

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Doktorská disertační práce

Barevné sloučeniny vznikající během zpracování
česnekovitých rostlin

Ing. Petra Kučerová

2013

Školitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu celého studia. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během mého studia. Nemalý dík patří také panu prof. RNDr. Janu Schramlovi, DrSc. za jeho obětavou pomoc při měření a následném vyhodnocování NMR experimentů, Ing. Ondřeji Lacinovi, Ph.D. za pomoc s MS experimenty a Ing. Petře Krejčové za její pomoc při testování antimikrobiální aktivity.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Jihočeské univerzity (GAJU 067/2010/Z, 067/2011/Z a 060/2012/Z).

SOUHRN

Tato práce je zaměřena na studium barevných sloučenin, které vznikají během zpracování česneku, cibule, póru a ostatních, v potravinářském průmyslu doposud méně využívaných česnekovitých rostlin, jako je cibule obří (*Allium giganteum* Regel) nebo česnek sicilský (*Allium siculum* Ucria Lindl). Zatímco při zpracování česneku dochází k tvorbě červených, zelených či modrých látek, v ostatních studovaných druzích se tvoří růžové až červené zbarvení. Tvorba barevných sloučenin ovšem významně snižuje senzoryckou kvalitu produktů z těchto zelenin a způsobuje jejich zpracovatelům nezanedbatelné ekonomické ztráty.

Vzhledem k mimořádné komplexnosti procesů vedoucích k tvorbě barevných látek v reálných vzorcích byla struktura těchto sloučenin a pravděpodobný mechanismus jejich vzniku studován pomocí modelových systémů, včetně využití celé řady izotopově substituovaných látek. Byl vypracován postup vedoucí k tvorbě těchto sloučenin, jejich izolaci, přečištění, rozdělení pomocí HPLC a následné identifikaci pomocí NMR a MS.

Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny jsou velmi pestrá směsí oligomerů *N*-substituovaných derivátů 3,4-dialkylpyrrolů, ve kterých jsou pyrrolová jádra propojena tří- nebo jednoduhlíkatým můstkem. V česneku bylo detekováno sedm hlavních barevných látek (λ_{max} 418–597 nm), v cibuli a póru bylo charakterizováno celkem 14 barevných sloučenin (λ_{max} 410–634 nm), přičemž většina těchto látek má stejný základní strukturní skelet, jenž se liší pouze strukturou postranních řetězců. V homogenátech česneku sicilského bylo charakterizováno celkem šest hlavních barevných látek (λ_{max} 430–580 nm), z nichž všechny vykazovaly značnou strukturní analogii s barevnými látkami nalezenými v cibuli a póru.

Na základě získaných dat byl navržen i pravděpodobný mechanismus vzniku těchto barevných sloučenin. Primárním prekurzorem barevných látek vznikajících v česneku, cibuli a póru je sirá aminokyselina isoalliin, zatímco v česneku sicilském to je její vyšší homolog homoisoalliin. Bylo zjištěno, že nezanedbatelnou úlohu při tvorbě barevných sloučenin však hraje také methiin. Po narušení pletiva dochází k enzymově katalyzovanému rozkladu těchto sirá aminokyselin na příslušné sulfenové kyseliny, jejichž kondenzací dochází k tvorbě nestabilních thiosulfínátů. Následnými

neenzymatickými reakcemi jejich rozkladných produktů s aminokyselinami pak vznikají barevné látky.

Zcela odlišným mechanismem ovšem vzniká červený pigment v cibuli obří. Bylo prokázáno, že prekurzorem těchto barevných látek je *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxid, který je po narušení pletiva rozštěpen alliinasou na 2-pyrrolsulfenovou kyselinu, která se posléze v několika krocích spontánně přeměňuje na červený 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol.

Vzhledem k chemické povaze procesů vedoucích k tvorbě studovaných barevných látek lze konstatovat, že jejich vzniku lze předcházet jen velmi obtížně, neboť prekurzory těchto sloučenin jsou aminokyseliny (isoalliin, alliin a methiin), které jsou zároveň klíčovými prekurzory látek, které se podílí na tvorbě typického a žádaného aroma česnekovitých rostlin.

KLÍČOVÁ SLOVA: růžovění cibule, zelenání česneku, Maillardova reakce, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium porrum*, *Allium giganteum*, *Allium sicutum*

SUMMARY

The thesis is focused on study of color compounds arising during processing of alliaceous plants such as garlic, leek, and onion. Discoloration of two less known *Allium* species, giant onion (*Allium giganteum* Regel) and Sicilian honey garlic (*Allium siculum* Ucria Lindl), was also examined. While red, green or blue compounds are formed during processing of garlic, pink to red compounds are formed in the other studied species. The formation of these compounds significantly lowers sensory quality of these vegetables which causes considerable economical losses.

Due to extreme complexity of the processes leading to formation of color compounds in real homogenates, the structure of the compounds and their formation pathways were studied by using of model systems including a wide range of isotopically-labeled compounds. A procedure was developed for isolation and purification of the color compounds, their separation by HPLC followed by identification using NMR and MS. It was found that these color compounds are a complex mixture of oligomers of *N*-substituted derivatives of 3,4-dialkylpyrroles in which are the pyrrole moieties connected with three- or one-carbon chains.

Seven main color compounds (λ_{max} 418–597 nm) were detected in garlic homogenates, while fourteen color compounds (λ_{max} 410–634 nm) arising in onion and leek homogenates were characterized. The vast majority of the compounds shared the identical base structure, which differed only in the structure of side chains. Six main color compounds (λ_{max} 430–580 nm) were characterized in a homogenate of Sicilian honey garlic, from which all of them showed considerable analogy of their structure with those found in onion and leek.

Based on the acquired information, a probable mechanism of formation of the pigments was proposed. While isoalliin was confirmed to be the primary precursor of color compounds arising in garlic, leek and onion, in Sicilian honey garlic homoisoalliin is the primary precursor. Methiin was showed to be another very important compound involved in the discoloration. After cell disruption, a catalytic cleavage of the sulfur amino acids (isoalliin, homoisoalliin, methiin, alliin) takes place to form the corresponding sulfenic acids, which in turn yield unstable thiosulfinates. The color compounds are then created by subsequent non-enzymatic reactions of degradation products of thiosulfinates with amino acids.

The red pigment of giant onion is formed in a completely different manner. *S*-(2-Pyrrolyl)cysteine *S*-oxide was shown to be the primary precursor of the color compounds. After cell disruption, it is cleaved by alliinase to form 2-pyrrolesulfenic acid, which turns spontaneously into the red 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrole in several steps.

Due to the chemical nature of processes leading to examined color compounds, it can be concluded that complete prevention of their formation is very difficult, because the precursors of the color compounds are amino acids, which also play an important role in generation of the typical and desired alliaceous aroma.

KEY WORDS: onion reddening, garlic greening, Maillard reaction, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium porrum*, *Allium giganteum*, *Allium sicutum*

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 PŮVOD ČESNEKOVITÝCH ROSTLIN	2
2.2 CHARAKTERISTIKA RODU <i>ALLIUM</i>	2
2.3 HOSPODÁŘSKÝ VÝZNAM ČESNEKOVITÝCH ROSTLIN	6
2.4 SÍRNÉ SLOUČENINY V ROSTLINÁCH RODU <i>ALLIUM</i>	9
2.4.1 Přehled sirných aminokyselin přítomných v česnekovitých rostlinách	9
2.4.2 Tvorba sensoricky aktivních sloučenin.....	10
2.4.3 Sekundární reakce thiosulfínátů a alkanthialsulfoxidů	13
2.5 RŮŽOVĚNÍ CIBULE	16
2.6 ZELENÁNÍ ČESNEKU.....	20
2.7 ČERVENÁNÍ PÓRU	24
2.8 BAREVNÉ ZMĚNY OSTATNÍCH ČESNEKOVITÝCH ROSTLIN	25
2.8.1 Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském	25
2.8.2 Tvorba barevných sloučenin v cibuli obří.....	25
2.9 TECHNOLOGICKÁ OPATŘENÍ ZAMEZUJÍCÍ VZNIKU NEŽÁDOUCÍHO ZBARVENÍ	27
3. CÍLE PRÁCE.....	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY.....	31
4.2 PŘÍSTROJE.....	33
4.3 GRADIENTY POUŽÍVANÉ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRÁFII	35
4.4 POSTUPY SPOJENÉ SE STUDIEM ČERVENÁNÍ CIBULE OBŘÍ.....	37

4.5 POSTUPY SPOJENÉ SE STUDIEM TVORBY BAREVNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU, CIBULI, PÓRU A ČESNEKU SICILSKÉM	41
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	50
5.1 TVORBA BAREVNÝCH LÁTEK V CIBULI OBŘÍ	50
5.1.1 Objasnění struktury některých sirných sloučenin přítomných v cibuli obří	50
5.1.2 Struktura barevných látek vznikajících po narušení pletiva v cibuli obří	56
5.1.3 Mechanismus tvorby barevných látek v cibuli obří	57
5.1.4 Antimikrobiální aktivita barevných látek tvořících se v cibuli obří	59
5.2 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V CIBULI A PÓRU	62
5.2.1 Relativní zastoupení <i>S</i> -alk(en)ylcysteinsulfoxidů v cibuli a v póru	62
5.2.2 Určení struktury barevných látek tvořících se v homogenátech cibule a póru	62
5.2.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v cibuli a póru	78
5.3 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU	84
5.3.1 Relativní zastoupení <i>S</i> -alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku	84
5.3.2 Určení struktury barevných látek tvořících se v homogenátech česneku	84
5.3.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku	90
5.4 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU SICILSKÉM	93
5.4.1 Relativní zastoupení <i>S</i> -alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku sicilském	93
5.4.2 Struktura barevných látek vznikajících v homogenátech česneku sicilského	93
5.4.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku sicilském	98
6. ZÁVĚR	103
6.1 TVORBA ČERVENÉ SLOUČENINY V CIBULI OBŘÍ	103
6.2 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V CIBULI A PÓRU	104
6.3 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU	105

6.4 TVORBA BAREVNÝCH SLOUČENIN V ČESNEKU SICILSKÉM	106
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	107
8. SEZNAM ZKRATEK	118
9. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	121
10. SEZNAM PŘÍLOH.....	122

1. ÚVOD

S česnekovitými rostlinami se můžeme setkat téměř po celém světě s výjimkou několika nehostinných oblastí. Nejen díky mnoha prospěšným účinkům na lidský organismus (antidiabetické, antimikrobiální, protiplísňové účinky, podpora imunitního systému apod.) se stále zvyšuje poptávka po této zelenině. Zejména česnek, pór a cibule jsou také nedílnou součástí potravinářského průmyslu. Díky svému typickému aroma a chuti se staly nepostradatelnou složkou různých kořenících směsí, přidávají se do salátů, dresinků, polévek, uzenin, slaných koláčů a jsou také velmi vhodným kořením k pečenému masu.

O stále rostoucí oblibě této zeleniny svědčí i zvyšující se zemědělská produkce, která narůstá téměř exponenciálně. Největším producentem česneku je Čína (v roce 2011 téměř 20 milionů tun) a největší produkci sušené cibule zaznamenává Indie (v roce 2011 téměř 16 milionů tun). Pro některé země tvoří produkce a export česnekovitých rostlin velmi významnou část jejich hrubého domácího produktu. Z důvodu snadnějšího transportu a skladování se většina produkce suší na prášek, granule či kolečka. Dále se také tato zelenina nakládá, vyrábějí se různé pasty, pyré, tinktury apod. Nejen během dehydratace, ale i během následného zpracování však často dochází k tvorbě barevných sloučenin. V česneku se tvoří modré až zelené látky, zatímco v cibuli a póru červené. Přítomnost těchto látek pak výrazně snižuje organoleptickou hodnotu zeleniny, která je následně konzumenty odmítána.

V technologické praxi zatím neexistuje žádný jednoduchý a ekonomicky nenáročný způsob, jak účinně zabránit vzniku tohoto nežádoucího zbarvení. K eliminaci tvorby těchto barevných látek je nutno provádět dehydrataci za vysokých teplot nebo surovinu okyselit popř. přidat cystein. Těmito technologickými zásahy však bohužel dochází ke ztrátám typické chuti a aroma, pro které je tato zelenina využívána. V případě přidavku cysteinu navíc vzniká nežádoucí sirný „přípach“. Nejenže jsou tak tyto technologické kroky často neefektivní, ale jsou také velmi náročné a nákladné, což producentům zvyšuje výrobní náklady.

Cílem této práce byla identifikace vznikajících barevných látek, popsání mechanismu jejich tvorby a na základě získaných informací také navržení efektivního způsobu zabránění jejich vzniku během zpracování česnekovitých rostlin (pokud vůbec nějaký existuje).

2. Literární přehled

2.1 Původ česnekovitých rostlin

Latinské rodové jméno česneku *Allium* bylo odvozeno od keltského slova „all“, což znamená pálivý. Česnek patrně pochází ze Střední Asie, kde vznikl z planého druhu *Allium longicuspis*. Odtud byl česnek převezen do Mezopotámie a z Etiopie do Egypta. První záznamy o používání česneku se objevily zhruba před čtyřmi tisíci lety.¹

Původ cibule není s jistotou znám. Zatímco někteří archeologové a botanici předpokládají, že pravlastí cibule je Střední Asie, kde vznikla z planého druhu *Allium oschaninii* (syn. *Allium cepa* var. *sylvestre*), jiní jsou přesvědčeni o tom, že cibule je původem z Íránu a západního Pákistánu.² Cibule byla populární již v dávnověku, je pěstována více než 4700 let a není známo, že by existovala jako planý druh.³ Pór pochází z Přední Asie a je pěstován více než 4000 let.³

2.2 Charakteristika rodu *Allium*

Rod *Allium* L. je velmi rozsáhlý, zahrnuje více než 1000 druhů, a patří tedy mezi nejpočetnější skupiny. Rostliny rodu *Allium* jsou rozšířeny od suchých subtropických zón až po severské oblasti. Většina druhů roste na otevřených, sušších slunečných místech s přiměřenou vlhkostí podnebí. Mezi zástupce toho rodu patří hojně využívaná cibule (*A. cepa*), pór (*A. porrum*) a česnek (*A. sativum*). Tyto druhy jsou velmi důležité pro výživu člověka na celém světě, mimo jiné díky jejich příznivým farmakologickým účinkům.^{4,5}

V nejnovějším taxonomickém členění jednoděložných rostlin (APG III) je rod *Allium* zařazen do čeledi amarylkovité (*Amarylidaceae*). V současné době je přijata tato botanická klasifikace:⁶

říše: rostliny (*Plantae*)

klad: krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiosperms*)

klad: jednoděložné (*Liliopsida, Monocots*)

řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

čeleď: amarylkovité (*Amarylidaceae*)

podčeleď: česnekovité (*Allioideae*)

rod: *Allium*

Zástupci rodu *Allium* jsou obvykle cibulovité trvalky, které mají společné některé rysy. Jejich podzemním zásobním orgánem jsou cibule, rhizomy nebo zduřelé kořeny. Cibule jsou rozděleny do několika typů: a) pravé cibule s jedním nebo dvěma velmi silnými listenci, b) nepravé cibule se silnými základními pouzdry a silnými listenci, c) suknicovité, blanité, vláknité nebo kožovité cibule. Oddenky jsou husté nebo protáhlé, zřídka šlahounovité, s velmi rozmanitými typy větvení. Dva a více listenů jsou obvykle sloučeny do zákrovů. Květenství je sloučené do okolíku nebo hlávky s různým počtem květů a různou hustotou květů.



Obrázek 1: *Allium sativum*¹

***Allium sativum* L.**

Allium sativum je česnek kuchyňský (též česnek setý) (**Obrázek 1**). Nejčastěji konzumovaná část česneku je cibule. Kromě „jednostroužkových“ druhů je cibule česneku rozdělena do několika jednotlivých stroužků. Stroužky česneku jsou používány na množení rostlin, konzumaci nebo k léčebným účelům. Tato část česneku má svou charakteristickou štiplavost, pikantní chuť, která se však vařením zjemní a zesládně.

***Allium cepa* L.**

Cibule kuchyňská (*Allium cepa*) je známá pouze jako kultivovaná rostlina, je však známo mnoho jejích barevných kultivarů. Nejčastěji se používá cibule žlutá, bílá nebo červená. Její drobné květy mají nejčastěji bílou nebo fialovou barvu. Stejně jako česnek se používá ke konzumaci nebo k léčebným účelům. Kromě charakteristické štiplavé chuti, která vařením zmizí, v cibuli vznikají během jejího zpracování slizotvorné látky.

¹ Zdroj obrázku: <http://www.waynesword.palomar.edu>

Allium porrum L.

Allium porrum (**Obrázek 2**), běžně nazývaný pór nebo pórek, byl vyšlechtěn z planého druhu *Allium ampeloprasum*, který pochází z jižní Evropy a jihozápadní Asie. Jedlá část póru je svazek listů, který je občas nazýván stonek nebo lodyha. Chuť póru není tak intenzivní, jako je chuť cibule, ale je velmi podobná. Tato chuť by se dala popsat jako směs cibule a okurky se svěží vůní podobné šalotce.



Obrázek 2: *Allium porrum*²

Allium giganteum Regel



Obrázek 3: Květenství *A. giganteum*³

Pro její výšku, která dosahuje až 180 cm, se tato rostlina nazývá cibule obří. Patří mezi nejvyšší zástupce rodu *Allium*. Cibule obří pochází ze Střední a Východní Asie a nejčastěji je pěstována jako okrasná květina. Její květenství bývá velmi pěknou součástí suchých kytic, neboť obsahuje více než 100 drobných květů a má tmavě fialovou barvu (**Obrázek 3**).

A. giganteum je taxonomicky řazeno do podrodu *Melanocrommyum* (Webb et Berthel.) Rouy a nevyznačuje se výrazným aroma jako například česnek nebo cibule. Tento druh je však známý svojí schopností tvořit velmi intenzivní červené zbarvení při narušení pletiva. Ačkoli biologická aktivita cibule obří nebyla doposud detailně studována, některé rostliny podrodu *Melanocrommyum* jsou využívány v lidovém léčitelství.⁷ Je tedy možné, že barevné sloučeniny, které vznikají v *A. giganteum*, mohou mít zajímavé biologické účinky.

² Zdroj obrázku: <http://www.theplantencyclopedia.org>

³ Zdroj obrázku: <http://www.flickr.com>

***Allium siculum* (syn. *Nectaroscordum siculum*)
(Ucria) Lindl**

Allium siculum (**Obrázek 4**) je známo pod lidovými názvy sicilská medová lilie nebo sicilský česnek. Jedná se o cibulovitou trvalku taxonomicky se řadící do podrodu *Nectaroscordum* (Lindl), která se nejvíce využívá jako okrasná květina. *A. siculum* se také používá jako koření v balkánských zemích, kde je tato rostlina známá jako „samardala”. Usušené listy se smíchají se solí a vzniklá směs se pak používá k dochucení pokrmů, především masných. Tato rostlina původně pochází z Francie a Itálie a má velmi podobnou chuť a aroma jako cibule kuchyňská (včetně intenzivních slzotvorných účinků).



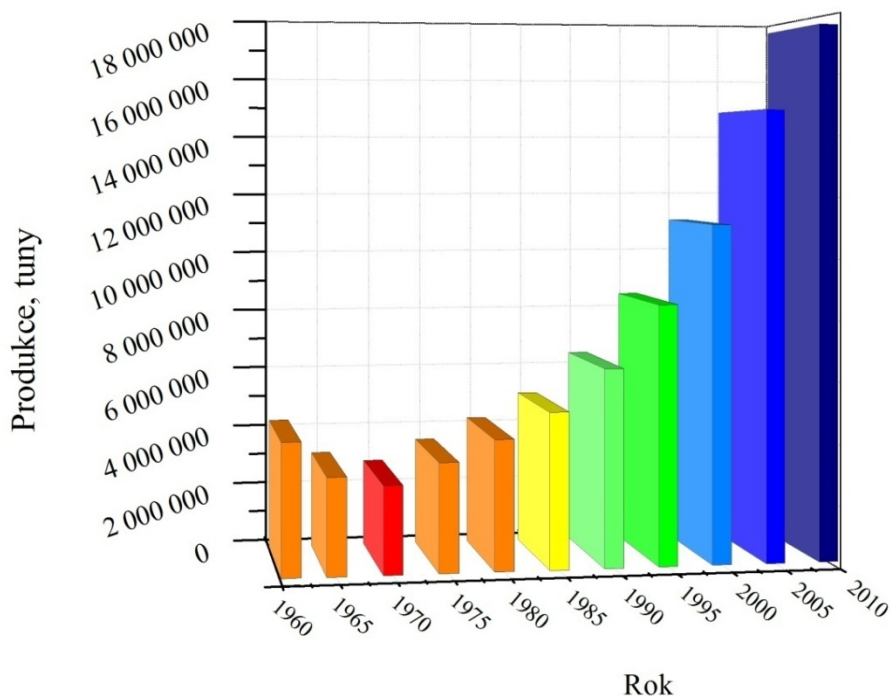
Obrázek 4: *Allium siculum*⁴

⁴ Zdroj obrázku: <http://www.biocyclopedia.com/>

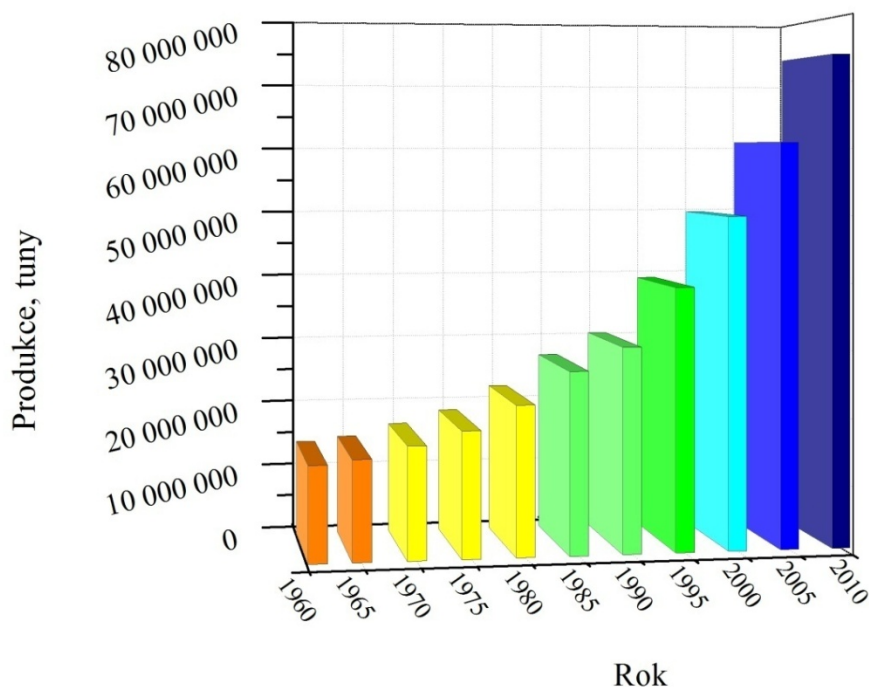
2.3 Hospodářský význam česnekovitých rostlin

V poslední době významně roste obliba česneku a cibule nejen díky jejich chuti a typickému aroma, ale také díky jejich prokázanému příznivému vlivu na lidské zdraví.^{8–17} Česnekovité rostliny se staly nedílnou součástí mnoha pokrmů po celém světě a v současné době jsou hojně využívány nejen potravinářským, ale i farmaceutickým průmyslem. Nejvíce se tato zelenina používá jako složka různých kořenících směsí, přidává se do polévek, omáček, gulášů, dresinků, salátů, koření se s ní uzené maso a mnohé další.

O stále rostoucí poptávce po česnekovitých rostlinách, ať už v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu, svědčí údaje FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), ukazující, že v roce 2010 činila celosvětová produkce česneku 17,6 milionů tun a produkce sušené cibule se v témže roce vyšplhala na 74,2 milionů tun. V obou případech to jen za posledních deset let představuje nárůst o více než 60 % (**Obrázek 5 a Obrázek 6**).



Obrázek 5: Světová produkce česneku¹⁸



Obrázek 6: Světová produkce sušené cibule¹⁸

Většina produkce se suší, a to zejména z důvodů snadnějšího skladování a přepravy. Nejčastěji se lze setkat s práškem, granulami či kroužky. Běžně se k sušení používají tunely s proměnnou teplotou sušení pro jednotlivá stádia, ale v roce 2006 byl navržen účinnější způsob dehydratace, a to katalytická dehydratace infračerveným zářením. Tato metoda by měla zvýšit účinnost dehydratace a snížit ekonomické nároky spojené s tímto procesem.¹⁹

Dále se česnek či cibule nakládají do nálevů, z homogenátů se vyrábí různé pasty apod. Během tohoto zpracování však často dochází ke vzniku barevných sloučenin (u cibule a póru růžových až sytě červených odstínů, u česneku tmavě zelených až zelenomodrých). Tyto sloučeniny ovšem nejsou stálé a relativně rychle se rozkládají za



Obrázek 7: Laba чеснок⁵

⁵ Zdroj obrázku: <http://test.zhaoxinpeng.com>

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

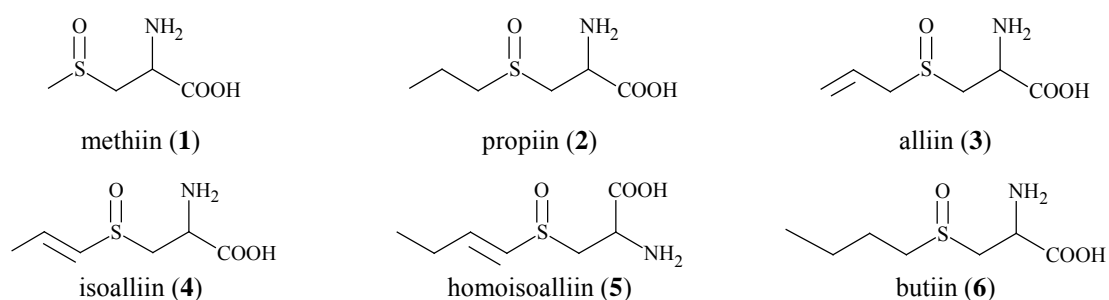
vzniku hnědých či hnědožlutých látek. Vznik tohoto zbarvení pak zákazníci pochopitelně odrazuje od konzumace.

Jediný případ, kdy je tvorba takového zbarvení žádoucí, je příprava tzv. „Laba“ česneku (**Obrázek 7**). „Laba“ znamená 8. prosinec v čínském lunárním kalendáři. „Laba“ česnek je tradiční domácí produkt, který se připravuje na podzim naložením česneku do octa a konzumuje se během zimy. Díky své unikátní chuti je takto upravený česnek velikou pochoutkou v severní Číně, kde ho jedí s knedlíky při oslavách čínského Nového roku.²⁰

2.4 Sirné sloučeniny v rostlinách rodu *Allium*

2.4.1 Přehled sirných aminokyselin přítomných v česnekovitých rostlinách

Česnek, cibule a další zástupci rodu *Allium* obsahují v sušině 1–3 % nebílkovinných sekundárních metabolitů odvozených od cysteinu. Doposud bylo v rostlinách rodu *Allium* nalezeno celkem 11 různých *S*-substituovaných derivátů cysteinu.²¹ Hlavními deriváty přítomnými v druzích zkoumaných v této práci jsou *S*-methyl-, *S*-propyl-, *S*-allyl-, (*E*)-*S*-(1-propenyl)-, (*E*)-*S*-(1-butenyl)- a *S*-butylcysteinsulfoxid (methiin, propiin, alliin, isoalliin, homoisoalliin a butiin, **1–6**) (Obrázek 8).^{22–27}



Obrázek 8: Hlavní sirné aminokyseliny vyskytující se v česneku, cibuli, póru a v česneku sicilském

Alliin (3) je hlavní sirnou aminokyselinou v česneku, zatímco v cibuli a póru je hlavním derivátem isoalliin (4). Ve všech těchto druzích je přítomen také methiin (1). Naopak přítomnost propiinu (2) v cibuli, póru nebo česneku je diskutabilní. Zatímco některé studie uvádějí jeho vysoký obsah, jiné jeho přítomnost zaznamenaly pouze ve stopovém množství nebo vůbec (Tabulka 1).^{23–27}

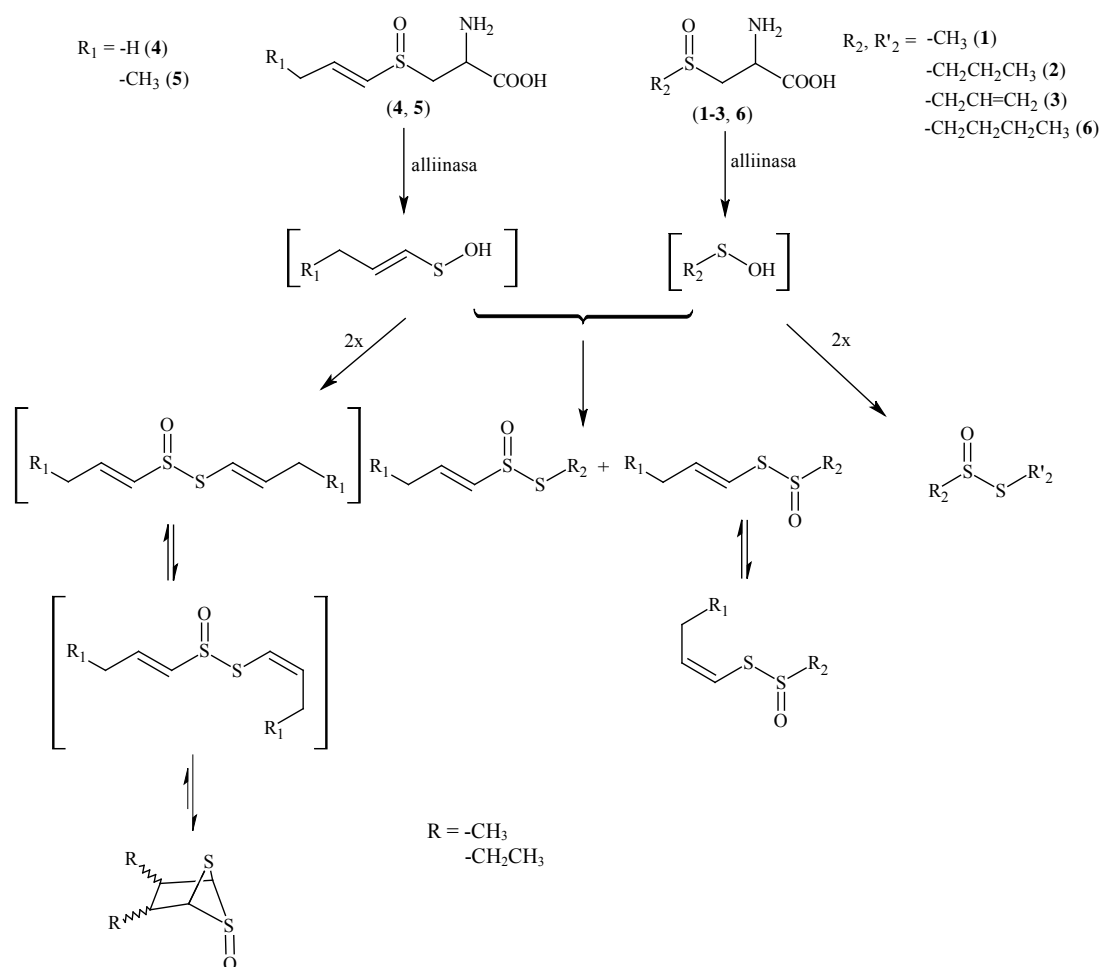
Hlavním *S*-alkenylcysteinsulfoxidem v česneku sicilském je vyšší homolog isoalliinu, a sice (*E*)-*S*-(1-butenyl)cysteinsulfoxid (homoisoalliin, 5). Dalšími deriváty přítomnými v této rostlině jsou butiin (6) a také methiin (1) (Tabulka 1).^{23–27}

Tabulka 1: Zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku, cibuli, česneku sicilském a v póru (rel. %)

	alliin	butiin	homoisoalliin	isoalliin	methiin	propiin	ref.
česnek	74–95	–	–	2–11	2–24	0–2	24–27
pór	–	–	–	8–92	8–27	0–62	24,25,27
cibule	5	–	–	49	34	6	22,28
sicilský česnek	–	5	65	–	32	–	22,29

2.4.2 Tvorba senzorycky aktivních sloučenin

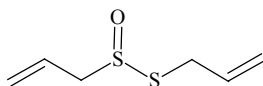
Typické aroma česnekovitých rostlin se utváří až při jejich zpracování (např. při krájení nebo drcení). Prekurzory těchto senzorycky aktivních sloučenin jsou výše popsané sírné aminokyseliny (**1–6**), které jsou rozkládány účinkem enzymu alliinasy. Alliinasa (EC 4.4.1.4) je obvykle situována uvnitř rostlinné buňky ve vakuole, zatímco *S*-substituované deriváty cysteinu (**1–6**) v cytoplazmě. Jakmile dojde k porušení rostlinného pletiva, alliinasa se uvolní a katalyzuje rozklad aminokyselin (**1–6**).²⁸ Nejprve dochází k vytvoření příslušných sulfenových kyselin, které však velmi rychle kondenzují za vzniku thiosulfinátů. Vedlejšími produkty této reakce jsou amoniak a pyrohroznová kyselina.



Obrázek 9: Schéma tvorby thiosulfinátů

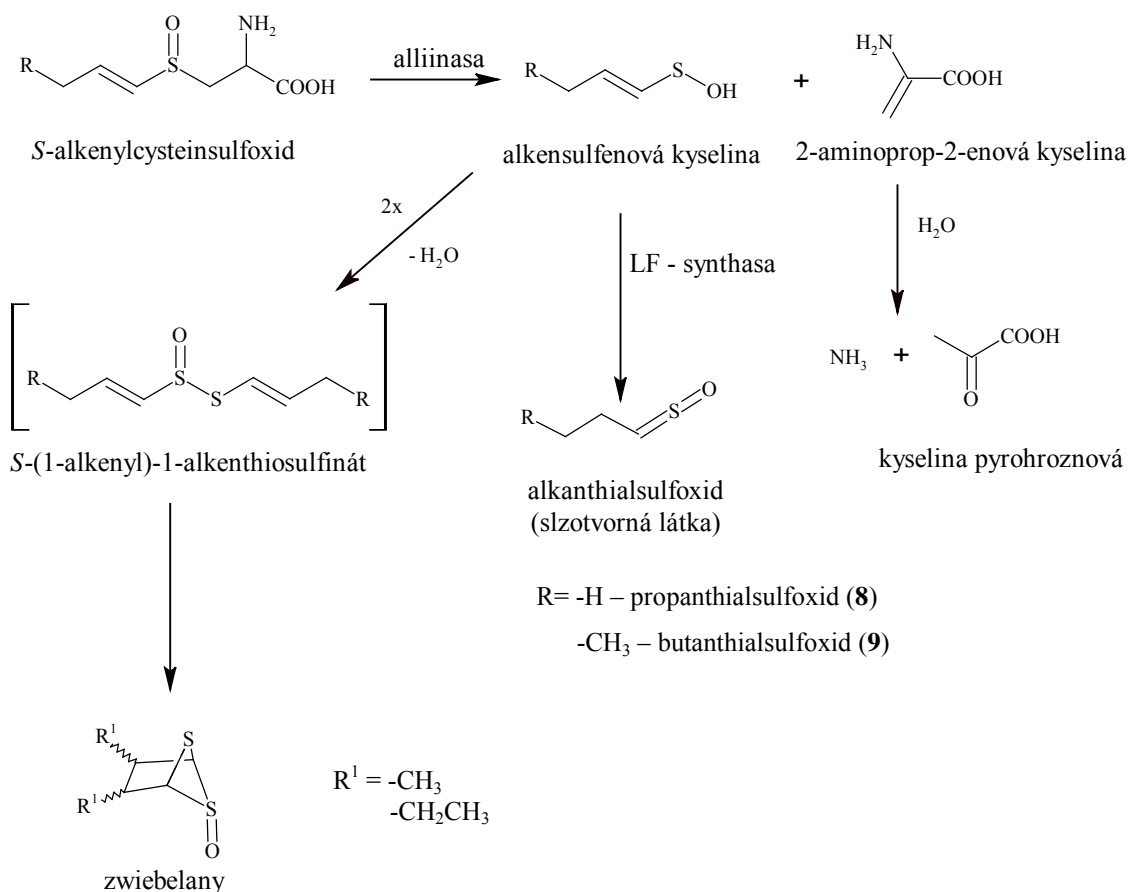
V jednotlivých druzích česnekovitých rostlin se vždy vyskytuje hned několik *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů (**Tabulka 1**) a při mechanickém poškození buňky dochází k enzymatickému rozkladu všech těchto derivátů. Tím také vzniká několik sulfenových kyselin, jejichž vzájemnou kondenzací vznikají asymetrické thiosulfináty (**Obrázek 9**).

V česneku vznikají sensoricky aktivní látky především katalytickým rozkladem alliinu (**3**), který je sám sensoricky neaktivní. Alliinasa velmi rychle přemění alliin na směs sloučenin charakteristických pro česnekové aroma a chuť. Hlavním produktem této reakce je *S*-allyl-2-propenthiosulfinát (allicin, **7**) (**Obrázek 10**). Tato sloučenina je velmi aromatická, nestabilní, snadno polymerizovatelná a má silné antibakteriální účinky.²³

allicin (**7**)*Obrázek 10: Struktura allicinu*

Podobný mechanismus rozkladu se objevuje i u sloučenin obsažených v cibuli, póru a česneku sicilském. Hlavním prekurzorem sensoricky aktivních látek cibule je (*E*)-*S*-(1-propenyl)cysteinsulfoxid (isoalliin, 1-PeCSO, **4**). Vzniklá 1-propensulfenová kyselina kondenzuje na příslušné thiosulfináty, které jsou velmi nestabilní a okamžitě se spontánně rozkládají na zwiebelany²³ a zároveň, působením dalšího enzymu, LF-synthasy, vzniká slzotvorný propanthialsulfoxid (**8**) (**Obrázek 11**).²⁹ Ačkoliv je isoalliin hlavní volnou sirnou aminokyselinou v cibuli, vyskytuje se i v česneku, kde zpravidla tvoří přibližně 10 % obsahu všech *S*-substituovaných derivátů cysteinu (viz **Tabulku 1**).^{22,30}

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED



Obrázek 11: Katalytický rozklad isoalliinu ($R = H$) v cibuli a póru nebo homoisoalliinu ($R = CH_3$) v česneku sicilském

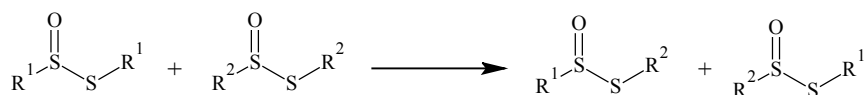
V případě *A. siculum* je hlavní volnou sirnou aminokyselinou (*E*)-*S*-(1-butenyl)-cysteinsulfoxid (homoisoalliin, 1-BeCSO, **5**), který je doprovázen methiinem (**1**) a butiinem (**6**) (**Tabulka 1**). Katalytický rozklad homoisoalliinu probíhá stejně jako rozklad isoalliinu v cibuli (**Obrázek 11**), kdy vznikající 1-butensulfenová kyselina kondenzuje v thiosulfináty a zároveň se za katalýzy LF-synthasou tvoří slzotvorná látka, butanthialsulfoxid (**9**).²²

2.4.3 Sekundární reakce thiosulfinátů a alkanthialsulfoxidů

Thiosulfináty jsou poměrně nestabilní sloučeniny, které při kulinárním zpracování mohou podléhat celé řadě sekundárních reakcí, ať už jde o jejich izomerizaci či záměnné nebo rozkladné reakce.

Záměnné reakce thiosulfinátů

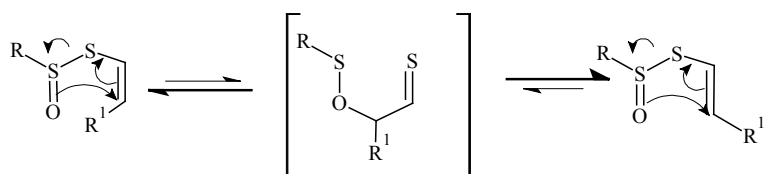
Pokud jsou smíchány dva různé thiosulfináty, nastane velmi rychle rovnováha, přičemž dojde k záměně sulfinylových a sulfenylových částí výchozích thiosulfinátů (**Obrázek 12**). Tento typ záměnné reakce se však nevyskytuje u disulfidů.³¹



Obrázek 12: Záměnné reakce thiosulfinátů

E,Z izomerizace mono- α,β -nenasycených thiosulfinátů

V homogenátech mnoha česnekovitých rostlin (např. cibule, póru či česneku) se hojně nachází také thiosulfináty obsahující 1-propenylovou skupinu v geometrické konfiguraci *Z*, ačkoliv jejich prekurzor, isoalliin (**4**), obsahuje tuto skupinu výlučně v konfiguraci *E*. Tvorba těchto *Z* izomerů je vysvětlována pomocí [2,3]-sigmatropního přesmyku (**Obrázek 13**). Meziproduct této konverze má poločas existence cca 1 hodinu při teplotě 25 °C. Této izomerizaci však nepodléhají příslušné disulfidy ani thiosulfináty, které mají kyslík navázaný na druhém atomu síry.³¹ K analogickému přesmyku pravděpodobně dochází i v případě thiosulfinátů obsahujících 1-butenylovou skupinu v česneku sicilském.²²



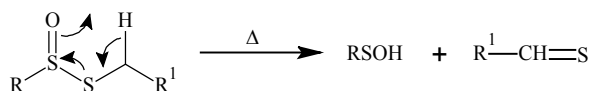
Cibule, pór a česnek: $R^1 = -CH_3$

A. sicutum: $R^1 = -CH_2CH_3$

Obrázek 13: Izomerizace thiosulfínátů obsahující 1-propenylovou (cibule, pór a česnek) nebo 1-butenylovou (*A. sicutum*) skupinu.

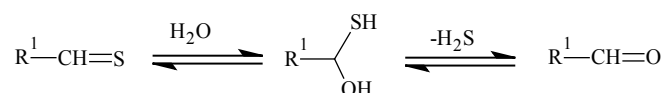
Rozklad thiosulfínátů a sulfinů

Vazba mezi atomy síry je v thiosulfínátech neobvykle slabá a vodík vázaný k uhlíku, na který je vázán atom síry, je kyselější, čímž dochází k eliminaci již za velmi mírných podmínek (**Obrázek 14**). Tímto rozkladem vznikají příslušné reaktivní thioaldehydy, a sice thioformaldehyd (v česneku, cibuli, póru a *A. sicutum*), thioakrolein (v česneku), propanthial (v cibuli a póru) a butanthial (v *A. sicutum*).



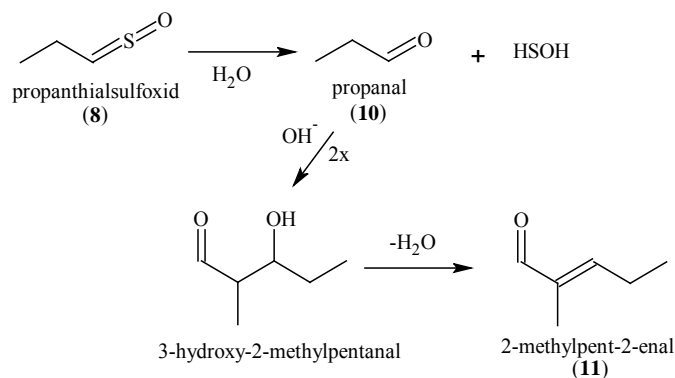
Obrázek 14: Rozklad thiosulfínátů na thioaldehydy

Ve vodném prostředí dochází k přeměně thioaldehydů, které vznikají rozkladem thiosulfínátů, na aldehydy. Adicí vody na thioaldehyd vzniká hemiacetal, ze kterého následným odštěpením sulfanu vzniká příslušný aldehyd. Jedná se o rovnovážnou reakci, kdy však díky velkému nadbytku vody převládá aldehydová forma (**Obrázek 15**).



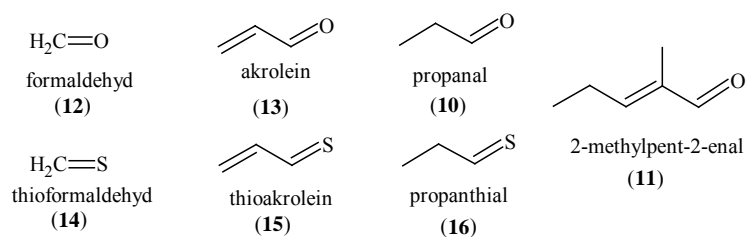
Obrázek 15: Přeměna thioaldehydů na aldehydy ve vodném prostředí

Také propanthialsulfoxid (**8**), slzotvorná sloučenina cibule, se samovolně rozkládá za vzniku propanalu (**10**). Aldolizací (a následnou aldolovou kondenzací) propanalu pak dochází ke vzniku 2-methylpent-2-enalu (**11**) (**Obrázek 16**). Přítomnost těchto dvou aldehydů v homogenizované cibuli byla prokázána několika studiemi.^{32–35}



Obrázek 16: Vznik 2-methylpent-2-enalu z propanthialsulfoxidu (**8**)

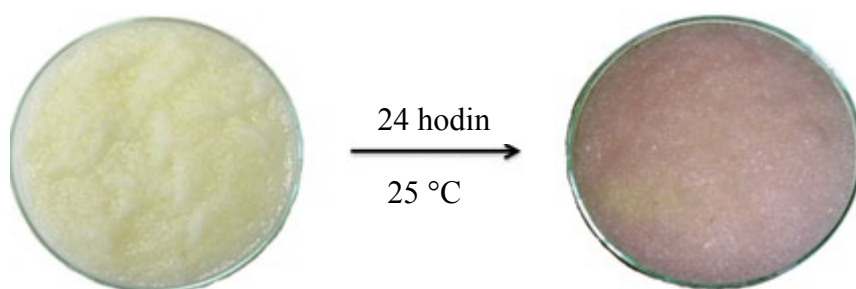
Obrázek 17 znázorňuje přehled nejvýznamnějších (thio)karbonylových sloučenin, které spontánně vznikají v cibuli, póru a česneku.



Obrázek 17: (Thio)aldehydy, které nejčastěji vznikají v česneku, póru a cibuli

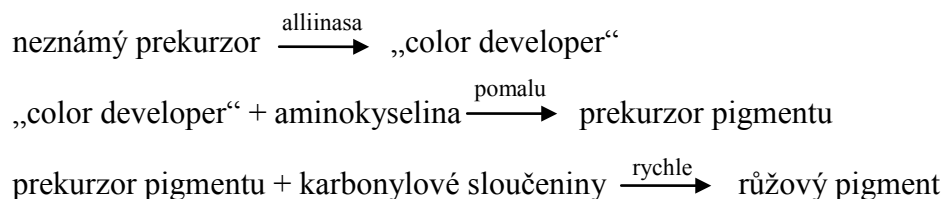
2.5 Růžovění cibule

Dříve mnoho lidí věřilo, že růžovění cibule je způsobeno růstem kontaminujících bakterií a plísní. Tato domněnka však byla později zcela vyvrácena, neboť nebyly zjištěny žádné stopy mikroorganismů v růžovém macerátu cibule.³⁶ Vznikající červený pigment (**Obrázek 18**), jehož absorpční maximum leží v blízkosti 520 nm, je rozpustný ve vodě a Joslyn a Peterson³⁷ předpokládali jeho anthokyaninový charakter. Zjistili, že pigment není ninhydrin-pozitivní a obsahuje terciární atomy dusíku, avšak žádný atom síry.



Obrázek 18: Růžovění homogenátu z cibule

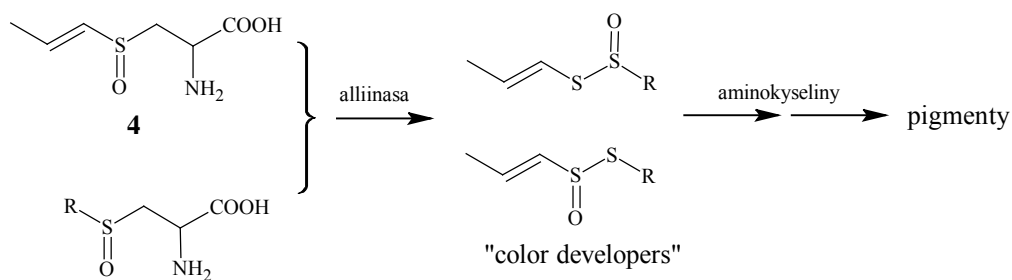
Dospěli k závěru, že v první fázi tvorby pigmentu dochází k enzymově katalyzovanému rozkladu neznámého substrátu. Tato fáze probíhá velmi rychle po narušení buněčné stěny. Enzymatickým rozkladem výchozího substrátu, který je teplotně stabilní a rozpustný ve vodě, vzniká bezbarvá sloučenina, tzv. „color developer“. Tento bezbarvý produkt je částečně rozpustný v diethyletheru a je možné ho tímto rozpouštědlem extrahovat z cibulového macerátu ještě před vlastní tvorbou barevných látek. Následná neenzymatická reakce „color developeru“ s aminokyselinami je velmi pomalá a pigmenty, které takto vzniknou, již nejsou rozpustné v diethyletheru, ale jsou rozpustné ve vodě a alkoholech.³⁶ Přídavek formaldehydu nebo jiných karbonylových sloučenin podporuje vznik červeného zbarvení.^{38,39}



Obrázek 19: První návrh mechanismu růžovění cibule podle Shannona a kol.^{40,41}

K velmi podobným závěrům o několik let později dospěli také Shannon a kol.⁴⁰ Byl navržen mechanismus, který sestává ze sledu třech reakcí (**Obrázek 19**). V prvním kroku dochází k velmi rychlému enzymatickému rozkladu neznámého prekursoru za vzniku bezbarvé, v diethyletheru rozpustné sloučeniny, kterou označili jako „color developer“. V dalším kroku pak vzniklý „color developer“ reaguje s aminokyselinou. Tato část reakce je oproti prvnímu kroku velmi pomalá a vede k tvorbě bezbarvé sloučeniny (tzv. „pigment precursor“), která není rozpustná v diethyletheru. Tento krok se zdá být velmi komplikovaný a zahrnuje reakci dvou molárních ekvivalentů aminokyseliny. Třetí krok zahrnuje reakci prekursoru pigmentu s karbonylovou sloučeninou, která se v cibuli přirozeně vyskytuje (např. formaldehyd), a vzniká růžový pigment.

Shannon a kol.⁴¹ předpokládali, že neznámý „color developer“ by mohl být *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinát (**17**), což je produkt enzymatického rozkladu isoalliinu (**4**). Naopak Bandyopadhyay a Tewari⁴² jako „color developer“ izolovali a identifikovali propanthialsulfoxid (**8**), což bylo ovšem později jednoznačně vyvráceno Kubcem a kol.⁴³ Tito autoři potvrdili, že neznámým „color developerem“ jsou naopak všechny thiosulfináty, které obsahují 1-propenyllovou skupinu. Isoalliin (**4**), ze kterého tyto aktivní thiosulfináty vznikají, je tedy naprosto klíčovým prekurzorem pro tvorbu pigmentů jak v cibuli a póru, tak i v česneku (**Obrázek 20**).



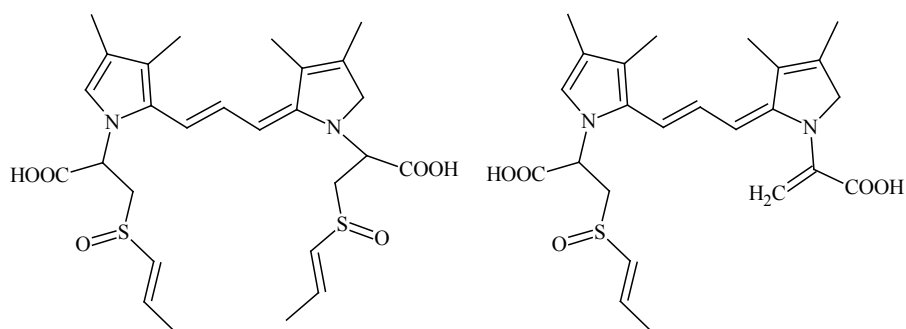
- R= -CH₃ (methiin, **1**)
 -CH₂CH₂CH₃ (propiin, **2**)
 -CH₂CH=CH₂ (alliin, **3**)

Obrázek 20: Mechanismus tvorby pigmentů v česnekovitých rostlinách navržen Kubcem a kol.⁴³

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

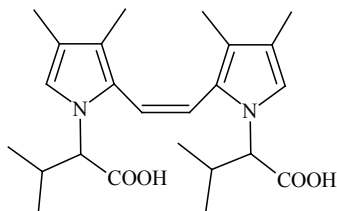
Kubec a Velíšek⁴⁴ studovali vliv pH a strukturní požadavky na sloučeniny, které vstupují do sledu reakcí při tvorbě pigmentů. Bylo zjištěno, že vliv pH na tvorbu barevných sloučenin z thiosulfínátů a aminokyselin je obrovský. Optimální hodnota pH pro tvorbu pigmentů je kolem 5,5. Dále bylo zjištěno, že aminokyselina musí obsahovat nesubstituovanou primární aminoskupinu a volnou karboxylovou skupinu, aby mohlo dojít ke vzniku zbarvení. Také byla testována schopnost různých izomerů a strukturních analogů thiosulfínátů tvořit barevné sloučeniny. Při reakci s glycinem došlo k tvorbě barevných látek jen ve směsích, které obsahovaly α,β -nenasycené thiosulfínáty s minimálně třemi uhlíky v uhlíkovém řetězci a zároveň β -uhlík nesl alespoň jeden atom vodíku. Naopak sulfoxidy, sulfidy a disulfidy po smíchání s glycinem žádné barevné látky nevytvořily.

Alternativní reakční mechanismus vzniku růžového zbarvení navrhli Dong a kol.⁴⁵ Tento mechanismus navazuje na předchozí poznatky,^{20,43,44,46} ovšem nevyžaduje přítomnost alliinasy a aminokyselin. Jako klíčová sloučenina byl opět identifikován isoalliin (**4**), ze kterého vznikly dvě červené látky pouze jeho rozpuštěním ve fosfátovém pufru při pH 5,0 bez jakéhokoli přídavku alliinasy či další aminokyseliny (k tvorbě významnějších množství těchto látek ovšem došlo až po více než 25 dnech při teplotě 40 °C). Struktury vzniklých sloučenin byly navrženy na základě HPLC-MS/MS analýzy (**Obrázek 21**).



Obrázek 21: Struktury sloučenin vzniklých pouze z isoalliinu navržené Dongem a kol.⁴⁵

Kato a kol.⁴⁷ připravili červený pigment reakcí isoallinu (**4**), alliinasy, valinu a formaldehydu. Vzniklá hlavní barevná sloučenina měla absorpční maximum 520 nm a její sumární vzorec byl $C_{24}H_{34}N_2O_4$. Její pravděpodobnou strukturu určili na základě HRMS/MS spekter (**Obrázek 22**).



Obrázek 22: Struktura červené sloučeniny navržená Katem a kol.⁴⁷

2.6 Zelenání česneku

Po poškození pletiva česnek často zmodrá popř. zezelená (**Obrázek 23**). Bylo zjištěno, že je k modráně výrazně náchylnější, když je skladován při nízkých teplotách.⁴⁸ Mnoho lidí se domnívalo, že zelená barva je způsobena přítomností chlorofylu případně měďnatých iontů, které se dostaly do česneku ze zálivky.



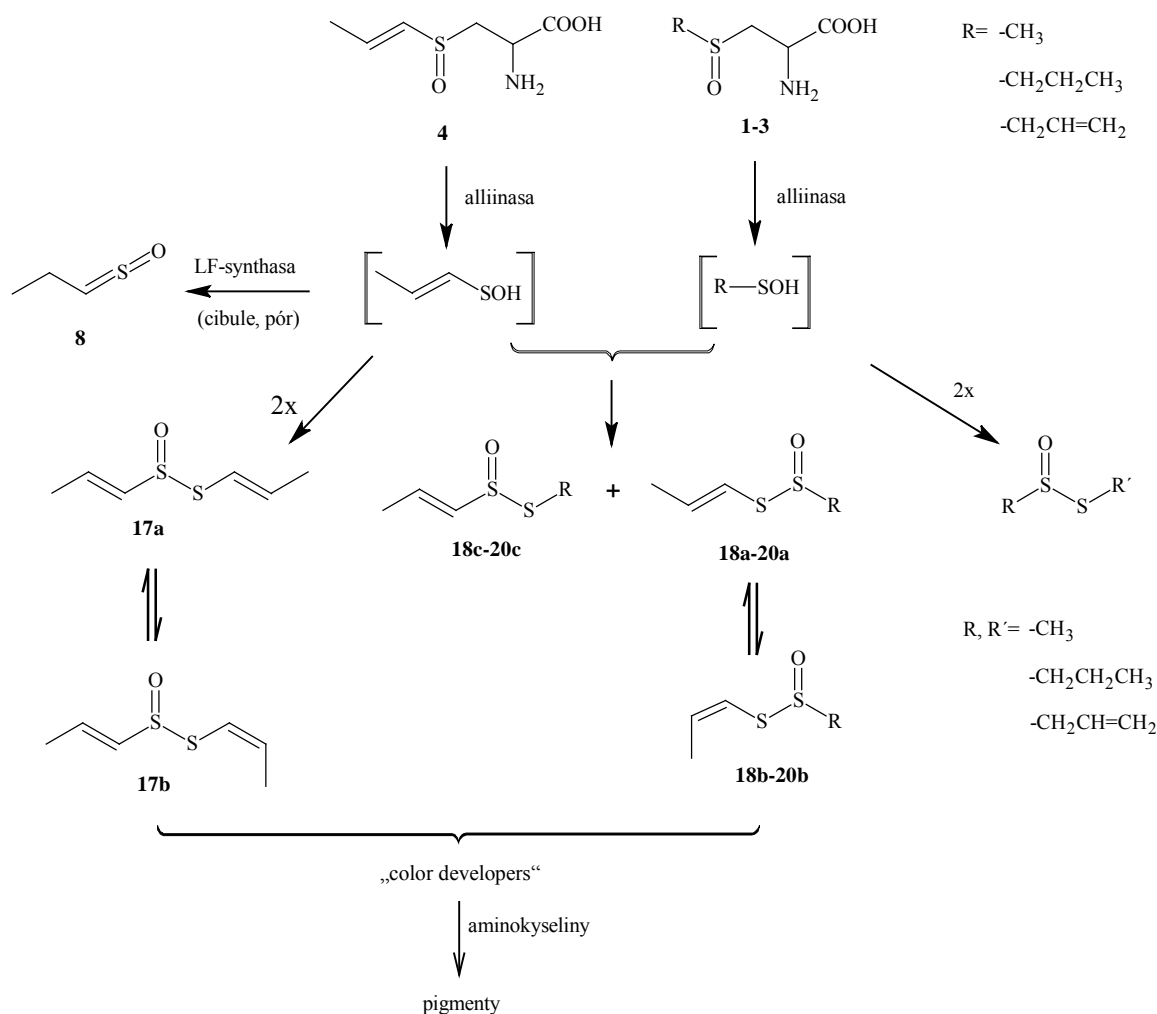
Obrázek 23: Zelenání česnekového homogenátu

Joslyn a Sano¹⁴ byli prvními vědci, kteří se zelenáním česneku zabývali. Bylo zjištěno, že pokud byly stroužky česneku pouze rozčtvrceny, žádné barevné látky nevníkaly. Jakmile však došlo k většímu porušení pletiva, např. rozdrcením, česnek zezelenal. Vzniklý zelený pigment byl rozpustný v acetonu a nerozpustný v hexanu či petroletheru. Dále bylo zjištěno, že se pigment nechová jako chlorofyl či jiná porfyrinová barviva. Vliv hodnoty pH na jeho tvorbu je velmi výrazný, stejně jako je tomu v případě cibule. Při $\text{pH} \geq 5$ macerát zezelená, kdežto při hodnotě $\text{pH} < 5$ macerát zmodrá. Také bylo zjištěno, že enzymy fenolasa a peroxidasa se tvorby těchto barevných látek neúčastní.¹⁴

Na základě experimentů s tvorbou růžového zbarvení v cibuli popsali Yamaguchi a kol.³⁹ tvorbu zeleného zbarvení v česneku, když smíchali homogenáty z cibule a česneku dohromady a nechali je inkubovat při 40 °C. Zjistili, že zelená barva homogenátu pochází z kombinace modrých a žlutých látek. Modrý pigment vykazoval absorpční maximum při 590 nm a žlutý pigment měl lokální absorpční maximum kolem 435 nm. Přídavek nenasycené karbonylové sloučeniny do homogenátu z cibule způsobil vznik modrého zbarvení. Protože česnek obsahuje velké množství alliinu (**3**), předpokládá se, že nenasycené karbonylové sloučeniny mohou vzniknout právě z něj. Také Lukes⁴⁸ ve své práci naznačil, že isoalliin (**4**) je zodpovědný za tvorbu zeleného zbarvení česneku.

Kim a Kim⁴⁹ pozorovali vliv hodnoty pH na zelenání česneku. Největší stupeň zelenání pozorovali po padesáti minutách při zahřívání na 50 °C a ideální hodnota pH pro tvorbu zeleného zbarvení byla 5,5. Další faktory ovlivňující zelenání česneku, jako je teplota skladování, přidavek soli, ošetření vysokým tlakem nebo blanšírováním, byly studovány několika vědeckými týmy.^{46,50–52}

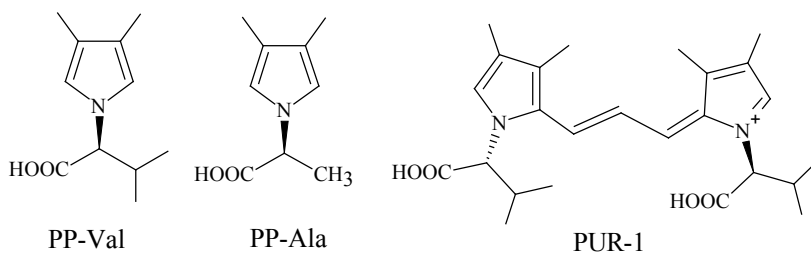
Kubec a kol.⁴³ potvrdili, že proces tvorby barevných látek v česneku je ve své podstatě velmi podobný procesu tvorby barevných látek v cibuli. Primárním prekurzorem je tedy opět *S*-(1-propenyl)cysteinsulfoxid (isoalliin, **4**) (**Obrázek 24**). Tito vědci také objevili, že zelenání česneku je vlastně specifickým typem Maillardovy reakce, neboť se jedná o reakce aminokyselin a (thio)karbonylových sloučenin.



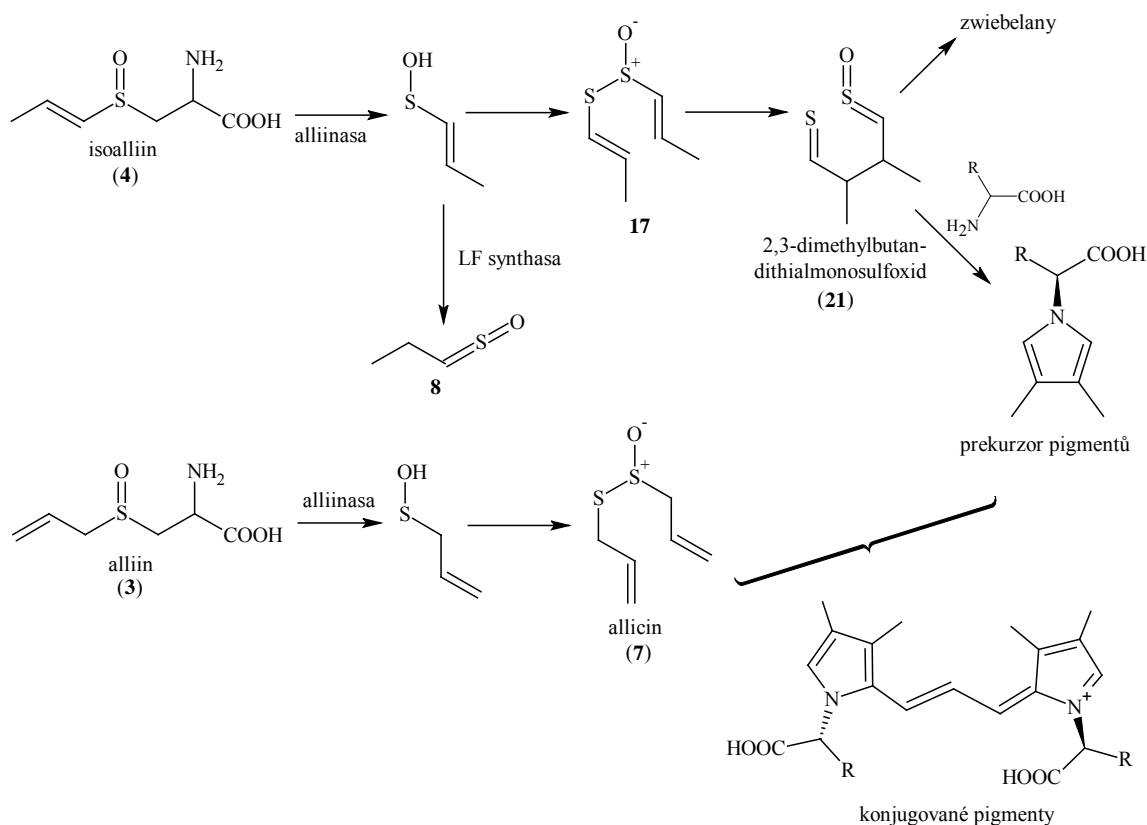
Obrázek 24: Reakční mechanismus tvorby pigmentů navržený Kubcem a kol.⁴³

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Imai a kol.⁵³ použili modelový reakční systém, jenž reprezentoval zelenání česneku. Podařilo se jim izolovat dva bezbarvé meziproducty (prekurzory pigmentů) (PP-Ala, PP-Val) a jednu fialovou látku (PUR-1, $\lambda_{max} = 570$ nm). Sloučeniny PP-Val a PP-Ala byly připraveny rozkladem isoalliinu (4) alliinasou a následným přidavkem aminokyseliny (valinu pro tvorbu PP-Val a alaninu pro tvorbu PP-Ala). Navržené struktury těchto meziproductů byly potvrzeny pomocí NMR a HRMS (**Obrázek 25**).



Obrázek 25: Navržené struktury dvou prekurzorů pigmentů a jedné fialové sloučeniny

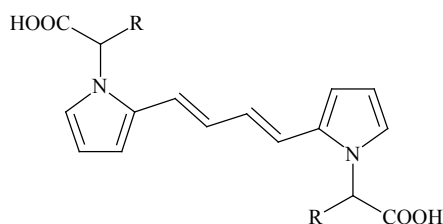


Obrázek 26: Reakční mechanismus tvorby pigmentů navržený Imaiem a kol.⁵³

Sloučenina PUR-1 byla připravena reakcí PP-Val s allicinem (**7**) a její struktura byla navržena na základě HRFAB-MS a NMR. Tato struktura je v souladu se závěry Joslyna,³⁷ který tvrdil, že pigmenty tvořené v česneku a cibuli obsahují dusík, ale neobsahují síru. Na základě tvrzení Blocka a kol.,²³ kteří uvedli, že *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfínát (**17**) se velmi rychle přeskupuje na stabilnější heterocyklické zwiebelany přes 2,3-dimethylbutandithialmonosulfoxid (**21**), navrhli Imai a kol.⁵³ reakční mechanismus vzniku sloučeniny PUR-1 (**Obrázek 26**).

Je zřejmé, že po narušení pletiva jsou isoalliin (**4**) a alliin (**3**) rozloženy alliinasou na příslušné sulfenové kyseliny, které dále kondenzují na thiosulfináty. Při zahřívání společně s aminokyselinami se z 2,3-dimethylbutandithialmonosulfoxidu (**21**) vytvoří bezbarvá 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina (prekurzor pigmentu). Po zahřátí vodného roztoku tohoto prekurzoru a allicinu se vytvoří barevná, dimerní sloučenina (např. PUR-1). Předpokládá se, že v delším časovém úseku mohou vznikat tri-, tetra- až oligopyrrolové sloučeniny, které díky vysokému stupni konjugace budou mít vyšší hodnoty λ_{max} (a tedy modrý až fialový odstín).

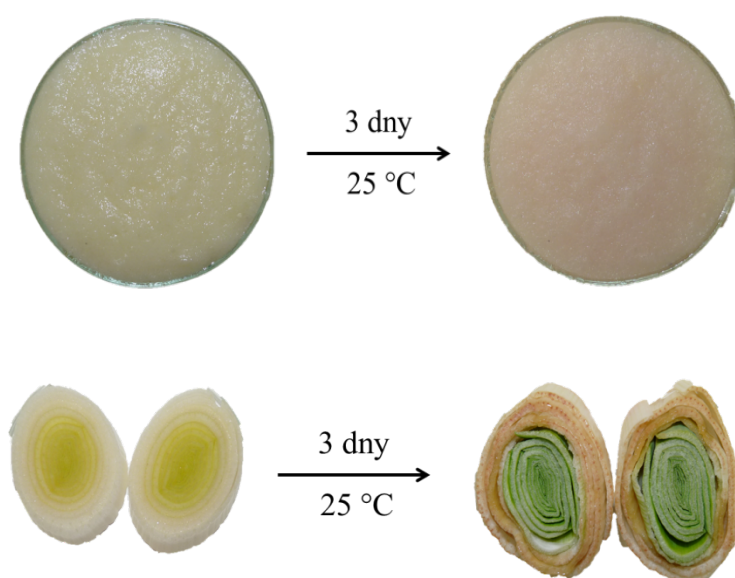
Také Wang a kol.^{54,55} potvrdili, že zelená barva tvořící se v homogenátu česneku je opravdu zapříčiněna směsí žlutých a modrých látek. Předpokládali, že žluté pigmenty jsou produkty reakce jejich modelových sloučenin s pyrohroznovou kyselinou a že také mohou vznikat rozkladem modrých sloučenin. Pravděpodobná struktura žluté sloučeniny vznikající v modelové směsi je zachycena na **Obrázku 27**.



Obrázek 27: Struktura žluté sloučeniny navržena Wangem a kol.⁵⁵

2.7 Červenání póru

Také nezelené části póru po homogenizaci podléhají při pokojové teplotě procesu zrůžovění (**Obrázek 28**). Prvními vědci, kteří se zabývali růžověním póru během jeho zpracování, byli Körner a Berk.⁵⁶ Předpokládali, že se jedná o stejný jev, jaký lze pozorovat u cibule, a který byl popsán Joslynem a Petersonem^{37,38} a Lukesem.³⁶ Dospěli k závěru, že první, enzymatický krok, je oxidace fenolických sloučenin přítomných v póru, která může být částečně inhibována přidavkem směsi cysteinu, thiomocoviny a askorbové kyseliny.⁵⁶



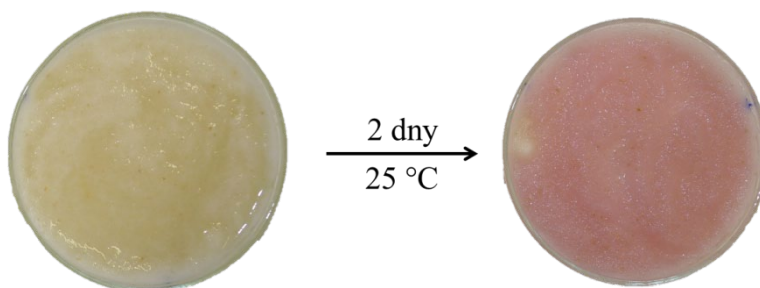
Obrázek 28: Růžovění homogenátu z póru (nahore) a růžovění póru na příčném řezu (dole)

Bylo zjištěno, že vlastnosti pigmentů a okolnosti jejich vzniku jsou shodné s barevnými látkami vznikajícími v cibuli (viz kapitolu 2.5).⁵⁷

2.8 Barevné změny ostatních česnekovitých rostlin

2.8.1 Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském

Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském (*A. siculum*) dosud nebyla ve vědecké literatuře popsána. Nicméně Kubec a Velíšek⁴⁴ dokázali, že thiosulfináty obsahující 1-butenylovou skupinu jsou při reakci s aminokyselinami také schopny tvořit růžové pigmenty. A právě prekurzor těchto thiosulfinátů, (*E*)-*S*-(1-butenyl)-cysteinsulfoxid (homoisoalliin, **5**), jakož i celá řada thiosulfinátů obsahujících 1-butenylovou skupinu byly v této rostlině nedávno objeveny.²² Proto byl tento méně známý zástupce rodu *Allium* také zařazen k rostlinám studovaným v této práci. A skutečně, při těchto experimentech bylo potvrzeno, že i homogenát česneku sicilského podléhá růžovění (**Obrázek 29**).



Obrázek 29: Růžovění homogenátu *A. siculum*

2.8.2 Tvorba barevných sloučenin v cibuli obří

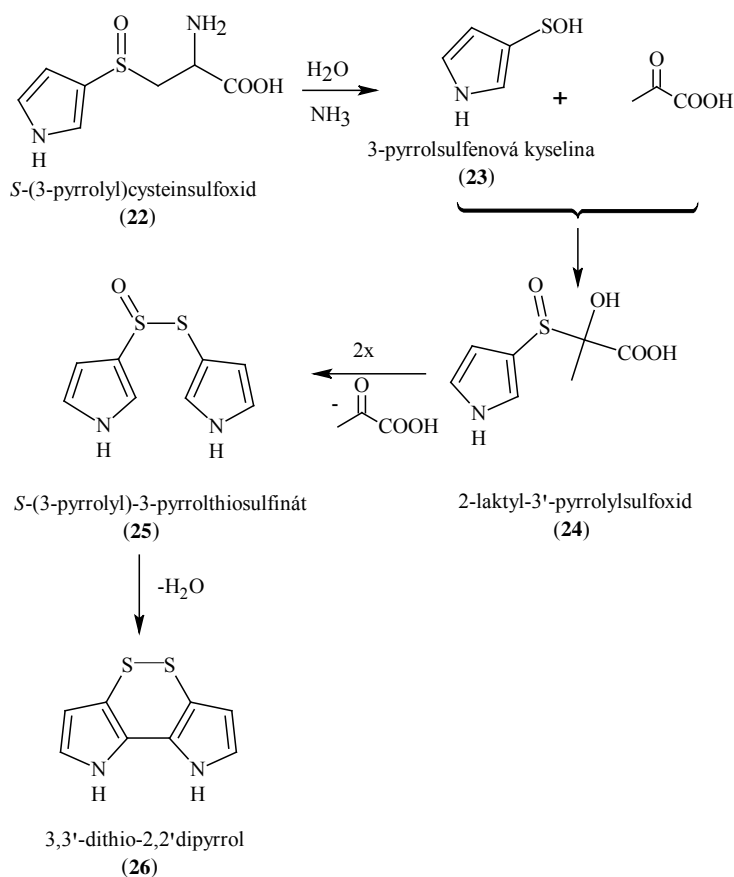
Jedelská a kol.⁵⁸ se zabývali barevnými změnami po narušení pletiva v cibulích rostliny *Allium giganteum*, které zčervenají mnohem rychleji (během 5–20 min) a mnohem intenzivněji, než je tomu u cibule či póru (**Obrázek 30**).



Obrázek 30: Tvorba červeného barviva v *A. giganteum* v závislosti na čase

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Dospěli k závěru, že prekurzorem červeného zbarvení je heterocyklický analog isoalliinu, a sice *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (**22**). Podařilo se jim také izolovat sytě červenou sloučeninu ($\lambda_{max} = 519$ nm), která vzniká po narušení pletiva cibule obří, a identifikovali ji jako 3,3'-dithio-2,2'-dipyrrol (**26**). Tato barevná sloučenina je velice nestabilní a snadno polymerizovatelná, což dokazuje i fakt, že během NMR měření ztmavla a později i zčernala. Byl navržen reakční mechanismus vzniku tohoto zbarvení (**Obrázek 31**). Prekurzor (**22**) je alliinasou rozložen na 3-pyrrolylsulfenovou kyselinu (**23**), která kondenzuje s kyselinou pyrohroznovou za vzniku semithioketalu (**24**). Ten následně kondenzuje v thiosulfínát obsahující dvě pyrrolová jádra (**25**). Spontánní dehydratací tohoto thiosulfínátu pak vzniká intenzivně červený dithiodipyrrol (**26**).



Obrázek 31: Mechanismus vzniku červené sloučeniny v cibuli obří navržený Jedelskou a kol.⁵⁸

2.9 Technologická opatření zamezující vzniku nežádoucího zbarvení

Jak již bylo uvedeno výše, barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin a jejich rozkladné produkty výrazně snižují organoleptickou hodnotu těchto zelenin. Byla proto navržena celá řada technologických opatření či postupů, jak zabránit nebo alespoň omezit vznik tohoto nežádoucího zbarvení.

Zpracování česneku

Bylo zjištěno, že významný vliv na zelenání česneku mají také skladovací podmínky. Lukes⁴⁸ ve své práci uvádí, že česnek je náchylnější k zelenání, když je skladován při nižších teplotách (3 °C a 12 °C). U česneku skladovaného při vyšších teplotách (23 °C a 28 °C) však k žádným znatelným barevným změnám nedochází. Toto pozorování lze vysvětlit tím, že při skladování za nízkých teplot dochází v česneku k nárůstu obsahu klíčového prekurzoru, isoalliinu (**4**), který se při těchto teplotách uvolňuje ze svého prekurzoru, γ -glutamyl-S-(1-propenyl)cysteinu.^{59–63} Jako optimální navrhuji Yamazaki a kol.⁶⁴ skladování česneku dva týdny při 40 °C, které následuje po dvanácti týdnech skladování při 3 °C. Takový postup úspěšně snížil zelenání natolik, že si homogenát uchoval obchodní kvalitu.

Jedním z komerčních způsobů přípravy česnekového homogenátu byla metoda zahrnující též přídavek soli nebo octa, nicméně takto vytvořený produkt ztratil chuť a vůni čerstvě rozmačkaného česneku, které jsou konzumenty vyžadovány.¹⁴ Sensoricky vyhovující česneková pasta byla později vyráběna rozdrčením celých, neoloupaných stroužků a následnou separací slupek pomocí rozmělnovače. Výsledný homogenát byl zahříván a ještě jednou rozmělněn. K vzniklé kaši byla přidána sůl (až 10 %). Během tohoto procesu však byla pozorována tvorba zeleného zbarvení, pokud byl zahřátý homogenát skladován při pokojové teplotě.¹⁴ Problém se vznikem nežádoucího zbarvení česnekové pasty by mohl být vyřešen rozdrčením stroužků ve zmrzlém stavu, následovaném ošetřením celulórou a sprejovým sušením.⁶⁵

Sušení stroužků česneku při 40 °C po dobu 30 minut, jejich následné spaření ve vodní lázni při 90 °C po 45 minut, rozemletí, přídavek 10 % soli, úprava pH pomocí 30% kyseliny citronové a závěrečná pasterizace poskytuje pastu, jejíž intenzita zeleného zbarvení klesá během skladování.⁶⁶ Aguilar a Rincón⁶⁷ navrhli přídavek cysteinu jako

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

vhodnou úpravu, která zamezuje vzniku zbarvení. Cystein inhibuje proces zelenání ve fázi tvorby thiosulfínátů již při 1% koncentraci cysteinu.

V poslední době se nejčastěji využívá sušení česneku dehydratací. Takto upravený česnek je méně náročný na skladovací prostory, má nižší hmotnost a delší údržnost. Tato metoda zpracování nevyžaduje žádné předcházející úpravy, ať už chemické nebo mechanické. Česnek může být sušen na slunném místě nebo pomocí speciálních sušících přístrojů. Vzniklý produkt (z čerstvě sklizených palic) má zpravidla krémový odstín a nejsou na něm patrné žádné známky zelenání, pokud je doba sušení 24 hodin.⁶⁸

Nedávno Lee a kol.⁶⁹ navrhli novou metodu, která zabraňuje zelenání česneku. Pokud je k česnekové pastě přidán lyofilizovaný prášek z cibule, který obsahuje aktivní cibulové enzymy (alliinasu a LF-synthasu), nedochází ke změně česnekového aroma a zároveň se nemění barva výsledného produktu.

Zpracování cibule a póru

V případě ošetření cibule a póru není možné použít blanšírování, případně úpravu pomocí kyseliny citronové, protože tento postup by denaturoval nestabilní alliinasu a LF-synthasu, které jsou zodpovědné za katalýzu reakcí, kterými vznikají žádoucí senzoricky aktivní látky. Zamezení vzniku růžového zbarvení lze dosáhnout velmi opatrným loupáním před procesem dehydratace.⁷⁰ Problém s červenáním póru by mohl být také vyřešen obrátným a rychlým zpracováním a ošetřením roztokem hydrogensířičitanu sodného.⁵⁶

Při zpracování homogenátů cibule a póru se také osvědčil přídavek kyseliny askorbové, která společně s kyselinou citronovou zamezí jejich růžovění.⁵⁶ Naopak Li a kol.⁷¹ zaregistrovali patent na použití cysteinu k prevenci růžovění cibulových homogenátů. Ačkoliv přídavek cysteinu úspěšně redukuje tvorbu pigmentů, zároveň nežádoucím způsobem modifikuje aroma takto ošetřených macerátů i při velmi nízkých koncentracích. Andonian a Dickinson⁷⁰ také zaregistrovali patent, který je založen na přidavku báze (neuvekli jaké) před dehydratací cibule nebo v její počáteční fázi.

Další způsob úpravy před samotnou dehydratací je mytí cibule ve vodě, která obsahuje 10 ppm chloru. Během následné dehydratace je voda odstraněna parním sušením při určité teplotě.⁷²

Všechny tyto metody jsou však poměrně nákladné a navíc během těchto technologických kroků může docházet k nežádoucím změnám nutriční kvality. Například dehydratovaný pórek obsahuje výrazně nižší podíl fenolických látek a askorbové kyseliny, takže jeho antioxidační aktivita klesla o více jak 50 %.⁷³ Také samotné způsoby úprav před procesem dehydratace (např. přidavek cysteinu) jsou diskutabilní i z toxikologického hlediska.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo získat detailní informace o chemické struktuře barevných látek, které vznikají v některých česnekovitých rostlinách při jejich zpracování. Na základě struktury těchto látek pak navrhnout pravděpodobný mechanismus jejich vzniku. Získané informace by mohly pomoci v předcházení vzniku těchto barevných sloučenin během technologického zpracování (sušení, nakládání, homogenizace, atd.).

Práce byla zaměřena na následující body:

- Izolaci a identifikaci prekurzoru pigmentu v cibuli obří (*A. giganteum*), určení struktury vzniklého červeného pigmentu a mechanismu jeho tvorby.
- Identifikaci pigmentů, které se vytvářejí během zpracování česneku, cibule, póru a česneku sicilského (*A. siculum*).
- Detailní studium mechanismu tvorby barevných látek v česneku, cibuli, póru a *A. siculum*.
- Na základě získaných informací navrhnout opatření, která by mohla zamezit vzniku barevných látek během technologického zpracování česnekovitých rostlin.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie

Amoniak (25–29 %), chlorid amonný (p.a.), *n*-butylalkohol (p.a.), diethylether (p.a.), glycerol (p.a.), kyselina chlorovodíková (35 %), thiokyanát draselný (p.a.), hydrogenuhličitan sodný (p.a.) a pentahydrát thiosíranu sodného (p.a.) byly zakoupeny od firmy Penta (Praha, Česká republika).

Kyselina octová (99,8 %), síran amonný (99 %), dichlormethan (p.a.), methanol (99,97 %), síran hořečnatý (bezvodý), pentan (čistý) a síra (p.a.) byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika).

EDTA (p.a.), jod (p.a.), dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.), hydroxid draselný (p.a.), octan sodný (p.a.), siřičitan sodný (čistý) a dekahydrát tetraboritanu sodného (p.a.) byly zakoupeny od firmy Lachema (Brno, Česká republika).

Amberlite IR-120 (H⁺ forma, 16–45 mesh), dichlorethan (≥ 99 %), dimethylsulfoxid ($\geq 99\%$), propylbromid (≥ 98 %) a tri-*n*-butylamin (≥ 98 %) byly zakoupeny od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko).

Allylbromid (99 %), allyl(methyl)sulfid (98 %), 4-(dimethylamino)benzaldehyd (99 %), Dowex 2X8-200, glycin (98 %), (D₃)jodmethan (99,5 % atomů D), (¹³C)jodmethan (99 % atomů ¹³C), hořčík (99,98 %), (*E*)-pent-2-enová kyselina (98 %) a 1-propenylbromid (98 %) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Acetonitril (HPLC grade) a methanol (HPLC grade) byly zakoupeny od firmy J. T. Baker (Griesheim, Německo).

β -Alanin (99+ %), *m*-CPBA (70–75 %), cystein (99+ %), dansylchlorid (98 %), *N,N*-dimethylformamid (99,8 %, extra suchý), Dowex 50WX4 (200–400 mesh), methylthiokyanát (99 %), kyanid draselný (97 %), lithium (99+ %), lithiualuminium-deuterid (98 % atomů D), propargylbromid (80 %), *tert*-butoxid draselný (98+ %), tetrahydrofuran (extra suchý) a α -toluensulfonylfluorid (99 %) byly zakoupeny od firmy Acros Organics (Geel, Belgie).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

D,L-(3-D₃)Alanin (99 % atomů D), D,L-(¹⁵N)alanin (99 % atomů ¹⁵N), D,L-(2-D)alanin (98 % atomů D) a D,L-(1-¹³C)alanin (99 % atomů ¹³C) byly zakoupeny od firmy Isotec (St. Louis, MO, USA).

Činidla

Ehrlichovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 2 g 4-(dimethylamino)benzaldehydu ve 100 ml 9% HCl. Roztok ninhydrinu byl připraven rozpuštěním 100 mg ninhydrinu v 50 ml acetonu. Činidlo na derivatizaci aminokyselin bylo připraveno rozpuštěním 27 mg dansylchloridu v 10 ml acetonitrilu.

Ostatní materiály

C18-SPE a C8-SPE kolonky (3 ml, 500 mg) byly opatřeny od firmy Supelco (Bellefonte, PE, USA). Dialyzační membrána (23 mm, 12 kDa) byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Membránové PTFE filtry (0,45 μm, 17 mm) byly zakoupeny od firmy Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Rostlinný materiál

Cibule *A. giganteum* a *A. siculum* byly zakoupeny od firmy Eurobulb (Zwanenburg, Nizozemsko) v září 2008 (*A. giganteum*) a v září 2011 (*A. siculum*). Cibule, česnek a pór byly zakoupeny v místním obchodě, kam byly dovezeny ze Španělska nebo Číny.

Materiály používané k přípravě kultivačních médií

Agar ST, živný agar č. 2 a kvasniční autolyzát byly zakoupeny od firmy Imuna Pharm, a.s. (Šarišské Michľany, Slovensko). Trypton byl opatřen od firmy Scharlau (Barcelona, Španělsko), sójový pepton byl zakoupen od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko), glukosa byla zakoupena od firmy Lachema (Brno, Česká republika) a bramborovo-dextrosový agar byl zakoupen od firmy Himedia (Mumbai, Indie).

4.2 Přístroje

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian INOVA 500 MHz a na spektrometru Varian Mercury 300 MHz (Varian, Palo Alto, CA, USA). Chemické posuny měřené v D_2O byly vztaženy k signálu natrium-4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonové kyseliny (DSS), ^1H posuny látek měřených v CDCl_3 byly vztaženy k signálu hexamethyldisilanu (HMDSS) (δ 0,04) a ^{13}C posuny k signálu rozpouštědla (δ 76,99).

Při měření LC-NMR dat byl použit Varian ProStar 230 HPLC systém (Varian, Palo Alto, CA, USA). Na detekci látek byl použit PDA detektor, na který byl připojen spektrometr Varian INOVA 500 MHz. ^1H LC-NMR data byla zaznamenána pomocí H/C/N kryosondy (60 μl aktivní objem) v módu stop-flow, který zahrnoval WET potlačení signálu rozpouštědla. Sběr dat probíhal během dvou sekund a zahrnoval spektrální šířku 10 kHz, následující po 90° RF pulsu (3,4 μs), zpoždění relaxace bylo nastaveno na 1 s.

IČ spektra byla pořízena přístrojem Nicolet FTIR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a CD spektra byla měřena na Jasco J-715 spektrometru (Jasco, Tokyo, Japonsko). Hodnoty specifické optické otáčivosti byly získány použitím polarimetru Autopol IV (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA). Nekorigované body tání byly stanoveny na bodotávku Stuart SMP 10.

HPLC separace byly prováděny na přístroji Dynamax SD-210 (Varian, Palo Alto, CA, USA), s použitím detektoru Varian PDA 335 a C-18 nebo C-8 kolon (RaininMicrosorb-MV 100 Å, 250 \times 4,6 mm, 5 μm). Případně byly použity preparativní kolony C-8 nebo C-18 (Rainin Dynamax-100 Å, 250 \times 21,4 mm, 8 μm).

GC analýzy byly prováděny na chromatografu Varian 3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA), opatřeným MS detektorem Varian 4000. Vzorky (1 μl) byly vstříkovány s použitím děliče toku 1:10 na HP-5MS křemennou kapilární kolonu (30 m \times 0,25 mm i.d.; tloušťka filmu 0,25 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Provozní podmínky byly následující: teplota nástřiku 180 $^\circ\text{C}$, teplota detektoru 250 $^\circ\text{C}$, nosný plyn helium o průtoku 1,3 ml/min; lineární teplotní gradient od 130 $^\circ\text{C}$ (první 3 min stálý) do 220 $^\circ\text{C}$, krok 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

ESI HRMS data byla získána pomocí hmotnostního spektrometru LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) při rozlišení $R = 50\,000$ (fwhm), provozním napětí 3,5 kV a teplotě iontového zdroje 200 °C.

UHPLC-HRMS data byla získána pomocí UltiMate 3000 RS UHPLC chromatografu (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA), který byl opatřen kolonou Acquity UHPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm, Waters; Milford, MA, USA) vyhřívané na 45 °C. Vzorky byly uchovány v autosampleru při 4 °C, objem nástřiku byl 5 μl. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena pomocí detektoru AB SCIEX TripleTOF 5600 (AB SCIEX, Toronto, ON, Kanada), který byl opatřen iontovým zdrojem (teplota 600 °C) DuoSpray. Napětí na jehle bylo pro ESI(+) +5 kV a pro ESI(-) -4,5 kV.

DART-MS systém sestával z iontového zdroje DART (DART-SVP, IonSense, Saugus, MA, USA) spojeného s hmotnostním spektrometrem Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vzdálenost mezi výstupem ze zdroje DART a keramickou trubicí byla nastavena na 10 mm, mezera mezi keramickou trubicí a přívodem do ohřáté kapiláry spektrometru Exactive byla 2 mm. Vzorky byly vpraveny manuálně pomocí Dip-It skleněných kapilár (IonSense, Saugus, MA, USA), desorpční čas byl 5 s. Přístroj byl nastaven jak na pozitivní, tak na negativní ionizaci s následujícími parametry: průtok helia 2,5 l/min; teplota vzduchu 350 °C; napětí na vylučovací jehle 5000 V; na mřížkované elektrodě 350 V; napětí na kapiláře 50 V; napětí na čočce trubice 120 V; teplota kapiláry 250 °C. Rozlišovací schopnost přístroje pro m/z 200 byla $R = 50\,000$ (fwhm).

Použitý software

Pro vyhodnocování HRMS/MS spekter byl použit program PeakView, verze 1.1.1.2 od firmy AB SCIEX (Framingham, MA, USA).

4.3 Gradienty používané v kapalinové chromatografii

- METODA A

průtok 18 ml/min	čas (min)	50mM KH ₂ PO ₄ , pH 5,5 (%)	acetonitril (%)
	0	100	0
	4	97	3
	6	40	60
	12	40	60
	15	97	3

- METODA B

průtok 18 ml/min	čas (min)	H ₂ O (%)	acetonitril (%)
	0	60	40
	8	56	44
	15	5	95
	20	5	95
	25	60	40

- METODA C

průtok 0,9 ml/min	čas (min)	H ₂ O (%)	acetonitril (%)
	0	95	5
	20	5	95
	20	95	5

- METODA D

průtok 0,9 ml/min	čas (min)	25mM KH ₂ PO ₄ , pH 5,5 (%)	acetonitril (%)
	0	97	3
	4	97	3
	9	40	60
	12	40	60
	15	97	3

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

- METODA E

průtok 0,9 ml/min	čas (min)	50mM CH ₃ COONa, pH 5,0 (%)	methanol (%)
	0	70	30
	35	60	40
	60	25	75
	65	25	75
	70	70	30

- METODA F

průtok 18 ml/min	čas (min)	10mM KH ₂ PO ₄ , pH 6,0 (%)	methanol(%)
	0	65	35
	5	65	35
	10	25	75
	12	25	75
	17	10	90
	22	65	35

- METODA G

průtok 18 ml/min	čas (min)	10mM KH ₂ PO ₄ , pH 5,4 (%)	acetonitril (%)
	0	97	3
	10	97	3
	13	65	35
	15	65	35
	20	97	3

- METODA H

čas (min)	průtok (ml/min)	10mM HCOOH (%)	methanol(%)
0	0,4	80	20
20	0,4	0	100

- METODA I

průtok 0,9 ml/min	čas (min)	10mM KH ₂ PO ₄ (%)	methanol (%)
	0	65	35
	10	60	40
	13	46	54
	25	25	75
	30	25	75
	35	5	95
	40	5	95
	45	65	35

4.4 Postupy spojené se studiem červení cibule obří

Izolace prekurzoru pigmentů v cibuli obří

Cibule *A. giganteum* (628 g) byly rozčtvrceny a homogenizovány v 1 l směsi MeOH/H₂O/HCl (90/9/1, v/v/v) vychlazené na 0 °C. Výsledný homogenát byl přefiltrován přes plátno. Extrakce byla opakována s dalším litrem extrakčního činidla. Získané extrakty byly spojeny a zakoncentrovány na cca 150 ml s použitím rotační vakuové odparky (RVO) (< 35 °C). Po odstředění bylo pH supernatantu upraveno na hodnotu 2,5 za použití 5M KOH. Takto upravený roztok byl nanesen na kolonu katexu (22 × 3 cm, Amberlite IR120). Po promytí kolony 200 ml vody byly aminokyseliny eluovány 0,5M NH₄OH. Frakce, které poskytovaly pozitivní reakci s Ehrlichovým činidlem, byly spojeny, jejich pH bylo upraveno na hodnotu 5,5–6,0 a následně byly tyto frakce lyofilizovány. Získaný prášek byl rozpuštěn ve 25 ml 50mM KH₂PO₄ (pH 5,5) a výsledný roztok byl nanesen na preparativní C-8 HPLC kolonu a rozdělen pomocí METODY A. Frakce, které byly eluovány v čase 3,7, 7,9 a 9,0 min, byly jímány a poté lyofilizovány. Prášek získaný po lyofilizaci byl extrahován 2 × 100 ml methanolu a přefiltrován. Ze spojených extraktů byl opatrně za sníženého tlaku odpařen methanol (< 30 °C). Bylo získáno 83 mg látky **22**, 552 mg látky **27** a 109 mg sloučeniny **28**.

Izolace barevných sloučenin vzniklých v cibuli obří po narušení pletiva

Cibule *A. giganteum* (372 g) byly rozčtvrceny a homogenizovány v 600 ml H₂O. Homogenát se ponechal macerovat 30 minut při pokojové teplotě, poté k němu byl přilít 1 l diethyletheru a výsledná suspenze byla přefiltrována přes plátno. Extrakce byla opakována s dalším litrem diethyletheru. Extrakty byly následně spojeny a vrstvy rozpouštědel byly odděleny odstředěním. Vodná vrstva byla ještě extrahována 500 ml diethyletheru. Spojené etherové extrakty byly přesušeny přes MgSO₄ a zakoncentrovány do sucha na RVO (< 30 °C). Získaný tmavě oranžový prášek byl rozpuštěn ve 30 ml acetonitrilu, roztok byl přefiltrován přes PTFE filtr (0,45 μm) a přečištěn přes SPE C-8 kolonku (3 ml, 500 mg). Acetonitril byl odpařen za sníženého tlaku s výtěžkem 455 mg tmavě oranžové pevné látky. Extrakt byl podroben preparativní C-8 HPLC (nástřík 1 ml) za použití METODY B. Frakce eluovaná v čase 18,1 min byla najímána a lyofilizována.

Izolace alliinasy

K izolaci alliinasy z cibulí rostlin *A. giganteum* a cibule kuchyňské byl využit postup popsany Shenem a Parkinem.⁷⁴ Všechny kroky byly prováděny při teplotě 0–4 °C. Postup zahrnoval homogenizaci cibulí (486 g) ve 250 ml 0,1M KH₂PO₄ (pH 7,5), který obsahoval 10 % glycerolu, 0,5 mM toluensulfonylfluoridu, 5 mM EDTA a 0,05 % cysteinu. Získaný homogenát byl přefiltrován přes plátno. Po odstředění (15 min, 9000 rpm, 4 °C) byl precipitát odstraněn a k supernatantu byl přidán síran amonný (65% nasycení). Po odstředění (20 min, 9000 rpm, 4 °C) byl supernatant odstraněn a precipitát byl rozpuštěn v 17 ml fosfátového pufru, který byl použit jako extrakční činidlo. Poté byla provedena důkladná dialýza proti stejnému pufru. Čistota ani specifická aktivita získaného preparátu již nebyly dále zkoumány.

Modelové reakce s alliinase

Jeden ml zásobního roztoku 2-PyrrCSO resp. 1 ml zásobního roztoku 3-PyrrCSO (25 mM v 50mM KH₂PO₄, pH 6,5) byl převeden do 10ml skleněných vialek. K roztokům bylo přidáno 0,5 ml roztoku alliinasy (10 mg/ml). Roztoky byly míchány při 23 °C po dobu 30 min. Následovala extrakce modelové reakční směsi diethyl-etherem (3 ml) a organické vrstvy byly odfoukány za použití argonu. Zbytky ve vialkách byly rozpuštěny ve 200 µl acetonitrilu, přefiltrovány přes PTFE filtr (0,45 µm) a analyzovány pomocí C-8 HPLC za použití METODY C.

Postupy spojené s testováním antimikrobiální aktivity barevných látek vznikajících v cibuli obří

Příprava kultivačních médií

Trypton sojový agar (TSA) byl připraven smícháním 3,75 g enzymatického kaseinového hydrolyzátu (trypton), 1,25 g sojového peptonu a 1,25 g NaCl s 3,75 g agaru. Směs byla doplněna vodou na celkový objem 250 ml a hodnota pH byla upravena na 7,2.

Masopeptonový agar obohacený glukosou (MPAg) byl připraven smícháním 10 g živného agaru č. 2, 2,5 g glukosy a 1,25 g kvasničního autolyzátu s 5 g agaru ST. Směs byla doplněna vodou na celkový objem 250 ml a hodnota pH byla upravena na 7,2.

Bramborovo-dextrosový agar (PDA) byl připraven rozpuštěním 9,75 g stejnojmenné směsi ve 250 ml vody. Všechna kultivační média byla sterilizována 20 minut v autoklávu při 121 °C.

Testování antimikrobiální aktivity

Testy byly provedeny Ing. Petrou Krejčovou. Optimálně narostlé bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sebedonicus* [G+, RICP 1297/99, (Smith 1910) Davis et al. 1984^{VP}], *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatorium* (G–, BCCM/LMG 931, Starr and Garces 1950^{AL}) a *Erwinia amylovora* [G–, RICP 121A, (Burrill 1882) Winslow et al. 1920^{AL}] byly odebrány z kultivačního média (MPAg) a umístěny do sterilní vody. Byla připravena bakteriální suspenze o hustotě 10⁹ CFU/ml. Tato suspenze (0,5 ml) byla rozetřena na Petriho misku, která obsahovala kultivační médium. Suspenze infiltrovala médium ve flow boxu přibližně tři hodiny. Roztoky (5 µl) testovaných látek (GIG1H, GIG24H a allicin) v methanolu nebo v ethanolu (allicin) (koncentrace 8, 4, 2 a 1 mg/ml) byly aplikovány na papírový disk o průměru 6 mm. Po odpaření rozpouštědla byly disky umístěny na Petriho misky obsahující bakterie infiltrované do kultivačního média. Bakterie byly inkubovány při 25 °C a zóny byly odečteny po 2 dnech u *Clavibacter michiganensis* subsp. *sebedonicus* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatorium* a po jednom dnu u *Erwinia amylovora*. Všechny testy byly provedeny třikrát.

Pro test byly využity také tyto tři bakterie: *Micrococcus luteus* [CCM 1048, (Schroeter 1872) Cohn 1872^{AL}], *Bacillus cereus* (CCM 869, Frankland a Frankland 1887^{AL}) a *Escherichia coli* [CCM 3954, (Migula 1895) Castellani a Chalmers 1919^{AL}]. Jako kultivační médium byl použit trypton sójový agar (TSA). Inkubace bakterií s papírovým diskem obsahující testované látky probíhala při 30 °C pro *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*, a při 37 °C u bakterie *Escherichia coli*. Zóny byly odečteny po jednom dnu inkubace. Všechny testy byly provedeny třikrát.

Biologická aktivita byla také testována na kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E. C. Hansen). Postup testu byl téměř stejný jako při testování bakterií. Bramborovo-dextrosový agar (PDA) byl použit jako kultivační médium, inkubace kvasinek s papírovými disky obsahujícími testované látky probíhala při 25 °C a zóny byly odečteny po jednom dnu inkubace. Všechny testy byly provedeny třikrát.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Protiplísňová aktivita byla testována na *Aspergillus niger* (KRV/ZF/JCU, van Tieghem), *Rhizoctonia solani* (F-1, Kuhn) a *Fusarium solani* [F-1036, (Martius) Saccardo]. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena za užití nepatrně pozměněné metody Oarda a kol.⁷⁵ Testování bylo prováděno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách. Testované sloučeniny byly převedeny do roztoku rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (methanol, ethanol). Byly připraveny roztoky o koncentraci 2000 µg/ml (GIG1H), 1000 µg/ml (GIG24H) a 5120 µg/ml (allicin). Testované roztoky byly dále zředěny bramborovo-dextrosovým agarem 10× při teplotě 70 °C. Další ředění bylo prováděno již přímo v destičce (ředění 2×). Koncentrační rozmezí bylo u vzorku GIG1H 200–0,4 µg/ml, u GIG24H 100–0,2 µg/ml a u allicinu 512–1 µg/ml. Ve všech jamkách byl celkový objem roztoku 100 µl. Po ztuhnutí agarů v jamkách byla nanášena suspenze plísňových sporů o koncentraci 10⁷ CFU/ml ve 0,05% Tweenu 80. Suspenze se nechala ztuhnout a MIC byla odečtena po 48 hodinách inkubace při 25 °C. Každý test byl proveden třikrát s dvojitým opakováním. MIC byla stanovena porovnáním zákalu před nárůstem daného mikroorganismu a zákalu po nárůstu mikroorganismu v testovaném roztoku.

Příprava barevných extraktů A. giganteum pro testování antimikrobiální aktivity

Směs aminokyselin (2 g), která byla extrahována z cibule obří, byla rozpuštěna ve 200 ml 0,05M fosfátového pufru (pH 6,5). Roztok zoranžověl několik minut po přidání 1 g alliinasy. Reakce byla ukončena po jedné hodině (vzorek GIG1H) resp. po 24 hodinách (vzorek GIG24H) při laboratorní teplotě. Získané barevné roztoky byly nanášeny na C-8 SPE kolonku (3 ml, 500 mg), promyty destilovanou vodou a barevné látky byly eluovány methanolem. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku (30 °C).

4.5 Postupy spojené se studiem tvorby barevných sloučenin v česneku, cibuli, póru a česneku sicilském

Příprava *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů

Pro izolaci isoalliinu (**4**) byla použita metoda Carsona a kol.⁷⁶ a homoisoalliin (**5**) byl izolován dle postupu Kubce a kol.²² Ostatní *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy (**1–3** a **6**) byly syntetizovány doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D. alkylací *L*-cysteinu příslušnými alk(en)ylhalidy a následnou oxidací pomocí H₂O₂.⁷⁷

Stanovení zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku, cibuli, póru a česneku sicilském

Ke stanovení byla použita mírně modifikovaná metoda Kubce a Dadákové.³⁰ Přibližně 15 g oloupaného česneku, cibule, póru, popř. *A. sicutum* bylo homogenizováno s 200 ml směsí methanol/H₂O/HCl (90/9/1, v/v/v). Vzniklý homogenát byl vařen 5 minut pod refluxem, zfiltrován a filtrát byl zakoncentrován na RVO při 40 °C na objem 10–15 ml. Tento roztok byl doplněn na 25 ml 20mM borátovým pufrům (pH 9,2).

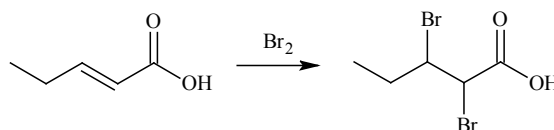
S-Substituované deriváty cysteinu (**1–6**) byly použity jako referenční sloučeniny. Malé množství příslušné aminokyseliny bylo rozpuštěno v 0,5 ml 20mM borátového pufru (pH 9,2). Takto připravený zásobní roztok byl následně použit pro derivatizaci dansylchloridem (Dns-Cl).

Derivatizované vzorky byly připraveny smícháním 100 µl extraktu vzorku (nebo zásobních roztoků standardů) s 250 µl Dns-Cl činidla (10mM dansylchlorid v acetonitrilu) a 0,65 ml 20mM borátového pufru (pH 9,2). Směs byla krátce promíchána a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl roztok zfiltrován přes 0,45µm PTFE filtr a analyzován pomocí C-18 HLPC za použití METODY E.

Porovnáním retenčních časů standardů a sloučenin v reálných extraktech byly přiřazeny píky jednotlivým sledovaným aminokyselinám. Relativní zastoupení těchto aminokyselin bylo spočítáno jako poměr plochy jejich píků.

Syntéza 2,3-dibrompentanové kyseliny

K syntéze byl použit postup publikovaný Morim a kol.⁷⁸ (**Obrázek 32**).

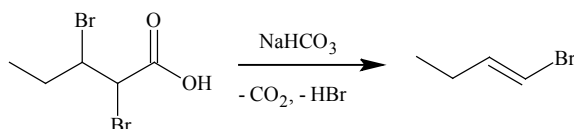


Obrázek 32: Syntéza 2,3-dibrompentanové kyseliny

Roztok 27 ml bromu (1 mol) v 50 ml dichlormethanu byl během jedné hodiny přikapáván do vychlazeného roztoku (*E*)-pent-2-enové kyseliny (50 g, 0,5 mol) ve 260 ml CH₂Cl₂. Roztok byl míchán 6 hodin při pokojové teplotě. Poté k němu bylo přidáno 250 ml 10% vodného roztoku NaHSO₃. Ihned došlo ke změně zbarvení směsi z oranžové na bílou. Vodná vrstva byla extrahována 300 ml CH₂Cl₂. Organické frakce byly spojeny a zakoncentrovány na RVO. Výsledný produkt byl přesušen přes bezvodý MgSO₄. Ponecháním produktu přes noc při pokojové teplotě se utvořily bílé krystaly (117 g, výtěžek 90 %).

Syntéza 1-butenylbromidu

Na základě postupu Moriho a kol.⁷⁸ (**Obrázek 33**) byla syntéza provedena doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D.



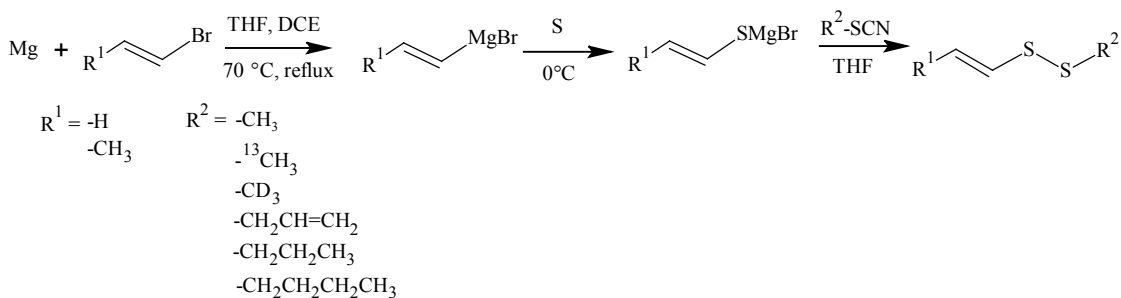
Obrázek 33: Syntéza 1-butenylbromidu

Do litrové trojhrdlé baňky opatřené teploměrem a přikapávací baňkou (třetí hrdlo bylo napojeno na vývěvu) byla umístěna suspenze 70 g NaHCO₃ ve 200 ml DMF. Za stálého míchání byl při teplotě 75 °C přikapáván roztok 2,3-dibrompentanové kyseliny (117 g, 0,45 mol) v 50 ml suchého DMF. Byl vytvořen podtlak 150 mm Hg a mezi reakční baňku a vývěvu byly umístěny dvě jímací baňky ponořené do směsi suchý led/acetón. Během přikapávání 2,3-dibrompentanové kyseliny došlo k bouřlivé reakci. Po přidání kyseliny byl podtlak nastaven na 100 mm Hg a po ukončení destilace byl použit obsah pouze první jímací baňky, která obsahovala bezbarvý produkt. Výsledný

produkt byl přesušen přes bezvodý MgSO_4 a jeho čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS (výtěžek 54 %).

Syntéza disulfidů obsahujících 1-propenylovou popř. 1-butenylovou skupinu

Disulfidy byly připraveny podle metody Wijerse a kol.⁷⁹ (**Obrázek 34**).

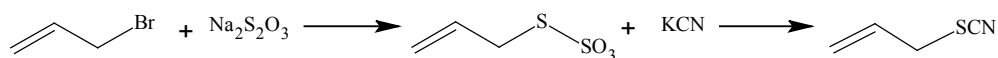


Obrázek 34: Syntéza 1-alk(en)yl[alk(en)yl]disulfidů

Hořčík (8,5 g, 0,34 mol) byl suspendován ve 30 ml THF v trojhrdlé baňce (250 ml) opatřené teploměrem, zpětným chladičem a příkapávací baňkou. K suspenzi byl pomalu příkapáván roztok 1-propenylbromidu (37 g, 0,3 mol) případně 1-butenylbromidu (40,5 g, 0,3 mol) a 1,2-dichlorethanu (3,5 g, 35 mmol) ve 120 ml THF. Reakce byla zahájena opatrným zahřátím pomocí fénu a probíhala pod refluxem (60–70 °C). Po ukončení první fáze reakce (když většina hořčíku zreagovala) byla směs ochlazena na pokojovou teplotu a za stálého míchání a chlazení bylo po malých dávkách přidáno 9,6 g (0,3 mol) síry. Dvacet minut po přidání síry bylo příkapáno 0,3 mol R-SCN (R = methyl, allyl, propyl, popř. butyl) ve 30 ml THF. Po 30 minutách míchání bylo přidáno 150 ml 25% vodného roztoku NH_4Cl . Vznikly dvě vrstvy, spodní (vodná) vrstva byla extrahována 2 × 150 ml dichlormethanu a všechny organické vrstvy byly spojeny, přesušeny přes bezvodý MgSO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku (< 30 °C). Bylo získáno přibližně 40 ml hnědé, zapáchající kapaliny. Destilací kapaliny za sníženého tlaku při 57–62 °C/10 mm Hg byl získán methyl-(1-propenyl)disulfid, při 60–70 °C/8 mm Hg byl získán allyl(1-propenyl)disulfid, při 78–80 °C/13 mm Hg byl získán 1-propenyl(propyl)disulfid, zatímco při 62–66 °C/10 mm Hg byl získán 1-butenyl(methyl)disulfid a při 95–105 °C/15 mm Hg byl získán 1-butenyl(butyl)disulfid. Všechny vzniklé disulfidy (výtěžky kolem 20 g) byly světle žluté zapáchající kapaliny, jejichž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS (viz **Přílohu 1**).

Syntéza allylthiokyanátu

Tato syntéza byla provedena podle lehce modifikované metody Slatera⁸⁰ (**Obrázek 35**).

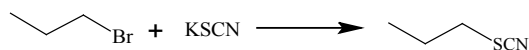


Obrázek 35: Syntéza allylthiokyanátu

Allylbromid (48,4 g, 0,4 mol) byl rozpuštěn ve 140 ml ethanolu a k tomuto roztoku byl přidán roztok 63,3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,4 mol) ve 140 ml vody. Výsledný roztok byl zahříván hodinu pod refluxem. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl roztok extrahován diethyletherem (2×200 ml). Do vodné vrstvy bylo přisypáno 26,5 g (0,4 mol) KCN. Směs byla míchána 60 minut, během kterých se vytvořily dvě vrstvy. Emulze byla extrahována pentanem (2×250 ml) a organické vrstvy byly spojeny a přesušeny přes bezvodý MgSO_4 . Odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku při 25°C bylo získáno 24,6 g (výtěžek 62 %) světle žluté aromatické kapaliny, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS.

Syntéza propylthiokyanátu

Syntéza byla provedena s užitím mírně pozměněné metody Reevese a kol.⁸¹ (**Obrázek 36**).

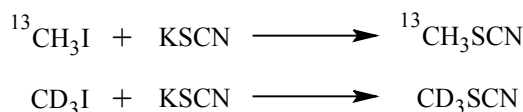


Obrázek 36: Syntéza propylthiokyanátu

Do litrové baňky s kulatým dnem bylo umístěno 86,1 g (0,7 mol) 1-bromopropanu, 136,1 g (1,4 mol) thiokyanátu draselného jako 50% vodný roztok a 3 g (16 mmol) tri-*n*-butylaminu. Roztok byl za stálého míchání zahříván pod zpětným chladičem dvě hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla horní vrstva odebrána a přesušena přes bezvodý MgSO_4 . Destilací za sníženého tlaku ($54\text{--}55^\circ\text{C}/10$ mm Hg) bylo získáno 46,2 g (výtěžek 71 %) nažloutlé kapaliny se silným zápachem připomínajícím křen, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS.

Syntéza izotopicky substituovaného methylthiokyanátu

Syntéza byla provedena podle mírně pozměněné metody Reevese a kol.⁸¹ (**Obrázek 37**).

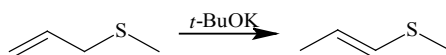


Obrázek 37: Syntéza ${}^{13}\text{CH}_3\text{SCN}$ a CD_3SCN

${}^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (10 g, 0,07 mol) a 13,6 g (0,14 mol) thiokyanátu draselného (jako 50% vodný roztok) byly smíchány ve 250ml varné baňce. Roztok byl za stálého míchání zahříván dvě hodiny pod zpětným chladičem. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla vzniklá reakční směs extrahována dichlormethanem (2×50 ml), spojené organické vrstvy byly přesušeny přes bezvodý MgSO_4 a zakoncentrovány za sníženého tlaku. Výsledný produkt byl získán destilací za normálního tlaku (b. v. 131–134 °C) (výtěžek 78 %). Syntéza CD_3SCN byla provedena analogicky za použití CD_3I (výtěžek 81 %).

Syntéza (E/Z)-methyl(1-propenyl)sulfidu

Postup byl proveden podle metody Blocka a kol.⁸² (**Obrázek 38**).

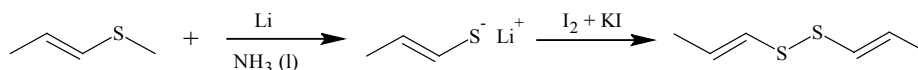


Obrázek 38: Syntéza (E/Z)-methyl(1-propenyl)sulfidu

Roztok allyl(methyl)sulfidu (100 g, 1,14 mol v 75 ml DMSO) byl přikapáván ke směsi 57 g *tert*-butoxidu draselného (0,5 mol) ve 375 ml DMSO. Vzniklá tmavě hnědá směs byla míchána nejprve hodinu při 45 °C a dalších 24 hodin při pokojové teplotě. K reakční směsi bylo poté přidáno 750 ml vody a vodná vrstva byla extrahována pentanem (2×650 ml). Pentan byl následně odpařen za sníženého tlaku při teplotě 8 °C. Destilací zbylé oranžové kapaliny při 90–100 °C bylo získáno 98 g (výtěžek 98 %) čiré, ostře páchnoucí kapaliny, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS.

Syntéza di(1-propenyl)disulfidu

Syntéza byla provedena doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D. za užití postupu Wijerse a kol.⁷⁹ (**Obrázek 39**).

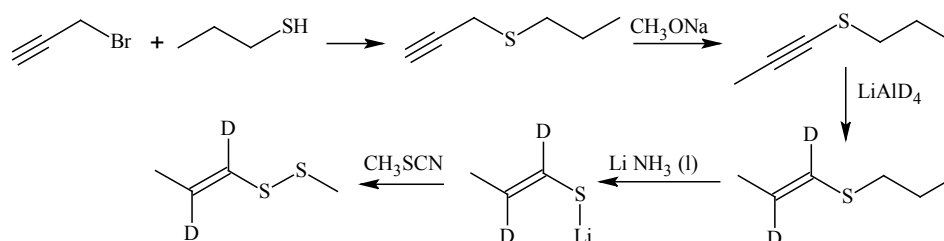


Obrázek 39: Syntéza di(1-propenyl)disulfidu

Kapalný amoniak (300 ml) byl umístěn do dvoulitrové trojhrdlé baňky opatřené přikapávací baňkou a ponořené do lázně obsahující suchý led/acetón ($-75\text{ }^\circ\text{C}$). Do baňky bylo po malých dávkách přidáno lithium (4,2 g, 0,6 mol). Po pětiminutovém míchání reakční směsi bylo přidáno 100 ml diethyletheru a 3 minuty poté byl přidán methyl(1-propenyl)sulfid (53 g, 0,6 mol). Poté byla teplota reakční směsi pomalu zvýšena na $-30\text{ }^\circ\text{C}$, při které se téměř všechen amoniak odpařil. Zbytky amoniaku pak byly odstraněny za sníženého tlaku. K výslednému produktu bylo přidáno 100 ml vody a 100 ml diethyletheru. Poté byl při teplotě v rozmezí $-10\text{ }^\circ\text{C}$ a $0\text{ }^\circ\text{C}$ přikapáván koncentrovaný roztok jodu a KI ve vodě, dokud docházelo k jeho odbarvení. Horní vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla extrahována 50 ml diethyletheru. Spojené organické vrstvy byly promyty $2 \times 50\text{ ml}$ 5% roztoku thiosíranu sodného a $2 \times 50\text{ ml}$ vody. Poté byl roztok přesušen přes bezvodý MgSO_4 a bylo získáno 23,7 g žluté kapaliny, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC-MS.

Syntéza izotopicky substituovaného methyl[(1,2- D_2)]1-propenyl]disulfidu

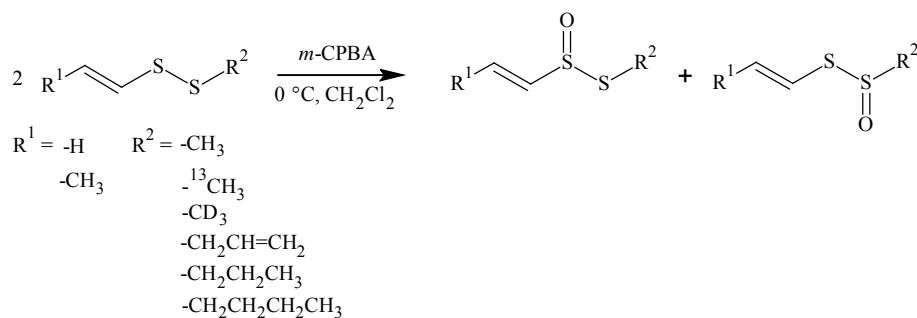
Syntéza byla provedena doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D. podle metody publikované Naganthanem⁸³ (**Obrázek 40**). Čistota a identita získaného disulfidu byly ověřeny pomocí GC-MS (viz **Přílohu 1**).



Obrázek 40: Syntéza izotopicky substituovaného methyl[(1,2- D_2)]1-propenyl]disulfidu

Oxidace disulfidů na thiosulfináty

Thiosulfináty byly připraveny oxidací příslušných disulfidů podle metody Kubce a kol.⁴³ (**Obrázek 41**). V této reakci byla jako oxidační činidlo použita *m*-chlorperoxybenzoová kyselina (*m*-CPBA).



Obrázek 41: Syntéza thiosulfinátů

V trojhrdlé baňce opatřené přikapávací baňkou a umístěné do ledové lázně bylo v 50 ml vychlazeného CH₂Cl₂ rozpuštěno 20 mmol methyl(1-propenyl)disulfidu, allyl(1-propenyl)disulfidu, 1-propenyl(propyl)disulfidu, 1-butenyl(methyl)disulfidu nebo 1-butenyl(butyl)disulfidu. Za stálého míchání byl ke směsi přikapáván roztok 3,85 g (22 mmol) *m*-CPBA rozpuštěné v 50 ml CH₂Cl₂ vychlazený na 0 °C. Reakce probíhala 45 minut, poté byla získaná směs přefiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku (< 30 °C). Pokud bylo nutné, směs byla opět přefiltrována, dokud odpařením rozpouštědla nevznikla žlutá viskózní kapalina. Reakcí bylo získáno přibližně 18 mmol příslušných thiosulfinátů.

Modelové reakce**Příprava modelových pigmentů**

10% roztok syntetických thiosulfinátů R₁CH₂CH=CHS(O)SR₂ (R₁ = -H, -CH₃, R₂ = -CH₃, -CH₂CH=CH₂, -CH=CHCH₃, -CH₂CH₂CH₃ nebo -CH₂CH₂CH₂CH₃) (2,4 g thiosulfinátů ve 24 g acetonitrilu) byl smíchán s 500 ml 0,5M KH₂PO₄ (pH 5,5), který obsahoval 0,05 mol L-alaninu. Roztok byl ponořen do lázně o teplotě 40 °C. Reakce probíhala za stálého míchání 19 hodin za vzniku růžového až fialového zbarvení. Analogicky byly prováděny i modelové experimenty s izotopicky substituovaným alaninem [D,L-(3-D₃)Ala, D,L-(¹⁵N)Ala, D,L-(2-D)Ala nebo

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

D,L-(1-¹³C)Ala] a izotopicky substituovanými thiosulfináty [CH₃CD=CDS(O)SCH₃, CH₃CH=CHS(O)S¹³CH₃, CH₃CH=CHS(O)SCD₃ nebo CH₃CH₂CH=CHS(O)S¹³CH₃].

Přečištění modelových pigmentů

Získané barevné roztoky byly nanášeny na C-18 SPE kolonku (60 ml, 10 g). Kolonka byla postupně promyta 50 ml vody, pentanu, CH₂Cl₂, diethyletheru, acetonitrilu, methanolu a okyseleného methanolu (CH₃OH/HCl, 99/1, v/v). Eluované frakce byly převážně bezbarvé, jen elucí methanolem byl získán barevný roztok (růžový až tyrkysový – v závislosti na použitém thiosulfinátu). Methanol byl odpařen, odparek byl rozpuštěn v minimálním množství methanolu (zpravidla < 100 μl) a k roztoku bylo přidáno desetkrát větší množství vody. Roztok (kromě pigmentu vytvořeného z CH₃CH=CHS(O)SCH₂CH=CH₂, jehož dalším přečištěním by došlo ke ztrátě žlutých látek) byl nanášen na C-8 SPE kolonku (3 ml, 500 mg). Kolonka byla promyta 3 ml vody, 25 ml acetonitrilu a 3 ml methanolu. HPLC analýzám byly podrobeny jen methanolicke frakce (ostatní frakce neobsahovaly významná množství barevných sloučenin).

Extrakce směsi thiosulfinátů z česneku, cibule, póru a česneku sicilského

Přibližně 500 g jedlých částí česneku, cibule, póru nebo česneku sicilského bylo homogenizováno v 500 ml vody. Homogenát byl po 30 minutách stání při pokojové teplotě přefiltrován přes plátno a filtrát byl extrahován diethyletherem (3 × 300 ml). Spojené etherové frakce byly zakoncentrovány za sníženého tlaku (< 30 °C) a uchovávány při –28 °C.

Tvorba pigmentů z extraktů česneku, cibule, póru a česneku sicilského

Výše připravené extrakty (10 ml) byly smíchány s alaninem ve fosfátovém pufru (300 ml 0,5M KH₂PO₄, pH 5,5). Výsledná koncentrace aminokyseliny v reakční směsi byla 100 mM. Roztok byl ponořen do vodní lázně o teplotě 40 °C, reakce probíhala za stálého míchání 19 hodin (v případě extraktu z česneku reakce probíhala 6 hodin). Analogicky byly prováděny i modelové experimenty s izotopicky substituovaným alaninem [D,L-(3-D₃)Ala, D,L-(¹⁵N)Ala, D,L-(2-D)Ala nebo D,L-(1-¹³C)Ala].

Přečištění pigmentů vzniklých reakcí diethyletherového extraktu česneku, cibule, póru nebo česneku sicilského s aminokyselinami

Modré (česnek) nebo růžovofialové (cibule, pór, česnek sicilský) modelové směsi byly izolovány a přečištěny analogicky s postupem uvedeným u pigmentů připravených ze syntetických thiosulfínátů. **Tabulka 2** znázorňuje přehledný postup přečištění pigmentů. Pigmenty vzniklé reakcí česnekového extraktu nebyly podrobeny dalšímu přečištění přes C-8 SPE kolonku, protože by došlo ke ztrátě žlutých látek, které v česnekovém homogenátu vznikají.

Tabulka 2: Přečištění směsí pigmentů – barvy eluátů

rozpouštědlo použité na promytí C-18 SPE kolonky	česnekové pigmenty	cibulové pigmenty	pórkové pigmenty	pigmenty vytvořené v <i>A. siculum</i>
voda	bezbarvý	bezbarvý	bezbarvý	bezbarvý
pentan	nažloutlý	nažloutlý	nažloutlý	bezbarvý
dichlormethan	nažloutlý	nažloutlý	nažloutlý	bezbarvý
diethylether	nažloutlý	nažloutlý	nažloutlý	bezbarvý
acetonitril	zelenožlutý	oranžový	oranžový	narůžovělý
methanol	tyrkysový**	fialový*	fialový*	červený*
methanol + 0,1% HCl	světle tyrkysový	světle fialový	světle fialový	růžový
rozpouštědlo použité na promytí C-8 SPE kolonky				
voda		bezbarvý	bezbarvý	bezbarvý
acetonitril		červený	červený	narůžovělý
methanol		fialový**	fialový**	růžový**
methanol + 0,1% HCl		bezbarvý	bezbarvý	bezbarvý

neoznačené roztoky nebyly dále zpracovávány

* roztoky byly podrobeny dalšímu přečištění

** roztoky byly analyzovány

Izolace sloučeniny GLO-371

Pomocí C-18 preparativní HPLC (METODA F) byla z vybraných modelových směsí izolována barevná látka ($\lambda_{max} = 568$ nm), která měla retenční čas 11,9 minut. Vzhledem ke značné nestabilitě této látky byl ze sloučených najímaných frakcí opatrně za sníženého tlaku odpařen methanol a zbylý roztok byl nanesen na SPE C-18 kolonku (3 ml, 500 mg), která byla následně promyta vodou (3 ml). Kolonka s adsorbovaným pigmentem byla uchovávána při teplotě -28 °C a samotná barevná látka z ní byla eluována těsně před NMR měřením pomocí CD_3OD .

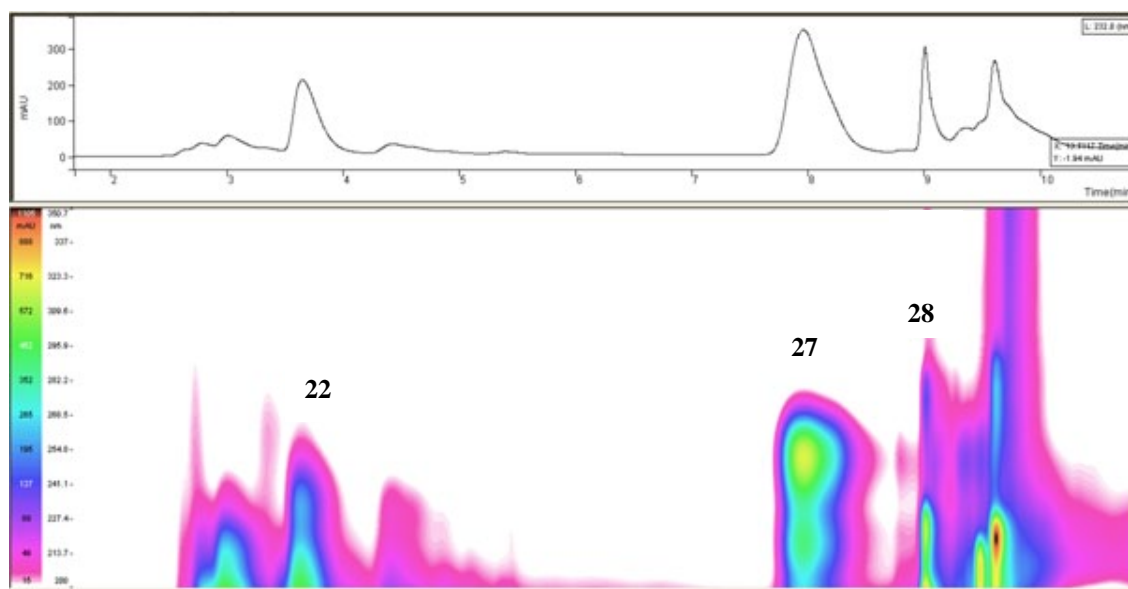
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Tvorba barevných látek v cibuli obří

K detailnímu studiu barevných změn probíhajících v cibuli obří byla nezbytná izolace prekurzoru těchto sloučenin. Na základě výsledků Jedelské a kol.⁵⁸ bylo možné předpokládat, že tímto prekurzorem je aminokyselina *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (3-PyrrCSO, **22**). Jak bude popsáno dále, během této izolace se nejenom podařilo izolovat několik jiných, ve vědecké literatuře dosud nepopsaných sloučenin, ale především prokázat, že prekurzorem barevných sloučenin v cibuli obří je ve skutečnosti jiná látka než 3-PyrrCSO.

5.1.1 Objasnění struktury některých sirných sloučenin přítomných v cibuli obří

Ve frakci obsahující aminokyseliny, která byla extrahována z cibulí *A. giganteum*, bylo pomocí HPLC detekováno několik sloučenin vykazujících absorpční maximum v rozmezí 240–280 nm. Tři z nich (**22**, **27** a **28**) byly následně izolovány pomocí kombinace iontovýmenné chromatografie a preparativní HPLC (**Obrázek 42**) a plně charakterizovány za použití různých spektroskopických metod.



Obrázek 42: Chromatogram frakce obsahující aminokyseliny přítomné v cibuli obří

Stanovení chemické struktury prekurzoru pigmentu

Hlavní sloučenina (**27**), která byla izolována, měla retenční čas 7,9 min (METODA A) a poskytovala pozitivní reakci jak s ninhydrinem, tak s Ehrlichovým činidlem (to naznačovalo její aminokyselinovou povahu a zároveň přítomnost pyrrolového jádra). Sloučenina **27** byla bílá krystalická látka, ovšem při laboratorní teplotě se během několika hodin její barva změnila na růžovou. O její citlivosti na zvýšenou teplotu svědčí i fakt, že také během izolace docházelo k jejímu rozkladu na barevné produkty. Částečný rozklad této sloučeniny byl pozorován také během jejího skladování při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy se její barva změnila během třech měsíců na oranžovohnědou.

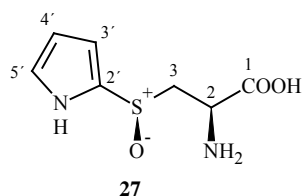
^{13}C NMR data látky **27** naznačila přítomnost čtyř aromatických uhlíků (C-2'-C-5') společně s jedním karboxylovým (C-1) a dvěma sp^3 -hybridizovanými uhlíkovými atomy (C-2, C-3) (**Tabulka 3**). Další NMR experimenty (včetně COSY, HETCOR, DEPT a HMBC – **Příloha 2**) odhalily přítomnost dvou oddělených strukturních podjednotek. První bylo monosubstituované pyrrolové jádro a tou druhou byl řetězec $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{X})\text{COOH}$. IČ spektrum látky **27** vykazovalo silnou absorpci při 1080 cm^{-1} , což naznačovalo přítomnost $-\text{S}=\text{O}$ skupiny. Měřením ESI-TOF HRMS byla zjištěna hmotnost $[\text{M} + \text{H}]^+$ 203,0485 Da, která se naprosto shodovala s vypočítanou hodnotou pro sumární vzorec $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Z těchto dat jednoznačně vyplývalo, že izolovaná sloučenina je *S*-pyrrolylcysteinsulfoxid.

Mnohem složitější však bylo stanovit přesné místo substituce pyrrolového jádra na cysteinylovou část. Vzhledem k vzájemné interakci všech třech aromatických $-\text{CH}=\text{vodíků}$ a srovnatelné velikosti interakčních konstant $^2J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ a $^3J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ nebyly standardní NMR experimenty (COSY, HMBC, DEPT nebo NOESY) schopné podat jasný důkaz o místě substituce pyrrolového jádra. NMR signály těchto třech aromatických vodíků tvořily tři oddělené dublety dubletu ($J = 3,8, 1,5$ a $2,7\text{ Hz}$) (viz **Přílohu 2**), což dle údajů v literatuře naznačovalo substituci v poloze 2 (signály 3-pyrrolyl derivátů totiž zpravidla tvoří jeden triplet a dva dublety dubletu).^{84–87} Nezvratný důkaz o substituci pyrrolového jádra v pozici 2 byl však získán až pomocí 1,1-ADEQUATE NMR experimentu.⁸⁸

Tabulka 3: ^1H a ^{13}C NMR data *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxidu (**27**, 2-PyrrCSO)

^1H NMR data	H-2	H-3a	H-3b	H-3'	H-4'	H-5'	
δ (ppm)	3,86	3,55	3,63	6,85	6,27	7,15	
intenzita signálu, multiplicita	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	
J (Hz)	8,2/5,2	5,2/13,8	13,8/8,2	1,5/3,8	2,7/3,8	1,5/2,7	
^{13}C NMR data	C-1	C-2	C-3	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
δ (ppm)	175,1	51,5	55,2	124,6	115,9	110,0	126,4

K určení absolutní konfigurace okolo dvou chirálních center (okolo atomu síry a α -uhlíku) posloužily CD a ^1H NMR spektroskopie společně s polarimetrií. CD spektrum izolované aminokyseliny vykazovalo pozitivní maximum při 251 nm (viz **Přílohu 3**). ^1H NMR spektrum obsahovalo charakteristické ABX rozdělení dvou signálů $-\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)-$ methylenových atomů vodíku, které sejevily jako dva zřetelně oddělené dublety dubletu ($J_{\text{AX}} = 5,2$ Hz a $J_{\text{BX}} = 8,2$ Hz) se středem při δ 3,55 a δ 3,63 ppm. Tato NMR data naznačovala, že aminoskupina a sulfoxidový atom kyslíku jsou orientovány v molekule stejným směrem.^{22,89} Hodnota optické otáčivosti izolované aminokyseliny je $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +36,2^\circ$, což ukázalo, že prostorová orientace sulfoxidové skupiny je analogická s ostatními pravotočivými *S*-substituovanými cysteinsulfoxidy (např. alliinem). Z uvedených informací bylo tedy možné odvodit, že struktura a absolutní konfigurace izolované aminokyseliny je (*R*_S,*R*_C)-*S*-(2-pyrrolyl)-cysteinsulfoxid (2-PyrrCSO, **27**) (**Obrázek 43**).

Obrázek 43: Chemická struktura *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxidu (2-PyrrCSO)

Objasnění chemické struktury 3-PyrrCSO

Retenční čas druhé izolované sloučeniny (**22**) byl 3,7 min (METODA A). Tato sloučenina také poskytovala pozitivní test s Ehrlichovým činidlem a ninhydrinem, což opět naznačovalo přítomnost pyrrolového jádra a aminokyselinovou povahu této látky.

Tato látka vykazovala velmi podobnou ESI-MS fragmentaci jako 2-PyrrCSO, a to jak v pozitivním, tak i v negativním módu (viz **Přílohy 4 a 9**). ESI-HRMS data ukázala, že 2-PyrrCSO a tato neznámá sloučenina mají stejné elementární složení ($C_7H_{10}N_2O_3S$) (zjištěno 203,0483 Da, vypočteno 203,0485 Da).

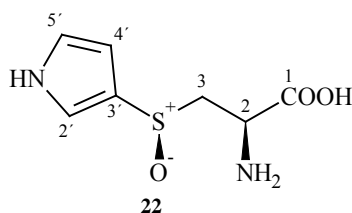
Také 1H a ^{13}C NMR spektra těchto dvou sloučenin se lišila jen nepatrně, což potvrdilo podobnost struktur obou látek (**Tabulka 4**). Tato zjištění v kombinaci s dalšími NMR experimenty (COSY, HETCOR, HMBC, HSQC – **Příloha 6**) a IČ daty (**Příloha 7**) odhalila, že aminokyselina je opět derivát *S*-pyrrolylcysteinsulfoxidu. 1,1-ADEQUATE NMR spektra pak jednoznačně potvrdila, že pyrrolové jádro je tentokrát substituováno v pozici 3.⁸⁸

Tabulka 4: 1H a ^{13}C NMR data *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxidu (**22**, 3-PyrrCSO)

1H NMR data	H-2	H-3a	H-3b	H-2'	H-4'	H-5'	
δ (ppm)	3,90	3,48	3,56	7,41	6,58	6,97	
intenzita signálu, multiplicita	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, t	1H, dd	1H, dd	
J (Hz)	8,2/4,8	4,8/13,9	13,9/8,2	1,8	1,7/3,1	1,9/3,1	
^{13}C NMR data	C-1	C-2	C-3	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
δ (ppm)	171,9	51,3	53,8	123,9	119,1	104,7	122,4

Absolutní konfigurace kolem atomu síry a α -uhlíku byla určena pomocí polarimetrie, 1H NMR a CD spektroskopie. 1H NMR spektrum opět obsahovalo dva oddělené dublety dubletu (δ 3,48 a δ 3,56 ppm s $J_{AX} = 4,8$ Hz a $J_{BX} = 8,2$ Hz), které byly přiřazeny dvěma methylenovým atomům vodíku navazaných na uhlíku C-3. Stejně jako 2-PyrrCSO i tato látka stáčí rovinu polarizovaného světla vpravo ($[\alpha]_D^{22} = +45,7^\circ$). Všechny získané informace potvrzovaly, že aminoskupina i sulfoxidový atom kyslíku jsou orientovány v molekule stejným směrem a absolutní konfigurace kolem atomu síry je tedy opět *R*.

Z toho jednoznačně vyplývalo, že struktura této aminokyseliny je (R_S, R_C)-*S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (3-PyrrCSO, **22**) (Obrázek 44).



Obrázek 44: Chemická struktura *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxidu (3-PyrrCSO)

Několik studií ovšem uvádí, že v kyselém prostředí 2-sulfinylpyrroly snadno izomerizují na příslušné 3-sulfinylpyrrolové deriváty.^{84–87} Jelikož byl při extrakci aminokyselin použit okyselený methanol (MeOH/H₂O/HCl 90/9/1, v/v/v), bylo nutné ověřit, zda je 3-PyrrCSO opravdu přítomen v neporušených cibulích, či se jedná jen o produkt, který se vytvořil z 2-PyrrCSO během izolace. Proto byl standard 2-PyrrCSO podroben stejnému zacházení jako během izolace, tedy i extrakci okyseleným methanolem. Bylo zjištěno, že se významná část 2-PyrrCSO přeměnila na 3-PyrrCSO v prostředí okyseleného methanolu (cca 50% přeměna po 4 hodinách). Za zmínku stojí, že tato izomerizace 2-PyrrCSO na 3-PyrrCSO probíhala za zachování absolutní konfigurace kolem atomu síry a zároveň nebyly pomocí HPLC detekovány žádné další rozkladné produkty. K důkazu, že 3-PyrrCSO není přítomen v neporušeném pletivu cibulí *A. giganteum*, byla provedena ještě jedna extrakce, tentokrát však vodným methanolem bez přídavku HCl (MeOH/H₂O 90/10, v/v). Ukázalo se, že 3-PyrrCSO se v tomto extraktu nenacházel, což potvrdilo domněnku, že se tato sloučenina v *A. giganteum* přirozeně nevyskytuje a jde pouze o artefakt vytvořený během extrakce z 2-PyrrCSO.

Ačkoli Jedelská a kol.⁵⁸ tvrdili, že 3-PyrrCSO je prekurzor červeného zbarvení vznikajícího po narušení pletiva *A. giganteum*, naše studie ukázala, že se tato aminokyselina vůbec v cibulích *A. giganteum* přirozeně nevyskytuje. Navíc, jak bude uvedeno dále, bylo zjištěno, že katalytickým rozkladem 3-PyrrCSO alliinasou žádné barevné sloučeniny nevznikají (na rozdíl od 2-PyrrCSO). NMR data sloučeniny, kterou Jedelská a kol. izolovali a identifikovali jako 3-PyrrCSO, jsou však téměř shodná s daty, která byla získána pro 2-PyrrCSO. Navíc NMR signály pyrrolových –CH= vodíků ve sloučenině izolované Jedelskou a spol. byly tři dublety dubletu se stejnými chemickými

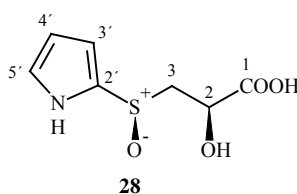
posuny a interakčními konstantami odpovídajícími 2-substituovanému derivátu (2-PyrrCSO). Dále bylo zjištěno, že UV spektra 2-PyrrCSO a 3-PyrrCSO se do značné míry liší. Zatímco 2-PyrrCSO vykazuje absorpční maxima při $\lambda = 219$ a 250 nm, absorpční maxima 3-PyrrCSO jsou při $\lambda = 202$ a 232 nm (viz **Přílohy 3 a 8**). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben interakcí mezi pyrrolovým –NH– vodíkem a atomem kyslíku v sulfoxidové skupině. Jedelská a kol.⁵⁸ uvedli, že UV spektrum sloučeniny, kterou se jim podařilo izolovat, vykazuje absorpční maxima při 220 a 250 nm, což jsou hodnoty, které opět téměř přesně odpovídají absorpčním maximům 2-PyrrCSO. Lze se tudíž oprávněně domnívat, že sloučenina, kterou izolovali Jedelská a kol., byla vlastně *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (**27**), jehož struktura byla nesprávně určena jako *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (**22**).

Stanovení chemické struktury 3-(2-pyrrolylsulfinyl)mléčné kyseliny

Třetí sloučenina (**28**) izolovaná z cibulí *A. giganteum* reagovala pozitivně s Ehrlichovým činidlem, její reakce s ninhydrinem však byla negativní. To naznačovalo, že tato sloučenina obsahovala pyrrolové jádro, ale nejednalo se o aminokyselinu. Tato látka měla velmi podobné NMR spektrum jako 2-PyrrCSO (**Tabulka 5, Příloha 10**), což naznačovalo přítomnost jak monosubstituovaného pyrrolového jádra, tak i řetězce –CH₂CH(X)COOH. Největší rozdíl mezi NMR spektry obou sloučenin byl zaznamenán v chemickém posunu C-2 uhlíků. Zatímco u 2-PyrrCSO byla hodnota chemického posunu $\delta = 51,5$ ppm, v případě látky **28** byla jeho hodnota $\delta = 67,1$ ppm. Tento rozdíl naznačoval, že substituent X na uhlíku C-2 vykazuje silnější záporný indukční efekt než –NH₂ skupina. IČ spektrum **28** obsahovalo velmi silný absorpční pás při 987 cm⁻¹, které náleží –S=O skupině (**Příloha 11**). Hmotnost iontu [M – H]⁻ změřená pomocí ESI-TOF HRMS byla $202,0182$ Da (pro C₇H₈NO₄S je vypočítaná hmotnost $202,0180$ Da). Chemický posun, způsob štěpení jednotlivých NMR signálů (tři oddělené dublety dubletu) a interakční konstanty pyrrolylových –CH= vodíků jasně dokazovaly, že pyrrolové jádro je substituované v pozici 2. UV a CD spektra této látky byla téměř shodná se spektry 2-PyrrCSO, což naznačovalo stejnou absolutní konfiguraci okolo obou chirálních center (**Příloha 12**). Na základě výše uvedených dat bylo zřejmé, že izolovaná sloučenina je (*R*_S,*R*_C)-3-(2-pyrrolylsulfinyl)mléčná kyselina [(*R*_S,*R*_C)-2-hydroxy-3-(2-pyrrolylsulfinyl)propanová kyselina, 2-PyrrSLA, **28**] (**Obrázek 45**).

Tabulka 5: ^1H a ^{13}C NMR data 3-(2-pyrrolylsulfinyl)mléčné kyseliny (**28**, 2-PyrrSLA)

^1H NMR data	H-2	H-3a	H-3b	H-3'	H-4'	H-5'	
δ (ppm)	4,23	3,07	3,69	6,79	6,24	7,10	
intenzita signálu, multiplicita	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	1H, dd	
J (Hz)	10,5/3,0	10,5/13,3	13,3/3,0	1,5/3,8	2,7/3,8	1,5/2,7	
^{13}C NMR data	C-1	C-2	C-3	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
δ (ppm)	178,3	67,1	57,9	125,4	115,1	109,8	125,8



Obrázek 45: Chemická struktura 3-(2-pyrrolylsulfinyl)mléčné kyseliny (2-PyrrSLA)

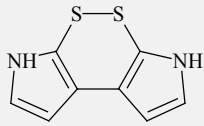
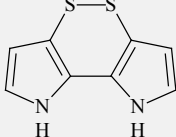
V modelové směsi obsahující 2-PyrrSLA (**28**) a alliinasu však ke vzniku barevných sloučenin nedocházelo. Lze tedy předpokládat, že tato látka není prekurzorem červeného zbarvení tvořícího se v cibuli obří. Vzhledem ke značné strukturální příbuznosti 2-PyrrSLA (**28**) s 2-PyrrCSO (**27**) se lze spíše domnívat, že 2-PyrrSLA je biochemickým prekurzorem 2-PyrrCSO (či naopak).

5.1.2 Struktura barevných látek vznikajících po narušení pletiva v cibuli obří

V další fázi byla pozornost zaměřena na izolaci a identifikaci hlavní červené sloučeniny, která se tvoří v macerátu cibulí *A. giganteum*. Tato sloučenina (**31**) vykazovala UV-Vis absorpční maximum při $\lambda = 519$ nm a měla shodná UV-Vis a ESI-MS spektra jako látka, která vznikla v modelové směsi sestávající z alliinasy a 2-PyrrCSO (**27**). Bohužel, všechny pokusy o izolaci této barevné sloučeniny pomocí preparativní HPLC byly neúspěšné. Ačkoli práce byly prováděny za velmi mírných podmínek, najímaný materiál se vždy částečně rozložil, a nebylo tudíž možné k jeho identifikaci použít standardní NMR měření. Kvůli vysoké nestabilitě této sloučeniny byla tedy její struktura určena pomocí ^1H LC-NMR a LC-HRMS. ESI-HRMS data naznačila sumární vzorec $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_2$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$, hodnota vypočtená pro $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{S}_2$ byla 192,9900 Da, naměřená 192,9898 Da). ^1H NMR spektrum této látky sestávalo pouze ze

dvou dubletů patřících páru vzájemně sdružených aromatických vodíků (viz **Tabulku 6** a **Přílohu 14**).

Tabulka 6: Porovnání spektroskopických dat látky 31 s daty uvedenými Jedelskou a kol.⁵⁸

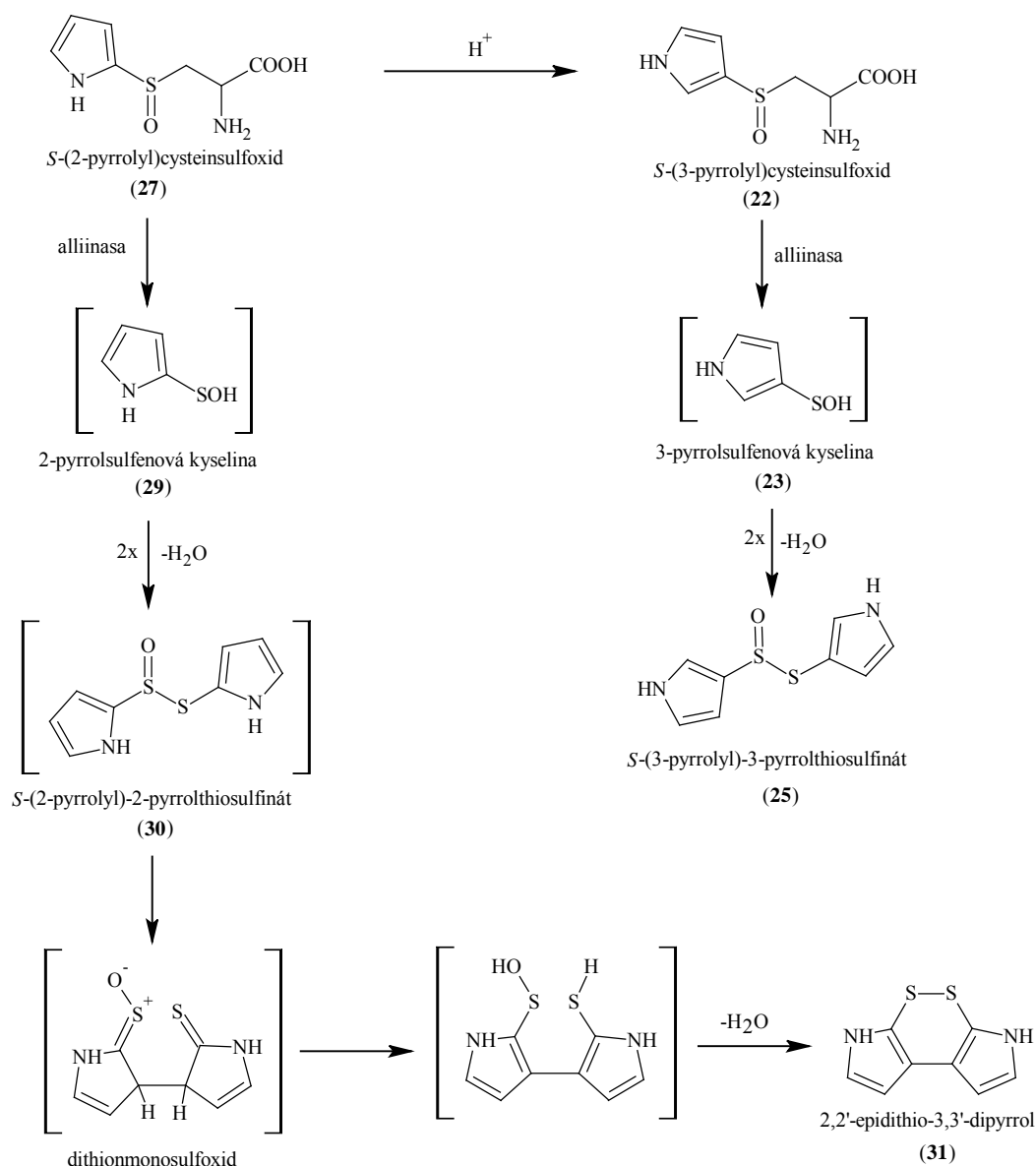
¹ H NMR data	tato práce	data uvedená Jedelskou a kol. ⁵⁸
δ (ppm)	6,36 (d); 6,48 (d)	6,28 (d); 6,43 (d)
J (Hz)	3,6	3,7
λ_{max} (nm)	519	518
navržená struktura		

Získaná spektroskopická data byla velmi podobná těm, která uvedli ve své práci Jedelská a kol.⁵⁸ pro červenou sloučeninu, kterou izolovali z cibulí *A. giganteum* (**Tabulka 6**). Strukturu této červené sloučeniny určili jako 3,3'-epidithio-2,2'-dipyrrol, protože (chybně) předpokládali, že prekurzorem červeného zbarvení je 3-PyrrCSO. Na základě námi zjištěných skutečností, především faktu, že skutečným prekurzorem červeného pigmentu je 2-PyrrCSO, je mnohem pravděpodobnější, že vznikající červená látka je 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol (alternativní název dipyrrolo[2,3-*d*:2',3'-*e*]-1,2-dithiin, **31**).

Je nutno poznamenat, že 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol (**31**) je sice zcela dominantní barevnou sloučeninou přítomnou v čerstvě připraveném homogenátu cibule obří, ale dále se spontánně rozkládá na celou řadu dalších, obtížně separovatelných sloučenin. Lze předpokládat, že tyto látky jsou oligomery **31**.⁵⁸

5.1.3 Mechanismus tvorby barevných látek v cibuli obří

2,2'-Epidithio-3,3'-dipyrrol (**31**) zřejmě vzniká katalytickým působením alliinasy na 2-PyrrCSO (**27**). Lze předpokládat, že při tomto enzymově katalyzovaném rozkladu 2-PyrrCSO primárně vzniká 2-pyrrolsulfenová kyselina (**29**), která následnou kondenzací poskytuje *S*-(2-pyrrolyl)-2-pyrrolthiosulfínát (**30**). Tento thiosulfínát poté spontánně (via [3,3]-sigmatropní přesmyk) poskytuje červený 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrol (**31**) (**Obrázek 46**).



Obrázek 46: Návrh mechanismu tvorby 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrolu v cibuli obří

Pro potvrzení předpokládaného mechanismu tvorby barevných látek v cibuli obří bylo provedeno několik modelových experimentů studujících rozklad 2-PyrrCSO (27) pomocí alliinasy. Okamžitě po přidavku alliinasy k roztoku 2-PyrrCSO došlo k tvorbě červeného zbarvení, ovšem kvůli mimořádně vysoké reaktivitě 2-pyrrolylsulfenové kyseliny (29) i thiosulfínátu 30 se tyto meziproducty pomocí HPLC detekovat nepodařilo. Proto pro potvrzení jejich tvorby byla využita technika DART-MS (direct analysis in real time mass spectrometry). Touto moderní analytickou technikou lze stanovit i velmi nestabilní sloučeniny s krátkou dobou existence. Při pozitivní ionizaci (PI-DART) byl detekován signál, který s velkou pravděpodobností příslušel thiosulfínátu 30. V negativním módu (NI-DART) byla detekována také 2-pyrrolylsulfenová kyselina (29)

(**Tabulka 7**). Oproti tomu v modelové směsi obsahující 3-PyrrCSO (**22**) (přirozeně se v cibuli obří nevyskytuje) a alliinasu vznikla pouze jediná sloučenina, a to *S*-(3-pyrrolyl)-3-pyrrolthiosulfinát (**25**), jenž vznikl kondenzací dvou molekul 3-pyrrol-sulfenové kyseliny (**23**). Oproti svému velmi reaktivnímu izomeru (**30**) byl tento thiosulfinát za daných podmínek stabilní, bylo možno jej detekovat pomocí HPLC a žádné barevné sloučeniny se z něho nevytvářely (**Obrázek 46**).

Tabulka 7: DART-MS data sloučenin vznikajících v *Allium giganteum*

sloučenina	molekulární iont	<i>m/z</i> spočítaná (Da)	<i>m/z</i> změřená (Da)
NI-DART			
30	[C ₄ H ₄ NOS] ⁻	114,0019	114,0016
PI-DART			
31	[C ₈ H ₈ N ₂ OS ₂ + H] ⁺	213,0151	213,0146
32	[C ₈ H ₆ N ₂ S ₂ + H] ⁺	195,0045	195,0041

pozn. zkratky vysvětleny na str. 58

5.1.4 Antimikrobiální aktivita barevných látek tvořících se v cibuli obří

Jedelská a kol.⁵⁸ pozorovali, že se větší množství červeného pigmentu tvoří v pletivu cibulí *A. giganteum* v blízkosti transportních cév. Vyslovili proto hypotézu, že tyto červené sloučeniny mohou plnit ochrannou funkci tím, že zabraňují mikrobiálnímu ataku poškozeného pletiva.

Kvůli značné nestabilitě a obtížím při izolaci jednotlivých barevných látek nebylo možné sledovat antimikrobiální aktivitu individuálních sloučenin, ale byl testován celý komplex látek vznikajících účinkem alliinasy na aminokyselinovou frakci (obsahující 2-PyrrCSO, **27**) izolovanou z cibule obří. Takto byly získány dvě modelové barevné směsi, a sice GIG1H (reakce probíhala 1 h) a GIG24H (reakce probíhala 24 h). Jako standard byl použit allicin (**7**), hlavní thiosulfinát česneku, jehož antimikrobiální účinky byly prokázány mnoha studiemi.^{90–102}

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tabulka 8: Průměr zón (mm) vytvořených interakcí testovaných látek s bakteriemi a kvasinkou

testované látky		GIG1H				GIG24H				allicin			
koncentrace (mg/ml)		8	4	2	1	8	4	2	1	8	4	2	1
bakterie	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	6	6	6	6	7	7	6	6	25	24	13	10
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatorium</i>	6	6	6	6	7	6	6	6	18	14	10	8
	<i>Erwinia amylovora</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	18	12	6	6
	<i>Micrococcus luteus</i>	7	6	6	6	7	6	6	6	10	6	6	6
	<i>Bacillus cereus</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6
	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	12	12	10	9
kvasinka	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	16	12	9	6

Tabulka 8 ukazuje přehled výsledků antimikrobiální aktivity testovaných sloučenin. Je zřejmé, že barevné látky vytvořené v cibuli obří nemají prakticky žádné antimikrobiální účinky. Průměr disků, na které byly sloučeniny nanášeny, byl 6 mm, tedy zóny aktivních vzorků by měly mít průměr ≥ 7 mm. Bakterie *Erwinia amylovora* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dokonce vytvořily kolonie přímo na discích obsahujících testované směsi.

Nebyly také nalezeny žádné výrazné rozdíly mezi účinky vzorků GIG1H a GIG24H. Ani jeden z nich nevykazoval účinky jak proti testovaným bakteriím, tak proti kvasince. Allicin byl použit jako referenční sloučenina a získané výsledky potvrzují jeho výraznou antimikrobiální aktivitu proti testované kvasince a většině bakterií (kromě *Bacillus cereus*).

Protiplísňová aktivita byla testována metodou stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) (**Tabulka 9**). U testovaného vzorku GIG1H nebyly stanoveny hodnoty MIC proti *Aspergillus niger* a *Rhizoctonia solani*, protože z důvodu omezené rozpustnosti vzorku nebylo možno připravit koncentrovanější roztok, který by nějakou aktivitu mohl vykazovat. Porovnáním výsledků obou testovaných vzorků je zřejmé, že

GIG24H vykazoval poněkud vyšší aktivitu než GIG1H, ačkoli v porovnání s allicinem je tato aktivita velmi nízká.

Tabulka 9: Minimální inhibiční koncentrace v µg/ml

testované plísňe	GIG1H	GIG24H	allicin
<i>Aspergillus niger</i>	–	50	4
<i>Rhizoctonia solani</i>	–	100	8
<i>Fusarium solani</i>	50	25	4

Biochemická funkce 2-PyrrCSO v cibuli obří

Předpokládá se, že *S*-substitované deriváty cysteinu v česnekovitých rostlinách slouží jako zásobní sloučeniny pro síru a dusík. Tyto aminokyseliny jsou zároveň prekurzory mnoha sloučenin (např. thiosulfínátů či slzotvorných sulfínů), které jsou důležité pro obranu rostlin. Na rozdíl od početných analogů, které se vyskytují v česneku a cibuli, pyrrolové sloučeniny vznikající enzymatickým rozkladem 2-PyrrCSO se nezdají být dostatečně těkavé, štiplavé nebo slzotvorné, aby přitahovaly opylovače nebo odpuzovaly predátory (hmyz, býložravce). Čili, 2-PyrrCSO a sloučeniny z něj vznikající tak pravděpodobně nemohou bezprostředně zabránit případným útokům predátorů. Zjištěná data o antimikrobiální aktivitě zároveň nenaznačují, že by tvorba barevných sloučenin při poškození pletiva cibule obří měla spojitost s ochranou rostliny proti napadení mikroorganismy, jak se domnívá Jedelská a spol.⁵⁸ Vzhledem k minimální antimikrobiální aktivitě lze předpokládat, že ochrana, pokud nějaká je, by mohla být spíše mechanická, než chemická. Vytvořením „strupu“ tvořeného červeným pigmentem by se mohlo mechanicky zabránit napadení mikroorganismy.

5.2 Tvorba barevných sloučenin v cibuli a póru

V reálných vzorcích česnekovitých zelenin je množství vznikajících barevných látek velmi malé, navíc se jedná o velmi komplexní, obtížně analyzovatelné směsi sloučenin. Proto byly při studiu tvorby těchto barevných látek použity modelové směsi sestávající z thiosulfínátů (syntetických či izolovaných z rostlinného materiálu) a aminokyselin.

5.2.1 Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v cibuli a v póru

Jak již bylo uvedeno v literárním přehledu, barevné látky vznikají v cibuli a póru reakcí thiosulfínátů obsahující 1-propenylovou skupinu s aminokyselinami. Na tvorbě těchto thiosulfínátů se však společně s isoalliinem (**4**) podílejí i ostatní přítomné *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy (**1–3**). Jejich enzymatickým rozkladem vznikají příslušné sulfenové kyseliny, které spolu navzájem kondenzují a tvoří tak symetrické a asymetrické thiosulfínáty (**Obrázek 48**). Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů (**1–4**) tedy zásadním způsobem ovlivňuje nejenom množství jednotlivých thiosulfínátů, které se z nich vytvoří, ale následně také množství a strukturu vznikajících barevných sloučenin.

Relativní zastoupení methiinu (**1**), propiinu (**2**), alliinu (**3**) a isoalliinu (**4**) ve zkoumaných vzorcích cibule a póru bylo stanoveno pomocí HPLC po předkolonové derivatizaci dansylchloridem. Zatímco v póru měl největší zastoupení isoalliin, cibule obsahovala největší množství methiinu (**Tabulka 10**). Ačkoli některé studie^{23–27} uvádějí, že je propiin přítomen v cibuli i v póru, ve vzorcích těchto zelenin použitých v této práci tato aminokyselina detekována nebyla.

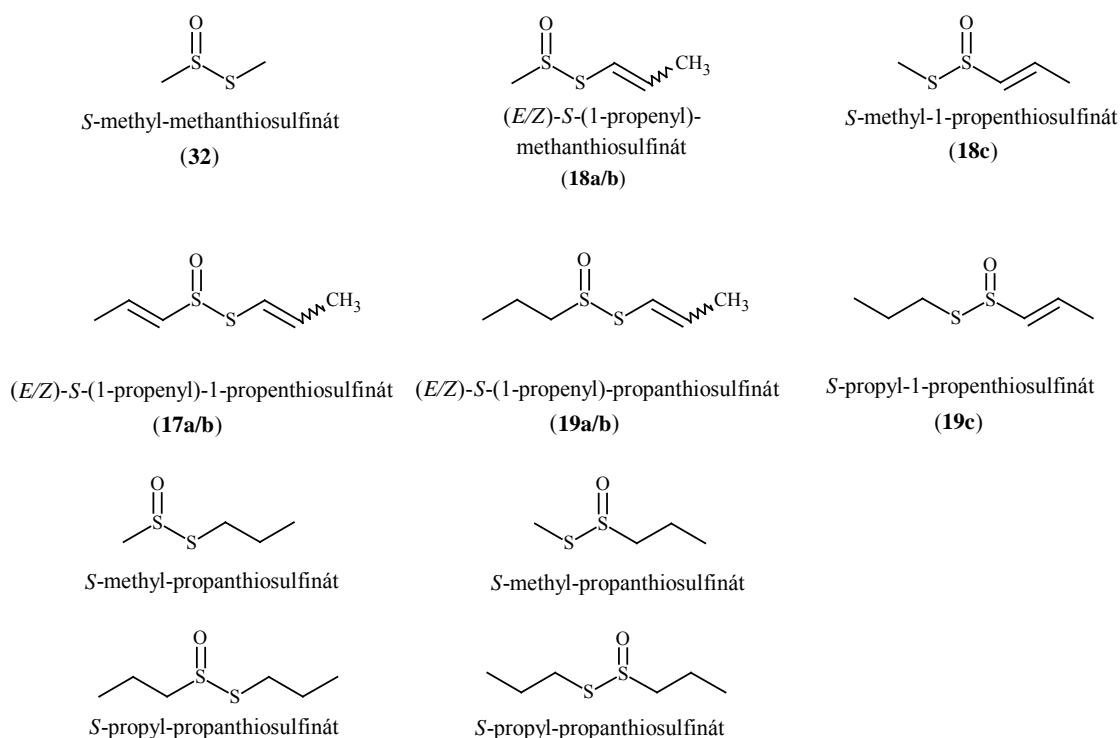
Tabulka 10: Zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v cibuli a v póru (rel. %)

	methiin	alliin	propiin	isoalliin
cibule	56	–	–	44
pór	41	–	–	59

5.2.2 Určení struktury barevných látek tvořících se v homogenátech cibule a póru

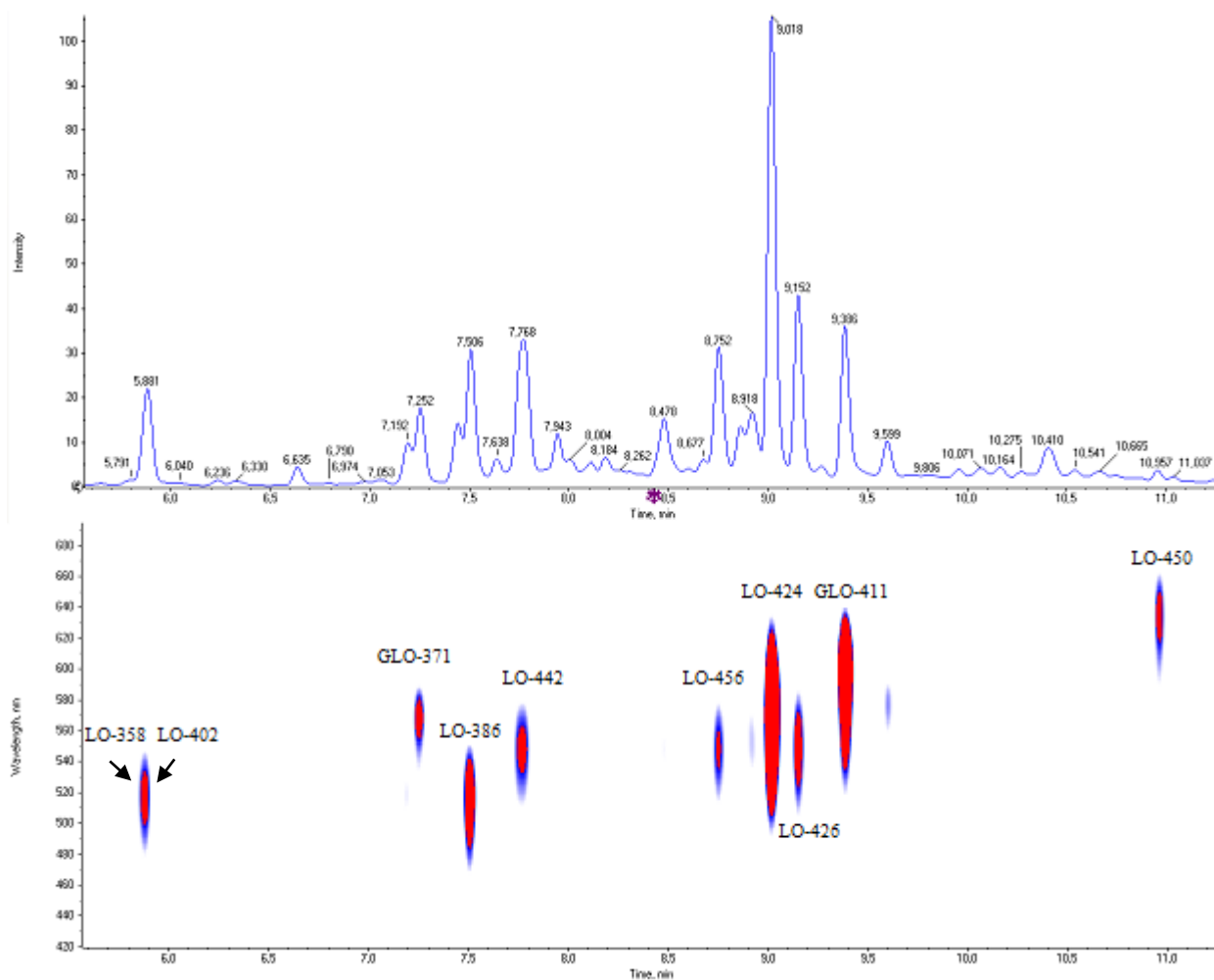
Relativní zastoupení obou *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů (**1** a **4**) je v póru a cibuli velmi podobné (**Tabulka 10**), a proto v homogenátech obou zelenin vznikají (za katalýzy alliinasou) podobné profily thiosulfínátů obsahující 1-propenylové a methylové skupiny

(17a,b, 18a–c, 32). V případě přítomnosti propiinu (2) lze očekávat ještě tvorbu thiosulfinátů obsahujících propylovou skupinu (19a–c) (Obrázek 47).



Obrázek 47: Thiosulfináty, které se převážně tvoří v cibuli a póru

Přirozeně se vyskytující směs thiosulfinátů byla izolována z homogenizované cibule resp. póru extrakcí diethyletherem. Inkubací těchto extraktů s alaninem (při pH 5,5) se během několika hodin vytvořil červený pigment. Analýzou těchto reakčních směsí pomocí HPLC bylo následně zjištěno, že jsou tvořeny mnoha barevnými sloučeninami, jejichž UV-Vis absorpční maxima se pohybovala v rozmezí 410–634 nm (Obrázek 48 a 49, Příloha 15). Vzhledem ke značné komplexnosti reakčních směsí byla další pozornost zaměřena na určení struktury pouze 14 nejvýznamnějších barevných látek. Většina z nich se vytvořila v macerátech obou druhů (póru i cibule), pouze jedna sloučenina (L-401) byla detekována výhradně v póru. Převážná většina níže popsaných barevných sloučenin vznikla také reakcí synteticky připravených thiosulfinátů s alaninem za stejných experimentálních podmínek, za kterých byly připraveny pigmenty z diethyletherových extraktů cibule a póru.

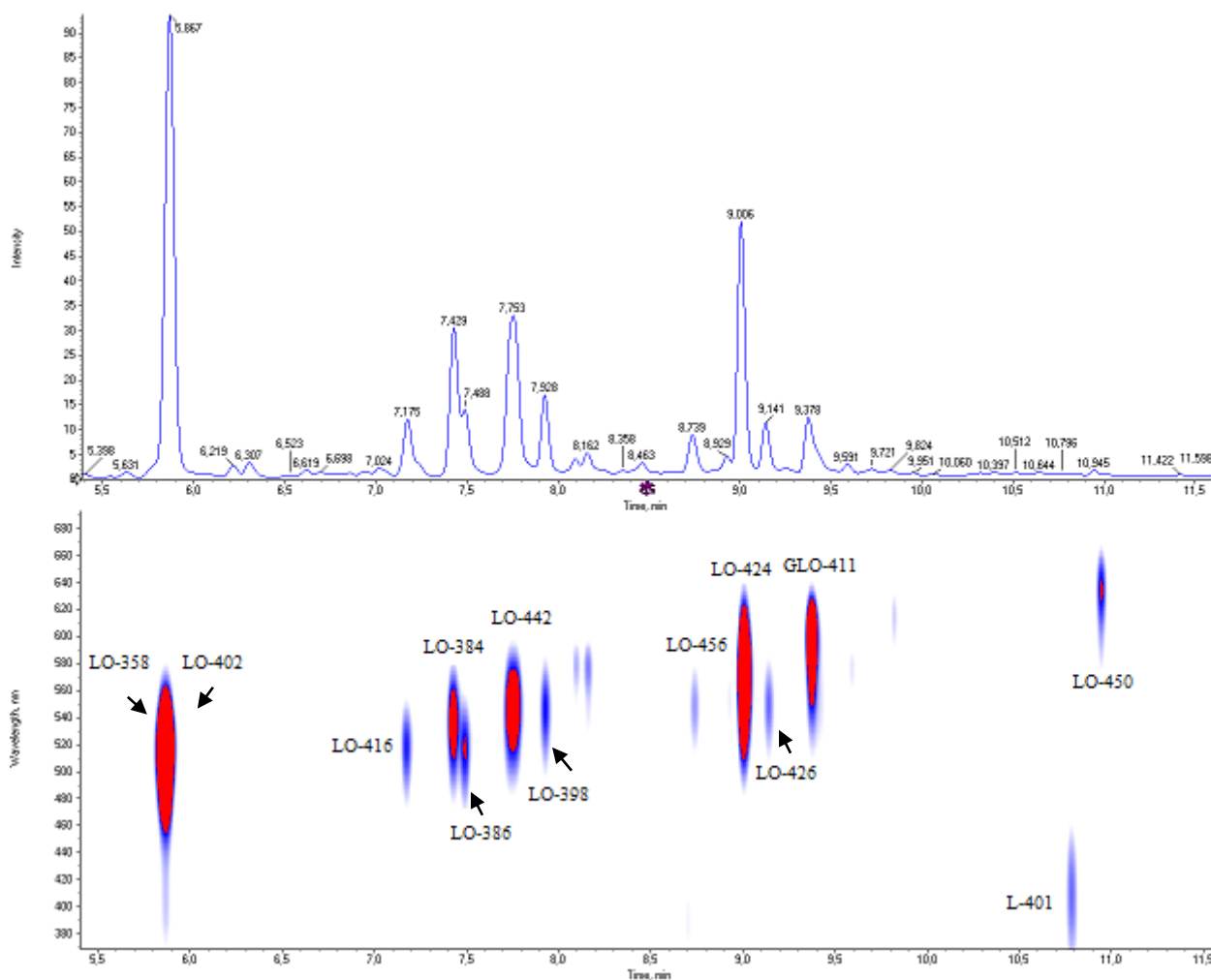


Obrázek 48: UHPLC chromatogram při 540 nm (nahore) a PDA záznam (dole) směsi pigmentů vytvořených v extraktu cibule s přísadkou alaninu (METODA H)

Pro lepší přehlednost označování studovaných sloučenin byl v této práci vytvořen systém pojmenování jednotlivých barevných látek na základě jejich výskytu v dané zelenině a jejich molární hmotnosti. První písmeno z názvu sloučeniny označuje přítomnost v daném druhu zeleniny. „G“ odpovídá česneku (z anglického „garlic“), „L“ odpovídá póru (z anglického „leek“) a „O“ odpovídá cibuli (z anglického „onion“). V případě výskytu dané látky v barevných směsích utvořených ve více druzích zeleniny je začátek názvu kombinací odpovídajících písmen. Číslo za pomlčkou označuje relativní molekulovou hmotnost dané sloučeniny (zjištěnou pomocí HRMS).

Obrázek 48 zobrazuje UHPLC chromatogram s 9 hlavními barevnými látkami, které vznikají při zpracování cibule a **Obrázek 49** zobrazuje UHPLC chromatogram s 13 hlavními barevnými látkami vznikajícími během zpracování póru. Z chromatogramů je zřejmé, že sloučeniny LO-358 a LO-402 mají stejný retenční čas,

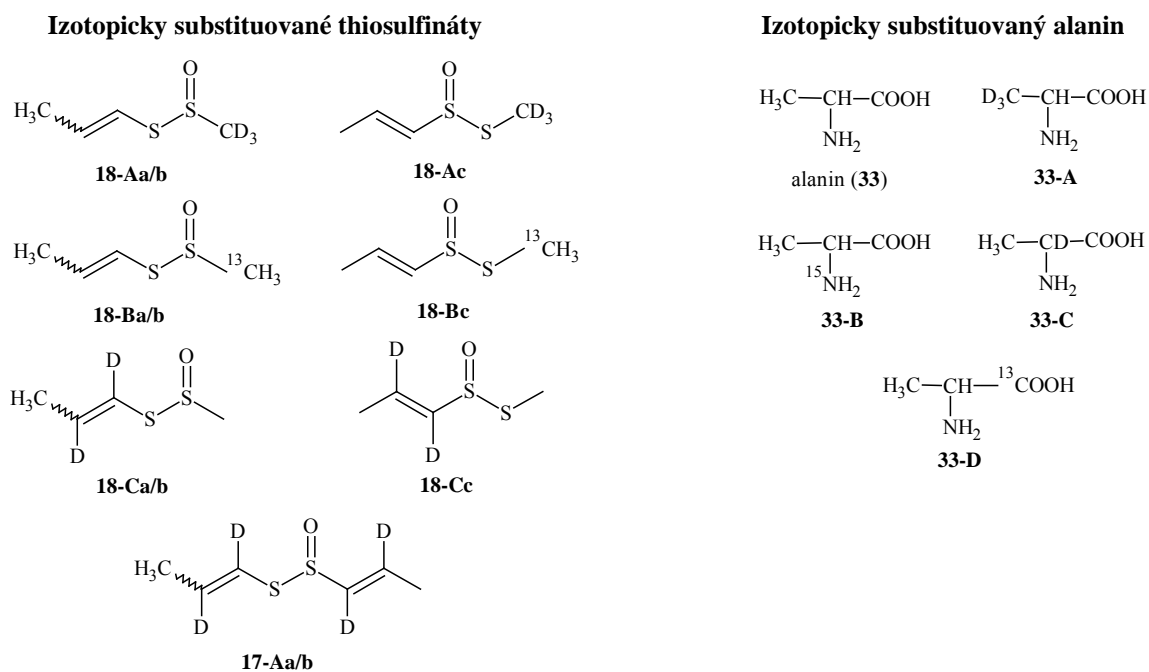
stejně absorpční maximum ($\lambda_{max} = 518 \text{ nm}$), avšak jedná se o dvě různé sloučeniny, které se od sebe nepodařilo separovat.



Obrázek 49: UHPLC chromatogram při 540 nm (nahore) a PDA záznam (dole) směsi pigmentů vytvořených v extraktu póru s přidavkem alaninu (METODA H)

V **Tabulce 10** jsou uvedena HRMS data barevných látek vznikajících reakcí diethyletherového extraktu cibule nebo póru s alaninem. Kombinací MS dat získaných v pozitivním a negativním módu ionizace bylo možné jednoznačně určit elementární složení studovaných sloučenin. Jak je z **Tabulky 10** patrné, všechny barevné látky obsahují alespoň dvacet atomů uhlíku a vždy dva atomy dusíku a čtyři nebo pět atomů kyslíku. Jejich obecný sumární vzorec je tedy buď $C_xH_yN_2O_4$, nebo $C_xH_yN_2O_5$ ($x = 20-26$, $y = 27-37$). Je zajímavé, že ačkoliv prekurzory těchto látek jsou sírné sloučeniny (thiosulfináty uvedené na **Obrázku 47**), ve vzniklých barevných produktech síra přítomna není. S ohledem na již publikované práce jiných autorů⁵³ bylo možné předpokládat, že na tvorbě jednotlivých barevných látek se vždy podílí dvě molekuly

alaninu (přispívající celkem dvěma atomy dusíku, čtyřmi atomy kyslíku, deseti atomy vodíku a šesti atomu uhlíku). Tato prvotní hypotéza byla následně ověřena pomocí experimentů s několika selektivně izotopicky substituovanými thiosulfináty (**17A**, **18A–C**) a izotopicky substituovaným alaninem (**33A–D**). Na **Obrázku 50** jsou uvedeny struktury jednotlivých izotopově substituovaných sloučenin využitých v těchto experimentech.



Obrázek 50: Izotopově substituované sloučeniny využité v modelových experimentech

Tabulka 11: HRMS data pigmentů vytvořených v cibulovém a pórovém extraktu po reakci s alaninem

sloučenina	retenční čas (min)	λ_{max} (nm)	ESI+					ESI-				
			<i>m/z</i> změřená (Da)	<i>m/z</i> spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB	<i>m/z</i> změřená (Da)	<i>m/z</i> spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
LO-358	5,89	518	359,1972	359,1965	1,9	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ O ₄	9	357,1800	357,1820	5,5	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₄	9
LO-402	5,89	518	403,2233	403,2227	1,4	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₅	9	401,2083	401,2082	0,5	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₅	9
LO-416	7,19	520	417,2395	417,2384	2,6	C ₂₃ H ₃₃ N ₂ O ₅	9	415,2239	415,2238	0,1	C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₅	9
GLO-371	7,26	568	371,1973	371,1965	2,1	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₄	10	369,1820	369,1820	0,1	C ₂₁ H ₂₅ N ₂ O ₄	10
LO-384	7,45	535	385,2133	385,2122	2,9	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₄	10	383,1793	383,1976	0,9	C ₂₂ H ₂₇ N ₂ O ₄	10
LO-386	7,51	517	387,2288	387,2278	2,5	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₄	9	385,2137	385,2133	1,6	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₄	9
LO-442	7,77	548	443,2546	443,254	1,2	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₅	10	441,2396	441,2395	0,2	C ₂₅ H ₃₃ N ₂ O ₅	10
LO-398	7,93	546	399,2287	399,2278	2,2	C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₄	10	397,2127	397,2133	1,5	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄	10
LO-456	8,76	548	457,2706	457,2697	2,0	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₅	10	455,2545	455,2551	1,4	C ₂₆ H ₃₅ N ₂ O ₅	10
LO-424	9,02	570	425,2442	425,2435	1,7	C ₂₅ H ₃₃ N ₂ O ₄	11	423,2290	423,2289	1,0	C ₂₅ H ₃₁ N ₂ O ₄	11
LO-426	9,16	548	427,2600	427,2591	2,0	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ O ₄	10	425,2444	425,2446	0,4	C ₂₅ H ₃₃ N ₂ O ₄	10
GLO-411	9,39	600	411,2288	411,2278	2,6	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₄	11	409,2133	409,2133	0,4	C ₂₄ H ₂₉ N ₂ O ₄	11
L-401*	10,79	410	401,2078	401,2071	1,7	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₅	10	399,1935	399,1925	2,4	C ₂₂ H ₂₇ N ₂ O ₅	10
LO-450	10,96	634	451,2603	451,2591	2,3	C ₂₇ H ₃₅ N ₂ O ₄	12	449,2441	449,2446	1,7	C ₂₇ H ₃₃ N ₂ O ₄	12

* barevná sloučenina vytvořená pouze v póru
pozn. vysvětlení zkratk viz Seznam zkratk

Tabulka 12 znázorňuje přehled modelových směsí, ve kterých vznikají jednotlivé barevné látky. Ačkoli sloučenina L-401 vzniká v reálném extraktu z póru, v modelových směsích nebyla nalezena (lze tedy předpokládat, že jejími prekurzory jsou kromě thiosulfínátů a alaninu ještě jiné sloučeniny přítomné v homogenizovaném póru).

Tabulka 12: Tvorba barevných látek v modelových reakčních směsích

sloučenina	modelová směs thiosulfínátů + alanin			
	1-PeS(O)SMe (18)	1-PeS(O)SPe (17)	1-PeS(O)SPr (19)	1-PeS(O)SAlI (20)
LO-358	×			
LO-402	×			
LO-416	×			
GLO-371	×	×	×	×
LO-384	×			
LO-386	×			
LO-442	×			
LO-398	×			
LO-456	×		×	
LO-424	×			
LO-426	×			
GLO-411		×	×	×
L-401*				
LO-450		×	×	

* látka detekována pouze v homogenátu póru s alaninem
pozn. zkratky thiosulfínátů viz Seznam zkratek

Struktura sloučeniny GLO-371

Všechny barevné roztoky připravené reakcí alaninu s diethyletherovými extrakty česneku, póru a cibule obsahovaly dvě společné barevné sloučeniny (GLO-371 a GLO-411). Struktura jedné z nich, GLO-371, již byla částečně popsána Imaiem a kol.,⁵³ kterým se ale tuto sloučeninu nepovedlo izolovat, a tedy plně spektrálně charakterizovat.

UV-Vis absorpční maximum této sloučeniny je $\lambda_{max} = 568$ nm. Rozpuštěním v methanolu tvoří fialový roztok, ve kterém je za velmi nízkých teplot (-28 °C) relativně stabilní. V čistém stavu je však jako pevná látka velmi nestabilní, rozloží se během několika hodin na nebarevné látky i při teplotě -28 °C. ESI(+)-HRMS data GLO-371 odpovídají sumárnímu vzorci $C_{21}H_{27}N_2O_4$ (zjištěná $M_r = 371,1973$ Da; vypočítaná 371,1965 Da).

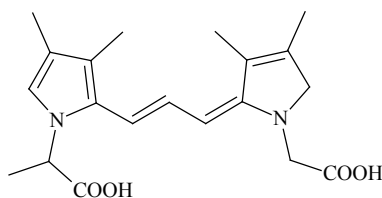
Experimenty s využitím různě izotopicky substituovaného alaninu (**33A–D**) jednoznačně potvrdily, že se na tvorbě GLO-371 podílí dvě molekuly této aminokyseliny. Detailní analýza jednotlivých HRMS a HRMS/MS spekter následně odhalila, že tyto dvě molekuly alaninu jsou do struktury GLO-371 zabudovány tak, aniž by u nich došlo k jakékoliv strukturní modifikaci (s výjimkou odštěpení čtyř atomů vodíku z obou $-\text{NH}_2$ skupin) (**Tabulka 13**).

Tabulka 13: ESI(+)-HRMS data sloučeniny GLO-371 vytvořené v modelových směsích s izotopicky substituovanými prekurzory

izotopově substituovaný prekurzor	m/z změřená (Da)	m/z spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec
(3- D_3)Ala (33-A)	377,2351	377,2342	2,3	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}^2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$
(^{15}N)Ala (33-B)	373,1909	373,1906	0,8	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}^{15}\text{N}_2\text{O}_4$
(2- D)Ala (33-C)	373,2101	373,2091	2,6	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}^2\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4$
(1- ^{13}C)Ala (33-D)	373,2046	373,2032	3,7	$\text{C}_{19}^{13}\text{C}_2\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$
$\text{CD}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_3$ (18-A a/b/c)	371,1986	371,1965	5,6	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$
$^{13}\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_3$ (18-B a/b/c)	371,1984	371,1965	5,0	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$
$\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCD}=\text{CDCH}_3$ (18-C a/b/c)	372,2036	372,2028	2,1	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}^2\text{HN}_2\text{O}_4$
$\text{CH}_3\text{CD}=\text{CDS}(\text{O})\text{SCD}=\text{CDCH}_3$ (17-A a/b)*	372,2031 (373,2088)	372,2028 (373,2091)	0,8	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}^2\text{HN}_2\text{O}_4$ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}^2\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4$

*v této směsi byly zaznamenány dvě hodnoty m/z , pro něž odpovídají dva různé molekulové vzorce

Tato zjištění jsou v rozporu s prací Leea a kol.,¹⁰³ kteří navrhli struktury několika červených sloučenin vznikajících při zpracování cibule, ve kterých u jedné ze dvou navázaných aminokyselin došlo k významné modifikaci jejího skeletu (viz **Obrázek 51**). Také Shannon a kol.⁴⁰ uvedli, že při zabudování aminokyselin do sloučeniny je jedna z nich dekarboxylována. Ovšem naše experimenty za využití $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{COOH}$ (**33-D**) potvrdily přítomnost obou karboxylových uhlíků navázaných v molekule GLO-371 (viz **Přílohu 16**).

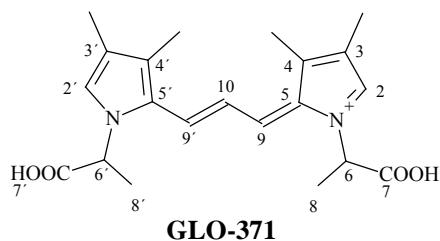


Obrázek 51: Struktura červeného sloučeniny navržená Leeem a kol.¹⁰³

GLO-371 byla také detekována v modelových směsích, které vznikly reakcí alaninu s $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})\text{SR}$, kde R je $-\text{CH}_3$ (**18a/b/c**), $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (**20a/b/c**), $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$ (**17a/b**) nebo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (**19a/b/c**). Tvorba této látky v modelových směsích

neobsahujících allylovou skupinu tak dokazuje, že pro vznik GLO-371 není allicin nezbytným prekurzorem. Toto zjištění je v rozporu se závěry studie Imaie a kol.,⁵³ kteří předpokládali, že tříuhlíkatý můstek mezi dvěma pyrrolovými jádry v GLO-371 je vytvořen právě reakcí allicinu či jeho rozkladných produktů. Modelová reakce alaninu s $^{13}\text{C}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_3$ (**18-Ba/b/c**) vyloučila také methiin (**1**) jako možného kandidáta na jednoho z prekurzorů tvorby GLO-371. Jelikož se M_r GLO-371 vzniklého z tohoto izotopově značeného thiosulfinátu nezměnila, bylo zřejmé, že se do jeho molekuly nezabudoval žádný uhlík pocházející z methylové části použitého thiosulfinátu. V modelové směsi vzniklé reakcí alaninu s $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCD}=\text{CDCH}_3$ (**18-Ca/b/c**) byla detekována hodnota m/z této sloučeniny o 1 Da vyšší, což naznačilo zabudování jednoho atomu deuteria do molekuly GLO-371 (**Tabulka 13**). Z toho vyplývá, že prekurzorem propenylenového můstku spojující dvě pyrrolová jádra bude thiosulfinát obsahující 1-propenylovou skupinu.

^1H NMR spektrum GLO-371 obsahovalo signály celkem sedmi magneticky neekvivalentních skupin vodíků [tři singlety, dva dublety, jeden dublet dubletu a jeden kvadruplet, (**Tabulka 14**)]. Hodnoty chemických posunů v aromatické části molekuly GLO-371 se téměř shodují s hodnotami pro sloučeninu PUR-1 (viz **Obrázek 25**), které ve své práci uvedli Imai a kol.⁵³ Bohužel, kvůli mimořádně vysoké nestabilitě a nízkému výtěžku GLO-371 se nepodařilo získat dostatečné množství materiálu na změření ^{13}C NMR spekter, přesto se na základě výsledků našich experimentů a závěrů Imaie a kol.⁵³ zdá velmi pravděpodobné, že sloučenina GLO-371 je (2*E*)-1-(karboxyethyl)-2-[(2*E*)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden]-3,4-dimethyl-2*H*-pyrrolium (**Obrázek 52**).



Obrázek 52: Pravděpodobná struktura látky GLO-371

Tabulka 14: ¹H NMR data látky GLO-371

¹ H NMR data	H-2	H-3Me	H-4Me	H-6	H-8	H-9	H-10
δ (ppm)	7,68	2,02	2,41	5,05	1,75	7,89	7,36
intenzita signálu, multiplicita	1H, s	1H, s	1H, s	1H, q	1H, d	1H, d	1H, dd
J (Hz)				7,1	7,1	13,4	13,4
	H-2	H-3'Me	H-4'Me	H-6'	H-8'	H-9'	
δ (ppm)	7,68	2,02	2,41	5,05	1,75	7,89	
intenzita signálu, multiplicita	1H, s	1H, s	1H, s	1H, q	1H, d	1H, d	
J (Hz)				7,1	7,1	13,4	

Struktura sloučeniny LO-358

Struktura této červené sloučeniny byla určena porovnáním HRMS/MS spekter modelových směsí, směsí obsahujících selektivně izotopicky substituovaný alanin a modelových směsí obsahujících izotopicky substituované thiosulfináty. Plná charakteristika této látky (např. pomocí NMR spektroskopie) nebyla možná vzhledem k velmi nízkému výtěžku, její vysoké nestabilitě a v neposlední řadě také proto, že se sloučeninu LO-358 nepodařilo separovat od sloučeniny LO-402, která měla shodný retenční čas i absorpční maximum.

UV-Vis absorpční maximum LO-358 bylo $\lambda_{max} = 518$ nm a její retenční čas při UHPLC separaci za použití METODY H byl 5,89 min. Jejím rozpuštěním v methanolu vznikl červený roztok, ve kterém byla LO-358 i za nízkých teplot velmi nestabilní, byl pozorován velký úbytek této sloučeniny během pěti měsíců při skladování v mrazicím boxu (−28 °C).

ESI(+)-HRMS data ukazovala na sumární vzorec C₂₀H₂₇N₂O₄ s hodnotou [M + H]⁺ 359,1972 Da (vypočítaná 359,1965 Da). Tato sloučenina byla také detekována v modelové barevné směsi, která vznikla reakcí alaninu s CH₃CH=CHS(O)SCH₃ (**18a/b/c**). Z modelové reakce alaninu s izotopicky substituovaným thiosulfinátem ¹³CH₃S(O)SCH=CHCH₃ vzešla sloučenina LO-358 s pozměněnou molekulovou hmotností. Molekulová hmotnost [M + H]⁺ se změnila o 2 Da, což naznačovalo sumární vzorec C₁₈¹³C₂H₂₇N₂O₄ (zjištěná hodnota *m/z* 361,2053 Da, vypočítaná 361,2032 Da). Dva uhlíky této sloučeniny tedy nepochybně pocházely z methylové části thiosulfinátu,

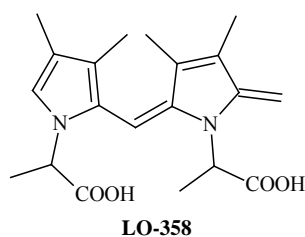
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

a lze tedy potvrdit methiin (**1**) jako další prekurzor pro tvorbu LO-358. Experimenty s izotopicky substituovaným alaninem jednoznačně potvrdily, že součástí jedné molekuly LO-358 jsou dvě molekuly aminokyseliny, u kterých během jejich zabudování nedošlo k žádným strukturálním změnám (kromě ztráty všech $-NH_2$ vodíků). V reakční směsi obsahující substituované thiosulfínáty **18-Aa/b/c** nebo **18-Ca/b/c** nedošlo ke změnám relativní molekulové hmotnosti této látky. Ačkoli byla prokázána přítomnost uhlíku pocházejícího z methiinu, výsledky s **18-Aa/b/c** [$CD_3S(O)SCH=CHCH_3$] nepotvrdily přítomnost atomů deuteria v LO-358. Vysvětlením by mohlo být, že během reakce dochází k výměně těchto kyselých vodíků s rozpouštědlem, proto z výsledků s **18-Aa/b/c** nelze dělat jednoznačné závěry (**Tabulka 15, Příloha 16**).

Tabulka 15: HRMS data LO-358 vytvořené v modelových směsích obsahující izotopicky substituované prekurzory

izotopově substitovaný prekurzor	<i>m/z</i> změřená (Da)	<i>m/z</i> spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec
(3- D_3)Ala (33-A)	365,2353	365,2342	0,5	$C_{20}H_{21}^2H_6N_2O_4$
(^{15}N)Ala (33-B)	361,1918	361,1906	3,3	$C_{20}H_{27}^{15}N_2O_4$
(2- D)Ala (33-C)	361,2104	361,2091	3,5	$C_{20}H_{25}^2H_2N_2O_4$
(1- ^{13}C)Ala (33-D)	361,2039	361,2032	1,9	$C_{18}^{13}C_2H_{27}N_2O_4$
$CD_3S(O)SCH=CHCH_3$ (18-A a/b/c)	359,1972	359,1965	1,9	$C_{20}H_{27}N_2O_4$
$^{13}CH_3S(O)SCH=CHCH_3$ (18-B a/b/c)	361,2053	361,2032	5,7	$C_{18}^{13}C_2H_{27}N_2O_4$
$CH_3S(O)SCD=CDCH_3$ (18-C a/b/c)	359,1972	359,1965	1,9	$C_{20}H_{27}N_2O_4$

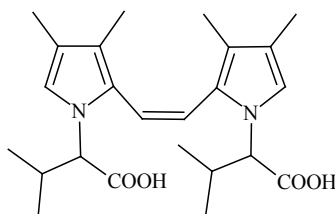
Na základě porovnání jednotlivých fragmentů HRMS/MS spektra bez značených atomů ve sloučenině se spektry obsahující výše zmíněné izotopicky značené atomy lze usoudit, že struktura LO-358 je pravděpodobně 2- $\{(E)-[1-(1\text{-karboxyethyl})-3,4\text{-dimethyl-5-methyliden-1,5-dihydro-2}H\text{-pyrrol-2-yliden]methyl}\}$ -3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina (**Obrázek 53**).



Obrázek 53: Pravděpodobná struktura sloučeniny LO-358

Lee a kol.¹⁰³ identifikovali v roztoku obsahujícím extrakt thiosulfinátů z cibule a alanin červenou sloučeninu ($\lambda_{max} = 505$ nm), jejíž molekulová hmotnost byla stejná jako M_r látky LO-358 ($[M + H]^+ = 359,1979$ Da). Na základě HRMS dat navrhli strukturu této látky (**Obrázek 52**), přičemž se nechali inspirovat návrhy Imaie a kol.⁵³ a předpokládali, že můstek mezi dvěma pyrrolovými jádry je tvořen třemi uhlíky a u jedné z aminokyselin došlo k odštěpení $-CH_3$ skupiny. Tato barevná látka měla ovšem téměř identickou MS/MS fragmentaci jako sloučenina LO-358 detekovaná v této práci. Jak již bylo uvedeno výše, experimenty s izotopicky substituovaným alaninem jednoznačně potvrdily přítomnost $-CH_3$ skupiny v obou molekulách aminokyseliny zakomponovaných v této červené sloučenině. Mimoto u takto vysoce konjugovaného systému lze předpokládat vyšší hodnotu λ_{max} , protože výše popsaná látka GLO-371 (má podobně konjugované π -elektrony) má absorpční maximum kolem 570 nm, což je o cca 50 nm více, než bylo naměřeno u této červené sloučeniny. Proto je pravděpodobnější, že chemická struktura červené látky izolované a charakterizované Leem a kol.¹⁰³ spíše odpovídá LO-358 (**Obrázek 53**).

Kato a kol.⁴⁷ připravili červenou sloučeninu (kterou označili α) pomocí modelových reakcí isoalliinu (**4**), alliinasy, formaldehydu (**12**) a valinu. Vědci určili pravděpodobnou strukturu vzniklé červené látky na základě HRMSⁿ spekter (**Obrázek 54**). Tato červená sloučenina, jejíž sumární vzorec byl $C_{24}H_{34}N_2O_4$, měla stejnou aromatickou část struktury s LO-358, jen byl místo alaninu navázán valin. Tomuto tvrzení odpovídalo i stejné absorpční maximum látky α a LO-358. Rovněž HRMS/MS spektra obou sloučenin byla velmi podobná – hmotnosti fragmentů se lišily pouze o rozdíl hmotnosti mezi navázanými aminokyselinami.



Obrázek 54: Struktura růžového pigmentu α navržená vědci Katem a kol.⁴⁷

Při porovnání HRMS/MS spekter LO-358 se sloučeninou α (ve sloučenině α by byl místo valinu navázán alanin) došlo k jistým nesrovnalostem při určování struktury jednoho z fragmentů. Při pozitivní ionizaci vznikl z LO-358 mimo jiné fragment

$[M + H]^+$ s hodnotou 136,1117 Da a relativní intenzitou 24 %. Z analýzy fragmentů obsahujících izotopicky značené atomy vyplývá, že fragment sestává z pyrrolylu, dekarboxylované aminokyseliny a pouze jednoho ze dvou uhlíků pocházejících z methiinu (**Tabulka 16, Příloha 12**). Z uvedených skutečností vyplývá, že není možné přiřadit odpovídající strukturu tomuto fragmentu ve sloučenině α , a je tedy velmi nepravděpodobné, že by pyrrolová jádra ve sloučenině byla spojena dvěma uhlíky, jak navrhuje Kato a spol. Lze se tedy domnívat, že skutečná struktura LO-358 spíše odpovídá návrhu uvedenému na **Obrázku 53**.

Tabulka 16: HRMS/MS data jednoho z fragmentů sloučeniny LO-358

prekurzor	m/z fragmentu změřená (Da)
Ala (33)	136,1117
(3-D ₃)Ala (33-A)	139,1276
(¹⁵ N)Ala (34-B)	137,1091
(2-D)Ala (33-C)	137,1187
(1- ¹³ C)Ala (33-D)	136,1118
¹³ CH ₃ S(O)SCH=CHCH ₃ (18-B a/b/c)	137,1151

Struktura ostatních barevných sloučenin

Struktura ostatních sloučenin byla také navržena na základě detailního studia HRMS/MS spekter modelových směsí, směsí obsahujících selektivně izotopicky substituovaný alanin a modelových směsí obsahujících izotopicky substituované thiosulfináty. Plná charakteristika barevných látek např. pomocí NMR spektroskopie nebyla možná vzhledem k obtížné HPLC separovatelnosti jednotlivých sloučenin, které navíc často vykazovaly značnou nestabilitu i při nízkých teplotách (−28 °C), což neumožnilo použití preparativní HPLC.

UHPLC-HRMS charakteristiku hlavních barevných sloučenin tvořících se v cibuli a póru zobrazuje **Tabulka 11**. Přehled ESI(+)-HRMS dat nejvýznamnějších barevných sloučenin, které vznikly v modelových směsích obsahujících izotopicky substituované prekurzory nabízí **Tabulka 17**. Ze získaných dat je zřejmá významná role methiinu (**1**) jako jednoho z dalších prekurzorů pro tvorbu těchto barevných látek. Z modelové reakce alaninu s izotopicky substituovaným ¹³CH₃S(O)SCH=CHCH₃ (**18-Ba/b/c**) vznikly některé sloučeniny s pozměněnou molekulovou hmotností. Pouze M_r sloučenin GLO-371 a LO-411 zůstaly beze změny. Tento výsledek naznačoval, že tyto látky ve své struktuře neobsahují uhlík pocházející z methylové části thiosulfinátu. Oproti tomu se $[M + H]^+$ sloučeniny LO-398 změnila o 2 Da, což naznačovalo sumární vzorec

$C_{21}^{13}C_2H_{31}N_2O_4$. Z toho vyplývá, že dva uhlíky této barevné sloučeniny pocházely z methylové části thiosulfinátu. Molekulové hmotnosti ostatních látek (LO-402, LO-416, LO-384, LO-386, GLO-442, LO-456, LO-424, LO-426 a L-401) vzrostly o 1 Da, což naznačovalo přítomnost jednoho uhlíku, který pocházel primárně z methiinu. Sloučenina LO-450 nebyla detekována ani ve směsi $CH_3S(O)SCH=CHCH_3$ s alaninem, proto je zřejmé, že ve své struktuře nebude obsahovat uhlík pocházející z methiinu (**Tabulka 17**).

Zabudování dvou atomů deuteria při reakci s $CH_3S(O)SCD=CDCH_3$ (**18-Ca/b/c**) se projevilo u sloučenin LO-402, LO-416, LO-384, LO-386 a LO-398, čímž se u těchto látek prokázala přítomnost jednoho tříuhlíkatého řetězce pocházejícího z 1-propenylové části thiosulfinátu. U sloučenin LO-442, LO-456, LO-424, LO-426 a GLO-411 došlo ke zvýšení molekulové hmotnosti o 4 Da, což naznačovalo přítomnost dvou řetězců pocházejících z 1-propenylové části thiosulfinátu. Experimenty s izotopicky substituovaným alaninem jednoznačně potvrdily, že do všech barevných sloučenin jsou zabudovány dvě aminokyseliny bez jakýchkoli strukturálních změn (kromě odštěpení vodíků z obou $-NH_2$ skupin).

Je tedy zřejmé, že tyto barevné sloučeniny budou strukturálně velmi podobné. Společný základ všech barevných sloučenin tedy pravděpodobně tvoří dvě molekuly 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny. Tyto dvě molekuly obsahují celkem 18 atomů uhlíku a vytvořené barevné sloučeniny jsou kombinací těchto dvou molekul a jedno- nebo tříuhlíkatých řetězců navázaných na jednotlivá pyrrolylová jádra v polohách 2 a/nebo 5.

U dvou sloučenin (LO-416 a LO-456) bylo z HRMS dat patrné, že měly ve své struktuře zabudované ještě dvě methylové skupiny mimo základní skelet, ačkoli ve směsi obsahující $^{13}CH_3S(O)SCH=CHCH_3$ (**18-Ba/b/c**) se hodnota jejich M_r jejich zvýšila pouze o 1 Da. Z **Tabulky 17** je dále zřejmé, že tyto sloučeniny obsahují mimo základní skelet ještě jeden atom kyslíku nebo jednu $-OH$ skupinu. Z HRMS/MS spekter obou sloučenin lze vyčíst, že při fragmentaci dochází k odštěpení CH_3O- skupiny, přičemž právě uhlík v této methoxy skupině není izotopicky substituovaný. Je možné, že tyto dvě látky vznikly jako artefakt (během izolace nebo UHPLC analýzy) adicí methanolu na některou z dvojných vazeb jiné barevné sloučeniny (**Obrázek 58**).

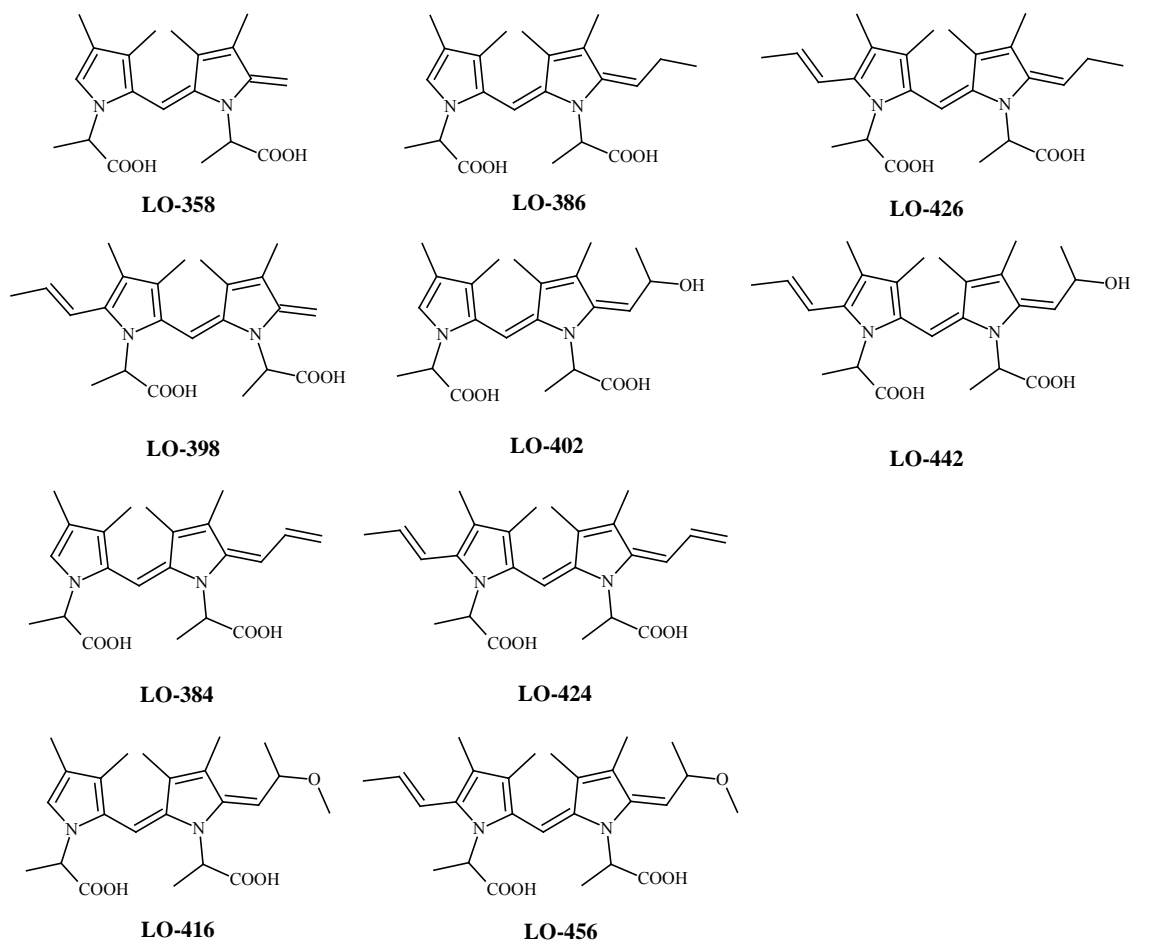
Struktury barevných látek byly navrženy na základě informací publikovaných v odborné literatuře,⁵³ další informace byly získány z fragmentace látky GLO-371 a nejzásadnější informace o struktuře poskytly HRMS/MS spektra jednotlivých sloučenin. Díky izotopicky substituovaným prekurzorům barevných látek bylo možné sestavit fragmenty jednotlivých molekul (viz **Přílohu 16**) a tím získat pravděpodobné struktury barevných sloučenin (**Obrázek 55**). Ačkoli má látka L-401 podobné chromatografické vlastnosti jako ostatní pigmenty, její struktura bohužel nebyla na základě dostupných informací objasněna. Zřejmě by se mohlo jednat o produkt vzniklý rozkladem některé z jiných barevných sloučenin. Tato látka rovněž nebyla detekována v žádné z barevných směsí připravených modelovou reakcí thiosulfinátů s alaninem.

Tabulka 17: ESI(+)-HRMS data barevných látek v reálné směsi a ve směsích obsahujících izotopicky substituované prekurzory

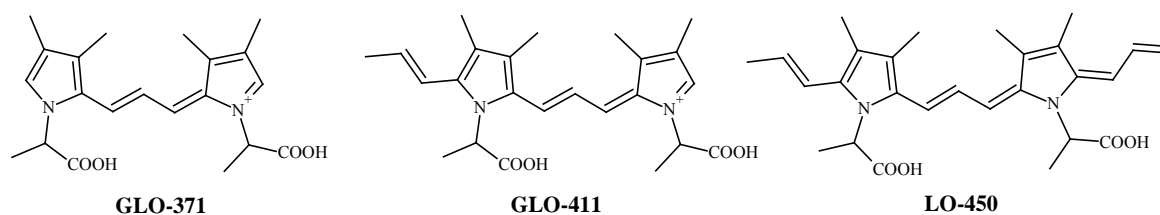
sloučenina	neznačené prekurzory	$^{13}\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_3$ (18-B a/b/c)	$\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCD}=\text{CDCH}_3$ (18-C a/b/c)	(3-D ₃)Ala (34-A)	(^{15}N)Ala (34-B)	(2-D)Ala (34-C)	(1- ^{13}C)Ala (34-D)	základní skladba podjednotek
	změřená <i>m/z</i> (Da)							
LO-358	359,1973	361,2053	359,1972	365,2353	361,1918	361,2104	361,2039	C ₁₈ + 2C ₁
LO-402	403,2237	404,2274	405,2361	409,2614	405,2164	405,2373	405,2314	C ₁₈ + C ₁ + C ₃ + OH
LO-416	417,2393	418,2440	419,2515	423,2767	419,2328	419,2525	419,2456	C ₁₈ + 2C ₁ + C ₃ + OH
GLO-371	371,1968	371,1986	372,2036	377,2342	373,1909	373,2101	373,2046	C ₁₈ + C ₃
LO-384	385,2131	386,2178	387,2248	391,2511	387,2089	387,2257	387,2205	C ₁₈ + C ₁ + C ₃
LO-386	387,2285	388,2335	389,2410	393,2665	389,2221	389,2419	389,2363	C ₁₈ + C ₁ + C ₃
LO-442	443,2548	444,2603	447,2800	449,2927	445,2482	445,2664	445,2614	C ₁₈ + C ₁ + 2C ₃ + OH
LO-398	399,2291	401,2365	401,2410	405,2662	459,2643	459,2800	459,2771	C ₁₈ + 2C ₁ + C ₃
LO-456	457,2701	414,2491	461,2945	463,3085	401,2232	401,2412	401,2356	C ₁₈ + 2C ₁ + 2C ₃ + OH
LO-424	425,2441	426,2492	429,2682	431,2819	427,2387	427,2564	427,2516	C ₁₈ + C ₁ + 2C ₃
LO-426	427,2598	428,2657	431,2845	433,2968	429,2538	429,2730	429,2672	C ₁₈ + C ₁ + 2C ₃
GLO-411	411,2287	411,2306	415,2535	417,2660	413,2225	413,2424	413,2367	C ₁₈ + 2C ₃
L-401	401,2078	402,2132	—*	407,2457	403,2027	403,2196	403,2152	C ₁₈ + C ₁ + C ₃ + OH
LO-450	451,2595	—*	—*	457,2971	453,2560	453,2736	453,2682	C ₁₈ + 3C ₃

* látky L-401 a LO-450 nebyly v některých modelových směsích detekovány, proto zde nejsou uvedena některá data

Barevné sloučeniny obsahující jednouhlikatý můstek



Barevné sloučeniny obsahující tříuhlikatý můstek



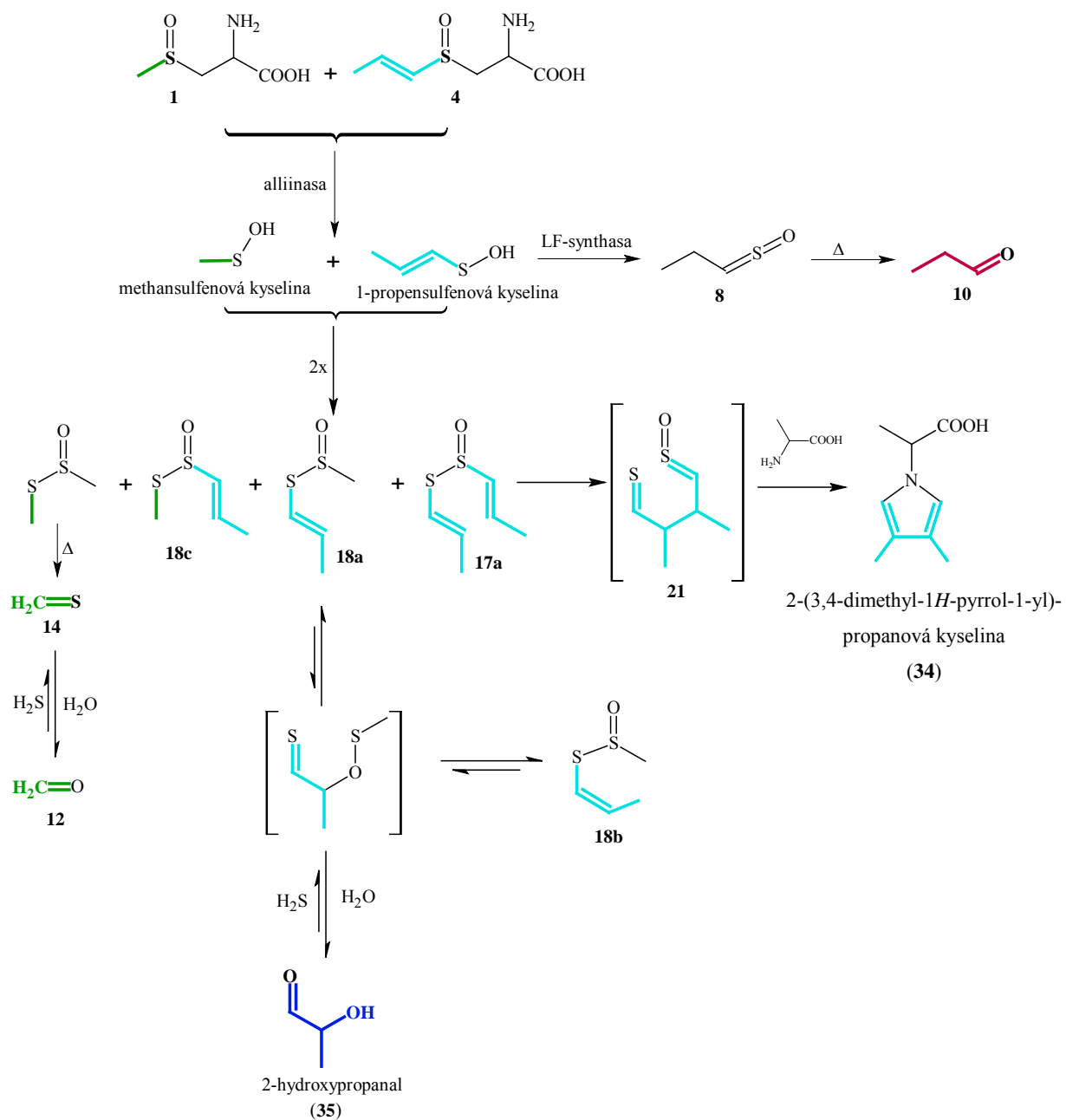
Obrázek 55: Pravděpodobné struktury barevných látek vznikajících v cibuli a póru po reakci thiosulfínátů s alaninem

5.2.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v cibuli a póru

Jak je z **Obrázku 55** patrné, barevné sloučeniny vzniklé reakcí thiosulfínátů s alaninem jsou si strukturně velmi podobné (**Příloha 23**). Lze je rozdělit na dvě základní podskupiny, a sice na sloučeniny obsahující jednouhlikatý můstek a látky, kde jsou pyrrolová jádra navzájem propojena můstkem trojúhlikatým.

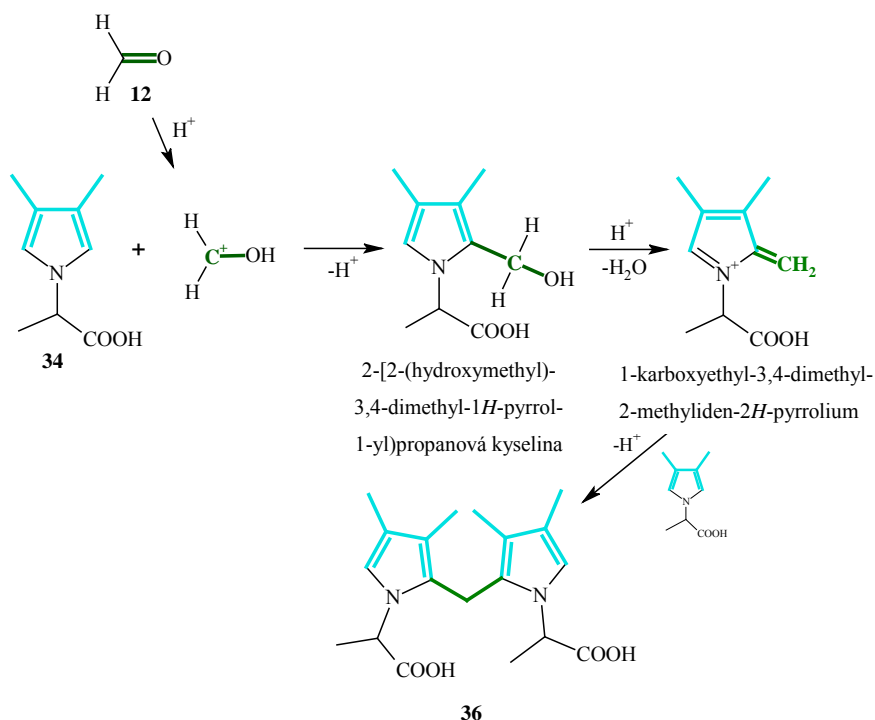
Základní fáze tvorby pigmentů byla již dříve popsána Imaiem a kol.⁵³ (**Obrázek 26**) a data získaná v této práci, tento navržený mechanismus potvrzují. Nejprve dochází k enzymatickému rozkladu isoalliinu (**4**) a methiinu (**1**) za vzniku příslušných sulfenových kyselin. Část 1-propensulfenové kyseliny tvořící se z isoalliinu je katalytickým působením LF-synthasy přeměněna na slzotvorný propanthialsulfoxid (**8**), ze kterého spontánně vzniká propanal (**10**). Současnou kondenzací sulfenových kyselin vznikají thiosulfináty, u kterých mimo jiné také dochází k záměnným a rozkladným reakcím (viz kapitolu 2.4.3). *S*-Methyl-methanthiosulfinát (**32**) se rozkládá na thioformaldehyd (**14**), ze kterého ve vodném prostředí vzniká formaldehyd (**12**). Díky záměnným reakcím thiosulfinátů a [3,3]-sigmatropnímu přesmyku thiosulfinátů obsahujících 1-propenylovou skupinu dochází mimo jiné k tvorbě 2,3-dimethylbutandithialmonosulfoxidu (tzv. „color developer“) (**21**), který se v přítomnosti aminokyseliny přemění na bezbarvou 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanovou kyselinu (**34**). U thiosulfinátů obsahujících 1-propenylovou skupinu dochází také ke spontánní *E/Z* izomerizaci. Meziprodukt této izomerizace obsahuje thiokarbonylovou skupinu, která se ve vodném prostředí ochotně přeměňuje na skupinu karbonylovou. Zároveň zřejmě dochází k rozštěpení –S–O– vazby a vzniká tak 2-hydroxypropanal (**35**). Všechny karbonylové sloučeniny, které takto vznikly, hrají velmi důležitou roli v dalších fázích tvorby barevných látek (**Obrázek 56**).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 56: První fáze tvorby barevných látek v cibuli a póru

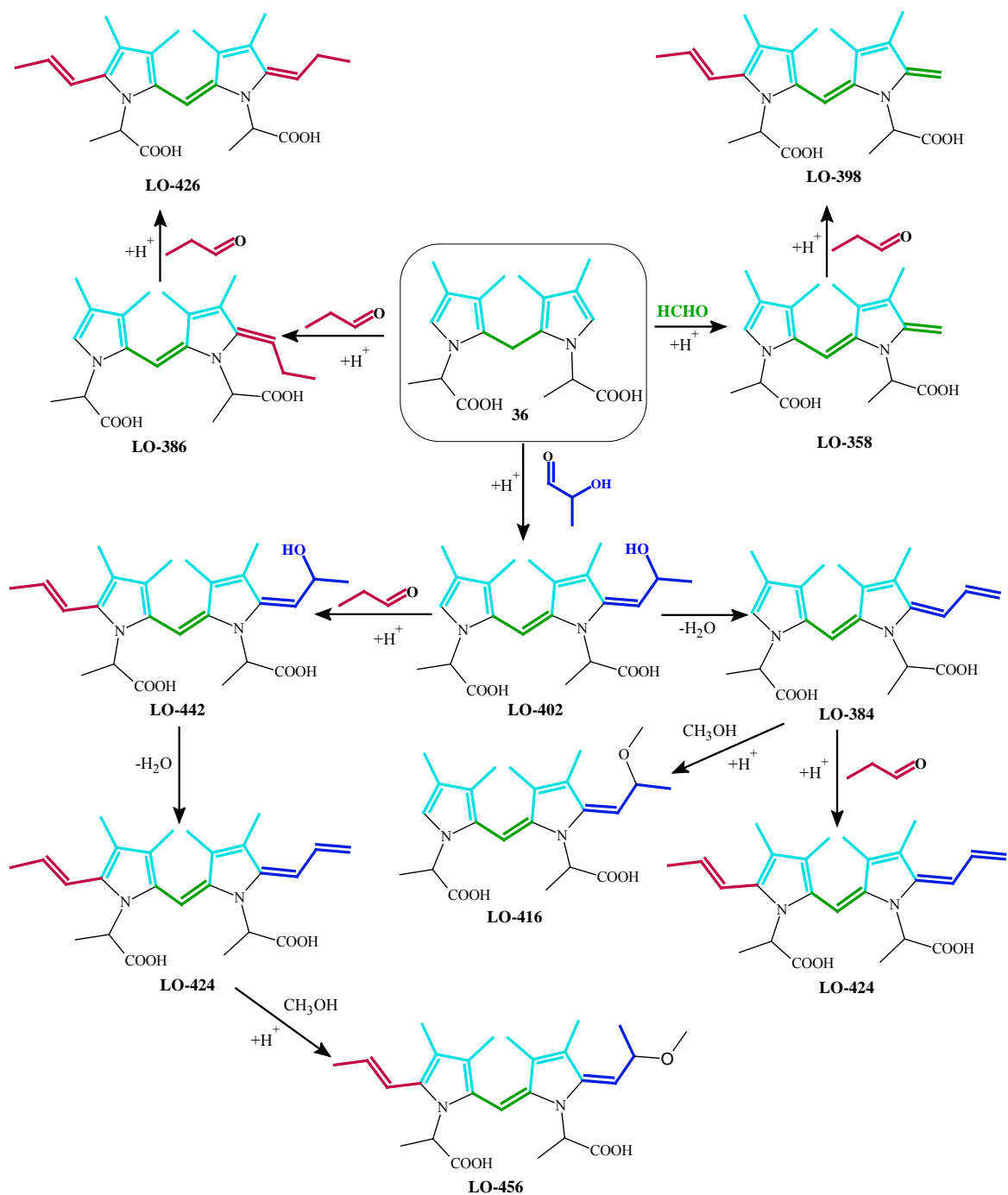
Vznik sloučenin, jejichž základ tvoří 2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanová kyselina



Obrázek 57: Reakce formaldehydu s 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanovou kyselinou (34) vzniklou v první fázi tvorby barevných látek

Pro většinu barevných sloučenin tvořících se v macerátech cibule či póru je klíčový vznik 2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanové kyseliny (36) (Obrázek 57). Jedná se o kyselé katalyzovanou elektrofilní substituci. K této hydroxymethylaci dochází mezi karbonylovými sloučeninami v přítomnosti pyrrolové sloučeniny, která má volnou polohu 2 nebo 5.¹⁰⁴

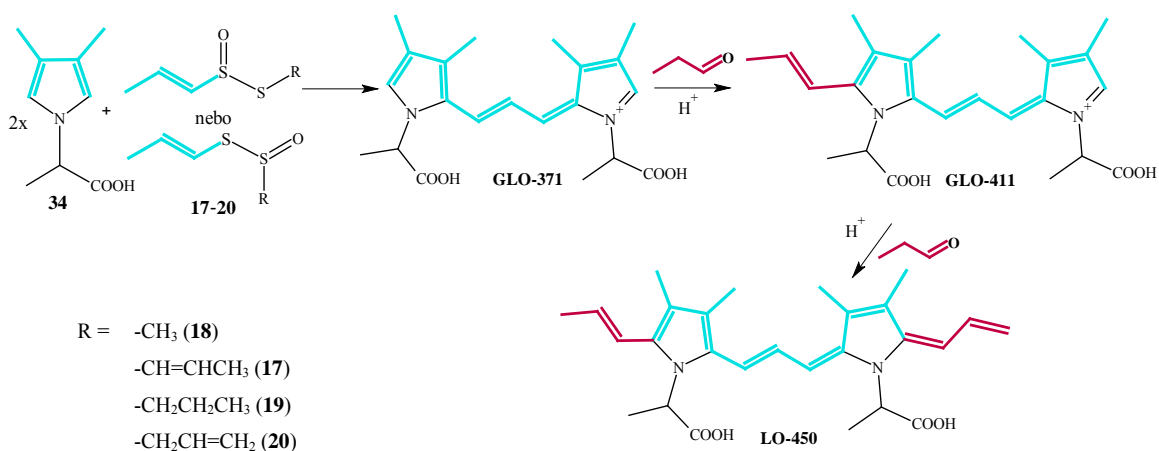
Obrázek 58 naznačuje pravděpodobnou tvorbu většiny barevných látek, které vznikají v cibuli a póru za přítomnosti alaninu. Reakcí substituované dipropanové kyseliny s karbonylovými sloučeninami, které vznikly v první fázi (Obrázek 56), se vytvoří látky LO-358, LO-386 a LO-402. Jejich následnými reakcemi s propanalem vznikají sloučeniny LO-398, LO-426 a LO-442. U látek, které mají navázanou $-OH$ skupinu, dochází k dehydrataci za vzniku LO-384 a LO-424. LO-424 také může vzniknout reakcí LO-384 s propanalem. Sloučeniny LO-416 a LO-456 zřejmě vznikají adicí methanolu na dvojnou vazbu LO-384 a LO-424, ke které dochází během zpracování/analýzy barevných směsí. Tyto dvě barevné látky tak zřejmě nejsou v reálných vzorcích přítomny.



Obrázek 58: Tvorba barevných sloučenin z 2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanové kyseliny

Vznik látek, jejichž základ je tvořen (2E)-1-(karboxyethyl)-2-[(2E)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden]-3,4-dimethyl-2H-pyrroliem

Přesný mechanismus vzniku těchto látek zatím není zcela objasněn. Jisté je ale to, že prekurzorem tříuhlíkatého můstku mezi pyrrolovými jádry je thiosulfínát obsahující 1-propenylovou skupinu. Reakcí bezbarvé 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny (**34**) s thiosulfínátem obsahujícím 1-propenylovou skupinu (**17–20**) vzniká GLO-371. Další reakcí GLO-371 s propanalem (**10**) v kyselém prostředí vzniká GLO-411, přičemž reakcí ještě s jednou molekulou propanalu zřejmě vzniká LO-450.



Obrázek 59: Předpokládaný vznik barevných sloučenin z GLO-371

5.3 Tvorba barevných sloučenin v česneku

Tvorba barevných sloučenin v česneku probíhá analogickým mechanismem jako v cibuli či póru. Bylo prokázáno, že k tvorbě barevných látek je nezbytná přítomnost thiosulfínátů obsahujících 1-propenyllovou skupinu (**Obrázek 47**), na jejichž vzniku se kromě isoalliinu (**4**) podílí i další *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy přítomné v česneku (methiin a alliin).^{43,44}

5.3.1 Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku

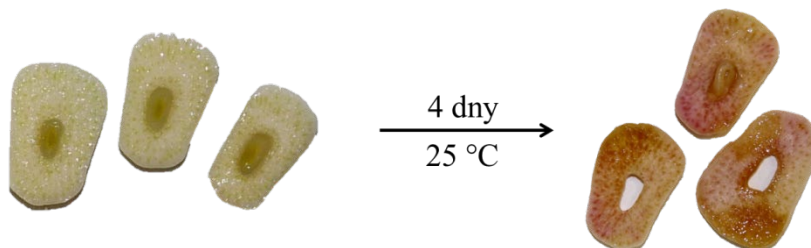
Hlavním *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidem vyskytujícím se v analyzovaném česneku je alliin (**3**). Dále byla detekována přítomnost methiinu (**1**) a isoalliinu (**4**), avšak žádné stopy propiinu (**2**) (**Tabulka 18**). Tyto výsledky jsou v souladu s hodnotami publikovanými jinými autory (**Tabulka 1**).

Tabulka 18: Zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku (rel. %)

methiin	alliin	propiin	isoalliin
10	76	–	14

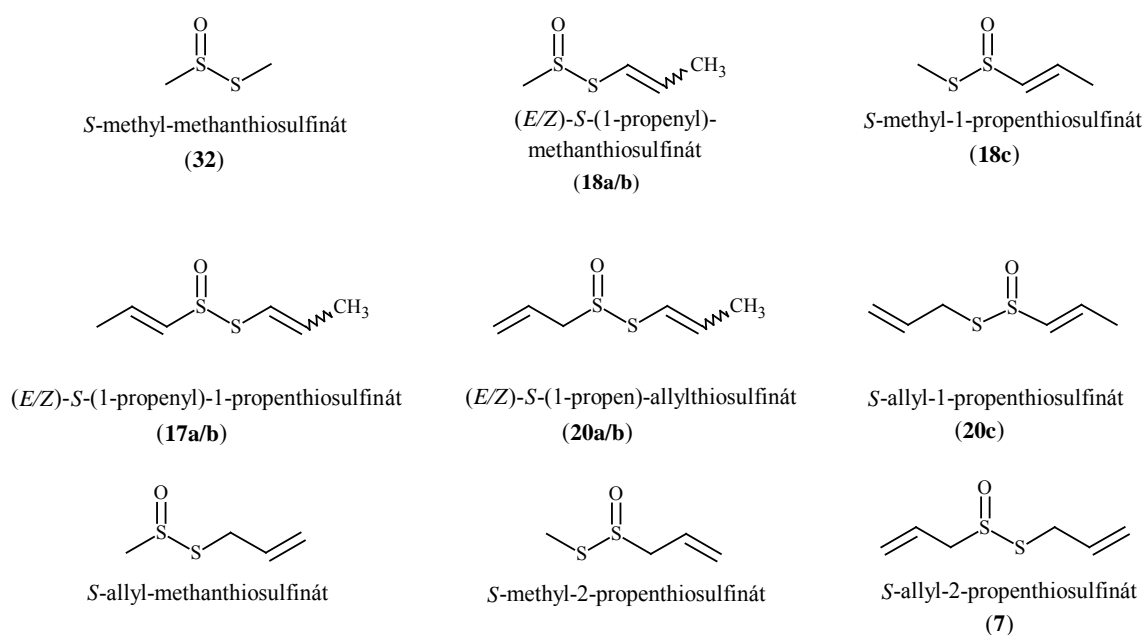
5.3.2 Určení struktury barevných látek tvořících se v homogenátech česneku

Ačkoli Joslyn a Sano¹⁴ ve své práci uvedli, že rozčtvrcené stroužky česneku nepodléhají barevným změnám, po čtyřech dnech po nakrájení česneku na plátky, bylo možné zachytit vzniklé barevné sloučeniny na příčném řezu stroužků. Ač se o barevných změnách, ke kterým v česneku dochází, hovoří jako o modrání či zelenání česneku, na řezu vznikly červenofialové sloučeniny (**Obrázek 60**). Pokud však byly stroužky česneku rozmělněny pomocí kuchyňského mixéru, vzniklý homogenát během 1–2 dnů skutečně zezelenal (**Obrázek 23**).



Obrázek 60: Barevné změny na příčném řezu stroužků česneku

Přirozeně se vyskytující směs thiosulfinátů (**Obrázek 61**) byla izolována z homogenizovaného česneku extrakcí diethyletherem. Inkubací tohoto extraktu s alaninem (při pH 5,5) se během několika hodin vytvořil zelený pigment. Během zpracování methanolvé frakce, která byla získána přečištěním barevného extraktu přes C-18 SPE kolonku, docházelo k barevné přeměně ze spíše modrého roztoku na roztok zelený, přičemž výsledný odparek měl i po opětovném rozpuštění v methanolu zelenou barvu. Toto chování svědčilo o značné nestabilitě vzniklých sloučenin. Analýzou těchto reakčních směsí pomocí HPLC bylo následně zjištěno, že byly tvořeny mnoha barevnými sloučeninami, jejichž UV-Vis absorpční maxima se pohybovala v rozmezí $\lambda_{max} = 385\text{--}597\text{ nm}$ (**Obrázek 62**). Vzhledem ke značné komplexnosti reakčních směsí byla další pozornost zaměřena na určení struktury pouze sedmi nejvýznamnějších barevných sloučenin.



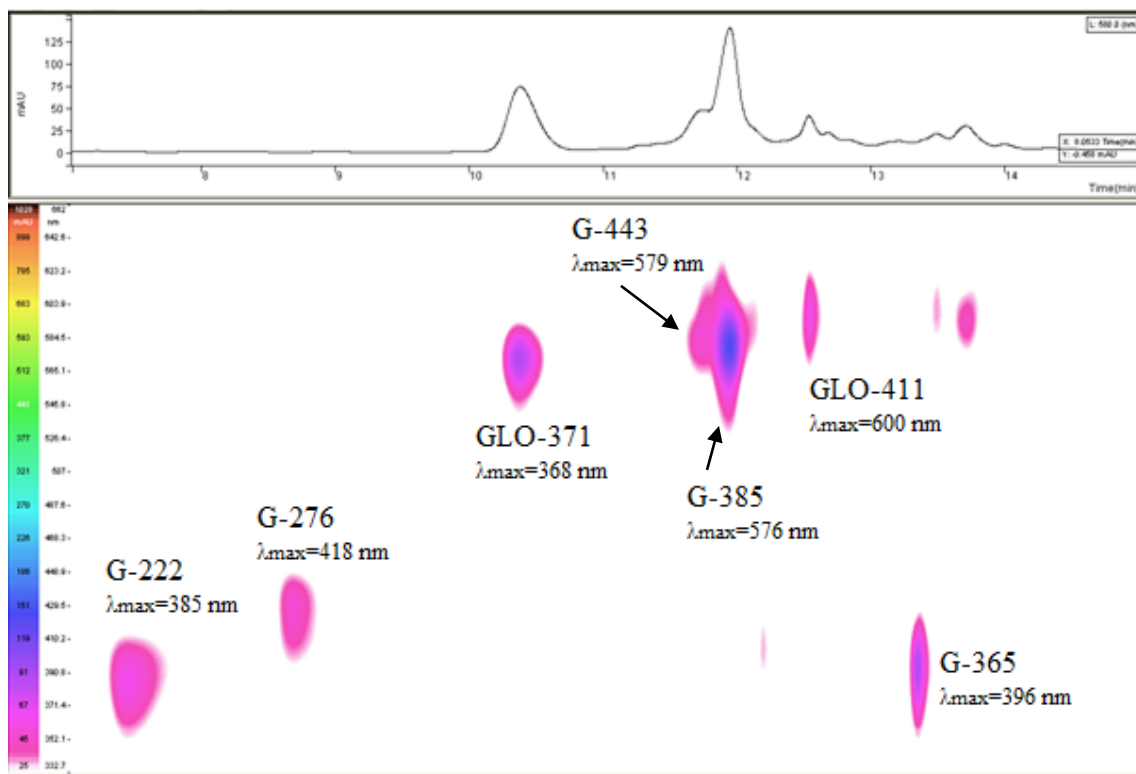
Obrázek 61: Nejvýznamnější thiosulfináty tvořící se v česneku

Charakteristika hlavních barevných sloučenin, které vznikají v česneku reakcí thiosulfinátů s alaninem

Barevný roztok získaný reakcí diethyletherového extraktu z česneku s alaninem byl přečištěn přes SPE C-18 kolonku. Jak bylo následně zjištěno pomocí HPLC, získaný extrakt obsahoval jak žluté, tak i modré sloučeniny (**Obrázek 62, Příloha 17**). Díky přítomnosti žlutých a modrých sloučenin se výsledná barva roztoku jevila jako zelená. Přítomnost těchto dvou skupin barevných látek již dříve detekovali Yamaguchi a kol.,³⁹ kteří jako první ve své práci uvedli, že zelená barva česnekového homogenátu je kombinací žlutých a modrých sloučenin.

V diethyletherovém extraktu z česneku bylo detekováno sedm hlavních barevných látek. Tři z nich byly žluté (λ_{max} v rozmezí 384–418 nm), ostatní čtyři byly fialové až modré (λ_{max} v rozmezí 568–597 nm). Bylo pozorováno, že tyto látky jsou velmi nestabilní, neboť i při použití velmi mírných podmínek během odpařování rozpouštědla na RVO (30 °C) docházelo ke změně barvy modrého eluátu na zelenou. Takto zřejmě dochází ke vzniku některých žlutých sloučenin.

Veškeré návrhy předpokládaných struktur barevných sloučenin a mechanismus jejich vzniku byly vytvořeny na základě porovnání HRMS/MS spekter barevných látek vytvořených v modelových směsích obsahujících přirozeně se vyskytující thiosulfináty a alanin s HRMS/MS spektry látek vytvořených v modelových směsích obsahujících izotopicky substituované prekurzory (**Obrázek 50**). Systém pojmenování jednotlivých barevných sloučenin je založen na stejném principu jako u cibule a póru. Písmeno v názvu pigmentu označuje zeleninu, ve které se pigment vytváří, a číslo za pomlčkou označuje relativní molekulovou hmotnost látky (zjištěno pomocí UHPLC-HRMS).



Obrázek 62: HPLC chromatogram při 580 nm (nahore) a PDA záznam (dole) směsi barevných sloučenin vznikajících v česnekovém homogenátu po reakci alaninem (METODA I)

V **Tabulce 19** jsou uvedena HRMS data barevných látek vznikajících smícháním diethyletherového extraktu česneku s alaninem. Jak je z **Tabulky 19** patrné, dvě barevné látky (G-222 a G-276) obsahují dvanáct resp. patnáct atomů uhlíku a pouze jeden atom dusíku a tři resp. čtyři atomy kyslíku. Jejich sumární vzorec je tedy $C_{12}H_{16}NO_4$ resp. $C_{15}H_{18}NO_5$. Je tedy zřejmé, že na tvorbě těchto sloučenin se podílí pouze jedna molekula aminokyseliny (což bylo potvrzeno i experimenty s izotopově substituovaným alaninem, jak bude uvedeno dále). Ostatní barevné sloučeniny obsahují, stejně jako v případě cibule a póru, minimálně dvacet atomů uhlíku, vždy dva atomy dusíku a čtyři až šest atomů kyslíku. Jejich obecný sumární vzorec je tedy $C_xH_yN_2O_z$, kde $x = 21-24$, $y = 17-31$ a $z = 4-6$. Opět není bez zajímavosti, že ani jedna barevná sloučenina neobsahuje síru. Počet aminokyselin, které se podílí na vzniku těchto barevných sloučenin, byl potvrzen pomocí experimentů s izotopově substituovaným alaninem (**Tabulka 20**). Stejně jako v případě barevných látek tvořících se v cibuli a póru jsou v jedné molekule barevné sloučeniny navázané dvě molekuly alaninu, které přispívají celkem dvěma atomy dusíku, deseti atomy vodíku, čtyřmi atomy kyslíku a šesti atomu uhlíku.

Tabulka 19: UHPLC-HRMS data barevných látek tvořících se v česnekovém homogenátu

sloučenina	retenční čas (min)	λ_{max} (nm)	m/z změřená (Da)	m/z spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-222	6,58	384	222,1134	222,1125	4,2	C ₁₂ H ₁₆ NO ₃	6
G-276	6,73	418	276,1240	276,1230	3,5	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	8
GLO-371	7,26	568	371,1982	371,1965	4,1	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₄	10
G-443	7,82	579	443,2178	443,2177	0,1	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₆	11
G-385	8,18	576	385,2131	385,2122	2,4	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₄	10
GLO-411	9,39	597	411,2287	411,2278	2,1	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₄	11
G-396	13,00	396	365,1124	365,1132	2,2	C ₂₀ H ₁₇ N ₂ O ₅	14

pozn. k separaci byla použita METODA H, HRMS data byla získána v pozitivním módu

zkratky uvedené v tabulce – viz Seznam zkratk

Tabulka 20 shrnuje ESI(+)-HRMS data barevných látek vznikajících v modelových směsích obsahujících alanin. S ohledem na dosud zjištěné poznatky⁵³ a předpoklad analogie struktury barevných látek tvořících se v cibuli a póru by se sloučeniny G-222 a G-276 dle naměřených dat měly skládat z jedné molekuly 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny a jednoho či dvou postranních řetězců. Základní „skelet“ těchto sloučenin tedy obsahuje celkem devět atomů uhlíku. Ostatní barevné látky by tedy měly obsahovat dvě molekuly 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny spojené jedno- nebo tříuhlíkatým můstkem, případně by ještě mohly nést boční řetězec. Základní „skelet“ těchto sloučenin tedy obsahuje 18 atomů uhlíku. Uhlíky, které jsou v sloučeninách navíc mimo základní skelet, budou součástí postranních řetězců navázaných na pyrrolová jádra v poloze 2 a/nebo 5. Sloučeniny G-276 a G-396 se nevyskytovaly v modelové směsi připravené reakcí **18**, proto nebylo možné potvrdit původ uhlíků, které by mohly primárně pocházet z methiinu. Bohužel nebyla připravena modelová směs obsahující izotopicky substituovaný **20**, takže nebylo možné získat informace o původu některých tříuhlíkatých řetězců. Je však pravděpodobné, že tříuhlíkatý postranní řetězec sloučenin, které nevznikají v cibuli a póru, by mohl pocházet z allicinu (**7**).

Tabulka 20: HRMS data barevných sloučenin vytvořených ve směsích obsahujících neznačený a izotopicky substituovaný alanin

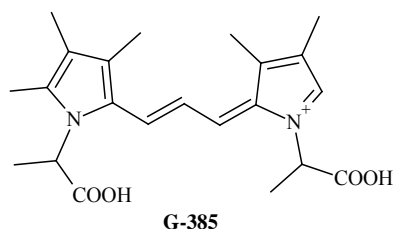
sloučenina	Ala (34)	(3-D ₃)Ala (34-A)	(¹⁵ N)Ala (34-B)	(2-D)Ala (34-C)	(1- ¹³ C)Ala (34-D)	základní skladba podjednotek
	změřená <i>m/z</i> (Da)					
G-222	222,1134	225,1321	223,1105	223,1197	223,1160	C ₉ + C ₃ + OH
G-276	276,1240	279,1428	277,1212	277,1302	277,1267	C ₉ + 2C ₁ + 2OH
GLO-371	371,1982	377,2351	373,1909	373,2101	373,2046	2C ₉ + C ₃
G-443	443,2178	449,2557	445,2129	445,2302	445,2236	2C ₉ + 2C ₃ +2OH
G-385	385,2131	391,2503	387,2076	387,2256	387,2185	2C ₉ +C ₁ + C ₃
GLO-411	411,2287	417,2672	413,2228	413,2415	413,2351	2C ₉ + 2C ₃
G-365	365,1124	368,1315	366,1101	366,1188	366,1150	2C ₉ + 2C ₁ + OH

Sloučeniny GLO-371 a GLO-411 byly detekovány také v barevném extraktu vytvořeném v cibuli a póru. Fakt, že jde o stejné sloučeniny, dokazuje nejen stejný retenční čas, ale i identické hodnoty jejich absorpčních maxim a v neposlední řadě i stejná MS fragmentace. Vznik a struktura těchto dvou látek jsou tedy blíže popsány v kapitole 5.2.2.

Stanovení struktury G-385

Sloučenina G-385 měla retenční čas velmi blízký sloučenině LO-384, která je tvořena v cibuli a póru, ale absorpční maximum G-385 je o 40 nm vyšší ($\lambda_{max} = 576$ nm). Při stejném sumárním vzorci, $[M + H]^+ C_{22}H_{29}N_2O_4$, lze předpokládat, že struktura obou sloučenin bude velmi podobná. V modelové směsi alaninu a ¹³CH₃S(O)SCH=CHCH₃ (**18-Ba/b/c**) byla detekována hodnota *m/z* této sloučeniny 386,2151 Da, což odpovídá sumárnímu vzorci C₂₁¹³CH₂₉N₂O₄. Tato změna molekulové hmotnosti sloučeniny o 1 Da tak naznačuje přítomnost jednoho atomu uhlíku pocházejícího primárně z methiinu. Dále byla v molekule G-385 zjištěna přítomnost dvou atomů deuteria, když byla sloučenina vytvořena ve směsi obsahující CH₃S(O)SCD=CDCH₃ (**18-Ca/b/c**) a alanin. Porovnáním způsobů fragmentace molekul obou barevných látek (G-385 a LO-384) bylo zjištěno, že nejde o stejné sloučeniny. Některé hmotnosti fragmentů se shodovaly (viz **Přílohu 16 a 18**), ve většině fragmentů se však lišily. Sloučenina G-385 měla nejintenzivnější fragment s hmotností 160,1128 Da. Tento fragment byl zároveň nejintenzivnější také v HRMS/MS spektru sloučeniny GLO-371. Způsob fragmentace tedy naznačoval, že jsou obě molekuly

2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny spojeny propenylenovým můstkem. Na základě všech doposud zjištěných informací by se tedy pravděpodobně mohlo jednat o (2*E*)-1-(1-karboxyethyl)-2-{(2*E*)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4,5-trimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl]-prop-2-en-1-yliden}-3,4-dimethyl-2*H*-pyrrolium (**Obrázek 63**).

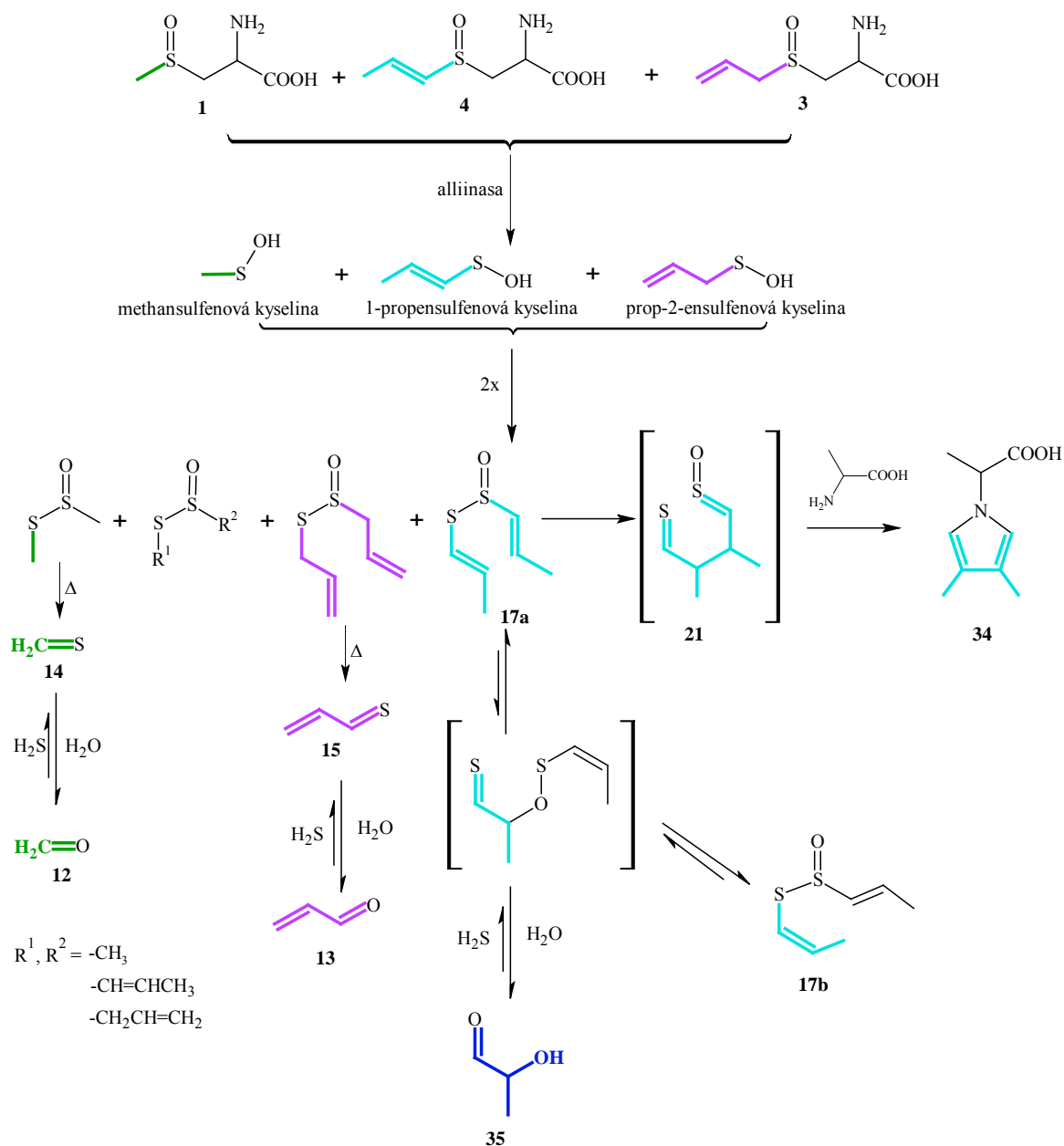


Obrázek 63: Předpokládaná struktura G-385

U ostatních barevných látek se bohužel na základě doposud získaných informací jejich strukturu objasnit nepodařilo. Ačkoli je zřejmá role aminokyseliny při tvorbě těchto sloučenin, informace z MS fragmentace molekul obsahujících izotopicky substituovaný alanin nebyly dostatečně ucelené na to, aby bylo možné o jejich struktuře udělat závěry.

5.3.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku

Barevné látky v česneku vznikají podobným mechanismem jako v cibuli či póru. V česneku byl detekován methiin (**1**), alliin (**3**) a isoalliin (**4**). Tyto aminokyseliny se působením alliinasy rozkládají za vzniku příslušných sulfenových kyselin, jejichž kondenzací vznikají thiosulfináty (viz **Obrázek 9** a **Obrázek 61**). Rozkladem allicinu (**7**) vzniká velmi reaktivní thioakrolein (**15**), jenž ve vodném prostředí přechází v akrolein (**13**). Z thiosulfinátů obsahujících methylovou skupinu analogicky vzniká formaldehyd (**12**). U thiosulfinátů obsahujících 1-propenylovou skupinu dochází k *E/Z* izomerizaci přes meziprodukt, ze kterého ve vodném prostředí pravděpodobně vzniká 2-hydroxypropanal (**35**). Z *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinátu (**17**) vzniká [3,3]-sigmatropním přesmykem 2,3-dimethylbutandithialmonosulfoxid (tzv. „color developer“, **21**). Produktem jeho reakce s aminokyselinou je bezbarvá 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina (**34**), stejně jako v cibuli či póru.

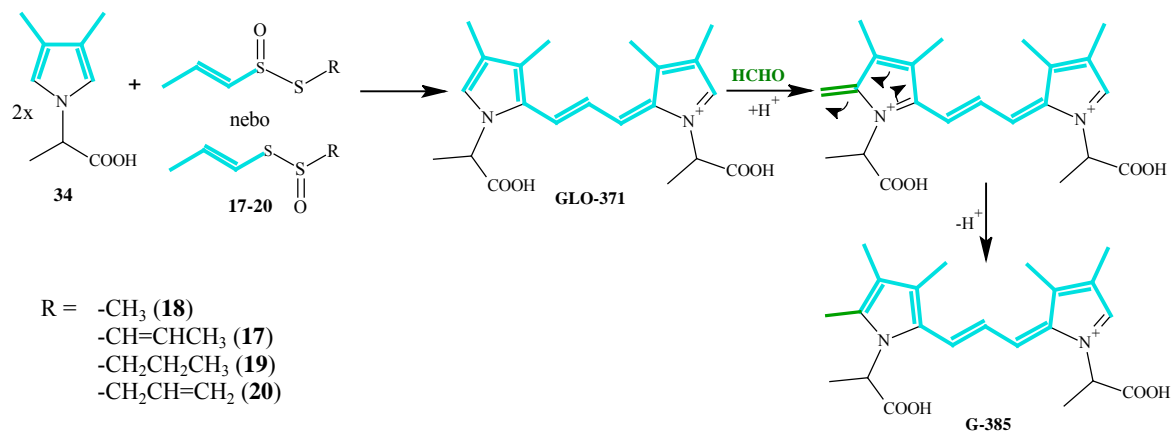


Obrázek 64: První fáze tvorby barevných sloučenin v česneku

Základ charakterizovaných barevných sloučenin tvoří, stejně jako v případě GLO-371, (2*E*)-1-(karboxyethyl)-2-[(2*E*)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-ylidén]-3,4-dimethyl-2*H*-pyrrolium, jehož přesný mechanismus vzniku je zatím neznámý. Jisté je, že k jeho tvorbě dochází reakcí bezbarvé 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny s thiosulfináty obsahujícími 1-propen-ylovou skupinu popř. 2-propenylovou (allylovou) skupinu. Sloučeniny mající jako základ tuto strukturu jsou pak zřejmě tvořeny reakcemi tohoto „dipyrrolylu“ s karbonylovými sloučeninami, které vznikají rozkladem thiosulfinátů ve vodném

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

prostředí. Opět se jedná o elektrofilní substituci do polohy 2 či 5. Na **Obrázku 65** je popsán pravděpodobný vznik sloučeniny G-385. Navrženou tvorbu GLO-411 je možné vidět na **Obrázku 59** v kapitole 5.2.3.



Obrázek 65: Pravděpodobný vznik GLO-385

5.4 Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském

Vznik růžového zbarvení byl pozorován také v homogenátech česneku sicilského (*A. siculum*). Vzhledem k tomu, že pravděpodobný prekurzor tohoto růžového zbarvení, homoisoalliin (**5**), má analogickou strukturu k prekurzoru barevných látek tvořících se v cibuli, póru a česneku, isoalliinu (**4**), lze předpokládat, že mechanismus tvorby pigmentů v *A. siculum* bude velmi podobný tomu, který probíhá v cibuli a póru. Lze také předpokládat, že i struktura vznikajících barevných látek bude analogická těm, které vznikají v cibuli a póru.

5.4.1 Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v česneku sicilském

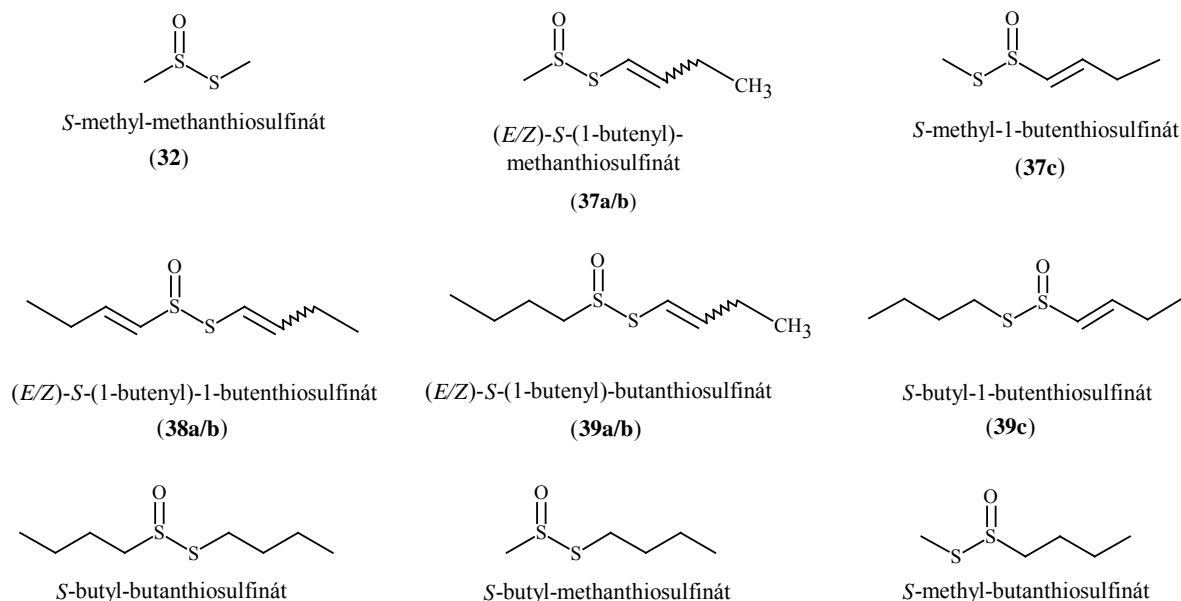
Je zřejmé, že v česneku sicilském jsou za vznik červeného zbarvení odpovědné thiosulfináty obsahující 1-butenylovou skupinu.⁴⁴ Na tvorbě těchto thiosulfinátů se však společně s homoisoalliinem (**5**) podílejí i ostatní přítomné *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy (methiin a butiin). Jejich enzymatickým rozkladem vznikají příslušné sulfenové kyseliny, které spolu navzájem kondenzují, a tvoří tak symetrické a asymetrické thiosulfináty (**Obrázek 47**). Relativní zastoupení methiinu (**1**), butiinu (**6**) a homoisoalliinu (**5**) ve studovaných cibulích česneku sicilského bylo stanoveno pomocí HPLC po předkolonové derivatizaci dansylchloridem (**Tabulka 21**).

Tabulka 21: Zastoupení *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů v cibulích *A. siculum* (rel. %)

methiin	butiin	homoisoalliin
46	6	48

5.4.2 Struktura barevných látek vznikajících v homogenátech česneku sicilského

Kromě symetrických thiosulfinátů (např. **32**) vznikají enzymatickým rozkladem methiinu (**1**), butiinu (**6**) a homoisoallinu (**5**) také thiosulfináty asymetrické obsahující 1-butenylovou skupinu (**Obrázek 66**). Tyto thiosulfináty, stejně jako v případě cibule a póru, pravděpodobně tvoří barevné látky po reakci s aminokyselinami.



Obrázek 66: Nejvýznamnější thiosulfináty tvořící se v česneku sicilském

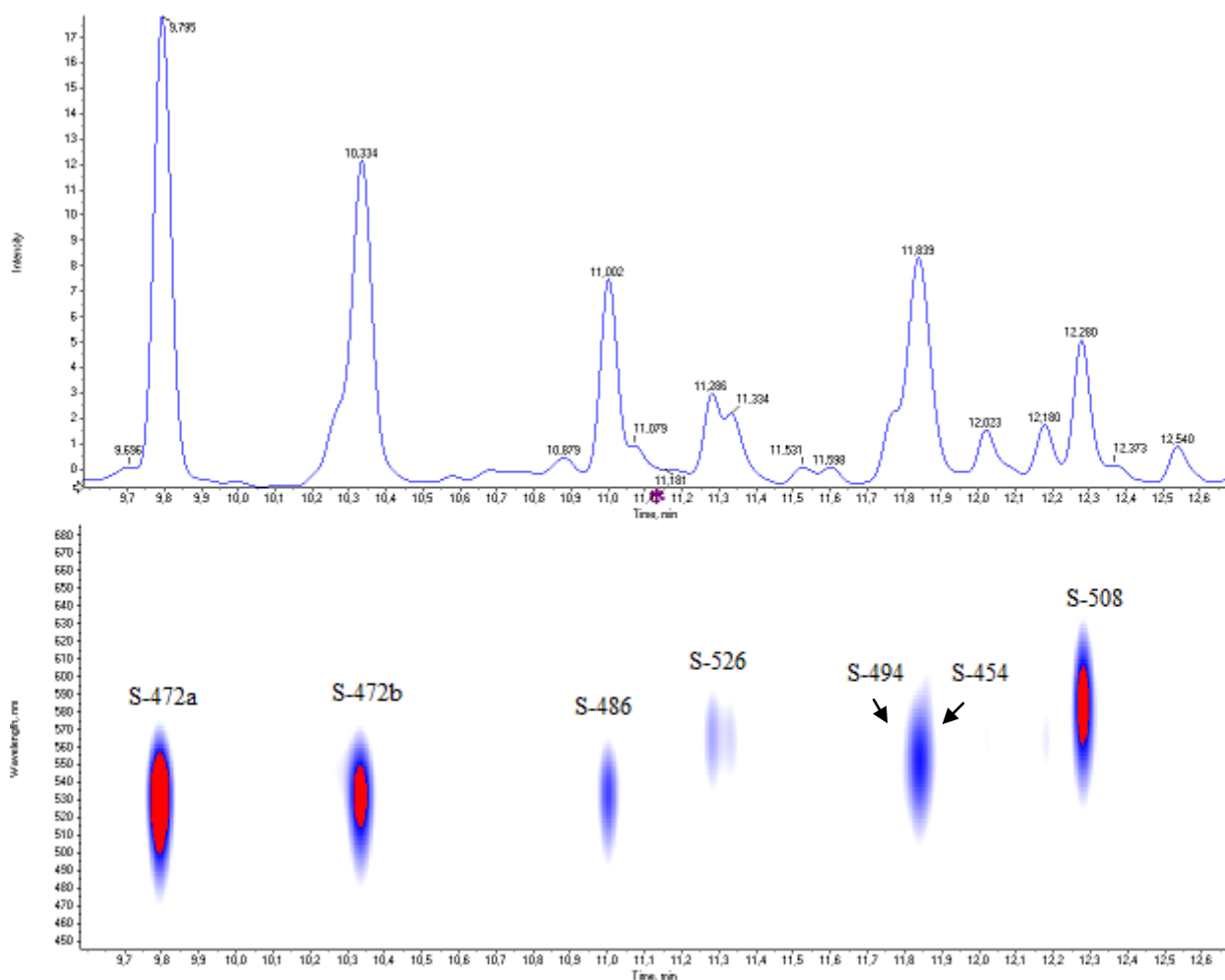
Přirozeně se vyskytující směs thiosulfinátů byla izolována z homogenizovaných cibulek česneku sicilského extrakcí diethyletherem. Inkubací těchto extraktů s alaninem (při pH 5,5) se během několika hodin vytvořil růžový pigment. Analýzou této reakční směsi pomocí HPLC bylo následně zjištěno, že je tvořena mnoha barevnými sloučeninami, jejichž UV-Vis absorpční maxima se pohybovala v rozmezí 533–580 nm (**Obrázek 67, Příloha 19**). Další pozornost byla zaměřena především na sedm hlavních barevných látek.

Některé níže popsané barevné sloučeniny vznikly také reakcí synteticky připravených thiosulfinátů (**37/b/c** a **39/b/c**) s alaninem za stejných experimentálních podmínek, za kterých byly připraveny pigmenty z diethyletherových extraktů česneku sicilského.

I přes použití modelových směsí byl výtěžek barevných sloučenin velmi nízký a nebylo možné získat dostatek materiálu na konvenční NMR experimenty. Pravděpodobné struktury barevných látek byly tedy navrženy výlučně na základě HRMS/MS dat za využití celé řady izotopově substituovaných prekurzorů.

Systém pojmenování jednotlivých barevných sloučenin je založen na stejném principu jako u cibule, póru a česneku. Písmeno „S“ v tomto případě znamená, že je

látku vytvořena v česneku sicilském (*A. siculum*), a číslo za pomlčkou opět vyjadřuje relativní molekulovou hmotnost dané sloučeniny (zjištěnou pomocí HRMS).



Obrázek 67: UHPLC chromatogram při 540 nm (nahore) a PDA záznam (dole) směsi barevných sloučenin vznikajících v extraktu *A. siculum* s přidavkem alaninu (METODA H)

Obrázek 67 zobrazuje UHPLC chromatogram se sedmi hlavními barevnými látkami, které vznikají při zpracování česneku sicilského. Je zajímavé, že v retenčních časech 9,8 min a 10,3 min byly detekovány sloučeniny (S-472a a S-472b), které mají stejnou molekulovou hmotnost (tedy i stejný sumární vzorec) a stejné absorpční maximum (**Tabulka 22**). Ani HRMS/MS spektra však neodhalila žádný rozdíl ve struktuře těchto sloučenin. Lze se tedy oprávněně domnívat, že se jedná o strukturně mimořádně blízké látky, pravděpodobně polohové nebo geometrické izomery.

Tabulka 22: ESI(+)-HRMS data hlavních barevných látek vytvořených v homogenátu *A. siculum*

sloučenina	retenční čas (min)	λ_{max} (nm)	m/z změřená (Da)	m/z spočítaná (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
S-472a	9,79	533	473,3020	473,3010	2,1	C ₂₇ H ₄₁ N ₂ O ₅	9
S-472b	10,34	533	473,3024	473,3010	3,0	C ₂₇ H ₄₁ N ₂ O ₅	9
S-486	11,01	535	487,3177	487,3166	2,2	C ₂₈ H ₄₃ N ₂ O ₅	9
S-526	11,28	566	527,3506	527,3479	5,0	C ₃₁ H ₄₇ N ₂ O ₅	10
S-494	11,84	551	495,3219	495,3217	0,3	C ₃₀ H ₄₃ N ₂ O ₄	11
S-454	11,86	557	455,2909	455,2904	1,0	C ₂₇ H ₃₉ N ₂ O ₄	10
S-508	12,28	580	509,3388	509,3374	2,8	C ₃₁ H ₄₅ N ₂ O ₄	11

Sumární vzorce detekovaných látek jsou analogické sumárním vzorcům sloučenin nalezených v cibuli a póru. Všechny barevné sloučeniny vznikající v česneku sicilském sestávají minimálně z 27 atomů uhlíku, vždy dvou atomů dusíku a čtyř nebo pěti atomů kyslíku. Jejich obecný vzorec je tedy C_xH_yN₂O₄ nebo C_xH_yN₂O₅ (x = 27–31, y = 39–47). Na základě doposud získaných informací se lze domnívat, že i tyto barevné sloučeniny mají pyrrolový charakter. Pokud je základní struktura tvořena analogicky jako u cibule, póru a česneku, je pravděpodobné, že se jedná o 2,2'-[methandiylbis(3,4-diethyl-1H-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanovou kyselinu (**44**). Dvě molekuly alaninu do struktury jednotlivých barevných sloučenin přispívají (stejně jako u cibule, póru či česneku) celkem šesti atomy uhlíku, čtyřmi atomy kyslíku, deseti atomy vodíku a dvěma atomy dusíku. Tento příspěvek byl potvrzen reakcemi modelových směsí obsahujících selektivně izotopicky substituovaný alanin (**Tabulka 23**). Pro všechny barevné sloučeniny tedy platí, že základní „skelet“ molekuly, který je pro všechny sloučeniny shodný, je tvořen 22 atomy uhlíku, 4 atomy kyslíku a 2 atomy dusíku. Zbytek prvků připadá na tvorbu bočních řetězců v poloze 2 a/nebo 5, případně na tvorbu můstku mezi oběma pyrrolylovými jádry. Vzhledem k rozsahu absorpčních maxim barevných látek (λ_{max} = 533–580 nm) lze předpokládat, že můstek mezi pyrrolylovými jádry nebude tvořen čtyřuhlíkatým řetězcem, ale spíše řetězcem jednouhlíkatým.

Tabulka 23: ESI(+)-HRMS data barevných sloučenin v reálné směsi a ve směsích obsahujících izotopicky substituovaný alanin

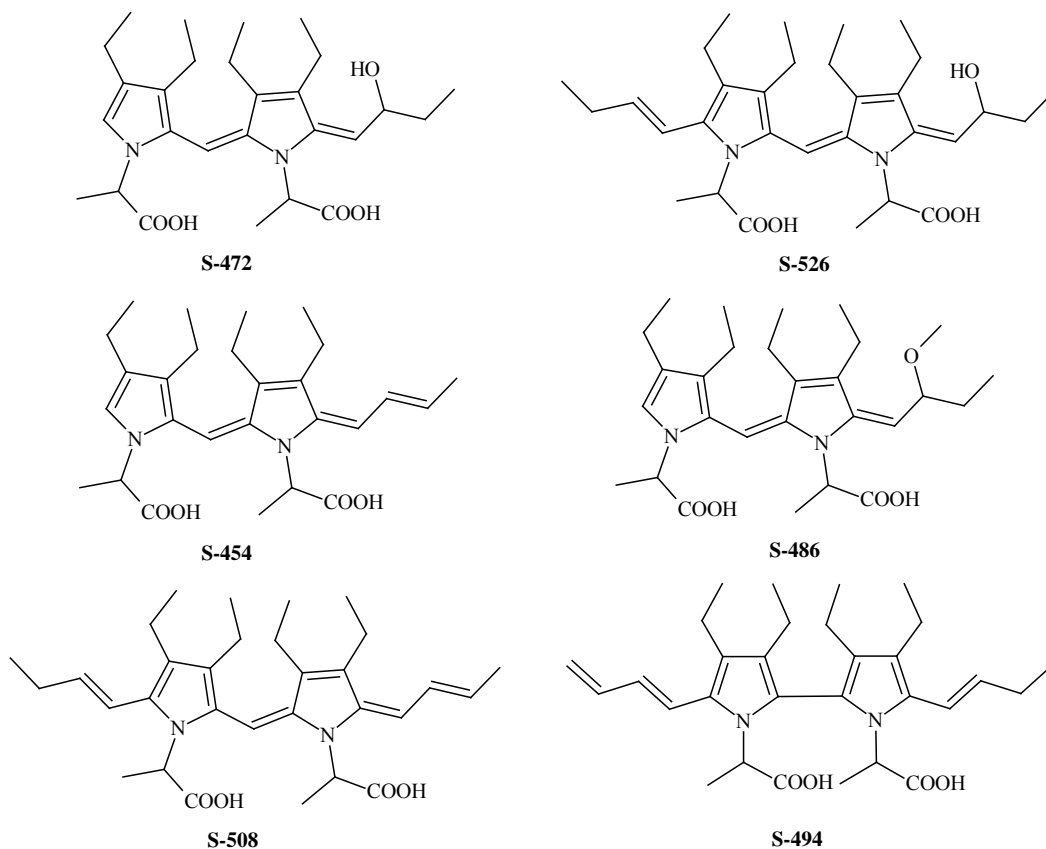
sloučenina	Ala (34)	(3-D ₃)Ala (34-A)	(¹⁵ N)Ala (34-B)	(2-D)Ala (34-C)	(1- ¹³ C)Ala (34-D)	základní skladba podjednotek
	změřená <i>m/z</i> (Da)					
S-472	473,3024	479,3398	475,2955	475,3139	475,3085	C ₂₂ + C ₁ + C ₄ + OH
S-486	487,3177	493,3538	489,3111	489,3286	489,3232	C ₂₂ + 2C ₁ + C ₄ + OH
S-526	527,3506	533,3849	529,3421	529,3597	529,3541	C ₂₂ + C ₁ + 2C ₄ + OH
S-494	495,3219	501,3595	497,3159	497,3332	497,3275	C ₂₂ + 2C ₄
S-454	455,2909	461,3291	457,2855	457,3035	457,2978	C ₂₂ + C ₁ + C ₄
S-508	509,3388	515,3758	511,3320	511,3496	511,3438	C ₂₂ + C ₁ + 2C ₄

Tabulka 23 zobrazuje naměřené hodnoty molekulových hmotností (v pozitivním módu ionizace) barevných látek ve směsi obsahující alanin a ve směsích, které obsahovaly izotopicky substituovaný alanin (**33A–D**). Z hodnot je zřejmé, že u všech látek jsou zabudovány dvě molekuly aminokyseliny, které byly začleněny bez jakýchkoli strukturních změn (kromě odštěpení –NH₂ vodíků). Bohužel, barevné směsi vzniklé reakcí izotopicky substituovaného thiosulfínátu ¹³CH₃S(O)SCH=CHCH₂CH₃ nebyly natolik koncentrované, aby byl MS signál dostatečně intenzivní a naměřená data měla informativní charakter.

Je pravděpodobné, že všechny sloučeniny, kromě S-494, budou strukturně velmi příbuzné. Dvě pyrrolová jádra budou spojena methylenylovým můstkem. Jejich struktury se pak budou lišit postranními řetězci. Jak již bylo uvedeno výše, lze předpokládat jistou analogii mezi těmito barevnými látkami a látkami vznikajícími v cibuli a póru. Proto je pravděpodobné, že S-472 bude mít strukturu analogickou k LO-402, S-486 k LO-416, S-526 k LO-442, S-454 k LO-384 a konečně S-508 by mohl být analogický k LO-426. Pouze ke sloučenině S-494 nebyla nalezena žádná odpovídající látka, která vzniká v cibuli a póru.

Sloučenina S-494 ve své struktuře obsahuje dvě pyrrolová jádra, dvě aminokyseliny a dva čtyřhlíkaté řetězce. Vzhledem k její hodnotě λ_{max} (551 nm) lze předpokládat, že můstek mezi oběma pyrrolylovými jádry nebude tvořen ani jedním z těchto dvou čtyřhlíkatých řetězců. Pokud by tato možnost byla brána v úvahu, muselo by dojít ke značnému stupni konjugace dvojných vazeb, aby sloučenina byla barevná. Pokud by byl konjugovaný systém tvořen dalšími třemi dvojnými vazbami mezi oběma jádry,

absorpční maximum by mělo být vyšší než 570 nm (viz GLO-371). O pyrrolech je známo, že v kyselém prostředí ochotně polymerizují, a proto by struktura látky S-494 mohla vypadat například jako je uvedena na **Obrázku 68**, kde jsou navrženy pravděpodobné struktury také ostatních barevných sloučenin (**Příloha 25**).

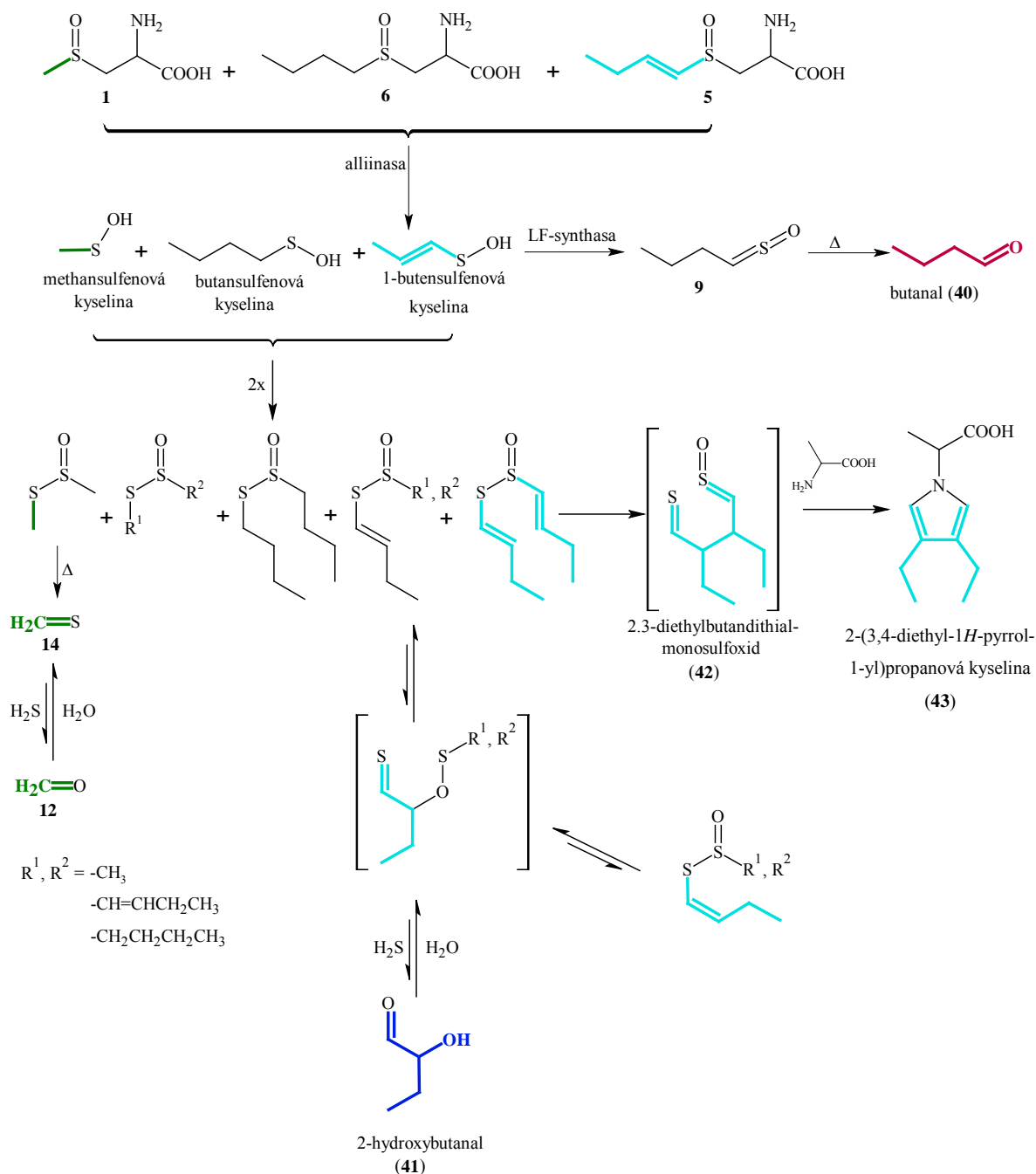


*Obrázek 68: Pravděpodobné struktury barevných sloučenin vytvářených v homogénatech *A. siculum* po reakci s alaninem*

5.4.3 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku sicilském

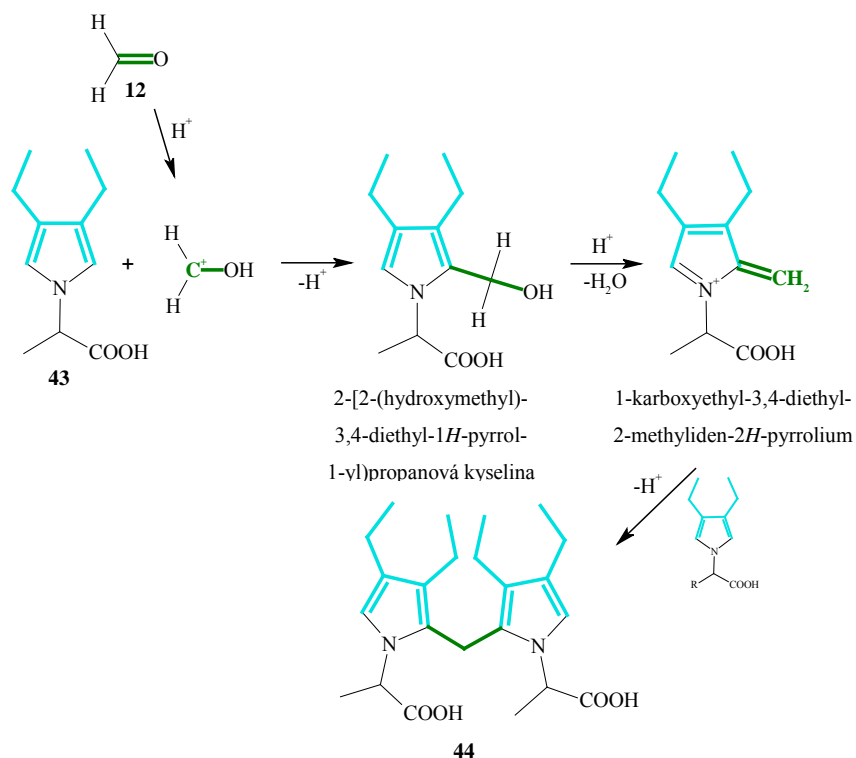
Lze předpokládat, že první fáze vzniku barevných látek je velmi podobná té v cibuli a póru. Působením alliinasy dojde ke katalytickému rozkladu homoisoalliinu, butiinu a methiinu za vzniku příslušných sulfenových kyselin. Působením LF-synthasy se část 1-butensulfenové kyseliny přemění na slzotvorný butanthialsulfoxid (**9**), který se samovolně rozkládá za vzniku butanalů (**40**). Současně dochází ke vzájemné kondenzaci vždy dvou molekul sulfenových kyselin za vzniku thiosulfínátů. Rozkladem *S*-methyl-methanthiosulfínátu vzniká reaktivní thioformaldehyd (**14**), ze kterého ve vodném prostředí vzniká formaldehyd (**12**). Stejně jako v homogénatech cibule a póru, i zde analogicky dochází k tvorbě thiosulfínátů obsahujících 1-butenylovou skupinu,

kteřé snadno podléhají *E/Z* izomerizaci. Meziproduct této izomerizace může ve vodném prostředí tvořit 2-hydroxybutanal (**41**). Z *S*-(1-butenyl)-1-butenthiosulfínátu vzniká [3,3]-sigmatropním přesmykem tzv. „color developer“ (2,3-diethylbutandithialmonosulfoxid, **42**), jehož reakcí s alaninem dochází ke vzniku 2-(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny (**43**) (Obrázek 69).



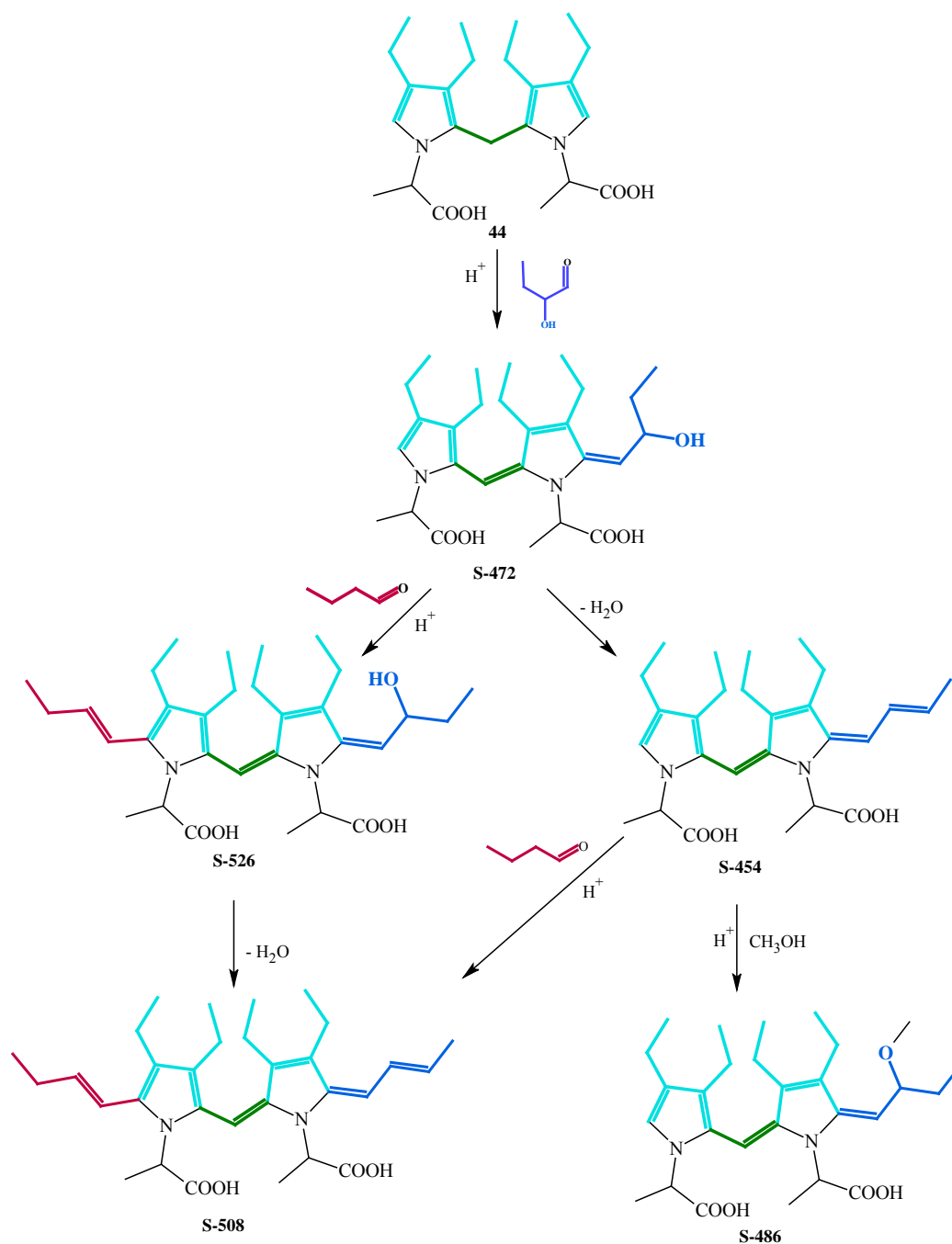
Obrázek 69: První fáze tvorby barevných látek v homogenátu *A. siculum*

Další klíčovou fází je vznik 2,2'-[methandiylbis(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanové kyseliny (**44**) (**Obrázek 70**), která tvoří základ většiny barevných látek charakterizovaných v *A. siculum*. Jedná se o kyselou katalyzovanou elektrofilní substituci. K této hydroxymethylaci dochází mezi karbonylovými sloučeninami v přítomnosti pyrrolové sloučeniny, která má volnou polohu 2 nebo 5.¹⁰⁴



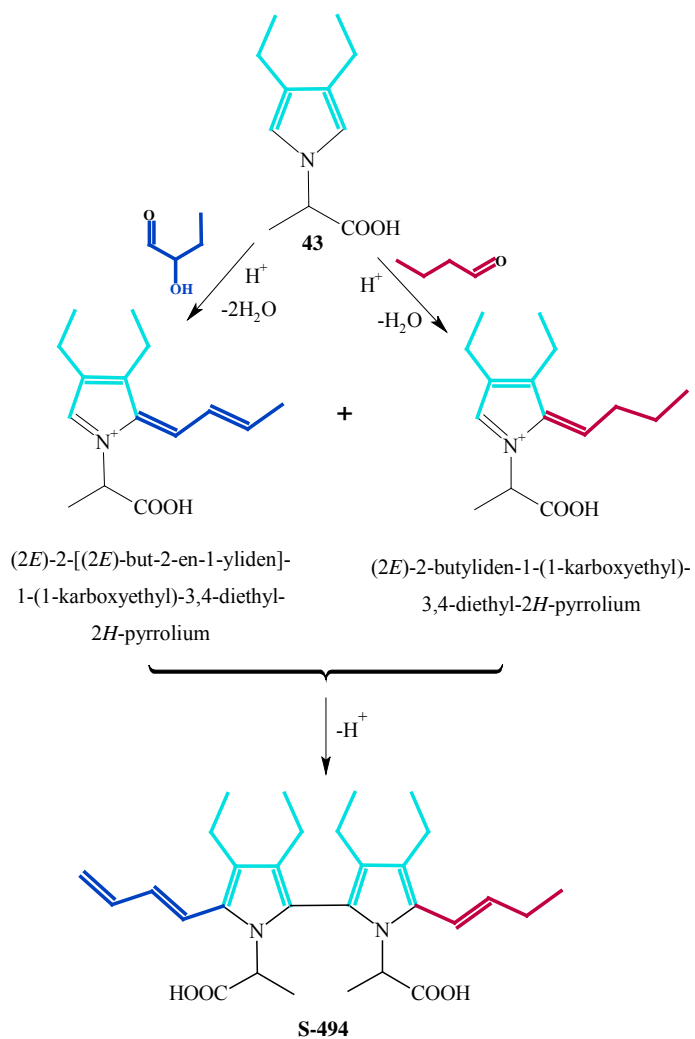
Obrázek 70: Reakce 2-(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny (**43**) s formaldehydem

Obrázek 71 zachycuje pravděpodobnou tvorbu většiny barevných látek vznikajících v česneku sicilském. Jejich prekurzorem je 2,2'-[methandiylbis(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanová kyselina (**44**), jejíž reakcí s 2-hydroxybutanalem (**41**) zřejmě vzniká S-472. U této barevné látky může docházet k dehydrataci, čímž dojde k tvorbě S-454, nebo může reagovat s butanalem za vzniku S-526. Sloučenina S-454 také může reagovat s butanalem, přičemž dojde k tvorbě S-508. Zároveň by také sloučenina S-508 mohla vzniknout dehydratací látky S-526. Zřejmě dochází, stejně jako u barevných směsí cibulového a pórového extraktu, k adici methanolu na dvojnou vazbu během zpracování nebo analýzy barevné směsi. V HRMS/MS spektru sloučeniny S-486 je opět patrné odštěpení methoxy skupiny, proto je možné, že vznikla kyselou katalyzovanou adicí na dvojnou vazbu sloučeniny S-454.



Obrázek 71: Předpokládaný vznik barevných látek v homogenátu *A. siculum* v přítomnosti alaninu

Na **Obrázku 72** je naznačen možný mechanismus vzniku sloučeniny S-494. Reakcí 2-(3,4-diethyl-1H-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny (**43**) s 2-hydroxybutanalem (**41**) by mohlo docházet k hydroxyalkylaci v poloze 2, stejně jako k reakci s butanalem. Následným odštěpením molekuly vody z obou meziproductů a jejich dimerizací by za odštěpení H^+ mohla vzniknout barevná sloučenina S-494.



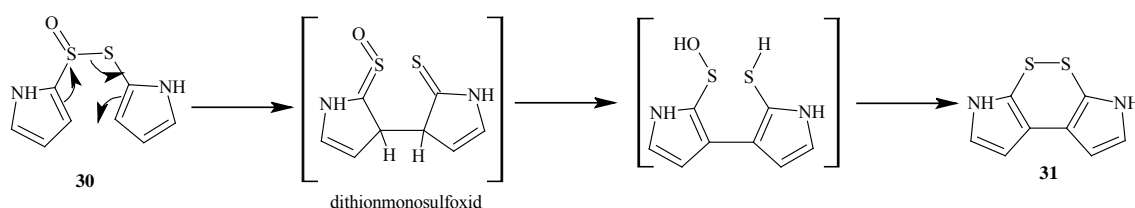
Obrázek 72: Pravděpodobný mechanismus vzniku sloučeniny S-494

6. ZÁVĚR

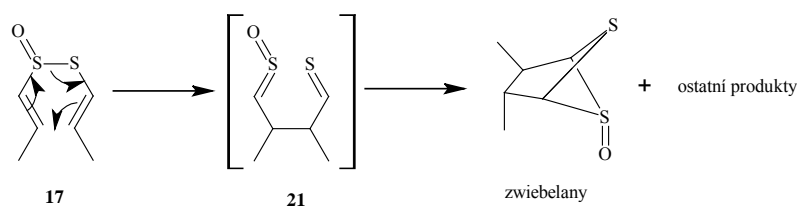
6.1 Tvorba červené sloučeniny v cibuli obří

Některé rysy tvorby červené sloučeniny v cibuli obří jsou podobné těm při tvorbě růžového pigmentu v homogenátu cibule kuchyňské. Tvorba obou druhů pigmentů je iniciována katalytickým štěpením *S*-substituovaného cysteinsulfoxidu [*S*-(2-pyrrolyl)-cysteinsulfoxidu v cibuli obří a *S*-(*E*)-(1-propenyl)cysteinsulfoxidu (isoalliinu) v cibuli kuchyňské]. V obou případech dochází k tvorbě thiosulfínátů, které velmi snadno podléhají [3,3]-sigmatropnímu přesmyku (**Obrázek 73**). Nicméně výsledné struktury barevných sloučenin a dráhy jejich vzniku v obou druzích cibule se značně liší. Zatímco pigment se v *A. giganteum* tvoří přesmykem přímo z thiosulfínátů, růžování cibule je mnohem složitější a časově mnohem pomalejší proces. Je zde zapotřebí přítomnost thiosulfínátu obsahující 1-propenylovou skupinu, aminokyseliny a (thio)karbonylové sloučeniny.

cibule obří:



cibule kuchyňská:



Obrázek 73: Produkty [3,3]-sigmatropního přesmyku v cibuli obří a v cibuli kuchyňské

6.2 Tvorba barevných sloučenin v cibuli a póru

Tvorba barevných sloučenin v cibuli a póru je iniciována katalytickým štěpením *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidů na příslušné sulfenové kyseliny. Tvorbu slzotvorné látky zapříčiňuje LF-synthasa, která katalyzuje rozklad 1-propensulfenové kyseliny. Současnou kondenzací sulfenových kyselin vznikají symetrické a asymetrické thiosulfináty. U thiosulfinátů, jež obsahují 1-propenylovou skupinu, dochází k *E/Z* izomerizaci, přičemž meziproduct izomerizace je ve vodném prostředí dále rozkládán. Reakcí tzv. „color developer“ s alaninem vzniká 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina. Ta reakcí s formaldehydem vytváří 2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanovou kyselinu, jež tvoří společný základ většiny červených látek charakterizovaných v homogenátech cibule a póru. Následnými reakcemi této dipropanové kyseliny s karbonylovými sloučeninami, které jsou rozkladnými produkty thiosulfinátů a slzotvorné látky, vznikají červené sloučeniny. Fialové sloučeniny, jejichž pyrrolová jádra jsou spojena tříuhlíkatým můstkem, vznikají reakcí 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny s thiosulfináty obsahujícími 1-propenylovou skupinu a následnými reakcemi s ostatními karbonylovými sloučeninami.

Nejdůležitější roli při tvorbě barevných sloučenin tedy hrají *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy, zejména množství přítomného *S*-(1-propenyl)cysteinsulfoxidu (isoalliinu). Jeho rozkladem vznikají slzotvorný propanthialsulfoxid a thiosulfináty obsahující 1-propenylovou skupinu, které jsou však zároveň nositeli typické a konzumenty žádané štiplavé chuti a vůně. Tyto látky zároveň vykazují různé pozitivní biologické účinky, proto je vyšší hladina isoalliinu v cibuli a póru vyžadována jak potravinářským, tak farmaceutickým průmyslem. Jisté řešení se nabízí ve vyšlechtění kultivaru, který by měl velmi aktivní enzym LF-synthasu. Z isoalliinu by přednostně vznikal propanthialsulfoxid (slzotvorná látka) na úkor výše zmíněných thiosulfinátů. Ačkoli by se tvorba červeného zbarvení výrazně omezila, tento produkt by zřejmě nebyl konzumenty vyhledáván pro jeho vyšší slzotvorné účinky.

6.3 Tvorba barevných sloučenin v česneku

Počátek tvorby barevných sloučenin v česneku je stejný jako v případě cibule a póru. Barevné látky vznikající v česnekovém homogenátu mají společný strukturní základ tvořený dvěma molekulami 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny spojenými 1-propenylenovým můstkem. Jednotlivé barevné látky pak dále vznikají reakcí 2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanové kyseliny s karbonylovými sloučeninami vytvořenými rozkladem thiosulfínátů. Zelený odstín homogenátu způsobuje přítomnost žlutých sloučenin, které jsou pravděpodobně rozkladnými produkty fialových a modrých látek.

V procesu zelenání česneku opět hraje klíčovou roli isoalliin. Ačkoli je obsah této aminokyseliny v česneku nízký (obvykle kolem 10 % z celkového množství *S*-alk(en)-ylcysteinsulfoxidů), jeho přítomnost způsobuje vznik barevných sloučenin. V tomto případě by se tvorba barevných látek dala omezit vhodným skladováním (při teplotách kolem 20 °C), množství isoalliinu je totiž závislé na teplotě skladování. Dalším řešením by mohlo být vyšlechtění kultivarů, které by přirozeně obsahovaly jen minimální množství isoalliinu. Chuť a aroma pro česnek typické totiž zapřičiňuje především rozklad *S*-allylcysteinsulfoxidu (alliinu) na allicin. Také za příznivé biologické účinky česneku jsou zodpovědné zejména látky vznikající rozkladem alliinu.

6.4 Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském

Podle předchozích předpokladů jsou rysy tvorby červených sloučenin v česneku sicilském podobné těm při tvorbě červených látek v cibuli a póru. Tvorba barevných sloučenin je iniciována katalytickým štěpením *S*-substituovaných cysteinsulfoxidů (methiinu, butiinu a homoisoalliinu). Dochází tak k tvorbě thiosulfinátů, které se dále rozkládají. Thiosulfináty obsahující 1-butenylovou skupinu podléhají *E/Z* izomerizaci, přičemž meziproduct izomerizace je ve vodném prostředí dále rozkládán. Následnou reakcí tzv. „color developer“ s alaninem vzniká bezbarvá 2-(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina. Její reakcí s formaldehydem vzniká 2,2'-[methandiylbis-(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2,1-diyl)]dipropanová kyselina, jež tvoří základ většiny barevných látek popsanych v homogenátu *A. siculum*. Následnými reakcemi této látky s karbonylovými sloučeninami vznikají červené pigmenty.

Je tedy zřejmé, že proces červenání česneku sicilského probíhá stejným způsobem jako červenání cibule a póru. Vzhledem ke skutečnosti, že tento druh česneku je pěstován spíše jako okrasná rostlina, není potřeba řešit problém se vznikem barevných sloučenin během jeho zpracování.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 Schuler, S. V *Simon & Schuster's guide to herbs and spices*, 1. vydání; Simon & Schuster, New York, USA, 1990. ISBN 067173489X.
- 2 The National Onion Association. History of onion. <http://onion-usa.org/all-about-onion/history-of-onion>. (přístup 2011-01-12).
- 3 Brewster, J. L. V *Onion and other vegetable Alliums*, 2. vydání; CABI Publishing, Oxon, UK, 2008. ISBN 1845933990.
- 4 Agarwal, K. C. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 111–124.
- 5 Rabinowitch H. D. a Currah L. V *Allium crop science: Recent advances*, CABI Publishing, New York, USA, 2002. ISBN 0851995101.
- 6 Angiosperm Phylogeny Website, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb> (přístup 2013-06-06).
- 7 Keusgen, M., Fritsch, R. M., Hisoriev, H., Kurbonova, P. A. a Khassanov, F. O. Wild *Allium* species (Alliaceae) used in folk medicine of Tajikistan and Uzbekistan. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 18–27.
- 8 Eidi, A., Eidi, M. a Esmaili, E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* **2006**, *13*, 624–629.
- 9 O'Gara, E. A., Hill, D. J. a Maslin, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallylconstituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2269–2273.
- 10 Tsao, S. M. a Yin, M. C. In vitro activity of garlic oil and four diallylsulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 665–670.
- 11 Ankri, S. a Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* **1999**, *1*, 125–129.

- 12 Hiyasat, B., Sabha, D., Grotzinger, K., Kempfert, J., Rauwald, J. W., Mohr, F. W. a Dhein, S. Antiplatelet activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Pharmacology*. **2009**, *83*, 197–204.
- 13 Borek, C. Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 810–812.
- 14 Joslyn, M. A. a Sano T. The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue. *Food Res.* **1956**, *21*, 170–183.
- 15 Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S. a Itakura, Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 955–962.
- 16 Aizikov, M., Kravets, S., Prokhorova, I. a Kurmukov, A. Structure and hypolipidemic activity of alloside B extracted from anzuronion. *Pharm. Chem. J.* **1995**, *29*, 547–549.
- 17 Goldman, I. L., Kopelberg, M., Debaene, J. E. a Schwartz, B. S. Antiplatelet activity in onion (*Allium cepa*) is sulfur dependent. *Thromb. Haemost.* **1996**, *76*, 450–452.
- 18 FAO: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, for the world without hunger. <http://www.fao.org> (přístup 2013-01-02).
- 19 Gabel, M. M., Pan, Z., Amaratunga, K. S. P., Harris, L. J. a Thompson, J. F. Catalytic infrared dehydration of onions. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 351–357.
- 20 Bai, B., Chen, F., Wang, Z., Liao, X., Zhao, G. a Hu, X. Mechanism of the greening color formation of “Laba”garlic, a traditional homemade Chinese food product. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7103–7107.
- 21 Kubec, R., Krejčová, P., Mansur, L. a García, N. Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in Alliaceae species native to South Africa and South America. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1335–1342.

-
- 22 Kubec, R., Cody, R. B., Dane, A. J., Musah, R. A., Schraml, J., Vattekkatte A., a Block, E. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. (Z)-Butanethial sulfoxide and 1-butenylthiosulfinates and their S-(E)-1-butenylcysteine sulfoxide precursor from *Allium sicutum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1121–1128.
- 23 Block, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1992**, *31*, 1135–1178.
- 24 Thomas, D. J. a Parkin, K. L. Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1632–1638.
- 25 Sun Yoo, K. S. a Pike, L. M. Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-l-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Sci. Hortic.* **1998**, *75*, 1–10.
- 26 Lawson, L. D. The composition and chemistry of garlic cloves and processes garlic. V *Garlic. The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*; Koch, H. P., Lawson, L. D., Eds; Williams & Wilkins; USA, **1996**, 37–101. ISBN 0683181475.
- 27 Freeman, G. G. a Whenham, R. J. A survey of volatile components of some *Allium* species in terms of S-alk(en)yl-l-cysteine sulphoxides present as flavour precursors. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 1869–1886.
- 28 Block, E., Dane, A. J., Thomas, S. a Cody, R. B. Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyltrisulfane S-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4617–4625.
- 29 Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T. a Kumagai, H. Plant biochemistry: An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature.* **2002**, *419*, 685.

- 30 Kubec, R. a Dadáková E. Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives - A comparative study. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 6957–6963.
- 31 Block, E. a O'Connor, J. Chemistry of alkyl thiosulfinate esters. VII. Mechanistic studies and synthetic applications. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3929–3944.
- 32 Farkaš, P., Hradský, P. a Kovác, M. Novel flavour components identified in the steam distillate of onion (*Allium cepa* L.). *Z. Lebens. Unters. For.* **1992**, *195*, 459–462.
- 33 Järvenpää, E. P., Zhang, Z., Huopalahti, R. a King, J. W. Determination of fresh onion (*Allium cepa* L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Z. Lebens. Unters. For. A.* **1998**, *207*, 39–43.
- 34 Mondy, N., Duplat, D., Christides, J. P., Arnault, I. a Auger, J. Aroma analysis of fresh and preserved onion and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **2002**, *963*, 89–93.
- 35 Schulz, H., Krüger, H., Liebmann, J. a Peterka, H. Distribution of volatile sulfur compounds in aninterspecific hybrid between onion (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium porrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5220–5224.
- 36 Lukes, T. M. Pinking of onion during dehydration. *Food Technol.* **1959**, *13*, 391–393.
- 37 Joslyn, M. A. a Peterson, R. G. Reddening of white onion bulb purees. *J. Agric. Food Chem.* **1958**, *6*, 754–765.
- 38 Joslyn, M. A. a Peterson, R. G. Reddening of white-onion tissue. *J. Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 72–76.
- 39 Yamaguchi, M., Shannon, S., Howard, F. D. a Joslyn, M. A. Factors affecting the formation of a pink pigment in purees of onion. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1965**, *86*, 475–483.

- 40 Shannon, S., Yamaguchi, M. a Howard, F. D. Reactions involved in formation of a pink pigment in onion purees. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 417–422.
- 41 Shannon, S., Yamaguchi, M. a Howard, F. D. Precursors involved in the formation of pink pigments in onion purees. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 423–426.
- 42 Bandyopadhyay, C., Tewari, G. M. Thin-layer chromatographic investigation of color developer involved in pinking of white onion purees. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 952–954.
- 43 Kubec, R., Hrbáčová, M., Musah, R. A. a Velíšek, J. *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5089–5094.
- 44 Kubec, R. a Velíšek, J. *Allium* discoloration: The color-forming potential of individual thiosulfinates and amino acids: Structural requirements for the color-developing precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3491–3497.
- 45 Dong, Y., Wang, D., Li, M., Hu, X. a Zhao, G. One new pathway for *Allium* discoloration. *Food Chem.* **2010**, *119*, 548–553.
- 46 Hong, S. I. a Kim, K. H. Storage quality of chopped garlic as influenced by organic acids and high-pressure treatment. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 397–403.
- 47 Kato, M., Kamoi, T., Sasaki, R., Sakurai, N., Aoki, K., Shibata, D. a Imai, S. Structures and reactions of compounds involved in pink discoloration of onion. *Food Chem.*, **2013**, *139*, 885–892.
- 48 Lukes, T. M. Factors governing the greening of garlic puree. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1577–1578.
- 49 Kim, D. M. a Kim, K. H. On the development of flesh greening of the stored garlic. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **1990**, *22*, 50–55.
- 50 Cho J. S., Ku K. H. a Kim W. J. Effects on rating, pH, salts and organic acids on color changes of ground garlic. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **1999**, *31*, 399–403.

- 51 Kim, W. J., Cho, J. S. a Kim, K. H. Stabilization of ground garlic color by cysteine, ascorbic acid, trisodium phosphate and sodium metabisulfite. *J. Food Quality*. **1999**, 22, 681–691.
- 52 Tsouvaltzis, P., Siomos, A. S. a Gerasopoulos, D. Effect of hot water treatment on leaf extension growth, fresh weight loss and color of stored minimally processed leeks. *Postharvest Biol. Technol.* **2006**, 39, 56–60.
- 53 Imai, S., Akita, K., Tomotake, M. a Sawada, H. Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in the blue-green discoloration of onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 843–847.
- 54 Wang, D., Nanding, H., Han, N., Chen, F. a Zhao, G. 2-(1*H*-Pyrrolyl)carboxylic acids as pigment precursors in garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1495–1500.
- 55 Wang, D., Yang, X., Wang, Z., Hu, X. a Zhao, G. Isolation and identification of one kind of yellow pigments from model reaction systems related to garlic greening. *Food Chem.* **2009**, 117, 296-301.
- 56 Körner, B. a Berk, Z. The mechanism of pink-red pigment formation in leeks. *Adv. Front. Plant Sci.* **1967**, 18, 39–52.
- 57 Schwimmer S. V *Source book of food enzymology*, 1. vydání; AVI Publishing Company. Connecticut, USA, 1981. ISBN 0870553690.
- 58 Jedelská, J., Vogt, A., Reinscheid, U. M. a Keusgen, M. Isolation and identification of a red pigment from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1465–1470.
- 59 Ichikawa M., Ide N. a Ono K. Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4849–4854.
- 60 Kopsell, D. E., Randle, W. M. a Eiteman, M. A. Changes in the *S*-alk(en)yl-cysteine sulfoxides and their biosynthetic intermediates during onion storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **1999**, 124, 177–183.

- 61 Matsuura H., Inagaki M., Maeshige K., Ide N., Kajimura Y. a Itakura Y. Changes in contents of gamma-glutamyl peptides and fructan during growth of *Allium sativum*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 70–71.
- 62 Lawson, L. D. Wang, Z. J. a Hughes, B. G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp.: precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 436–444.
- 63 Lancaster, J. E. a Shaw, M. L. γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-l-cysteine sulphoxides (flavour precursors) in *Allium*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 455–460.
- 64 Yamazaki, Y., Yamamoto, T. a Toshikatsu, O. Causes and remedies for green discoloration of processed garlic puree: effects of storage conditions on ingredient bulbs. *Food Sci. Technol. Res.* **2012**, *18*, 187–193.
- 65 Noznick, P. P. a Bundus, R. H. Preparation of garlic concentrates and powders, U.S. Patent 3,258,343, 28. června, 1966.
- 66 Ahmed, J. a Shivhare, U. S. Thermal kinetics of color change, rheology, and storage characteristics of garlic puree/paste. *J. Food Sci.* **2001**, *25*, 15–23.
- 67 Aguilar, M. a Rincón, F. Improving knowledge of garlic paste greening through the design of an experimental strategy. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10266–10274.
- 68 Entre Pinoys Atbp. Garlic Processing: Dehydration Process. <http://www.mixph.com/2007/08/garlic-processing-dehydration-process.html>. (přístup 2011-01-12).
- 69 Lee, E. J., Yoo, K. S. a Patil B. S. Freeze-dried fresh onion powder prevents green discoloration (greening) in macerated garlic. *Food Chem.* **2012**, *131*, 397–404.
- 70 Andonian, H. A. a Dickinson, W. A. Process for controlling the pinking of onion. U.S. patent 4,374,153, 15. února, 1983.
- 71 Li, K. H., Bundus, R. H. a Noznick, P. P. Prevention of pink color in white onion. U.S. patent 3,352,691, 14. listopadu, 1967

- 72 Darshan Foods. Dehydration process. <http://www.darshanfood.com/production-process.html>. (přístup 2011-01-12).
- 73 Ozgur, M., Akpınar-Bayizit, A., Ozcan, T. a Yilmaz-Ersan, L. Effect of dehydration on several physico-chemical properties and the antioxidant activity of leeks (*Allium porrum* L.). *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. **2011**, *39*, 144–151.
- 74 Shen, C. a Parkin, K. L. *In vitro* biogenesis of pure thiosulfinates and propanethial sulfoxide. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6254–6260.
- 75 Oard, S., Rush, M. C. a Oard, J. H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 169–180.
- 76 Carson, J. F., Lundin, R. E. a Lukes, T. M. Configuration of (*E*)-*S*-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide from *Allium cepa*. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1634–1635.
- 77 Kubec, R., Svobodová, M. a Velišek, J. Gas chromatographic determination of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *J. Chromatogr. A*. **1999**, *862*, 85–94.
- 78 Mori, K. a Brevet, J. L. Pheromone Synthesis; CXXXIII. 1 Synthesis of both the enantiomers of (3*Z*,9*Z*)-*cis*-6,7-epoxy-3,9-nonadecadiene, a pheromone component of *Erannis defoliaria*. *Synthesis*. **1991**, *1991*, 1125–1129.
- 79 Wijers, H. E., Boelens, H., Gen, van der, A. a Brandsma, L. Synthesis and some properties of 1-alkenyl alkyl disulfides and di(1-alkenyl) disulfides. *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas*. **1969**, *88*, 519–529.
- 80 Slater, G. P. Allyl thiocyanate-natural product or artifact in crucifer extracts? *Chromatographia*. **1992**, *34*, 461–467.
- 81 Reeves, W. P., White, M. R., Hilbrich R. G. a Biegert L. L. Phase transfer catalysis: Preparation of alkyl thiocyanates. *Synthetic Comm.* **1976**, *6*, 509–514.
- 82 Block, E., Thiruvazhi, M., Toscano, P. J., Bayer, T., Grisoni, S. a Zhao S. *Allium* chemistry: Structure, synthesis, natural occurrence in onion (*Allium cepa*), and reactions of 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2791–2798.

- 83 Naganathan, S. Organosulfur Chemistry of *Allium* Species. Disertační práce, SUNY Albany, NY, USA, 1992.
- 84 Carmona, O., Greenhouse, R., Landeros, R. a Muchowski, J. M. Synthesis and rearrangement of 2-(arylsulfinyl)- and 2-(alkylsulfinyl)-pyrroles. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5336–5339.
- 85 DeSales, J., Greenhouse, R. a Muchowski, J. M. Synthesis and rearrangement of pyrrolyl sulfides and sulfones. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3668–3672.
- 86 Thompson, A., Butler, R. J., Grundy, M. N., Laltoo, A. B. E., Robertson, K. N. a Cameron, T. S. Sulfur-based protecting groups for pyrroles and the facile deprotection of 2-(2,4-dinitrobenzene)sulfinyl and sulfonyl pyrroles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3753–3756.
- 87 Garabatos-Perera, J. R., Rotstein, B. H. a Thompson, A. Comparison of benzene, nitrobenzene, and dinitrobenzene 2-arylsulfonylpyrroles. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7382–7385.
- 88 Schraml, J., Kubec, R. a Kučerová P. Determination of substitution sites in monosubstituted five-membered aromatic heterocycles. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 147–150.
- 89 Kubec, R. a Musah, R. A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*. **2001**, *58*, 981–985.
- 90 Corzo-Martínez, M., Corzo, N. a Villamiel, M. Biological properties of onion and garlic. *Trends Food Sci. Tech.* **2007**, *18*, 609–625.
- 91 Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T. a Ariga, T. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4229–4235.
- 92 Ankri S. a Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* **1999**, *2*, 125–129.
- 93 Bachrach, G., Jamil, A., Naor, R., Tal, G., Ludmer, Z. a Steinberg, D. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J. Med. Food.* **2011**, *14*, 1338–1343.

- 94 Shadkchan, Y., Shemesh, E., Mirelman, D., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M. a Osherov, N. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. in vitro, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2004**, *53*, 832–836.
- 95 Ilic, D. P., Nikolic, V. D., Nikolic, L. B., Stankovic, M. Z. a Stanojevic, L. P. Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin incorporated in gel. *Chem. Ind.* **2010**, *64*, 85–91.
- 96 Arzanlou, M., Bohlooli, S., Jannati, E. a Mirzanejad-Asl, H. Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O in vitro. *Toxicon.* **2011**, *57*, 540–545.
- 97 Aronstein, K. A. a Hayes, G. W. Antimicrobial activity of allicin against honey bee pathogens. *J. Apicult. Res.* **2004**, *43*, 57–59.
- 98 Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T. a Ariga, T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2009**, *73*, 1948–1955.
- 99 Cai, Y., Wang, R., Pei, F. a Liang, B. B. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with beta-lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonasa eruginosa*. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 335–338.
- 100 Kundakovic, T. D., Ciric, A. D., Sokovic, M. D., Milenkovic, M. T., Nikolic, V. D. a Nikolic, G. S. Antimicrobial activity of lozenge with garlic bulb powder. *Chem. Ind.* **2011**, *65*, 607–610.
- 101 Choi, M. K., Chae, K. Y., Lee, J. Y. a Kyung, K. H. Antimicrobial activity of chemical substances derived from *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum* L. *Food Sci. Biotech.* **2007**, *16*, 1–7.
- 102 Kim, J. W., Huh, J. E., Kyung, S. H. a Kyung, K. H. Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. *Food Sci. Biotech.* **2004**, *13*, 235–239.

- 103 Lee, E. J., Rezenom, Y. H., Russell, D. H., Patil, B. S. a Yoo, K. S. Elucidation of chemical structures of pink-red pigments responsible for ‘pinking’ in macerated onion (*Allium cepa* L.) using HPLC–DAD and tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2012**, *131*, 852–861.
- 104 Eicher T. a Hauptmann, S. V *The chemistry of heterocycles*, Druhé vydání; Wiley-VCH, Weinheim, Německo, 2003. ISBN 3527307206.

8. SEZNAM ZKRATEK

- 1-BeCSO** – (*E*)-*S*-(1-butenyl)cysteinsulfoxid, homoisoalliin
- 1-PeCSO** – (*E*)-*S*-(1-propenyl)cysteinsulfoxid, isoalliin
- 1-PeS(O)SMe** – *S*-methyl-1-propenthiosulfinát
- 1-PeS(O)S1-Pe** – *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinát
- 1-PeS(O)SPr** – *S*-(1-propenyl)propanthiosulfinát
- 1-PeS(O)SAlI** – *S*-allyl-1-propenthiosulfinát
- 2-PyrrCSO** – *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxid
- 2-PyrrSLA** – 3-(2-pyrrolylsulfinyl)mléčná kyselina
- 3-PyrrCSO** – *S*-(3-pyrrolyl)cysteinsulfoxid
- ADEQUATE** – „adequately sensitive double quantum transfer experiment”
- APG III** – třetí verze taxonomického systému publikována skupinou vědců zvanou „Angiosperm Phylogeny Group“
- BCCM/LMG** – „Belgium Coordinatel Collections of Microorganisms“ (belgická sbírka mikroorganismů)
- CCM** – „Czech Collection of Microorganisms“ (česká sbírka mikroorganismů)
- CD** – circulární dichroismus
- CFU** – „colony forming unit“
- COSY** – „correlation spectroscopy“ (korelační spektroskopie)
- m*-CPBA** – *m*-chlorperoxybenzoová kyselina
- DART** – „direct analysis in real time“ (přímá analýza v reálném čase)
- DCE** – dichlorethan
- DEPT** – „distortionless enhancement by polarization“
- DMF** – dimethylformamid
- Dns-Cl** – dansylchlorid
- DSS** – sodná sůl kyseliny 3-(trimethylsilyl)propansulfonové
- EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina
- ESI** – „electrospray ionisation“ (ionizace elektrosprejem)
- FAO** – „Food and Agriculture Organization of the United Nations“
- FTIR** – „Fourier transformation infrared spectroscopy“ (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
- fwhm** – „full width at half maximum“ (šířka píku v jeho poloviční výšce)

- GC-MS** – „gas chromatography-mass spectrometry“ (plynová chromatografie-hmotnostní spektroskopie)
- HETCOR** – „heteronuclear chemical shift correlation“
- HMBC** – „heteronuclear multiple bond correlation“
- HMDSS** – hexamethyldisilan
- HPLC** – „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
- HRFAB** – „high resolution fast atom bombardement“ (bombardování rychlými atomy s vysokým rozlišením)
- HRMS** – „high resolution mass spectrometry“ (hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením)
- HSQC** – „heteronuclear single quantum correlation“
- IČ** – infračervený
- KRV/ZF/JCU** – Katedra rostlinné výroby/Zemědělská fakulta/Jihočeská univerzita
- LC-MS** – „liquid chromatography-mass spectrometry“ (kapalinová chromatografie-hmotnostní spektroskopie)
- LC-NMR** – „liquid chromatography-nuclear magnetic resonance“ (kapalinová chromatografie–nukleární magnetická rezonance)
- LF** – „lachrymatory factor“ (slzotvorná látka)
- MeOH** – methanol
- MIC** – minimální inhibiční koncentrace
- MPAg** – masopeptonový agar s glukosou
- MS** – „mass spectrometry“ (hmotnostní spektrometrie)
- NMR** – „nuclear magnetic resonance“ (nukleární magnetická rezonance)
- NOESY** – „nuclear Overhauser effect spectroscopy“
- PDA detektor** – polydiodové pole
- PDA kultivační médium** – „potato-dextrose agar“ (bramborovo-dextrosový agar)
- PFG-HMQC** – „pulse field gradient-heteronuclear multiple-quantum coherence“
- PTFE** – polytetrafluorethylen
- RDB** – „rings and double bonds“ (počet kruhů a dvojných vazeb)
- RF** – radiofrekvenční
- RICP** – „Research Institute of Crop Production“
- rpm** – „rounds per minute“ (počet otáček za minutu)
- RVO** – rotační vakuová odparka

8. SEZNAM ZKRATEK

SPE – „solid phase extraction” (extrakce pevnou fází)

TLC – „thin liquid chromatography“ (chromatografie na tenké vrstvě)

THF – tetrahydrofuran

TOF – „time of flight“ (doba letu)

TSA – trypton sójový agar

UHPLC – „ultrahigh performance liquid chromatography“ (ultraúčinná kapalinová chromatografie)

WET – „water eliminated through transverse gradients”

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace související s tématem disertační práce

- Schraml, J., Kubec, R., Kučerová P. Determination of substitution sites in monosubstituted five-membered aromatic heterocycles. *Mag. Res. Chem.* **2011**, 49, 147–150. (IF – 1,528; osobní podíl 20 %)
- Kučerová, P., Kubec, R., Šimek, P., Václavík, L., Schraml, J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 1821–1828. (IF – 2,906; osobní podíl 40 %)

Ostatní publikace

- Krejčová, P., Kučerová, P., Jäger, A. K., Stafford, G., Kubec, R. Antiinflammatory and neurological activity of pyrithione and related sulfur-containing pyridine *N*-oxides from Persian shallot (*Allium stipitatum*) (připraveno k odeslání do *J. Ethnopharmacol.*, osobní podíl 25 %)

10. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: GC-MS spektra $\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$, $\text{CD}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$, $^{13}\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$ a $\text{CH}_3\text{SSCD}=\text{CDCH}_3$
- Příloha 2: ^1H NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), ^{13}C NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), 1,1-ADEQUATE NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), COSY NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**) a HETCOR NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**)
- Příloha 3: UV a CD spektrum 2-PyrrCSO (**27**)
- Příloha 4: MS/MS spektra 2-PyrrCSO (**27**)
- Příloha 5: IČ spektrum 2-PyrrCSO (**27**)
- Příloha 6: ^1H NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), ^{13}C NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), 1,1-ADEQUATE NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), gHMBC NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), gHSQC NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**)
- Příloha 7: IČ spektrum 3-PyrrCSO (**22**)
- Příloha 8: UV a CD spektrum 3-PyrrCSO (**22**)
- Příloha 9: MS/MS spektra 3-PyrrCSO (**22**)
- Příloha 10: ^1H NMR spektrum a ^{13}C NMR spektrum 2-PyrrSLA (**28**)
- Příloha 11: IČ spektrum 2-PyrrSLA (**28**)
- Příloha 12: UV and CD spektrum 2-PyrrSLA (**28**)
- Příloha 13: MS/MS spektra 2-PyrrSLA (**28**)
- Příloha 14: ^1H NMR spektrum 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrolu (**31**)
- Příloha 15: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených v cibuli a póru
- Příloha 16: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučenin vytvořených v cibuli a póru
- Příloha 17: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených v česneku

- Příloha 18: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučenin vytvořených v česneku
- Příloha 19: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených v česneku sicilském
- Příloha 20: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučeniny vytvořených v česneku sicilském
- Příloha 21: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v cibuli a póru
- Příloha 22: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v česneku
- Příloha 23: Přehled sloučenin obsahujících dvě pyrrolová jádra vznikajících v cibuli, póru nebo v česneku
- Příloha 24: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v česneku sicilském
- Příloha 25: Přehled sloučenin obsahující dvě pyrrolová jádra vznikajících v česneku sicilském

Schraml, J., Kubec, R., Kučerová P. Determination of substitution sites in monosubstituted five-membered aromatic heterocycles. *Mag. Res. Chem.* **2011**, *49*, 147–150.

Determination of substitution sites in monosubstituted five-membered aromatic heterocycles

Jan Schraml,^{a*} Roman Kubec^b and Petra Kučerová^b

Similar magnitudes of proton–proton couplings across three, four, and five bonds and proton–carbon couplings across two and three bonds combined with difficult to predict substituent effects make the results of an indiscriminate use of routine (COSY, HSQC, HMBC, etc.) techniques for substitution site determination in C-monosubstituted five-membered heteroaromatics suspect. As demonstrated on two examples of natural products, the use of 1,1-ADEQUATE leads to unambiguous substitution site determination lending thus further support to suggested inclusion of 1,1-ADEQUATE data into computer-assisted structure elucidation (CASE) protocols. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: ¹H NMR; ¹³C NMR; INADEQUATE; 1,1-ADEQUATE; pyrrole

Introduction

It is often difficult to determine unambiguously the substituent position in structurally relatively simple mono C-substituted five-membered heteroaromatics (e.g. pyrrole, furan or thiophene). The three CH protons in these compounds form AMX spin systems with similar magnitudes of three-, four-, and five-bond proton–proton couplings and no symmetry that would distinguish the isomers similarly as it differentiates some isomers of six-membered heterocycles. Furthermore, the two- and three-bond ¹³C–¹H couplings have similar magnitudes. Combination of these NMR properties renders variants of HMBC or the recently developed method H2BC^[1–3] useless. With the possible exception of furan, in which the chemical shift difference between α and β carbons amounts to 30 ppm, the use of ¹³C chemical shifts for this purpose is limited only to compounds bearing substituents with known substituent effects (SCS). However, the method of brute force, INADEQUATE,^[4] should solve the problem in every instance (provided a sufficient amount of a soluble sample is available). With the advent of polarization transfer enhanced and ¹H detected INADEQUATE versions, the low sensitivity limitations of INADEQUATE have been substantially reduced. Of the proposed methods (for a recent review, see Ref. [5]) 1,1-ADEQUATE^[6] produces good quality 2D spectra correlating ¹H chemical shifts with double quantum ¹³C frequencies ($\kappa = 0$)^[6] (i.e. with the sum of the ¹³C chemical shifts of the two ¹³C–¹³C coupled nuclei). We shall illustrate the application of this powerful method on two seemingly trivial examples of naturally occurring 2- and 3-substituted pyrrole derivatives.

Experimental

The studied compounds S-(2-pyrrolyl)cysteine S-oxide (**1**) and S-(3-pyrrolyl)cysteine S-oxide (**2**) were isolated from acidic extracts from bulbs of *Allium giganteum* Regel. A compound having essentially the same ¹H and ¹³C NMR spectra as **1** was recently isolated by other authors^[7] but was assigned structure **2**. Isolation

and spectral characterization of **1** and **2** is described elsewhere,^[8] while the isomer differentiation is described here. The lyophilized compounds were measured in D₂O (Aldrich, 99.9 at. % D) solutions (approximately 20 mg/ml).

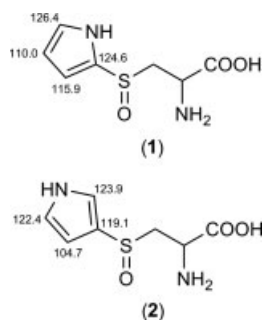
Solution ¹H and ¹³C NMR spectral measurements were performed on a Varian INOVA-500 spectrometer (operating at 499.9 and 125.7 MHz for ¹H and ¹³C, respectively) using a 5-mm broad-band switchable probe with $\pi/2$ pulses of 8.3 and 7.4 μ s for ¹H and ¹³C, respectively. Standard software (vnmr6.1C) was used in combination with the pulse sequence program (adequate_da) provided by Dr Peter Sandor, Varian. All the spectra were recorded at 25 °C. The relevant pyrrole parts of ¹H and ¹³C NMR spectra were measured using spectral widths of 800 and 4000 Hz, respectively. Protons were WALTZ^[9] decoupled while ¹³C decoupling was achieved by WURST-40^[10] decoupling. 1,1-ADEQUATE data were acquired using acquisition time 0.320 s, 64 increments, relaxation delay 1.5 s. The delays in the sequence were optimized for ¹J(¹³C–¹³C) = 62 Hz and ¹J(¹³C–¹H) = 181 Hz. The 512 data points along t_2 axis were zero filled to 1K and then weighted by shifted sine bell. Forward linear prediction was used to extend the data along t_1 axis to 128 points and then zero filled to 1K and weighted by shifted sine bell before the second Fourier transform.

Note that less than optimum probe was used in the measurements, the experimental time could be shortened by using an indirect detection probe or even more so by a cryoprobe not available to us.

* Correspondence to: Jan Schraml, Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v.v.i., Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic. E-mail: schraml@icpf.cas.cz

a Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v.v.i., Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic

b Department of Applied Chemistry, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic



Scheme 1. The structures and indicated ^{13}C chemical shifts were assigned as the result of the work reported here.

Results and Discussion

The two pyrrole derivatives (**1** and **2**) shown in Scheme 1 are good illustrative examples for demonstrating the utility of 1,1-ADEQUATE in determination of the substitution site of the heterocyclic moiety. The fact that the three CH pyrrole protons form an AMX spin system with similar magnitudes of 3J (2.5–3.5 Hz), 4J (4.5 Hz), and 5J (1.5 Hz)^[11] together with unknown substituent effects of the side chain does not allow to determine how many bonds separate each pair of the protons (i.e. to which proton is the substituted carbon adjacent). HMBC correlation-type experiments are also of little help as $^2J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ and $^3J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ couplings have similar magnitudes.^[12] The use of ^{13}C chemical shifts (δ (C-2,5) \sim 117 ppm and δ (C-3,4) \sim 107 ppm)^[12] can be misleading as demonstrated on 2-(methylsulfonium)pyrrole chloride (δ (C-2) = 103.6 ppm, the structure determined by X-ray diffraction).^[13] Similarly, the difference in $^1J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ couplings (183 Hz for C-2 as compared with 169 Hz for C-3)^[12] cannot be reliably utilized until the substituent effects are well documented. (In some cases, especially when the compound in question is soluble in solvents not allowing NH proton exchange, application of NOE-based methods^[14] might help. However, this is not the case of compounds **1** and **2**.)

It is straightforward to obtain one bond C-H connectivity for all pyrrole AMX protons of **1** by any of the available correlation experiments (HETCOR, HSQC, HMQC, etc.) and to identify the chemical shift of the carbon bearing the substituent (C_{ipso} , see Fig. 1). The C-C connectivities are established similarly straightforwardly from the 1,1-ADEQUATE spectrum presented in Fig. 2. The two cross peaks with F1 coordinate of 236.4 ppm (i.e. $\delta(C_A) + \delta(C_X)$) are due to two coupled ^{13}C nuclei (C_A-C_X) and those with F1 = 225.9 ppm (i.e. $\delta(C_M) + \delta(C_X)$) indicate that the nucleus C_X is also coupled to the C_M nucleus, establishing thus connectivity $C_A-C_X-C_M$. The only cross peak with F1 = 240.5 ppm (i.e. $\delta(C_M) + \delta(C_{\text{ipso}})$) proves that the C_{ipso} carbon is attached to the C_M carbon. Thus, the connectivity $C_A-C_X-C_M-C_{\text{ipso}}$ unambiguously identifies the sample as a 2-pyrrolyl derivative. It should be mentioned that the compound having within experimental errors the same ^1H and ^{13}C spectra as **1** was previously identified (supposedly on the basis of HSQC, HMBC, and COSY experiments) as the 3-pyrrolyl derivative.^[7]

As the 1,1-ADEQUATE spectrum of **2** (Fig. 3) shows, the signal pattern observed for the 3-pyrrolyl derivative is entirely different, with only one pair of cross peaks having the same F1 coordinate. The other cross peaks do not have their counterparts as the remaining two carbons (C_A and C_X) are coupled to the carbon bearing no hydrogen atom (C_{ipso}). These data clearly establish the connectivity $C_A-C_{\text{ipso}}-C_X-C_M$ corresponding to the 3-substituted pyrrole derivative.

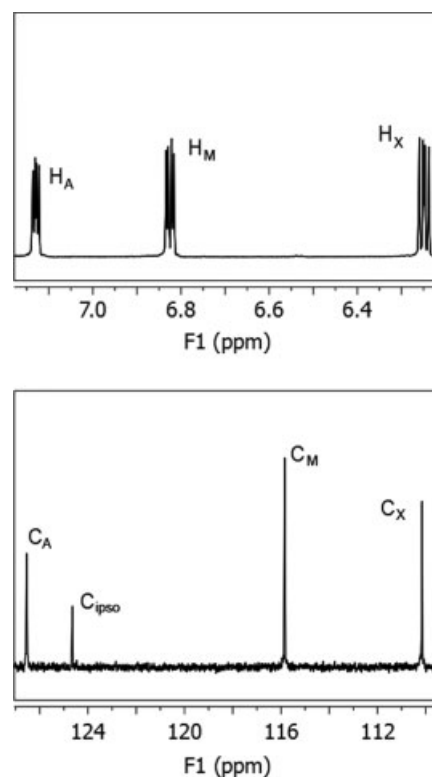


Figure 1. NMR spectra of **1** (pyrrole part). Top: ^1H NMR spectrum, bottom: ^{13}C NMR spectrum. Peaks are labeled according to ^1H NMR spectrum and one-bond $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ correlation.

Table 1. Relevant ^1H and ^{13}C NMR data of **1** and **2**^a

	1	2
H-2'	–	7.41 ($J(2'4') = 1.7$; $J(2'5') = 1.9$)
H-3'	6.86 ($J(3'5') = 1.5$; $J(3'4') = 3.8$)	–
H-4'	6.28 ($J(4'5') = 2.7$)	6.58 ($J(4'5') = 3.1$)
H-5'	7.16	6.97
C-2'	124.6 (C_{ipso})	123.9 (C_A)
C-3'	115.9 (C_M)	119.1 (C_{ipso})
C-4'	110.0 (C_X)	104.7 (C_X)
C-5'	126.4 (C_A)	122.4 (C_M)

^a Chemical shifts in δ scale, coupling constants (J) in Hz. Carbon labeling used in figures are indicated in parentheses.

The assigned NMR parameters are summarized in Table 1.

Although we have demonstrated the application of 1,1-ADEQUATE on pyrrole derivatives only, extension of this approach to other heterocyclic compounds is obvious. The straightforward interpretation of 1,1-ADEQUATE data speaks again for their inclusion into computer-assisted structure elucidation (CASE) protocols as suggested by Cheatham *et al.*^[15]

Conclusion

This contribution underscores the utility of 1,1-ADEQUATE in determination of the site of substitution in five-membered

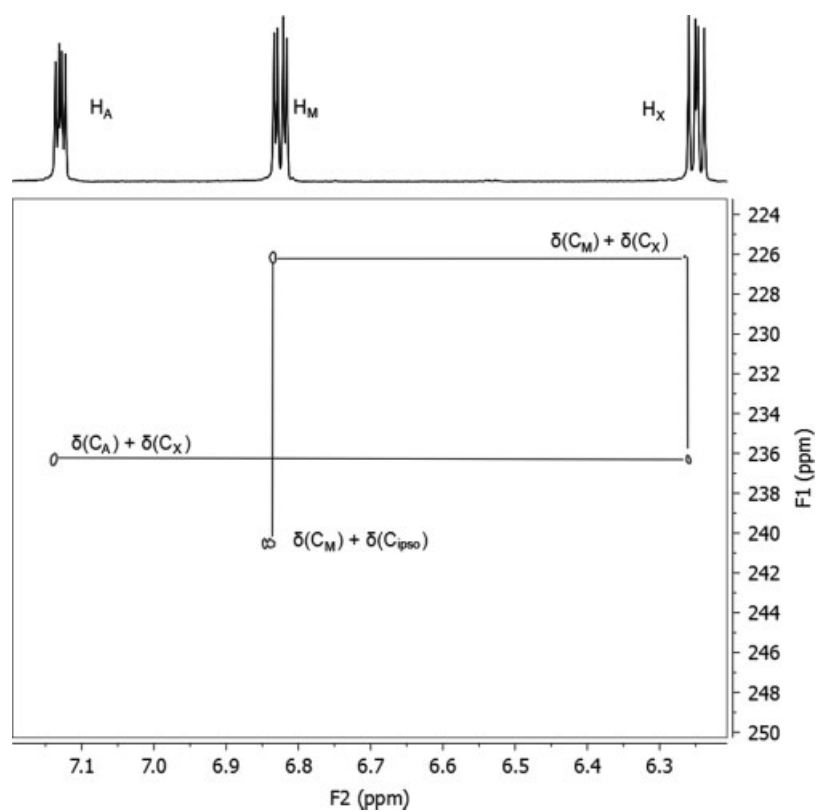


Figure 2. 1,1-ADEQUATE spectrum of the pyrrole part of **1** with ^1H NMR spectrum shown on the top. C–C connectivities and double quantum chemical shifts are indicated.

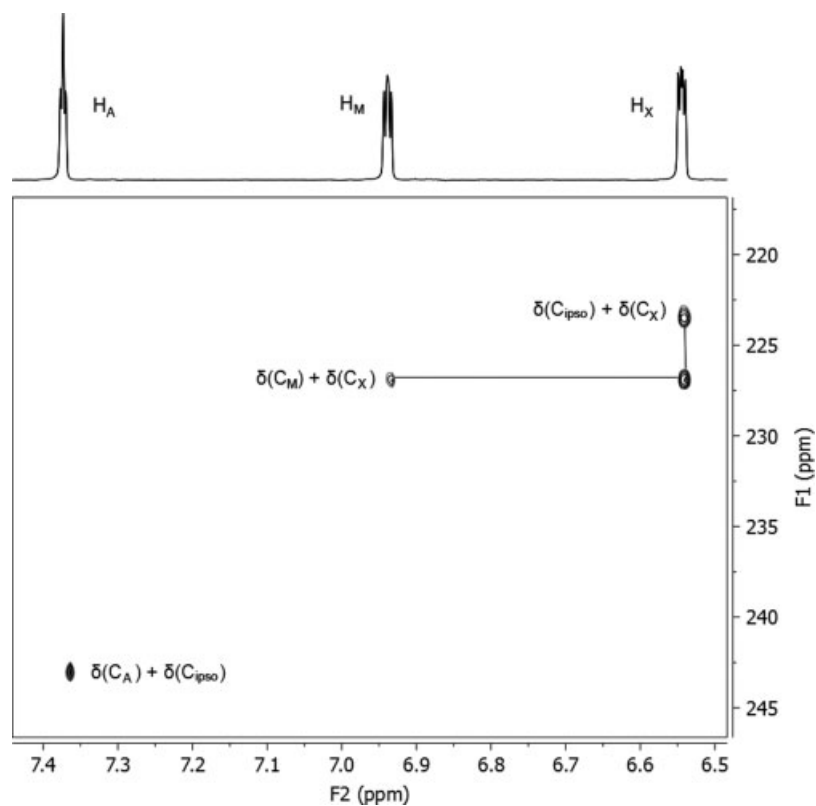


Figure 3. 1,1-ADEQUATE spectrum of the pyrrole part of **2** with ^1H NMR spectrum shown on the top. C–C connectivities and double quantum chemical shifts are indicated.

aromatic heterocycles. Providing that a sufficient signal-to-noise ratio can be achieved, 1,1-ADEQUATE provides a fool-proof method for distinguishing 2- and 3-pyrrolyl derivatives where the substituent position is often difficult to determine by routine NMR techniques. This robust method appears to be the method of choice also for substituent position determination in other heteroaromatic compounds. Though 1,1-ADEQUATE is a general method, its realm of use seems to be reserved for complex molecules (especially those with a number of quaternary carbon atoms). However, the present work demonstrates that it can also solve some seemingly trivial problems related to small molecules. Inclusion of 1,1-ADEQUATE data into CASE protocols would significantly speed up structure determination especially when a cryogenically cooled probe is available.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support provided by the Grant Agency of AS CR (IAA 400720706) (J.S.), the Grant Agency of South Bohemia (GAJU 067/2010/Z) (R.K.), and the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM6007665806) (R.K.). The authors also thank Dr Peter Sandor of Varian (now Agilent) for providing the pulse sequence adequate_da. Discussions with Dr Radek Pohl (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of AS CR) are gratefully acknowledged.

References

- [1] N. T. Nyberg, J. O. Duus, O. W. Sorensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6154.
- [2] N. T. Nyberg, J. O. Duus, O. W. Sorensen, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 971.
- [3] A. J. Benie, O. W. Sorensen, *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 315.
- [4] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2102.
- [5] T. Parella, F. Sánchez-Ferrando, *J. Magn. Reson.* **2004**, *166*, 123.
- [6] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. A* **1996**, *118*, 282.
- [7] J. Jedelská, A. Vogt, U. M. Reinscheid, M. Keusgen, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1465.
- [8] P. Kučerová, R. Kubec, P. Šimek, L. Václavík, J. Schraml, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59.
- [9] A. J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 335.
- [10] É. Kupče, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1995**, *115A*, 273.
- [11] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, *Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectra Data*, Springer: Berlin, **2000**.
- [12] H.-O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *¹³C-NMR-Spektroskopie*, G. Thieme: Stuttgart, **1984**.
- [13] A. Thompson, R. J. Butler, M. N. Grundy, A. B. E. Laltoo, K. N. Robertson, T. S. Cameron, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3753.
- [14] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers: Weinheim, **2000**.
- [15] S. F. Cheatham, M. Kline, R. R. Sasaki, K. A. Blinov, M. E. Elyashberg, S. G. Molodtsov, *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 571.

Kučerová, P., Kubec, R., Šimek, P., Václavík, L., Schraml, J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 1821–1828.

Allium Discoloration: The Precursor and Formation of the Red Pigment in Giant Onion (*Allium giganteum* Regel) and Some Other Subgenus *Melanocrommyum* Species

Petra Kučerová,[†] Roman Kubec,^{*,†} Petr Šimek,[‡] Lukáš Václavík,[§] and Jan Schraml^{||}

[†]Department of Applied Chemistry, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

[‡]Laboratory of Analytical Biochemistry, Biology Centre of the ASCR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05, České Budějovice, Czech Republic

[§]Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

^{||}Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v.v.i., Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic

S Supporting Information

ABSTRACT: The precursor of the orange-red pigment formed upon wounding the bulbs of *Allium giganteum* (*Allium* subg. *Melanocrommyum*) was isolated and shown to be *S*-(2-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide. In addition, two other pyrrolylsulfinyl derivatives were found in an extract from the bulbs, namely, 3-(2-pyrrolylsulfinyl)lactic acid and *S*-(3-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide. Contrary to a previous report, the latter compound was shown not to serve as the precursor of the pigment, being in fact only an artifact formed during isolation. The formation of pyrrolyl-containing compounds following disruption of *A. giganteum* bulbs was studied by a combination of LC–MS, LC–NMR and DART-MS. It was found that *S*-(2-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide is cleaved by a C–S lyase (alliinase) to yield 2-pyrroloethanesulfenic acid. Two molecules of the latter compound give rise to highly reactive *S*-(2-pyrrolyl) 2-pyrroloethiosulfinate which in turn converts into red 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrole (dipyrrolo[2,3-*d*:2',3'-*e*]-1,2-dithiin). Several other pyrrolyl-containing compounds were detected in *A. giganteum* for the first time, including *S*-methyl 2-pyrroloethiosulfinate, *S*-(2-pyrrolyl) methanethiosulfinate, di(2-pyrrolyl) disulfide, and *S*-(2-pyrrolyl) 2-pyrroloethiosulfonate. It can be concluded that the formation of the orange-red pigment in *Allium* subg. *Melanocrommyum* species, despite sharing several analogous features, is of a different nature than the pink discoloration of onion (*A. cepa*).

KEYWORDS: *S*-(2-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide, *S*-(3-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide, giant onion, *Allium giganteum*, *Melanocrommyum*, discoloration, thiosulfinate, pigment, LC–NMR, DART-MS, sulfenic acid, non-protein amino acid

INTRODUCTION

The genus *Allium* L. (Alliaceae) comprises more than 800 different species growing mostly in the Northern hemisphere. Due to its large diversity, the genus is currently divided into 15 subgenera, with *Melanocrommyum* being one of the largest groups. The subgenus *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy comprises about 160 mostly perennial species native to arid regions of the Mediterranean, the Near and Middle East, northwestern China, Pakistan and Central Asia.^{1,2} Many of these plants are frequently consumed (e.g., *A. stipitatum* or *A. rosenbachianum*) or used in traditional medicine (e.g., *A. suworowii*, *A. motor* or *A. hissaricum*) to treat a variety of disorders.³ Thanks to their attractive and long-lasting inflorescences, many subgenus *Melanocrommyum* species are popular ornamental plants and some are commercially cultivated for landscaping purposes.

A. giganteum Regel belongs to the tallest *Allium* species, hence its common name “giant onion”. It produces sturdy stalks up to 160 cm tall, each bearing a fireworks-like cluster of star-shaped, purple flowers with a diameter of about 20 cm. This bulbous plant is native to the dry steppes of Eastern and Central Asia. Giant onion is known for its ability to produce remarkable amounts of an intensely orange-red exudate upon wounding the bulbs or leaves (Figure 1). Reportedly, this pigment is locally used for dyeing of clothes.⁴



Figure 1. Color changes of *A. giganteum* bulb induced by cutting.

We were attracted to the orange-red pigment of giant onion due to our long-term interest in colored compounds formed in alliaceous plants following tissue disruption. For example, the color of garlic (*Allium sativum*) often turns green-blue during pickling,⁵ whereas undesirable pink discoloration can develop during industrial or culinary processing of onion (*Allium cepa*).⁶ Although the discoloration of garlic and onion has been extensively studied, this economically important phenomenon is still

Received: October 28, 2010

Accepted: January 11, 2011

Revised: January 4, 2011

Published: February 07, 2011

not completely understood. It has been found that the discoloration of both onion and garlic is of a very similar nature, with *S*-(*E*)-(1-propenyl)cysteine *S*-oxide (isoalliin) being the primary precursor.^{7–10} Isoalliin, together with other *S*-alk(en)ylcysteine *S*-oxides (mainly methiin and alliin), is enzymatically cleaved upon disruption of the tissue, yielding 1-propenyl-containing thiosulfonates [(*E*)-CH₃CH=CHS(O)SR and (*E/Z*)-CH₃CH=CHSS(O)R]. These thiosulfonates subsequently react with amino compounds to give a variety of *N*-substituted derivatives of 3,4-dimethylpyrrole^{7–12} (Figure 2).

The formation of the pigment in giant onion is noticeably faster compared to that in common onion. Whereas the orange-red exudate in *A. giganteum* is formed nearly instantly after tissue disruption, the formation of pink discoloration in onion takes much longer (typically several hours at room temperature). Joslyn and Peterson⁶ were the first to study the red compounds formed in *A. giganteum*. They noticed a close similarity of UV–vis spectra of the pigments formed upon tissue disruption of *A. giganteum* and common onion. Jedelská et al.⁴ recently reported the pigment precursor in giant onion to be *S*-(3-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide (3-PyrCSO). It was proposed that this amino acid is cleaved by alliinase to yield a red pyrrole derivative 3,3'-epidithio-2,2'-dipyrrole (alternative name [2,3-*c*:2',3'-*f*]-1,2-dithiin).

In this paper, we report the results of our studies of the orange-red pigment formed in *A. giganteum* and several other subgenus *Melanocrommyum* species upon tissue disruption. Besides other

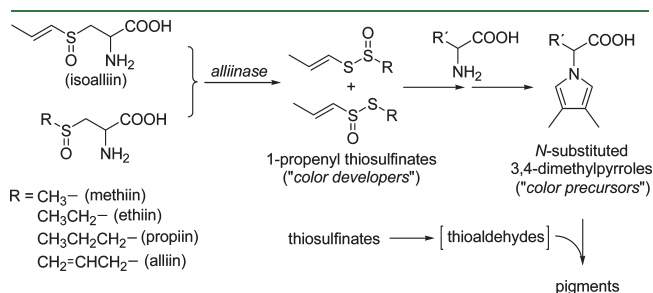


Figure 2. Formation of colored compounds during processing of garlic and onion.

novel findings, we present evidence that the structure of the amino acid precursor of this pigment is different from that reported previously by Jedelská et al.⁴

RESULTS AND DISCUSSION

An amino acid-containing fraction from the bulbs of *A. giganteum* was obtained by extraction with acidified aqueous methanol (MeOH/H₂O/HCl 90/9/1, v/v/v) and subsequent treatment by cation-exchange chromatography. C-8 HPLC analysis of the fraction revealed the presence of several compounds exhibiting significant absorption in the region of 240–280 nm. Three of these compounds (1–3) were subsequently isolated and fully characterized by spectroscopic methods.

The major isolated compound (1) was found to be both Ehrlich-positive and ninhydrin-positive. Its ¹³C NMR spectroscopic data indicated the presence of four aromatic carbons (δ 110.0, 115.9, 124.6, and 126.4 ppm), together with one carboxylic (δ 175.1 ppm) and two sp³-hybridized (δ 51.5 and 55.2 ppm) carbon atoms. Further NMR experiments (including COSY, HETCOR, DEPT, and HMBC) revealed the presence of two isolated structural subunits: (i) a monosubstituted pyrrolyl moiety and (ii) a –CH₂CH(X)COOH chain (Table 1). The IR spectrum contained a very strong absorption band at 995 cm⁻¹ (–S=O) and the ESI-TOF HRMS exhibited [M + H]⁺ of 203.0485 (calcd for C₇H₁₁N₂O₃S 203.0485), indicating that the compound is an *S*-pyrrolyl substituted cysteine *S*-oxide. The most difficult task in the structure elucidation of 1 appeared to be establishing the site of pyrrole substitution by the cysteinyl moiety. Due to mutual coupling of all three pyrrolyl –CH= hydrogens and comparable magnitudes of ²J(¹³C–¹H) and ³J(¹³C–¹H) coupling constants, COSY, HMBC, DEPT or NOESY NMR experiments could not provide a clear proof regarding the site of pyrrole substitution. Comparison of the NMR data of 1 with those of various 2- and 3-sulfinyl pyrrole derivatives reported in the literature^{13–16} indicated substitution at position 2. For example, the signals of the pyrrolyl –CH= hydrogens in 2-sulfinyl derivatives typically appear as three distinct doublets of doublets (*J*_{3,4}, *J*_{3,5} and *J*_{4,5} of 3.8, 1.5, and 2.8 Hz, respectively). On the other hand, the pyrrolyl hydrogens in 3-sulfinyl derivatives usually exhibit one triplet and two

Table 1. ¹H and ¹³C NMR Data of Compounds Isolated in This Study (1–3) and the Compound Reported in Ref 4

	chemical shifts (ppm), signal intensity, multiplicity, coupling constants (Hz)			
	1	2	3	2'
H-2	3.86 (1H, dd, 8.2/5.2)	3.90 (1H, dd, 8.2/4.8)	4.23 (1H, dd, 10.5/3.0)	4.23 (1H, dd, 7.8/6.7)
H-3a	3.55 (1H, dd, 5.2/13.8)	3.48 (1H, dd, 4.8/13.9)	3.07 (1H, dd, 10.5/13.3)	3.64 (1H, dd, 6.7/5.7)
H-3b	3.63 (1H, dd, 13.8/8.2)	3.56 (1H, dd, 13.9/8.2)	3.69 (1H, dd, 13.3/3.0)	3.83 (1H, dd, 7.8/5.7)
H-2'		7.41 (1H, t, 1.8)		7.22 (1H, dd, 1.0/3.0) ^a
H-3'	6.85 (1H, dd, 1.5/3.8)		6.79 (1H, dd, 1.5/3.8)	
H-4'	6.27 (1H, dd, 2.7/3.8)	6.58 (1H, dd, 1.7/3.1)	6.24 (1H, dd, 2.7/3.8)	6.35 (1H, dd, 3.0/3.9)
H-5'	7.15 (1H, dd, 1.5/2.7)	6.97 (1H, dd, 1.9/3.1)	7.10 (1H, dd, 1.5/2.7)	6.92 (1H, dd, 1.0/3.9) ^b
C-1	175.1	171.9	178.3	174.3
C-2	51.5	51.3	67.1	51.3
C-3	55.2	53.8	57.9	53.9
C-2'	124.6	123.9	125.4	126.5 ^c
C-3'	115.9	119.1	115.1	124.7 ^d
C-4'	110.0	104.7	109.8	110.3
C-5'	126.4	122.4	125.8	115.9 ^e

^a Correct assignment is H-5'. ^b Correct assignment is H-3'. ^c Correct assignment is C-5'. ^d Correct assignment is C-2'. ^e Correct assignment is C-3'.

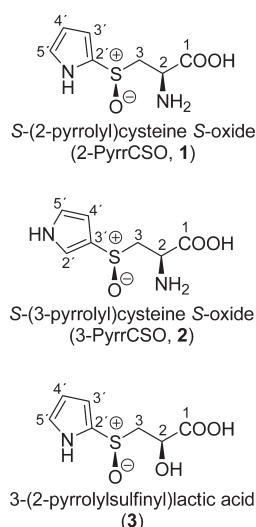


Figure 3. Structures of pyrrolyl-containing compounds isolated from *Allium giganteum* bulbs.

doublets of doublets ($J_{2,4}$, $J_{2,5}$ and $J_{4,5}$ of 1.7–1.8, 2.0–2.1 and 3.1–3.2 Hz, respectively). The signals in **1** appeared as three nicely separated doublets of doublets ($J = 3.8$, 1.5, and 2.7 Hz), indicating substitution at position 2. Foolproof evidence that the pyrrolyl moiety is indeed substituted at position 2 was obtained by a 1,1-ADEQUATE NMR experiment (see Supporting Information).¹⁷

CD and ¹H NMR spectroscopy together with polarimetry were used to determine the absolute configuration around the two chiral centers of **1** (around the sulfur and the α -carbon). The CD spectrum of the amino acid showed a positive maximum at 251 nm (see Supporting Information). The ¹H NMR spectrum of **1** contained a characteristic ABX splitting pattern for the two $-\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^-$ methylene protons which appeared as two distinct doublets of doublets ($J_{\text{AX}} = 5.2$ Hz and $J_{\text{BX}} = 8.2$ Hz) centered at δ 3.55 and δ 3.63 ppm, respectively. These NMR data suggested that both the amino group and the sulfoxide oxygen are on the same face of the molecule.^{18,19} Furthermore, the optical rotation of the compound was found to be $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +36.2^\circ$, indicating that the spatial arrangement about the sulfoxide group is analogous to that of other dextrorotary S-substituted cysteine S-oxides (e.g., alliin). Thus, the structure of the isolated amino acid could be unambiguously determined as ($R_{\text{S}}, R_{\text{C}}$)-S-(2-pyrrolyl)cysteine S-oxide (2-PyrrCSO, **1**) (Figure 3).

The second isolated compound (**2**) gave positive tests with both Ehrlich's reagent and ninhydrin, which suggested that it is also a pyrrolyl-containing amino acid. The compound exhibited very similar ESI-MS fragmentation patterns to those of **1** in both negative and positive modes (see Supporting Information), and the ESI-HRMS data showed that **1** and **2** have the same elemental composition ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$). ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** and **2** differed only slightly, confirming a very close structural similarity of these two compounds (Table 1). These findings in combination with further NMR experiments (including COSY, HETCOR, HMBC, HSQC) and IR data revealed that **2** is also an S-pyrrolyl substituted cysteine S-oxide. The 1,1-ADEQUATE NMR spectrum of **2** provided fool-proof evidence that the pyrrole moiety is substituted at position 3 (see Supporting Information).¹⁷ Furthermore, the signals corresponding to the three pyrrolyl $-\text{CH}=\text{}$ hydrogens appeared as one triplet (H-2') and two doublets of

doublets (H-4' and H-5'), which is fully in agreement with literature data reported for 3-sulfinyl pyrrole derivatives.^{13,14}

The absolute configuration around the sulfur and the α -carbon in **2** was deduced from the sign of optical rotation and ¹H NMR and CD spectra. The ¹H NMR spectrum contained two nicely separated doublets of doublets (δ 3.48 and δ 3.56 ppm, with $J_{\text{AX}} = 4.8$ Hz and $J_{\text{BX}} = 8.2$ Hz, respectively), belonging to the two $-\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^-$ methylene protons. Furthermore, the compound was found to be dextrorotary ($[\alpha]_{\text{D}}^{22} +45.7^\circ$) and exhibited the same sign of the Cotton effect as **1**. All these data indicated that both the amino group and the sulfoxide oxygen are on the same face of the molecule and that the absolute configuration around the sulfur is *R*. Thus, the structure of the compound could be established as ($R_{\text{S}}, R_{\text{C}}$)-S-(3-pyrrolyl)cysteine S-oxide (3-PyrrCSO, **2**) (Figure 3).

It has been reported, however, that 2-sulfinylpyrroles can readily isomerize to the corresponding 3-sulfinyl derivatives in acidic solutions.^{13–16} Because acidified aqueous methanol was used for extraction, we decided to prove whether 3-PyrrCSO is a component genuinely present in the intact bulbs or it is only an artifact formed from 2-PyrrCSO during isolation. Pure **1** was thus subjected to the same treatment (including extraction with acidified methanol) as were the bulbs during the isolation procedure. It was found that 2-PyrrCSO extensively converted into 3-PyrrCSO when treated with cold acidified methanol (approx. 50% conversion after 4 h, with no other side products detectable by HPLC). It is noteworthy that this isomerization proceeded with complete retention of the absolute configuration around the sulfur. To confirm the absence of 3-PyrrCSO in intact bulbs of *A. giganteum*, another extract was prepared using nonacidified aqueous methanol (MeOH/H₂O 90/10, v/v). Indeed, 3-PyrrCSO was not detected in this extract, confirming that this compound is only an artifact not naturally present in the intact bulbs.

The presence of 3-PyrrCSO (**2**) in *A. giganteum* was recently reported by Jedelská et al.,⁴ who claimed that this compound is the precursor of the red pigment formed upon cutting the bulbs. In the present study, however, we have shown that 3-PyrrCSO is absent in the intact bulbs and, as will be described later, alliinase-mediated decomposition of this amino acid does not yield any red compounds. Careful evaluation of the analytical data given by Jedelská et al. for the compound they isolated (**2'**) revealed several major discrepancies with our findings. As summarized in Table 1, the ¹³C NMR shifts of **2'** are nearly identical to those of **1**. Furthermore, the signals of the pyrrolyl $-\text{CH}=\text{}$ hydrogens in **2'** appeared as three doublets of doublets, with the chemical shifts and coupling constants corresponding to the 2-substituted derivative (**1**). Jedelská et al. reported that they deduced the structure of **2'** mainly from the HMBC NMR data. According to our experience, however, the HMBC spectrum could not provide an affirmative proof of the site of pyrrole substitution due to many comparable long-range correlations. Furthermore, we also found that the UV spectra of 2-PyrrCSO and 3-PyrrCSO differ quite considerably (perhaps due to the hydrogen bonding between the pyrrolyl $-\text{NH}-$ hydrogen and the sulfoxide oxygen). Whereas 2-PyrrCSO exhibits UV absorption maxima at 219 and 250 nm, those of 3-PyrrCSO are located at 202 and 232 nm (see Supporting Information). Jedelská et al. reported that the UV spectrum of the compound they isolated (**2'**) exhibited maxima at 220 and 250 nm, which are values nearly identical to those we observed for 2-PyrrCSO. Thus, we believe that we gathered enough evidence to conclude that the compound isolated by Jedelská et al. (**2'**) was in fact S-(2-pyrrolyl)cysteine S-oxide (**1**).

The NMR spectra of the third compound (**3**) isolated from the bulbs were very similar to those of **1**, revealing the presence of both a monosubstituted pyrrolyl moiety and a $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{X})\text{COOH}$ chain (Table 1). The most obvious difference between the ^{13}C NMR spectra of **1** and **3** was observed in the chemical shifts of the C-2 carbons (δ 51.5 and 67.1 ppm, respectively), indicating that the substituent $-\text{X}$ in **3** is a more electron-withdrawing group than $-\text{NH}_2$. The compound gave a positive test with the Ehrlich's reagent, while it did not react with ninhydrin, showing that **3** probably contains a pyrrolyl moiety but it is not an amino acid. The IR spectrum of **3** contained a very strong absorption band at 987 cm^{-1} ($-\text{S}=\text{O}$) and the ESI-TOF HRMS exhibited $[\text{M} - \text{H}]^-$ of 202.0182 (calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_4\text{S}$ 202.0180). The chemical shifts, splitting patterns (three distinct doublets of doublets) and coupling constants of the pyrrolyl $-\text{CH}=\text{H}$ hydrogens clearly showed that the pyrrole moiety is substituted at position 2 (Table 1). Based on the aforementioned spectral data, we could conclude that **3** is 3-(2-pyrrolylsulfinyl)lactic acid. The UV and CD spectra of **3** were nearly identical with those of **1**, indicating that both compounds have the same absolute configuration around the two chiral centers, i.e. $R_S R_C$. Thus, the structure of **3** could be assigned as (R_S, R_C) -3-(2-pyrrolylsulfinyl)lactic acid (Figure 3).

The isolation of another pyrrolyl derivative of lactic acid, (R_S, R_C) -2-(3-pyrrolylsulfinyl)lactic acid (**3'**), from *A. giganteum* was reported by Jedelská et al.⁴ According to the NMR data given, it can be assumed that the compound was rather the corresponding 2-pyrrolylsulfinyl derivative, i.e. 3-(2-pyrrolylsulfinyl)lactic acid. It was proposed that **3'** is not present in the intact tissue, but it is generated by the reaction of the enzymatically formed pyrrole-sulfenic acid with pyruvic acid following tissue disruption. However, we consider this proposal highly questionable, because four different stereoisomers of **3'** would be formed by this hypothetical reaction but only one was found. Besides, we could not confirm the presence of **3'** in any of our samples or model mixtures although we specifically searched for components with M_r 203 other than **3** by LC-MS.

GC-MS and HPLC analysis of the amino acid fraction isolated from *A. giganteum* bulbs also revealed the presence of another S-substituted cysteine derivative, namely, (S_S, R_C) -S-methylcysteine S-oxide (methiin, MCSO, **4**). This well-known amino acid is commonly present in all alliaceous species^{19–21} and its finding in *A. giganteum* is in accordance with the previous report.⁴ The relative ratio of 1/4 was found to be 79/21 in the bulbs of *A. giganteum* we analyzed. None of the other cysteine derivatives monitored in this study was detected in the amino acid fraction from the bulbs.

In theory, the two cysteine derivatives present in the intact bulbs, 2-PyrrCSO (**1**) and MCSO (**4**), should give rise to four thiosulfates (two symmetrical and two unsymmetrical ones) under the catalysis by alliinase (Figure 4). In order to identify the products of alliinase-mediated decomposition of **1** and **4**, a diethyl ether extract of homogenized bulbs of *A. giganteum* was prepared. The expected presence of the four thiosulfates (**6–9**) in the extract was immediately monitored by LC-MS. To our surprise, none of the 2-pyrrolyl-containing thiosulfates (**6–8**) were detected, despite the abundant presence of their precursor (2-PyrrCSO, **1**) in the bulbs. Thus, we attempted to generate these three thiosulfates in model systems consisting of **1**, **4** and partially purified alliinase (EC 4.4.1.4) from either *A. giganteum* or onion. The color of all model mixtures containing 2-PyrrCSO turned orange immediately after mixing the components, indicating that an

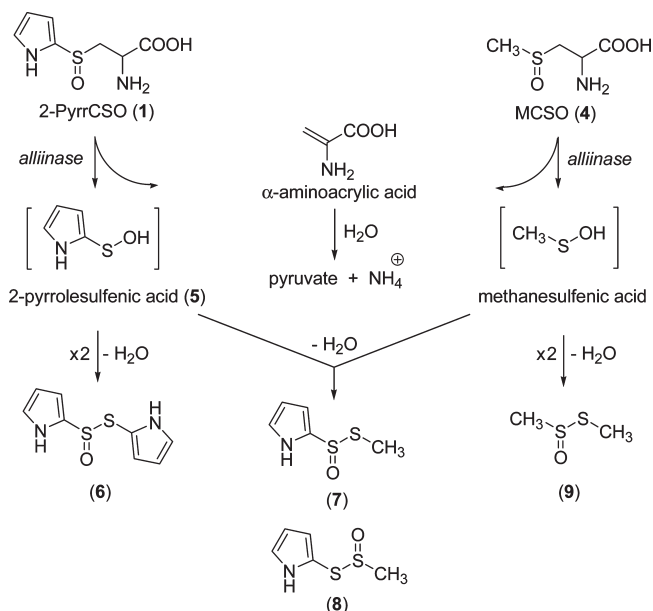


Figure 4. Alliinase-mediated formation of compounds in *Allium giganteum*.

enzymatically catalyzed reaction took place. Interestingly, there was no obvious visual difference observed when either the alliinase from *A. giganteum* or onion was employed. However, no components with the expected molecular weights (M_r 212 for **6** and M_r 161 for **7/8**) were detected by LC-MS in any model mixture. These results indicated that compounds **6–8**, if formed, are very short-living species.

To confirm the expected formation of thiosulfates **6–8** in *A. giganteum*, we decided to follow the alliinase-mediated conversion of 2-PyrrCSO and MCSO by direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS). This exceptionally mild analytical technique allows one to observe formation of compounds of only a fleeting existence without the necessity for prior treatment, simply by momentarily holding the sample in the DART gas stream.^{19,22} A bulb of *A. giganteum* was punctured by a sampling capillary, which was immediately (within 2–3 s after tissue disruption) inserted in the source region. Indeed, signals corresponding to pyrrolyl-containing thiosulfates **6–8** were detected by PI-DART-HRMS (Table 2). Although DART is not able to distinguish various isomers (unless additional MS/MS measurements are performed), it is reasonable to assume that both regiomers **7/8** were formed. Furthermore, the presence of 2-pyrrolesulfenic acid (**5**) was detected by NI-DART-HRMS. The formation of all these compounds (**5–9**) was also observed in various model mixtures consisting of 2-PyrrCSO, MCSO and alliinase. To the best of our knowledge, sulfenic acid **5** and thiosulfates **6–8** are novel compounds, not previously reported in the literature.

On the other hand, 3-PyrrCSO (**2**), the S-pyrrolylcysteine derivative not naturally occurring in *A. giganteum*, yielded a single compound (**10**) upon mixing with alliinase. This enzymatically formed product was shown to exhibit the expected M_r of 212 by LC-MS (see Supporting Information). It can be assumed that **10** was S-(3-pyrrolyl) 3-pyrrolylthiosulfate formed by condensation of two molecules of 3-pyrrolesulfenic acid (Figure 5). Unlike the extremely reactive isomer **6**, thiosulfate **10** appeared to be reasonably stable under experimental conditions, not transforming into any colored compounds.

In the next stage, we focused our attention on isolation and identification of the orange-red compound(s) formed upon crushing *A. giganteum* bulbs. The pigment was extracted from a bulb homogenate by diethyl ether. HPLC analysis of the extract

Table 2. *Allium giganteum* PI-DART and NI-DART Measurements

compd	species	calcd	found	diff (ppm)
PI-DART				
6	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$	213.0151	213.0146	-2.4
7/8	$[\text{C}_5\text{H}_7\text{NOS}_2 + \text{H}]^+$	162.0042	162.0038	-2.6
11	$[\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_2 + \text{H}]^+$	195.0045	195.0041	-2.1
NI-DART				
5	$[\text{C}_4\text{H}_4\text{NOS}]^-$	114.0019	114.0016	-2.6

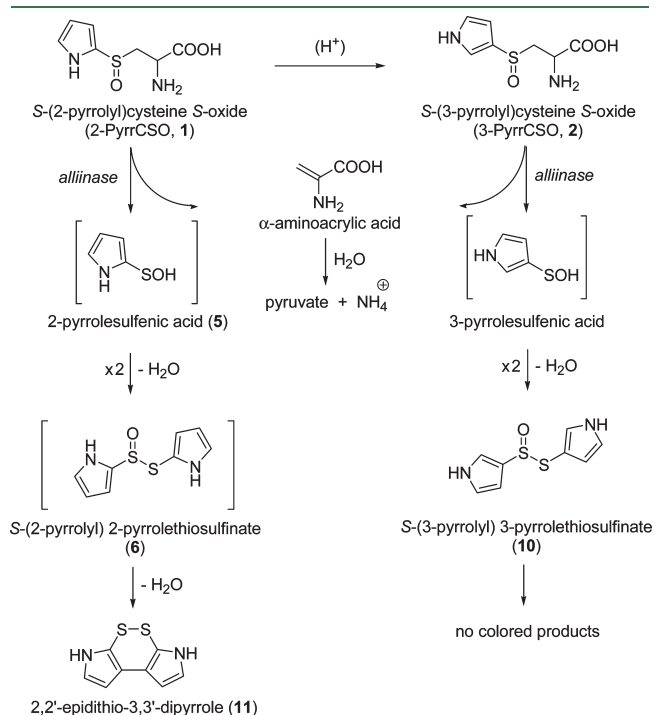


Figure 5. Alliinase-mediated decomposition of *S*-(2-pyrrolyl)- and *S*-(3-pyrrolyl)cysteine *S*-oxides.

revealed the abundant presence of a compound exhibiting a UV-vis absorption maximum at 519 nm (**11**). This compound was found to have identical UV-vis and ESI-MS spectra to those of the red product formed in model mixtures consisting of 2-PyrrCSO and alliinase. Thus, we attempted to obtain this compound by preparative HPLC. Despite using very mild conditions (e.g., freeze-drying), the collected material partially decomposed, rendering conventional NMR measurements impossible. Due to the profound instability of **11**, the structure of this compound was determined by means of LC-NMR and LC-HRMS. The ESI-HRMS data indicated the molecular formula of $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_2$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{S}_2$ 192.9900, found 192.9898). The ^1H LC-NMR spectrum consisted of only two doublets belonging to a pair of mutually coupled aromatic hydrogens (δ 6.36 and 6.48 ppm, $J = 3.6$ Hz, in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$). These spectroscopic data are consistent with those reported by Jedelská et al. (δ 6.28 and 6.43 ppm, $J = 3.7$ Hz, in CD_3OD) for the red compound (λ_{max} at 518 nm) they isolated from *A. giganteum*.⁴ They identified this compound as 3,3'-epidithio-2,2'-dipyrrole, assuming its precursor to be 3-PyrrCSO. Their proposal was based on comparison of experimental NMR data with those predicted by an NMR shift predictor for several possible isomeric structures. Based on our current findings that the precursor is in fact 2-PyrrCSO, it can be expected that **11** is rather 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrole (dipyrrolo[2,3-*d*:2',3'-*e*]-1,2-dithiin). It can be proposed that **11** is formed from *S*-(2-pyrrolyl) 2-pyrrolethiosulfinate (**6**) via facile [3,3]-sigmatropic rearrangement in a similar fashion to the rearrangement of *S*-(1-propenyl) 1-propeneithiosulfinate in cut onion^{23,24} (Figure 6).

Two other abundant components present in the ether extract were identified as di(2-pyrrolyl) disulfide (**12**) and *S*-(2-pyrrolyl) 2-pyrrolethiosulfinate (**13**). The identity of **12** was deduced from ESI-HRMS data ($[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{S}_2$ 195.0056, found 195.0049) and by comparison with an authentic sample obtained by synthesis. On the other hand, the structure of **13** was proposed only from the ESI-HRMS data ($[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 226.9954, found 226.9957) and ESI-MS fragmentation patterns and should be considered as tentative. Disulfides and thiosulfonates are typically found in extracts obtained from various *Allium* species under relatively harsh conditions (e.g., by steam-distillation) and are thought to be formed by heat-induced disproportionation of the corresponding thiosulfonates. However, compounds **12** and **13** were detected in abundance not only in fresh bulb extracts prepared under mild

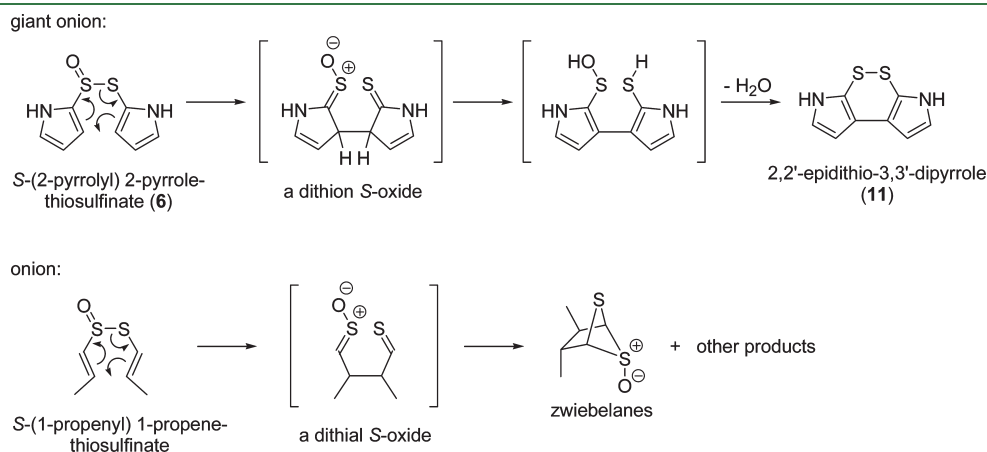


Figure 6. Proposed formation of 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrole in giant onion and the formation of zwiebelanes in onion.

conditions but also in model mixtures consisting of 2-PyrrCSO and alliinase. These observations suggest that **12** and **13** are formed spontaneously in cut *A. giganteum* bulbs, although their formation pathways remain unclear.

It should also be noted that the deep orange ether extract from a bulb homogenate usually turned cloudy within several minutes on standing at room temperature and a precipitate formed at the bottom of the flask, indicating that some components present in the extract could readily undergo further transformations. Furthermore, both **1** and **3** appeared to be very sensitive to elevated temperature, readily decomposing during the isolation procedure to give rise to red colored degradation products. Even when the temperature during evaporation was strictly maintained below 30 °C, the color of both compounds became slightly pinkish. Both compounds also gradually decomposed upon storing at -28 °C and their color changed to orange-brown after approximately 3 months. On the other hand, 3-PyrrCSO appeared to be much more stable and did not show any signs of decomposition during storing at -28 °C for several weeks. Thus, it can be assumed that the pigment in *Melanocrommyum* species can be formed not only under the catalysis of alliinase but also by nonenzymatic degradation of **1** and **3**.

Although the ability to form the red pigment is quite widespread among subgenus *Melanocrommyum* species, it is not common to all of them. We observed that the pigment was formed upon wounding the bulbs of the following species: *A. giganteum*, *A. macleanii*, *A. sarawaschanicum*, *A. fetisowii*, *A. darwasicum*, *A. protensum*, and *A. newskianum*. On the other hand, the bulbs of *A. stipitatum*, *A. altissimum*, *A. cupuliferum*, or *A. rosenbachianum* did not produce any red pigment when cut. The species lacking the ability to form the pigment apparently do not synthesize the precursor, 2-PyrrCSO. This distinct biochemical feature of various *Melanocrommyum* species seems to be an important marker which may help in taxonomic classification of the subgenus.

The biochemical role of **1** and **3** in subgenus *Melanocrommyum* species is unclear. It is generally assumed that *S*-substituted cysteine derivatives in alliaceous species serve as storage compounds for sulfur or nitrogen. These amino acids, being precursors of an extraordinary variety of compounds, also play an important role in defense mechanisms of many plants. Unlike numerous methyl/allyl/1-propenyl/propyl analogues occurring in garlic and onion, the pyrrolyl compounds enzymatically formed from 2-PyrrCSO do not seem to be sufficiently volatile, pungent or lachrymatory to serve as attractants for pollinators or as repulsive compounds to deter predators (insect, ruminants). Thus, **1**, **3** and the compounds formed from them probably do not immediately discourage predators from attacking *A. giganteum* or other subgenus *Melanocrommyum* species. However, these compounds are likely to exhibit antimicrobial activity, thus they can effectively protect the wounded site against attacks of various pathogens. It was also observed that cells surrounding the transportation vessels produced higher amounts of the red pigment than other parts of the plant, indicating that 2-PyrrCSO and products of its transformations could protect the vessels transporting nutrients from possible damage.⁴

It can be concluded that the formation of the orange-red pigment in *A. giganteum* and some other subgenus *Melanocrommyum* species shares several common features with pinking of onion homogenates (Figure 2). The formation of both pigments is initiated by alliinase-catalyzed cleavage of *S*-substituted cysteine *S*-oxide precursors [*S*-(2-pyrrolyl)cysteine *S*-oxide and *S*-(*E*)-(1-propenyl)cysteine *S*-oxide (isoalliin), respectively] following tissue disruption. In both

cases, alliinase-mediated cleavage of the respective precursor yields a thiosulfinate which can readily undergo [3,3]-sigmatropic rearrangement to form reactive dithiocarbonyl *S*-oxide intermediates (Figure 6). The structures and formation pathways of these two pyrrole-based pigments are however significantly different. Whereas the pigment in *Melanocrommyum* species seems to be formed solely by a spontaneous rearrangement of thiosulfinate **6**, pinking of onion homogenates is a more complex process, requiring the presence of a 1-propenyl-containing thiosulfinate, an amino compound and a (thio)carbonyl compound (Figure 2).

MATERIALS AND METHODS

General Methods. ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** and **2** were recorded on a Varian INOVA 500 MHz spectrometer, those of **3** were measured on a Varian Mercury 300 MHz spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). The chemical shifts were referenced externally to the signal of DSS. IR spectra were recorded on a Nicolet FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and CD spectra on a Jasco J-715 circular dichroism spectrometer (Jasco, Tokyo, Japan). Specific rotation values were determined by means of an Autopol IV polarimeter (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA). Melting points (uncorrected) were determined using a Stuart SMP 10 apparatus. HPLC separations were performed on a Dynamax SD-210 binary pump system (Varian, Palo Alto, CA, USA), employing a Varian PDA 335 detector and analytical C-18 or C-8 columns (Rainin Microsorb-MV 100 Å, 250 × 4.6 mm, 5 μm). Alternatively, a preparative C-8 column (Rainin Dynamax-100 Å, 250 × 21.4 mm, 8 μm) was used. A Varian ProStar 230 HPLC system (Varian, Palo Alto, CA, USA) was employed in the LC-NMR experiments. A PDA detector was used to detect chromatographic peaks which were then subjected to stop-flow ¹H NMR measurements conducted on a Varian INOVA 500 MHz spectrometer equipped with an H/C/N triple resonance microflow probe (60 μL active volume). ¹H LC-NMR data were collected in stop-flow mode employing WET multiple frequency solvent suppression. The data accumulation during 2 s acquisition time covering the spectral width of 10 kHz followed after 90° RF pulse (3.4 μs), the relaxation delay was set to 1 s. GC analyses were conducted on a Varian 3800 chromatograph (Varian, Palo Alto, CA, USA), equipped with a Varian 4000 MS detector. Samples (1 μL) were injected using a split ratio of 1:10 on an HP-5MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The operating conditions employed were as follows: injector and detector temperatures of 180 and 250 °C, respectively; a helium carrier gas flow rate of 1.3 mL min⁻¹; a temperature linear gradient from 130 (3-min hold) to 220 at 2 °C min⁻¹ was applied. ESI HRMS data were obtained by an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at resolution of *R* = 50 000 (fwhm), operating at 3.5 kV with ion source temperature of 200 °C. The DART-MS system consisted of a DART ion source (DART-SVP, IonSense, Saugus, MA, USA) coupled to an Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The distance between the exit of the DART gun and the ceramic transfer tube was set to 10 mm, the gap between the ceramic tube and the inlet to the heated capillary of the Exactive mass spectrometer was 2 mm. Samples were introduced manually, employing Dip-It glass capillaries (IonSense, Saugus, MA, USA), the desorption time was approximately 5 s. The instrument was operated either in positive or negative ionization mode, with the following settings: helium flow, 2.5 L min⁻¹; gas temperature, 350 °C; discharge needle voltage, ± 5000 V; grid electrode, ± 350 V; MS detection, capillary voltage, ± 50 V; tube lens voltage, ± 120 V; capillary temperature, 250 °C. The mass resolving power of the instrument calculated for *m/z* 200 was *R* = 50 000 (fwhm).

Plant Material. The bulbs of various *Melanocrommyum* species were obtained from Dr. Leonid Bondarenko (Lithuanian Rare Bulb Garden, Vilnius, Lithuania) in October 2008. The bulbs of *A. giganteum* used for preparative work were purchased from Eurobulb (Zwanenburg, The Netherlands) in September 2008. Voucher specimens are still cultivated in the Alliaceae species collection at University of South Bohemia and can be accessed upon request.

Synthesis of Reference Compounds. *S*-Alk(en)yl-L-cysteine *S*-oxides were synthesized or isolated as described elsewhere.^{18–21} 2-Pyrrolyl thiocyanate was obtained by thiocyanation of pyrrole according to Yadav et al.²⁵ Di(2-pyrrolyl) disulfide was prepared from 2-pyrrolyl thiocyanate by the procedure described in ref 26.

Isolation of Crude C–S Lyases (Alliinases). The procedure described by Shen and Parkin²⁷ was followed for the isolation of crude C–S lyases from the bulbs of *A. giganteum* and onion. The purity and specific activity of the obtained preparations were not examined in detail.

GC–MS and HPLC Analysis. *S*-Substituted cysteines present in the bulbs of various *Allium* subg. *Melanocrommyum* species were analyzed by the GC–MS method of Kubec et al.²¹ The presence of the following derivatives was monitored: *S*-methyl-, *S*-ethyl-, *S*-propyl-, *S*-isopropyl-, *S*-allyl-, (*E*)-*S*-(1-propenyl)-, (*Z*)-*S*-(1-propenyl)-, *S*-butyl-, *S*-isobutyl-, *S*-(*sec*-butyl)-, (*E*)-*S*-(1-butenyl)-, (*E*)-*S*-(2-butenyl)-, (*Z*)-*S*-(2-butenyl)-, *S*-(3-butenyl)-, *S*-pentyl-, *S*-(methylthiomethyl)-, *S*-phenyl-, and *S*-benzylcysteines. Quantitative determination was performed by HPLC after derivatization with dansyl chloride.²¹

Isolation of Compounds 1–3. Bulbs of *A. giganteum* (628 g) were cut in quarters and homogenized in 1 L of cold MeOH/H₂O/HCl (90/9/1, v/v/v), and the slurry was filtered through a layer of cotton wool. The extraction was repeated with another 1 L portion of cold MeOH/H₂O/HCl (90/9/1, v/v/v). The extracts were combined and concentrated to approximately 150 mL by vacuum evaporation (<35 °C). After centrifugation, the precipitate was disposed and the supernatant was adjusted to pH 2.5 by 5 M KOH and applied onto a cation-exchange column (22 × 3 cm; Amberlite IR-120, H⁺ form, 16–45 mesh). After washing the column with H₂O (200 mL), the amino acid-containing fraction was eluted with 0.5 M NH₄OH. The Ehrlich's reagent-positive fractions were collected, their pH adjusted to 5.5–6.0 and freeze-dried. The residue obtained was redissolved in 25 mL of 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 5.5) and subjected to preparative C-8 HPLC, with 50 mM KH₂PO₄ (pH 5.5, solvent A) and acetonitrile (solvent B) as the mobile phase. The gradient was as follows: A/B 100/0 (0 min), 100/0 (in 4 min), 97/3 (in 6 min), 40/60 (in 8 min), 40/60 (in 12 min), and 100/0 (in 15 min), with a flow rate of 18 mL min⁻¹. The fractions eluting at 4.3, 7.2, and 8.8 min were collected, pooled, and freeze-dried. The residues obtained were extracted with 2 × 100 mL of MeOH, filtered and the combined extracts were carefully evaporated (<30 °C) to yield **2** (83 mg), **1** (552 mg) and **3** (109 mg), respectively. Partially contaminated **2** was further purified by passing the fraction through a column of Dowex 1 × 8 (25 × 2 cm, acetate form, 200–400 mesh) to obtain 27 mg of a colorless solid.

Attempted Isolation of Compound 11. Bulbs of *A. giganteum* (372 g) were cut in quarters and homogenized in 600 mL of H₂O. The homogenate was allowed to stand at room temperature for 30 min. Diethyl ether (1 L) was added to the already orange homogenate, and the resulting slurry was filtered through a layer of cotton wool. The extraction was repeated with another 1 L portion of diethyl ether, the extracts were combined and the layers were separated by centrifugation. The aqueous layer was re-extracted with 500 mL of ether, and the combined ether portions were dried over MgSO₄ and concentrated to dryness by vacuum evaporation (<30 °C). The dark orange solid obtained was redissolved in 30 mL of CH₃CN, filtered through a syringe-tip PTFE filter (0.45 μm), and passed through a short SPE C-8 column (100 mg, Supelco). Acetonitrile was removed by vacuum evaporation (<30 °C) to yield 455 mg of a deeply orange-red solid. The extract was subjected to preparative C-8 HPLC (1 mL injection loop), with H₂O (solvent A) and acetonitrile (solvent B) as

the mobile phase. The gradient was as follows: A/B 60/40 (0 min), 56/44 (in 8 min), 5/95 (in 15 min), 5/95 (in 20 min), and 60/40 (in 25 min), with a flow rate of 18 mL min⁻¹. The fraction eluting at 18.1 min was collected, pooled and freeze-dried to yield 15 mg of a red solid. However, subsequent HPLC analysis of this fraction revealed that **11** partially decomposed giving rise to several products.

Model Experiments. Aliquots (1 mL) of stock solutions of **1** and **4** (25 mM in 50 mM KH₂PO₄ buffer, pH 6.5) were placed in 10 mL glass vials and mixed with 0.5 mL of an alliinase solution (10 mg/1 mL). The solutions were incubated with stirring at 23 °C for 30 min and extracted with 3 mL of diethyl ether and the organic portions stripped off using argon. The residues obtained were redissolved in acetonitrile (200 μL), filtered through a syringe-tip PTFE filter (0.45 μm) and analyzed by C-8 HPLC with H₂O (solvent A) and acetonitrile (solvent B) as the mobile phase. The gradient was as follows: A/B 95/5 (0 min), 5/95 (in 20 min), and 95/5 (in 25 min), with a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. Similar experiments were performed with 3-PyrrCSO (**2**).

Analytical Data of the Identified Compounds. (*R_SR_C*)-*S*-(2-Pyrrolyl)cysteine *S*-oxide (2-PyrrCSO, **1**): colorless solid; mp not determined (sample decomposed before melting); [α]_D²² +36.2° (H₂O); CD Δε_{max} (22 °C, H₂O) +3.24 (251 nm); UV (PDA, rel. int.) 250 nm (1.00), 219 nm (0.77); ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) and ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz), see Table 1 and Supporting Information; IR (KBr) 3205, 1616, 1427, 1350, 1080, 995 cm⁻¹; ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₇H₁₁N₂O₃S 203.0485 [M + H]⁺, found 203.0485; calculated for C₇H₁₀N₂NaO₃S 225.0304 [M + Na]⁺, found 225.0304; calculated for C₇H₁₀KN₂O₃S 241.0044 [M + K]⁺, found 241.0043.

(*R_SR_C*)-*S*-(3-Pyrrolyl)cysteine *S*-oxide (3-PyrrCSO, **2**): colorless solid; mp not determined (sample decomposed before melting); [α]_D²² +45.7° (H₂O); CD Δε_{max} (22 °C, H₂O) +3.57 (231 nm); UV (PDA, rel. int.) 202 nm (1.00), 232 nm (0.63); ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) and ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz), see Table 1 and Supporting Information; IR (KBr) 3108–3012, 1651, 1589, 1485, 1419, 1014 cm⁻¹; ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₇H₁₁N₂O₃S 203.0485 [M + H]⁺, found 203.0483; calculated for C₇H₉N₂O₃S 201.0339 [M – H]⁻, found 201.0336.

(*R_SR_C*)-3-(2-Pyrrolylsulfinyl)lactic acid (**3**): colorless solid; mp not determined (sample decomposed before melting); [α]_D²² +6.3° (H₂O); CD Δε_{max} (22 °C, H₂O) +2.89 (249 nm); UV (PDA, rel. int.) 250 nm (1.00), 216 nm (0.66); ¹H NMR (D₂O, 300 MHz) and ¹³C NMR (D₂O, 75 MHz), see Table 1 and Supporting Information; IR (KBr) 3290, 1647, 1084, 987, 864 cm⁻¹; ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₇H₈NO₄S 202.0180 [M – H]⁻, found 202.0182.

Dipyrrolo[2,3-*d*:2',3'-*e*]-1,2-dithiin (2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrole) (**11**): UV–vis (PDA, rel. int.) 519 nm (1.00), 295 nm (0.64), 355 nm (0.53); LC–¹H NMR (D₂O/CD₃CN, 500 MHz) δ 6.36 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H, H-4/H-4'), 6.48 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, H-5/H-5'); ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₈H₅N₂S₂ 192.9900 [M – H]⁻, found 192.9898.

Di(2-pyrrolyl) disulfide (**12**): UV (PDA, rel. int.) 312 nm (1.00), 218 nm (0.96); ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₈H₇N₂S₂ 195.0056 [M – H]⁻, found 195.0049.

S-(2-Pyrrolyl) 2-pyrrolethiosulfonate (**13**): UV (PDA, rel. int.) 288 nm (1.00), 225 nm (0.97); ESI-MS, see Supporting Information; ESI-TOF HRMS calculated for C₈H₇N₂O₂S₂ 226.9954 [M – H]⁻, found 226.9957.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. NMR, IR, CD, UV–vis, and ESI-MS spectra of compounds **1–3** and selected NMR, UV–vis, and ESI-MS spectra of compounds **10–13**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +420-38-7772664. Fax: +420-38-5310405. E-mail: kubecr@centrum.cz; kubecr@yahoo.com.

Funding Sources

Financial support provided by the Grant Agency of South Bohemia (GAJU 067/2010/Z) (R.K.), the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM6007665806 and MSM 6046137305) (R.K. and L.V.), and the Grant Agency of ASCR (IAA 400720706) (J.S.) is greatly appreciated.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Pavla Kružberská (Laboratory of Analytical Biochemistry, Biology Centre, ASCR, České Budějovice), Petr Žáček (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, ASCR, Prague), and Jan Sýkora (Institute of Chemical Process Fundamentals, ASCR, Prague) for their helpful technical assistance.

ABBREVIATIONS USED

ADEQUATE, adequately sensitive double quantum transfer experiment; CD, circular dichroism; COSY, correlation spectroscopy; DART, direct analysis in real time; DEPT, distortionless enhancement by polarization transfer; DSS, 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid; ESI, electrospray ionization; fwhm, full width at half-maximum; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; HETCOR, heteronuclear chemical shift correlation; HMBC, heteronuclear multiple bond correlation; HPLC, high-performance liquid chromatography; HRMS, high-resolution mass spectrometry; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; IR, infrared; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; MCSO, S-methylcysteine S-oxide (methiin); NI, negative ionization; NMR, nuclear magnetic resonance; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; PDA, photo diode array; PI, positive ionization; PTFE, polytetrafluoroethylene; 2-PyrrCSO, S-(2-pyrrolyl)cysteine S-oxide; 3-PyrrCSO, S-(3-pyrrolyl)cysteine S-oxide; RF, radio frequency; SPE, solid phase extraction; subg., subgenus; TOF, time-of-flight; UV, ultraviolet; WET, water suppression enhanced through T1 effects.

REFERENCES

- (1) Fritsch, R. M.; Blattner, F. R.; Gurushidze, M. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton* **2010**, *49*, 145–220.
- (2) Gurushidze, M.; Fritsch, R. M.; Blattner, F. R. Phylogenetic analysis of *Allium* subg. *Melanocrommyum* infers cryptic species and demands a new sectional classification. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *49*, 997–1007.
- (3) Keusgen, M.; Fritsch, R. M.; Hisoriev, H.; Kurbonova, P. A.; Khassanov, F. O. Wild *Allium* species (Alliaceae) used in folk medicine of Tajikistan and Uzbekistan. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 18.
- (4) Jedelská, J.; Vogt, A.; Reinscheid, U. M.; Keusgen, M. Isolation and identification of a red pigment from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1465–1470.
- (5) Bai, B.; Chen, F.; Wang, Z.; Liao, X.; Zhao, G.; Hu, X. Mechanism of the greening color formation of “Laba” garlic, a traditional homemade Chinese food product. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7103–7107.
- (6) Joslyn, M. A.; Peterson, R. G. Reddening of white onion tissue. *J. Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 72–76.
- (7) Kubec, R.; Hrbáčová, M.; Musah, R. A.; Velíšek, J. *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinkening and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5089–5094.

- (8) Imai, S.; Akita, K.; Tomotake, M.; Sawada, H. Model studies on precursor system generating blue pigment in onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 848–852.

- (9) Imai, S.; Akita, K.; Tomotake, M.; Sawada, H. Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in the blue-green discoloration of onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 843–847.

- (10) Kubec, R.; Velíšek, J. *Allium* discoloration: The color-forming potential of individual thiosulfates and amino acids: Structural requirements for the color-developing precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3491–3497.

- (11) Wang, D.; Yang, X.; Wang, Z.; Hu, X.; Zhao, G. Isolation and identification of one kind of yellow pigments from model reaction systems related to garlic greening. *Food Chem.* **2009**, *117*, 296–301.

- (12) Dong, Y.; Wang, D.; Li, M.; Hu, X.; Zhao, G. One new pathway for *Allium* discoloration. *Food Chem.* **2010**, *119*, 548–553.

- (13) Carmona, O.; Greenhouse, R.; Landeros, R.; Muchowski, J. M. Synthesis and rearrangement of 2-(arylsulfinyl)- and 2-(alkylsulfinyl)-pyrroles. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5336–5339.

- (14) DeSales, J.; Greenhouse, R.; Muchowski, J. M. Synthesis and rearrangement of pyrrolyl sulfides and sulfones. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3668–3672.

- (15) Thompson, A.; Butler, R. J.; Grundy, M. N.; Laltoo, A. B. E.; Robertson, K. N.; Cameron, T. S. Sulfur-based protecting groups for pyrroles and the facile deprotection of 2-(2,4-dinitrobenzene)sulfinyl and sulfonyl pyrroles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3753–3756.

- (16) Garabatos-Perera, J. R.; Rotstein, B. H.; Thompson, A. Comparison of benzene, nitrobenzene, and dinitrobenzene 2-arylsulfonylpyrroles. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7382–7385.

- (17) Schraml, J.; Kubec, R.; Kučerová, P. Determination of substitution sites in monosubstituted five-membered aromatic heterocycles. *Magn. Reson. Chem.* **2011** in press.

- (18) Kubec, R.; Musah, R. A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 981–985.

- (19) Kubec, R.; Cody, R. B.; Dane, A. J.; Musah, R. A.; Schraml, J.; Vattekkatte, A.; Block, E. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. (Z)-Butanethial S-oxide and 1-butenyl thiosulfates and their S-(E)-1-butenylcysteine S-oxide precursor from *Allium siculum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1121–1128.

- (20) Kubec, R.; Svobodová, M.; Velíšek, J. Distribution of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: S-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 428–433.

- (21) Kubec, R.; Dadáková, E. Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives – a comparative study. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6957–6963.

- (22) Block, E.; Dane, A. J.; Thomas, S.; Cody, R. B. Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyl trisulfane S-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4617–4625.

- (23) Block, E.; Bayer, T.; Naganathan, S.; Zhao, S. H. *Allium* chemistry: synthesis and sigmatropic rearrangements of alk(en)yl 1-propenyl disulfide S-oxides from cut onion and garlic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2799–2810.

- (24) Block, E. *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 2010; pp 212–213.

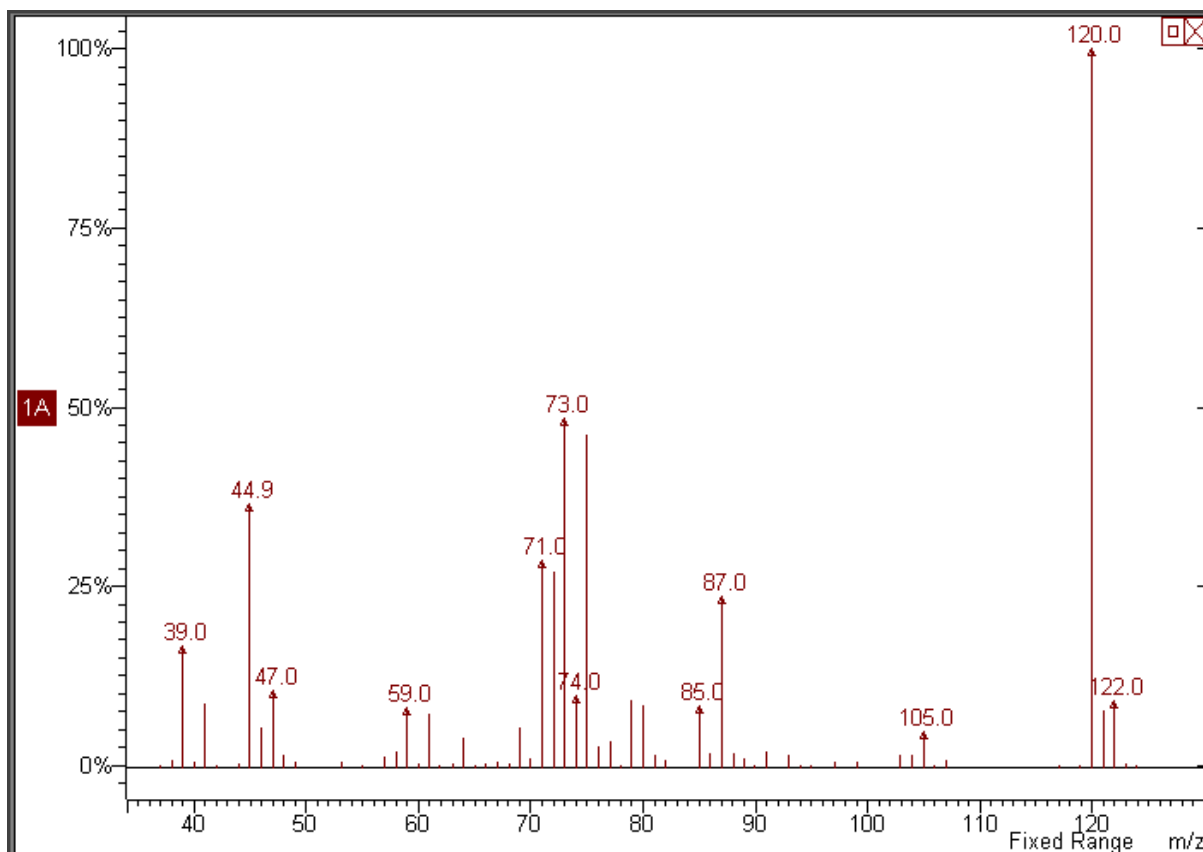
- (25) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, Y. J. 1-Chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octane bis(tetrafluoroborate) as novel and versatile reagent for the rapid thiocyanation of indoles, azaindole, and carbazole. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 652–653.

- (26) Prabhu, K. R.; Ramesha, A. R.; Chandrasekaran, S. Reductive dimerization of organic thiocyanates to disulfides mediated by tetra-thiomolybdate. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7142–7143.

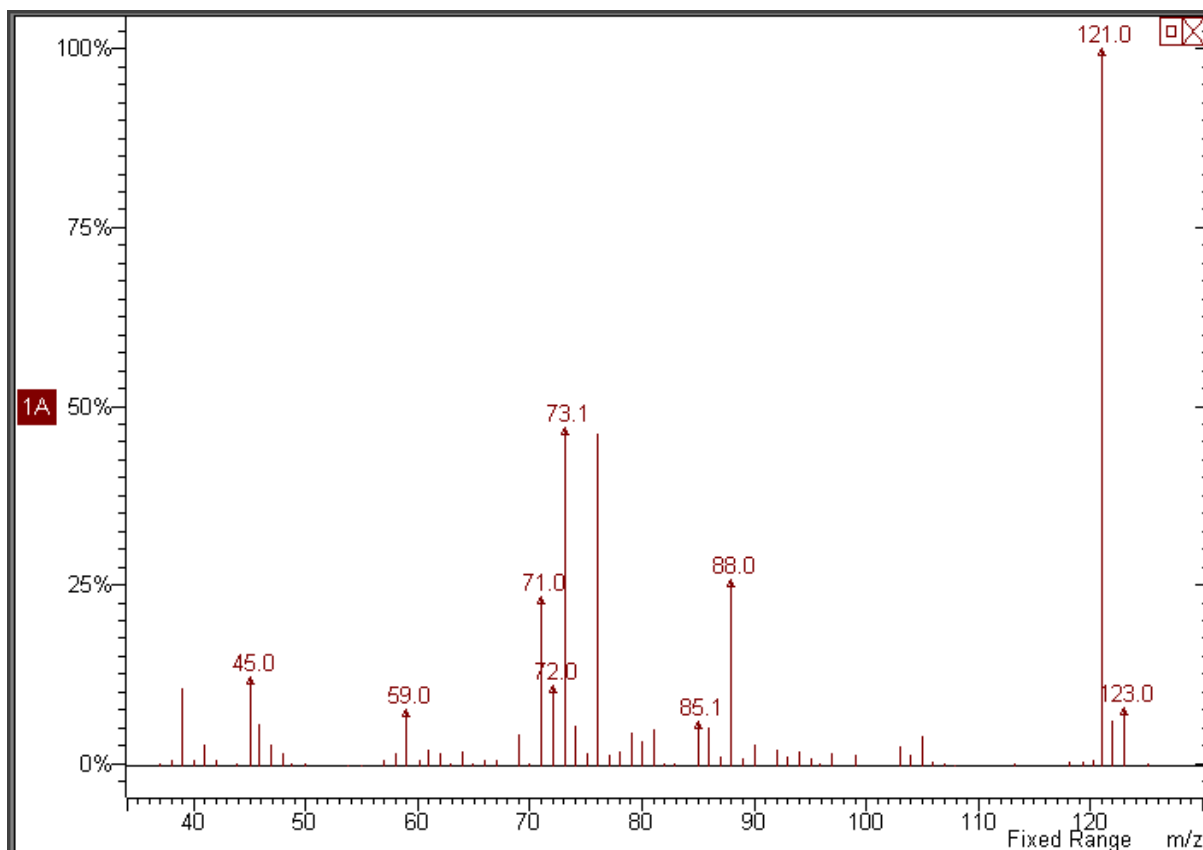
- (27) Shen, C.; Parkin, K. L. In vitro biogenesis of pure thiosulfates and propanethial-S-oxide. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6254–6260.

Příloha 1: GC-MS spektra $\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$, $\text{CD}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$,
 $^{13}\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$ a $\text{CH}_3\text{SSCD}=\text{CDCH}_3$

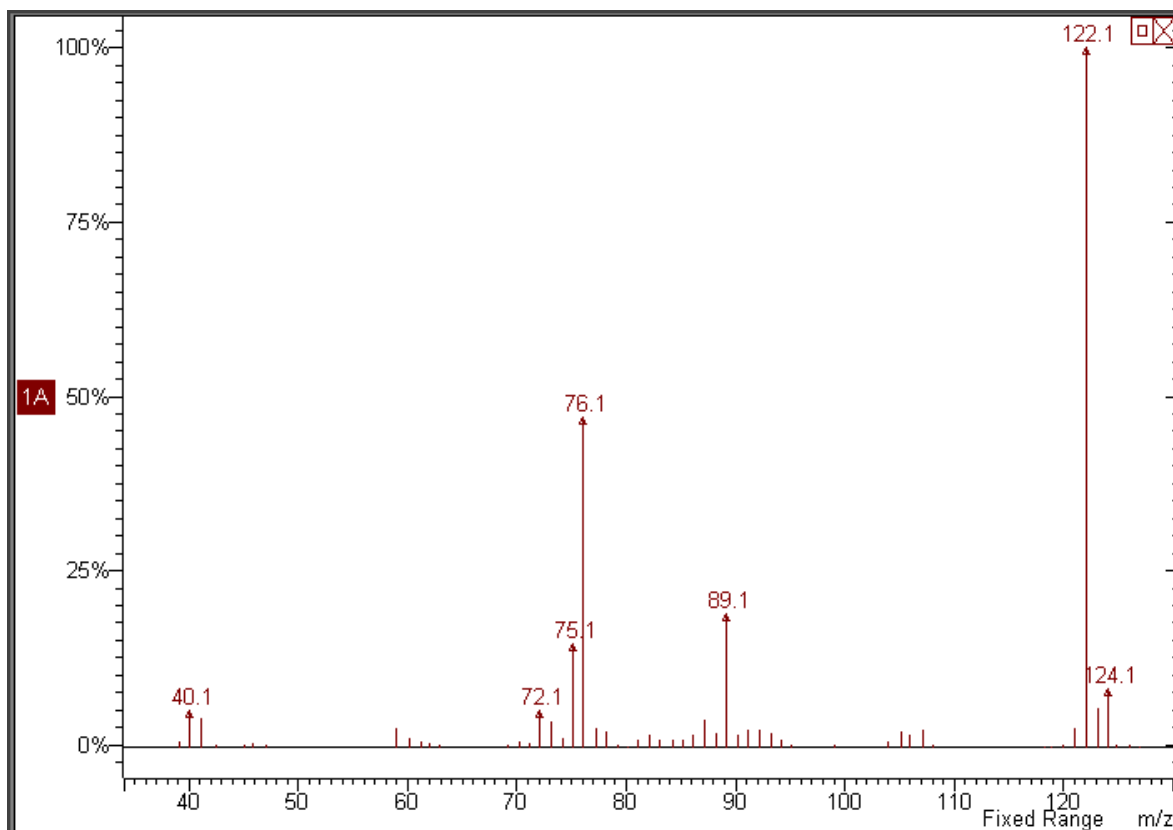
GC-MS spektrum $\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$



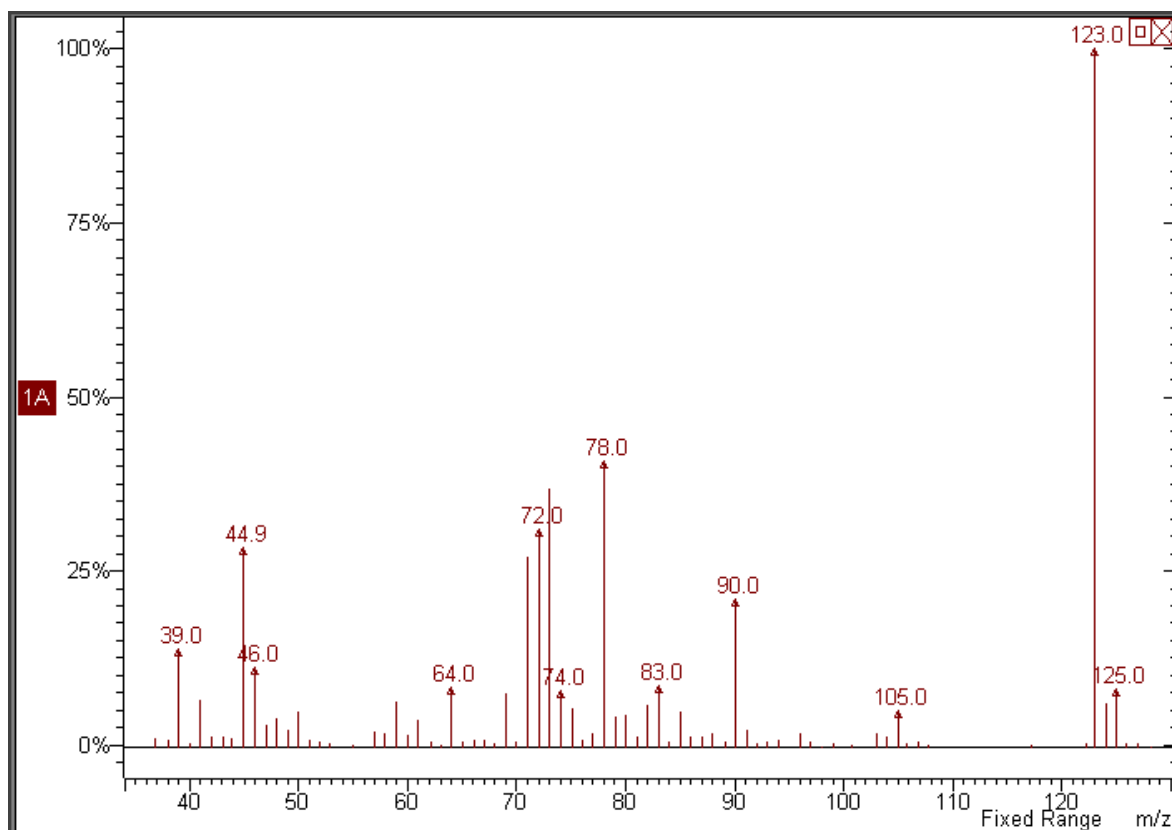
GC-MS spektrum $^{13}\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCH}_3$



GC-MS spektrum $\text{CH}_3\text{SSCD}=\text{CDCH}_3$

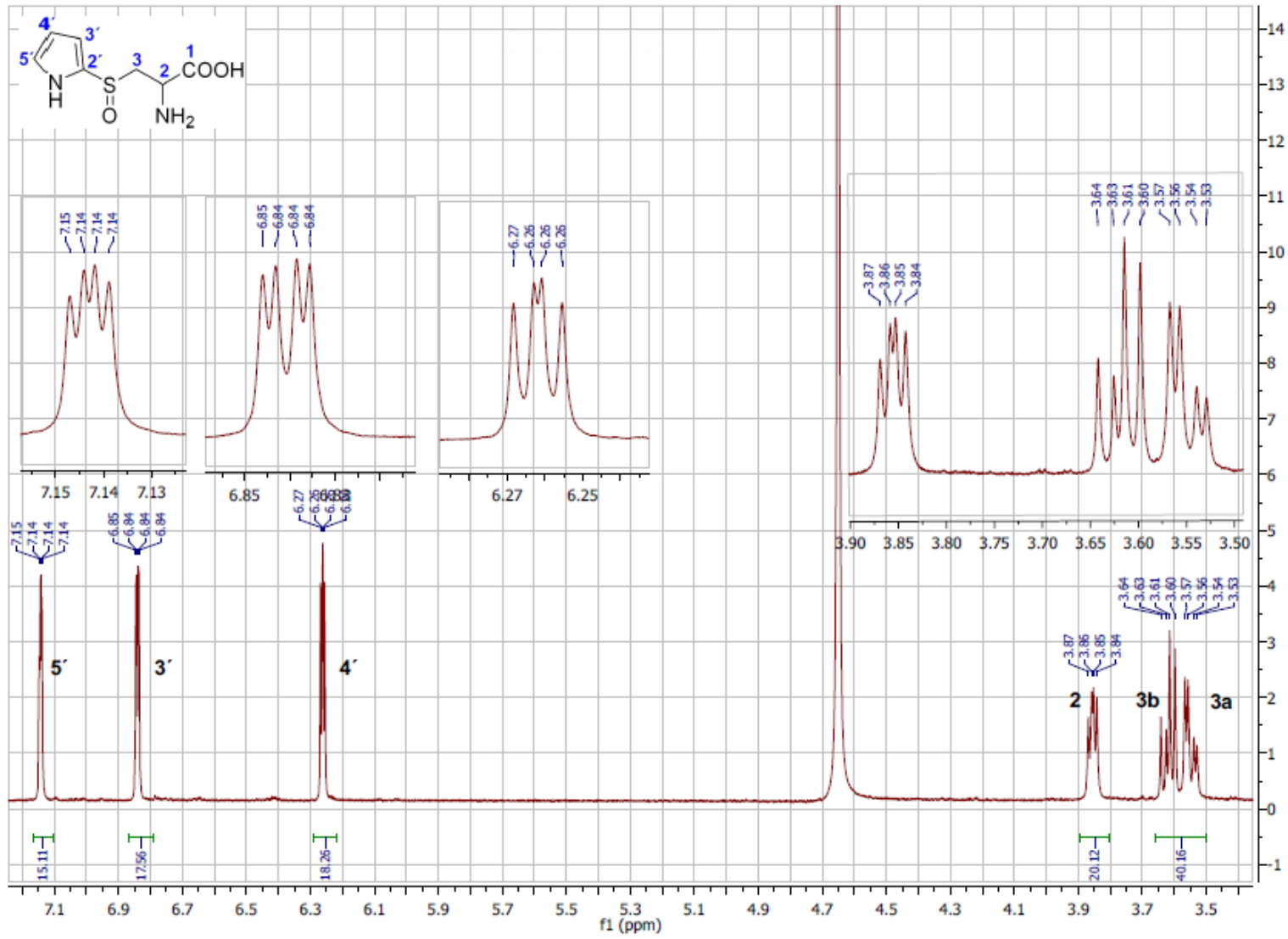


GC-MS spektrum $\text{CH}_3\text{SSCH}=\text{CHCD}_3$

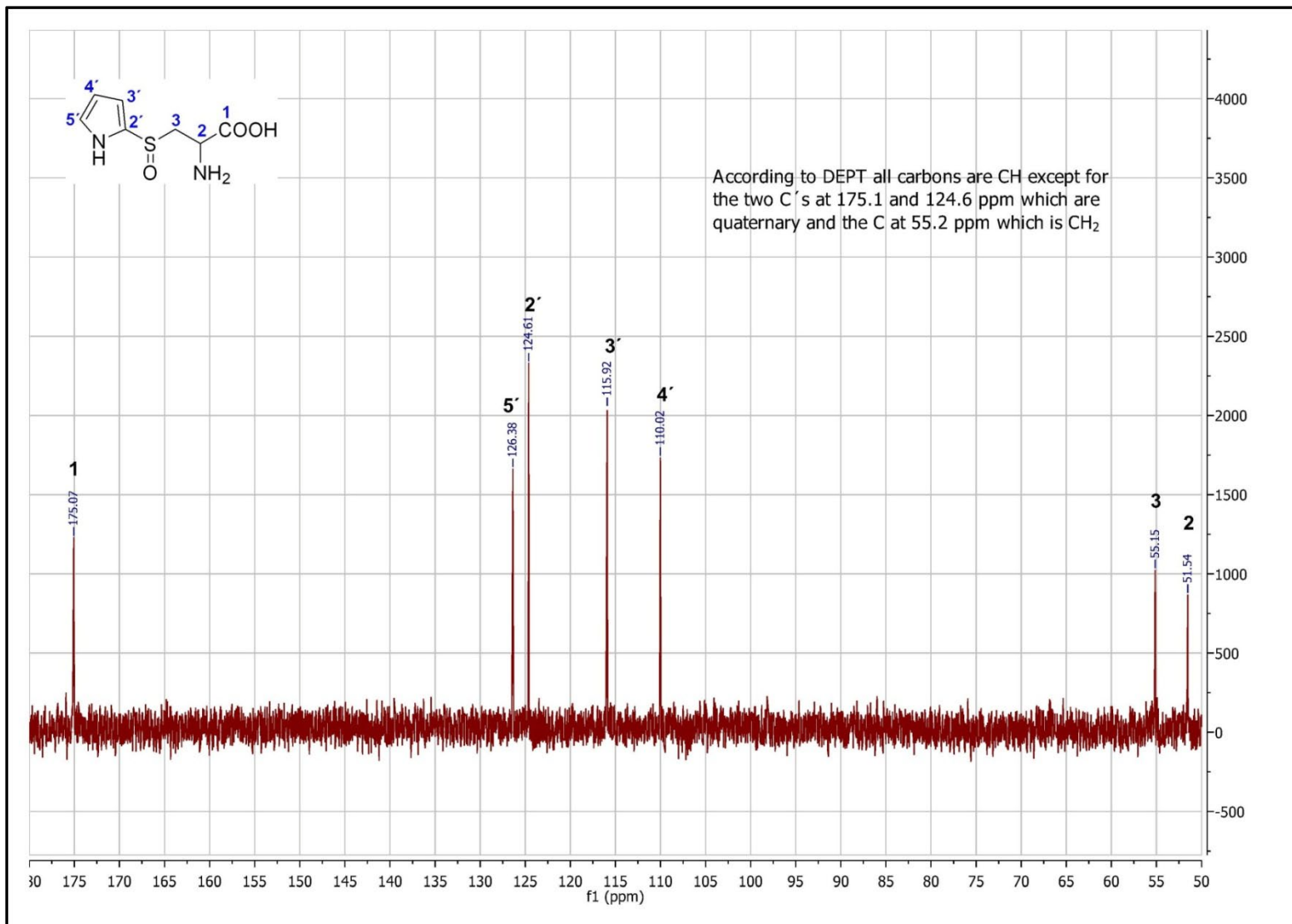


Příloha 2: ^1H NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), ^{13}C NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), 1,1-ADEQUATE NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**), COSY NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**) a HETCOR NMR spektrum 2-PyrrCSO (**27**)

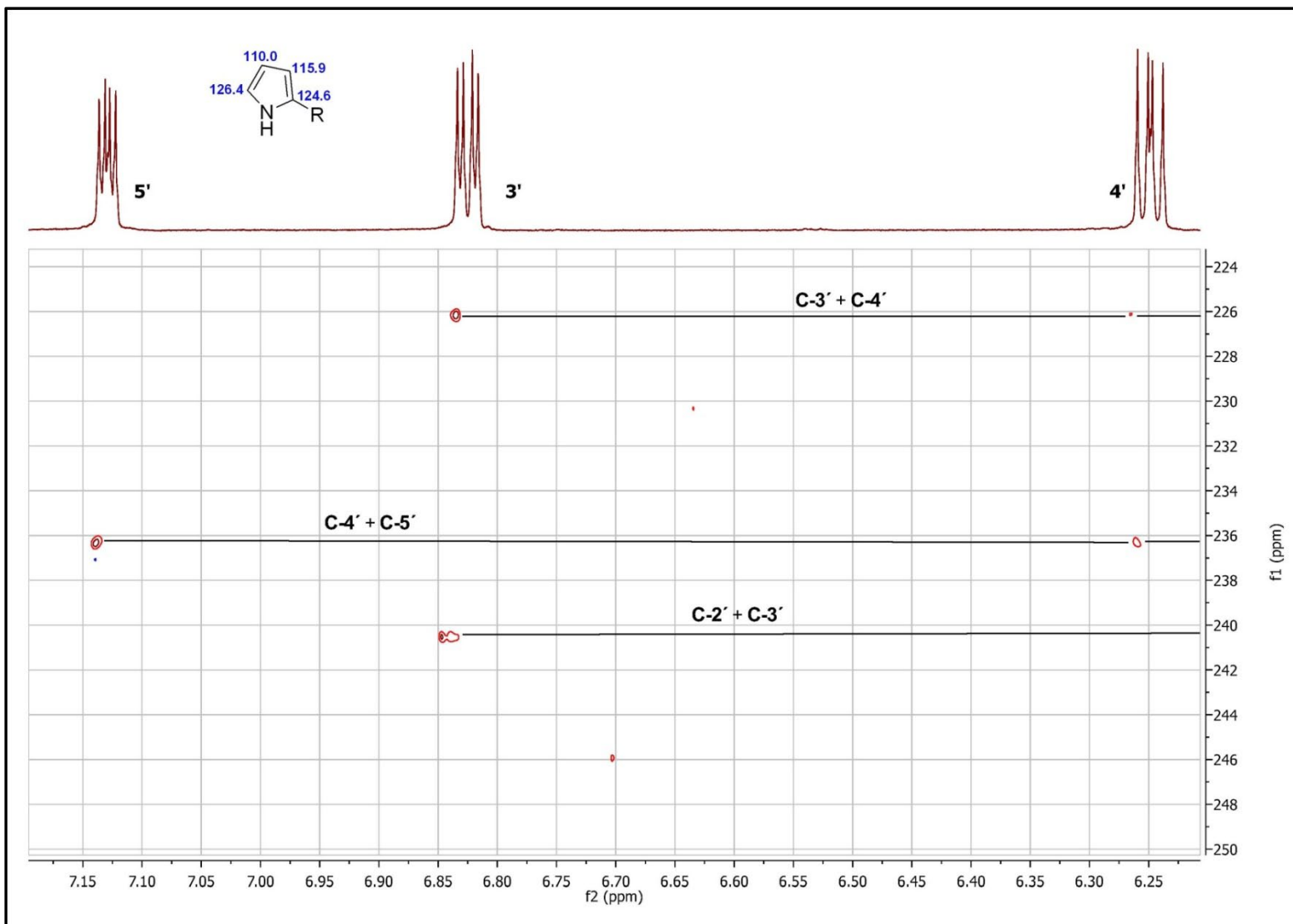
¹H NMR spektrum 2-PyrrCSO



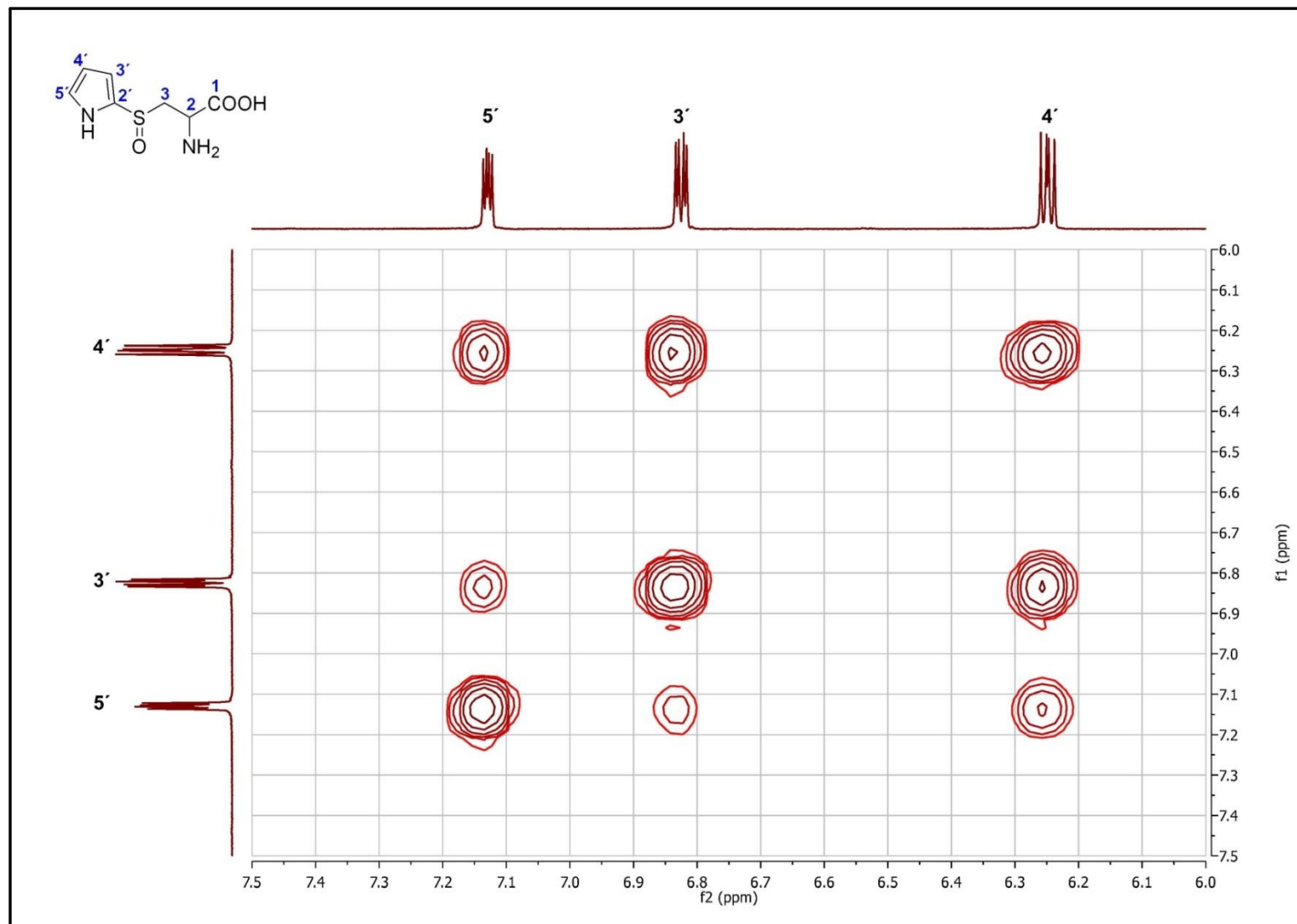
¹³C NMR spektrum 2-PyrrCSO



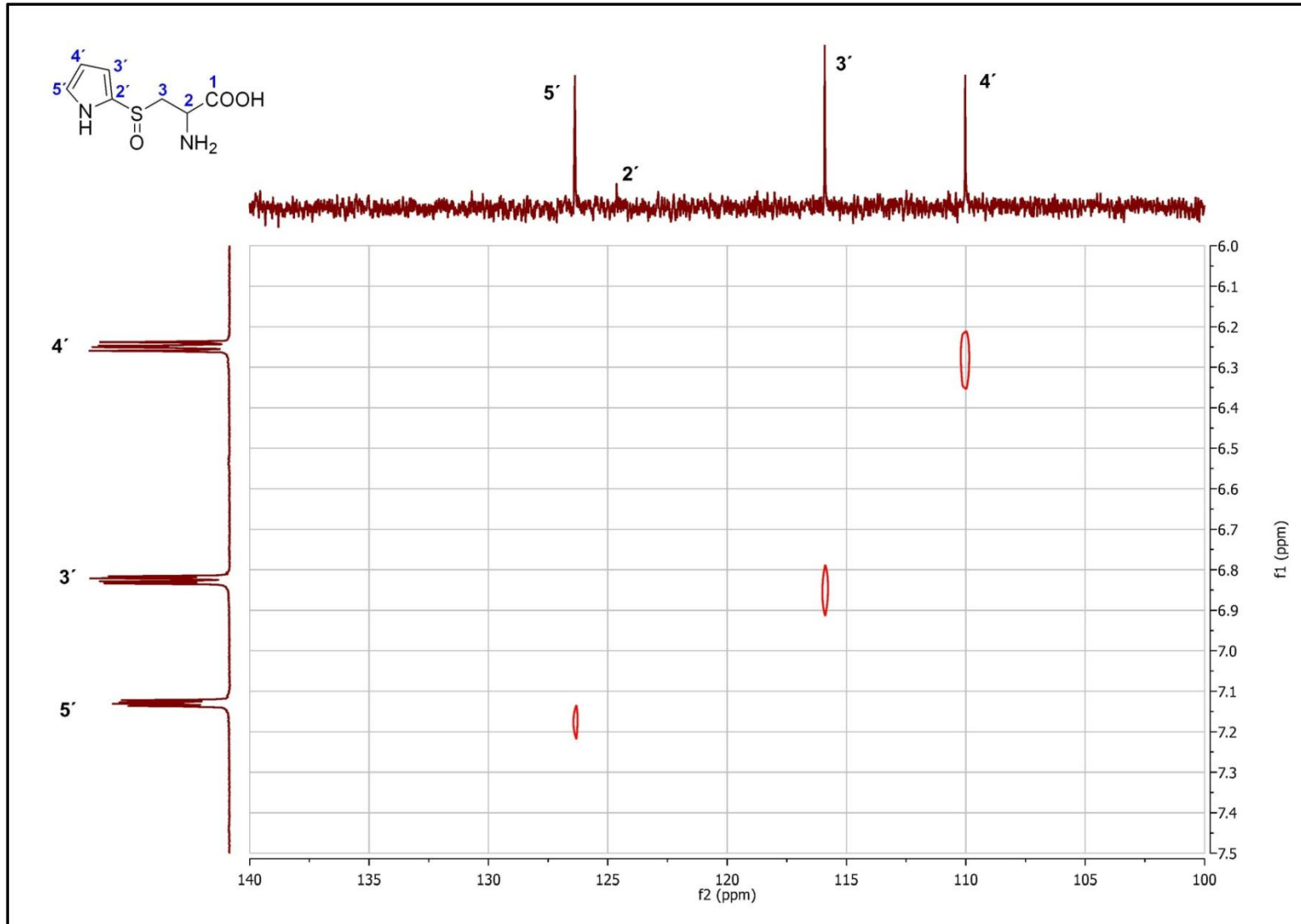
1,1-ADEQUATE NMR spektrum 2-PyrrCSO



COSY NMR spektrum 2-PyrrCSO

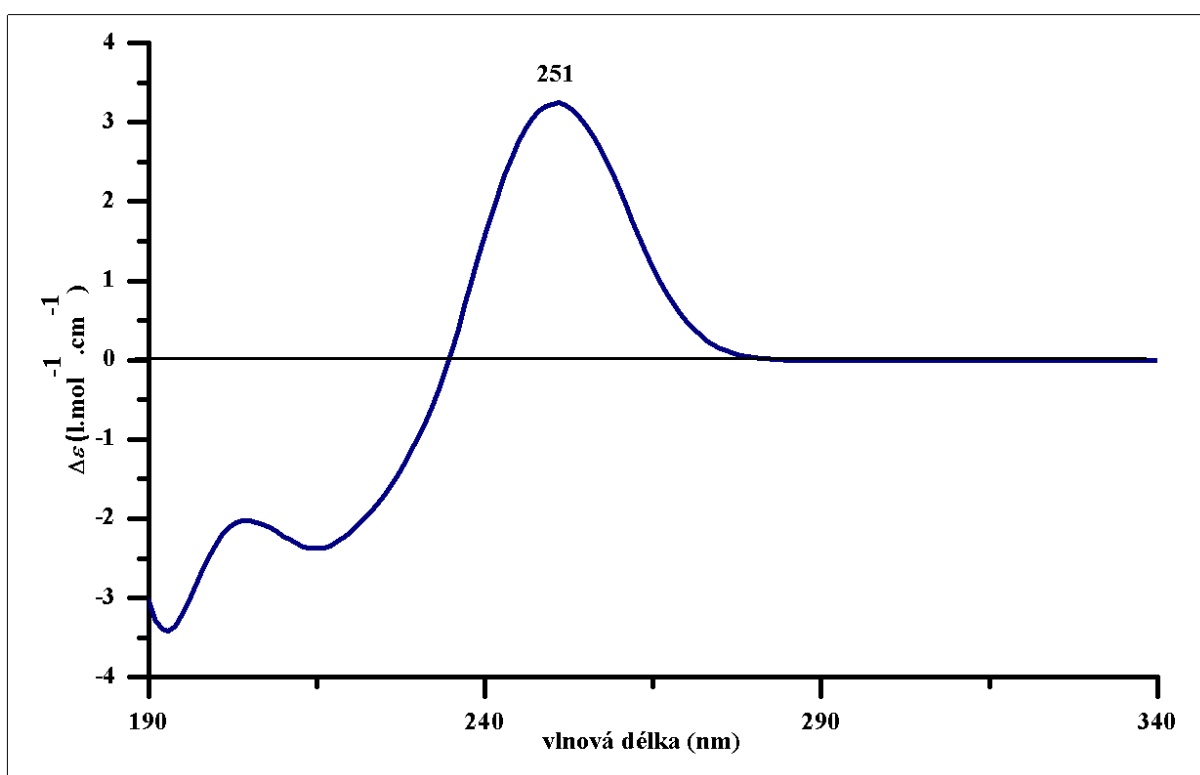
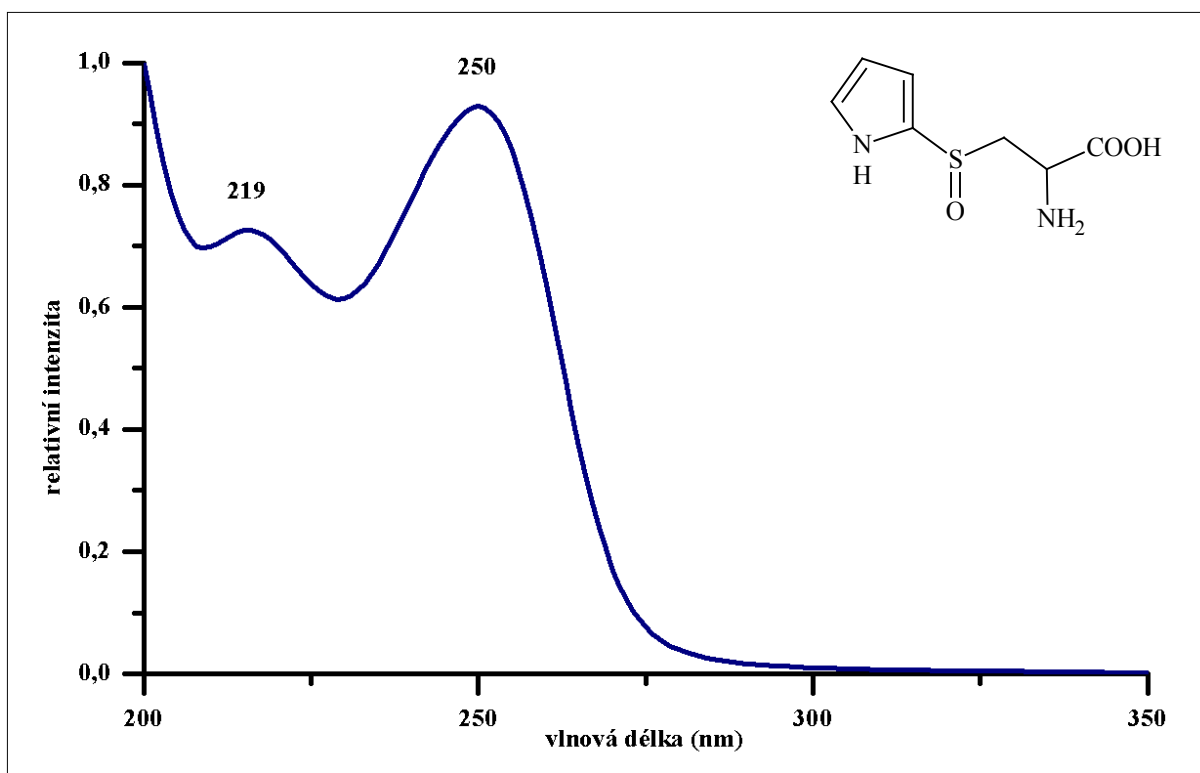


HETCOR NMR spektrum 2-PyrrCSO



Příloha 3: UV a CD spektrum 2-PyrrCSO (27)

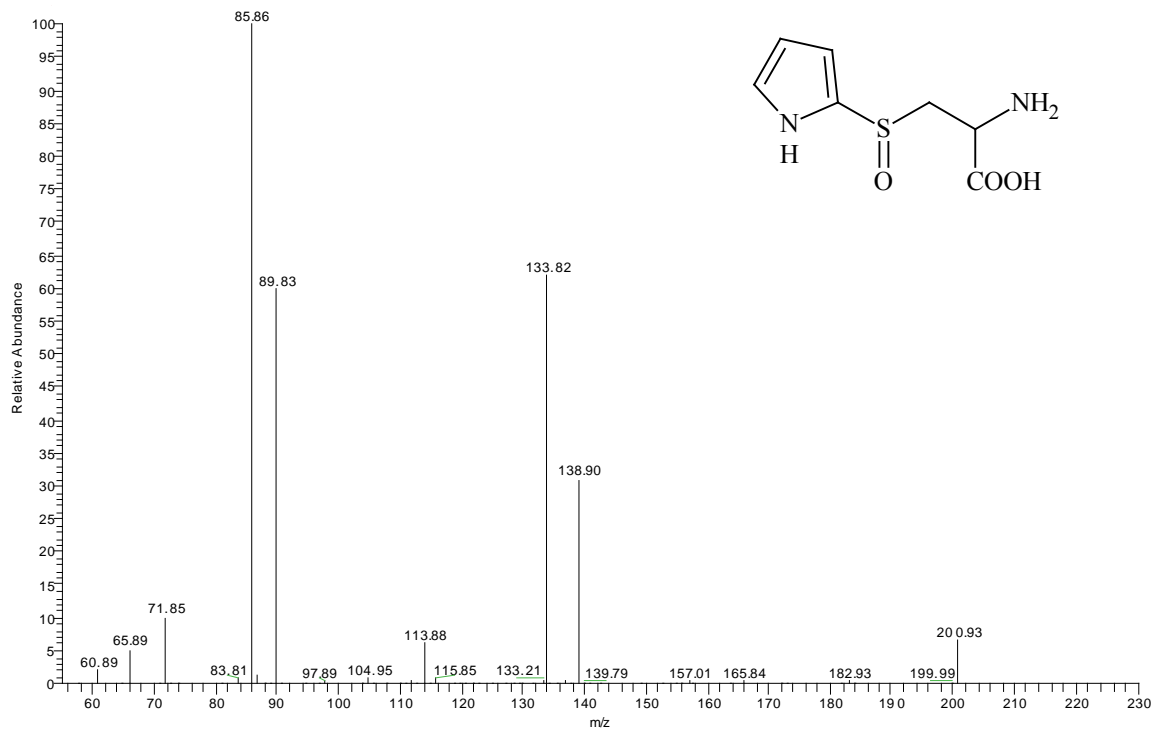
UV (nahore) a CD (dole) spektrum 2-PyrrCSO



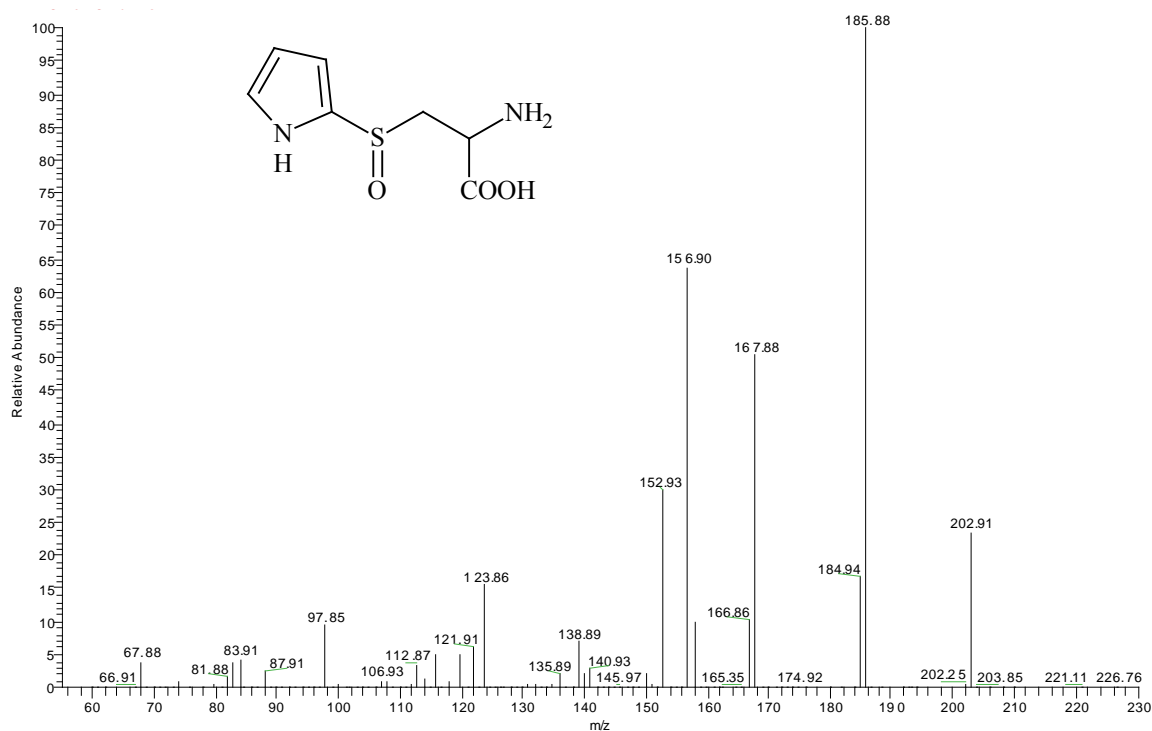
Příloha 4: MS/MS spektra 2-PyrrCSO (27)

MS/MS spektra 2-PyrrCSO

MS/MS spektrum iontu 201 (negativní ionizace)

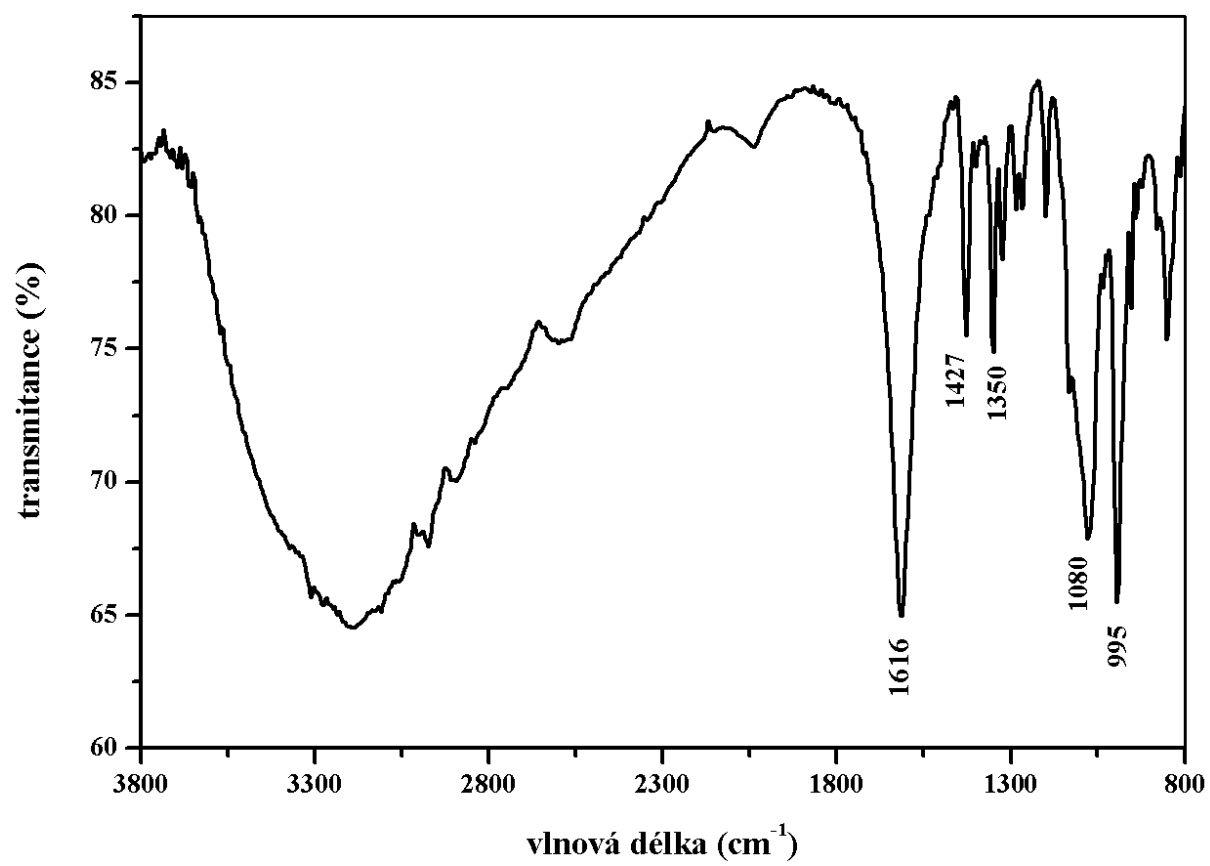


MS/MS spektrum iontu 203 (pozitivní ionizace)



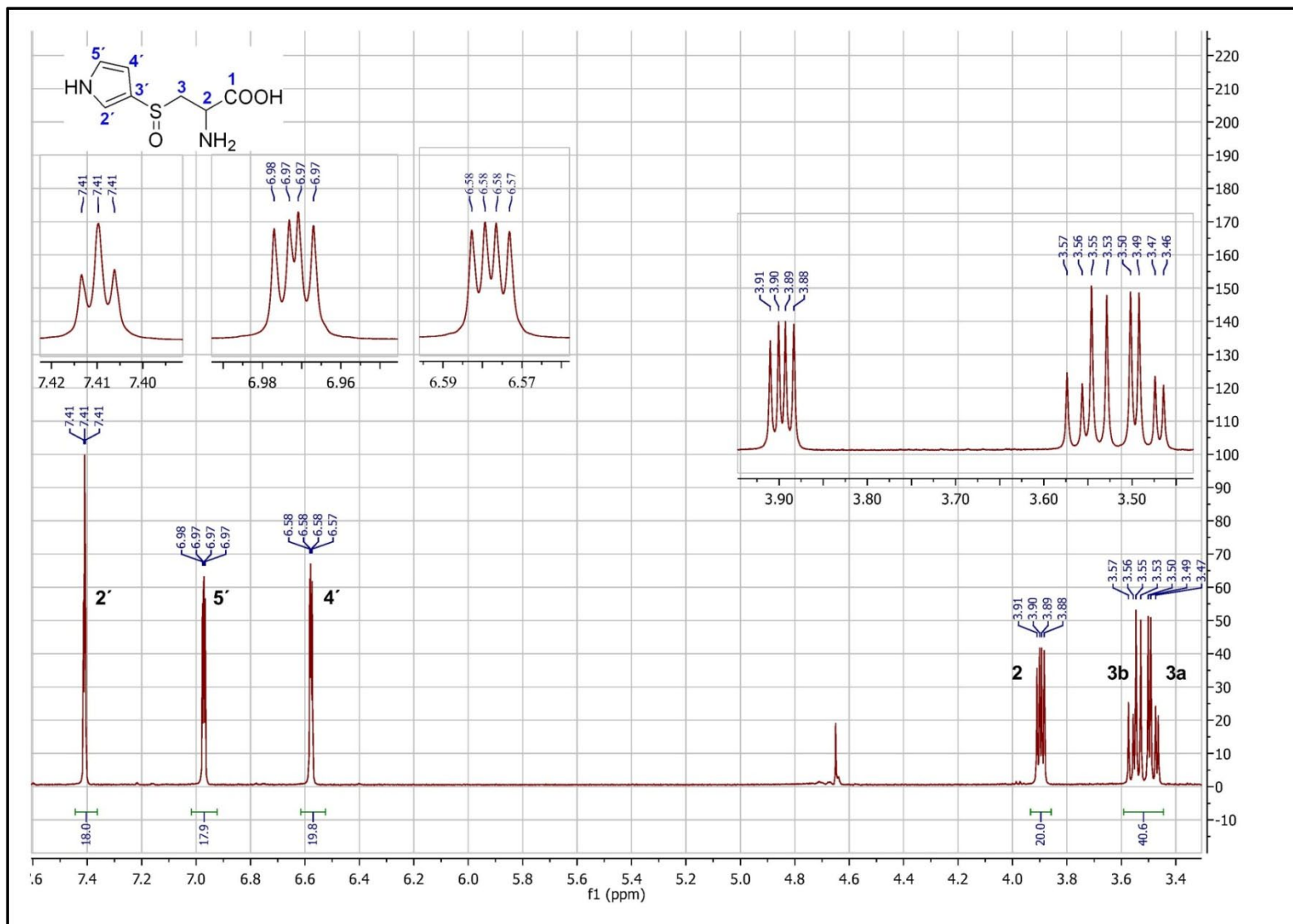
Příloha 5: IČ spektrum 2-PyrrCSO (27)

IČ spektrum 2-PyrrCSO

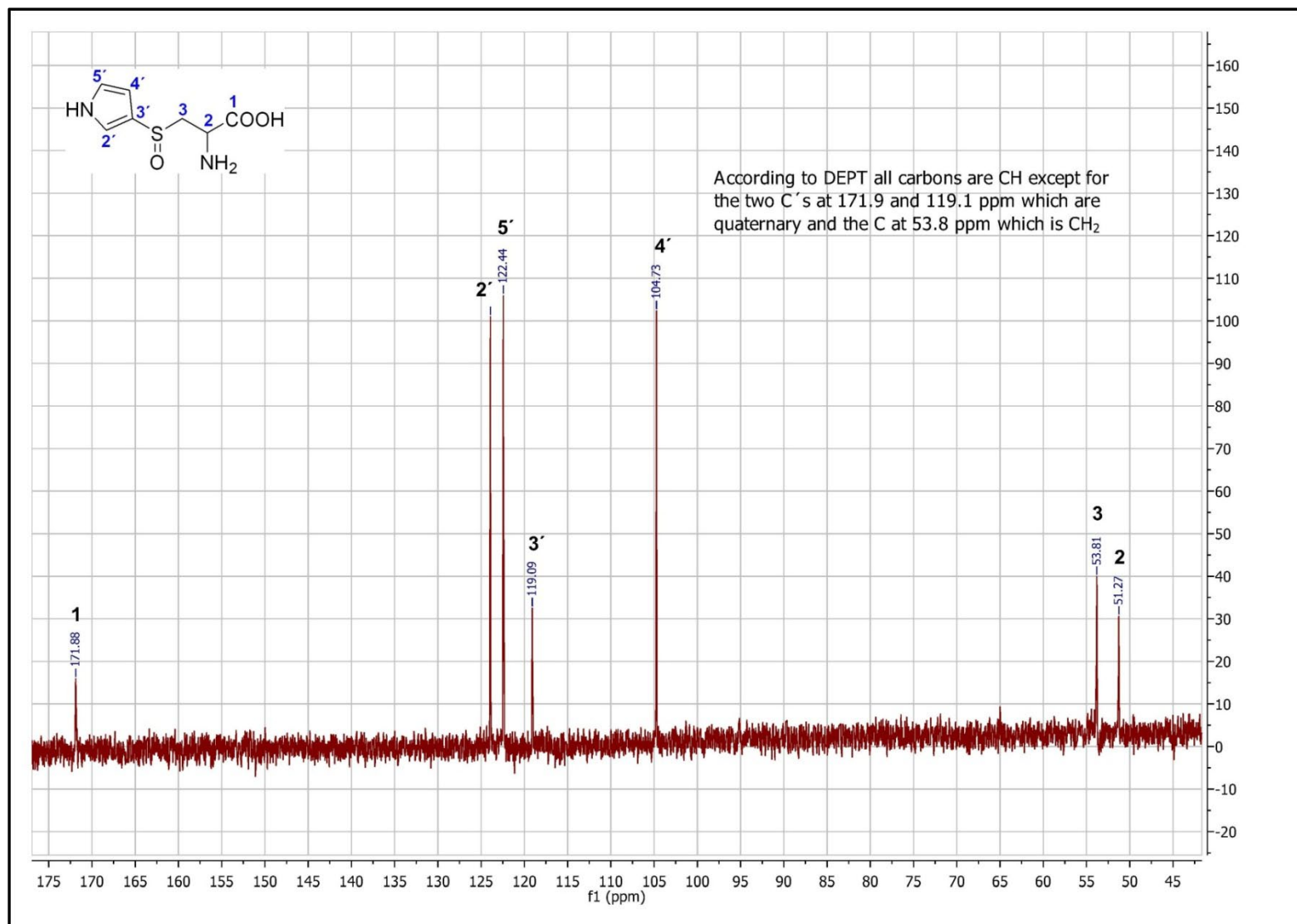


Příloha 6: ^1H NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), ^{13}C NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), 1,1-ADEQUATE NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), gHMBC NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**), gHSQC NMR spektrum 3-PyrrCSO (**22**)

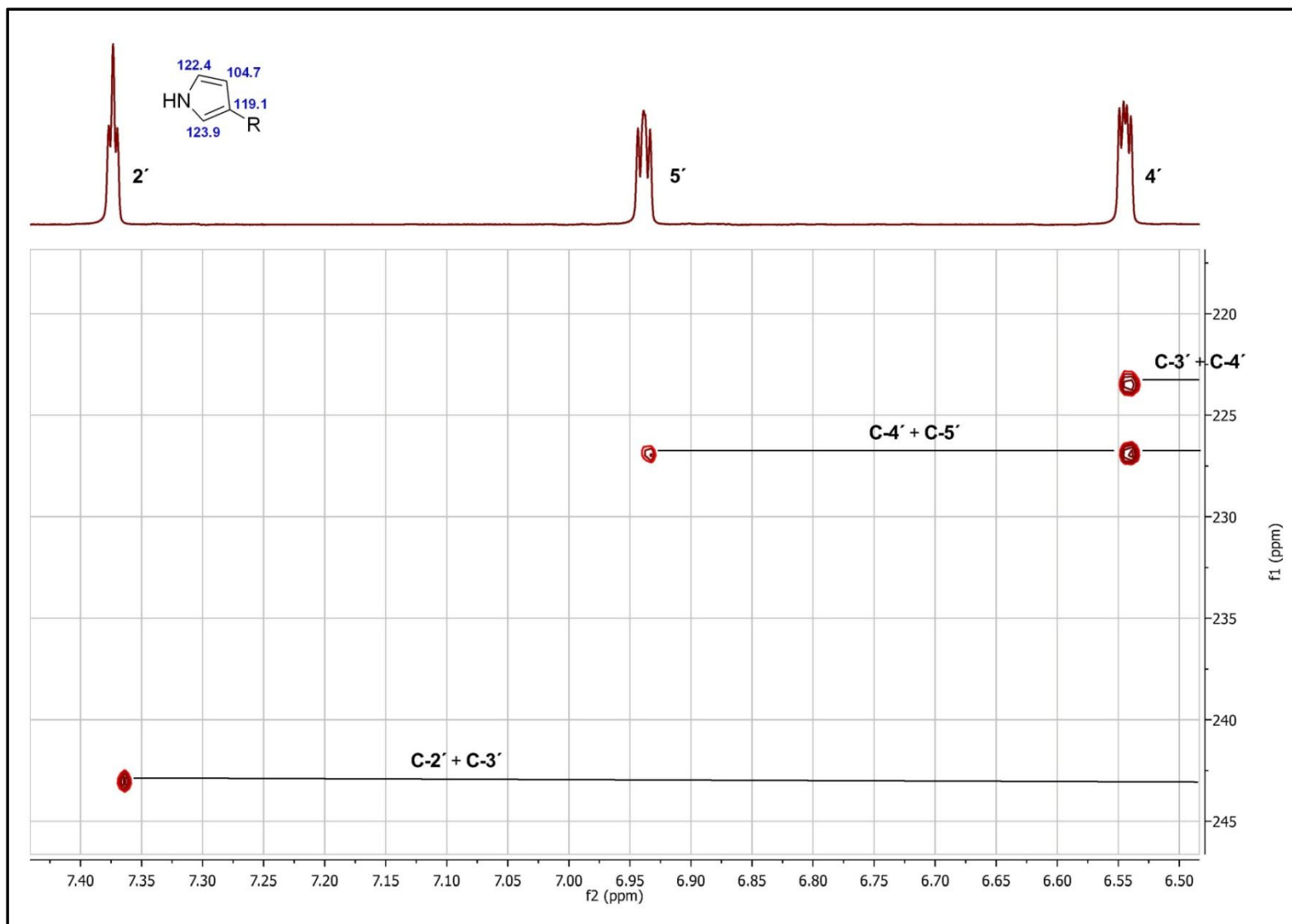
¹H NMR spektrum 3-PyrrCSO



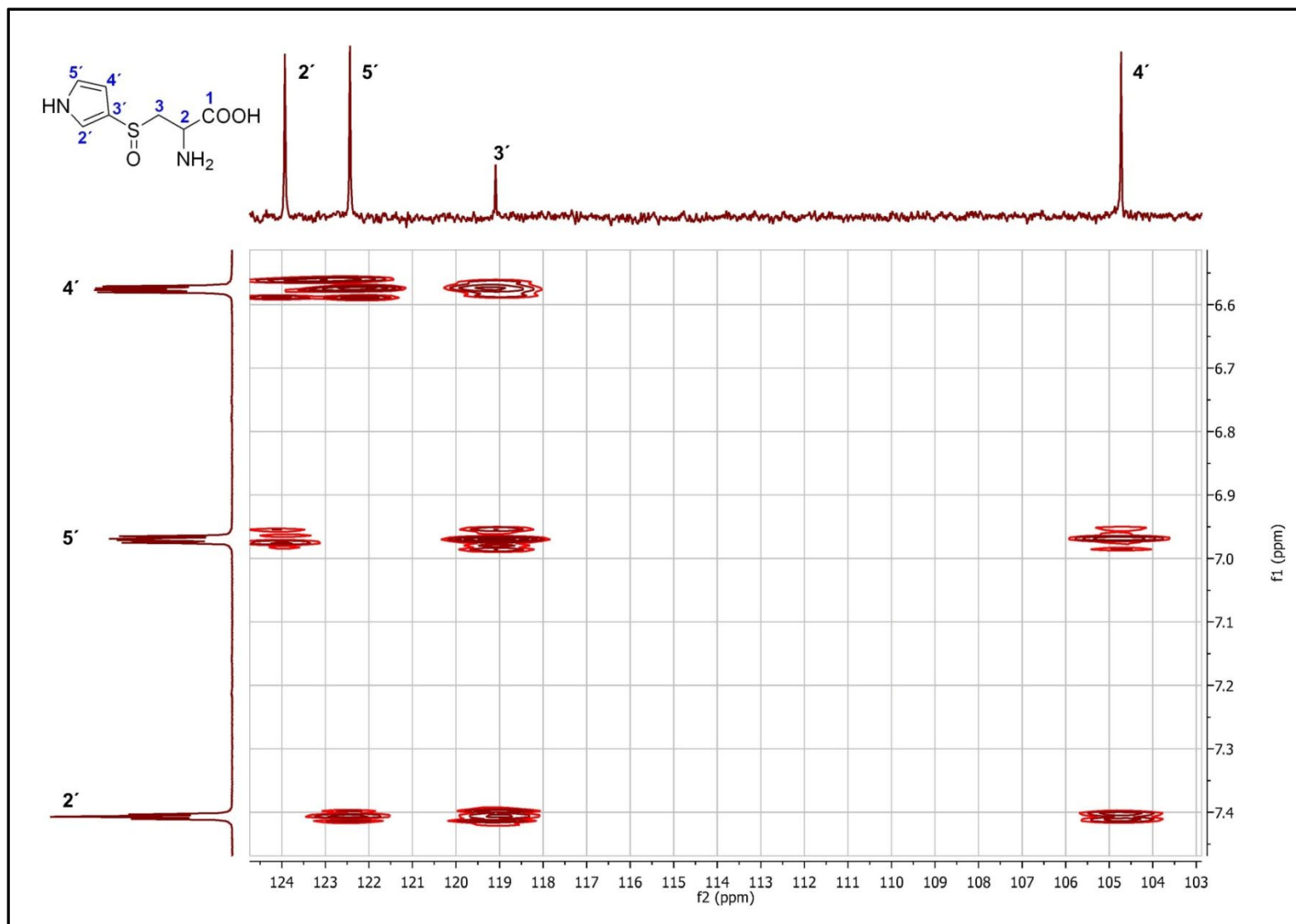
¹³C NMR spektrum 3-PyrrCSO



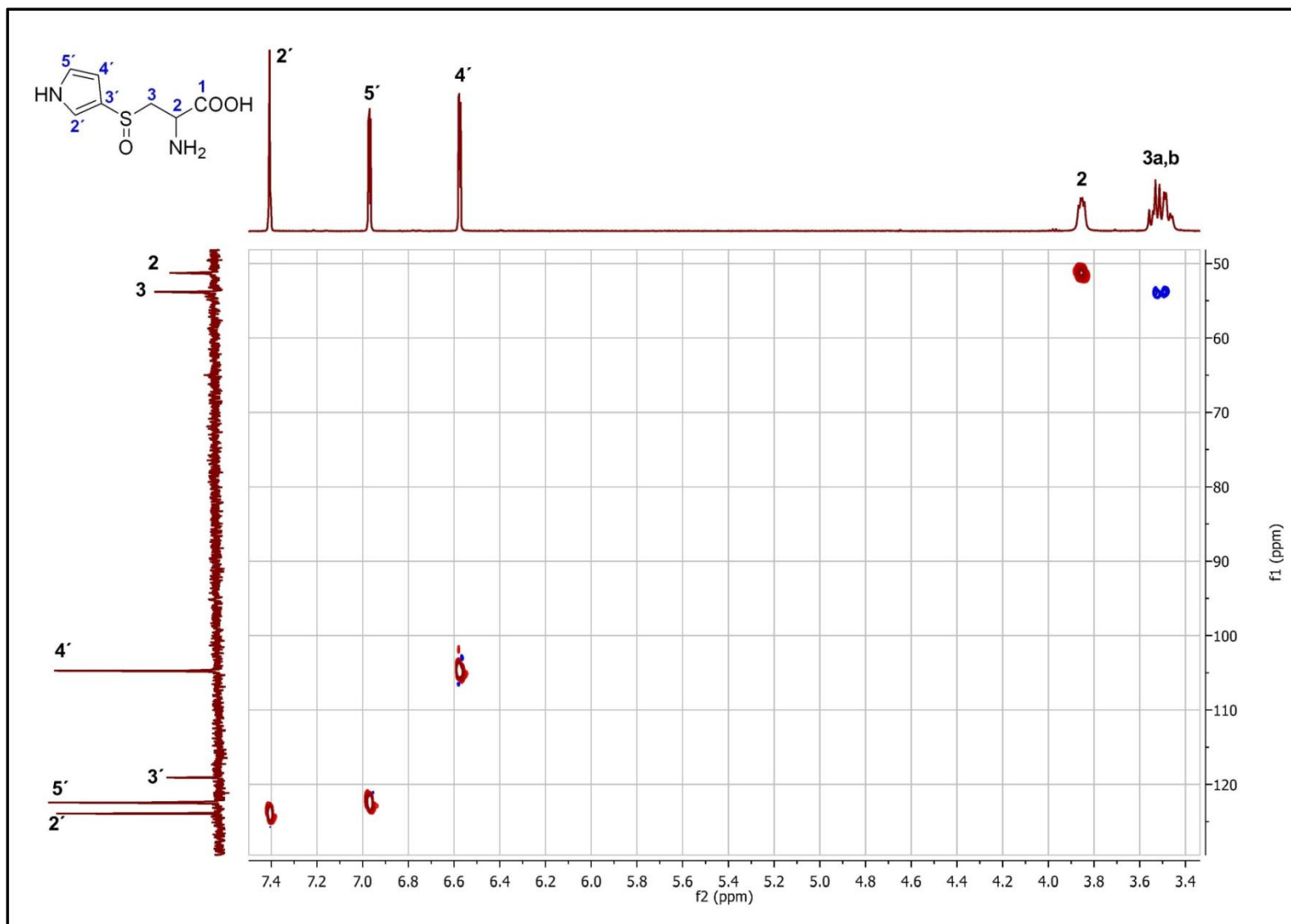
1,1-ADEQUATE NMR spektrum 3-PyrrCSO



gHMBC NMR spektrum 3-PyrrCSO

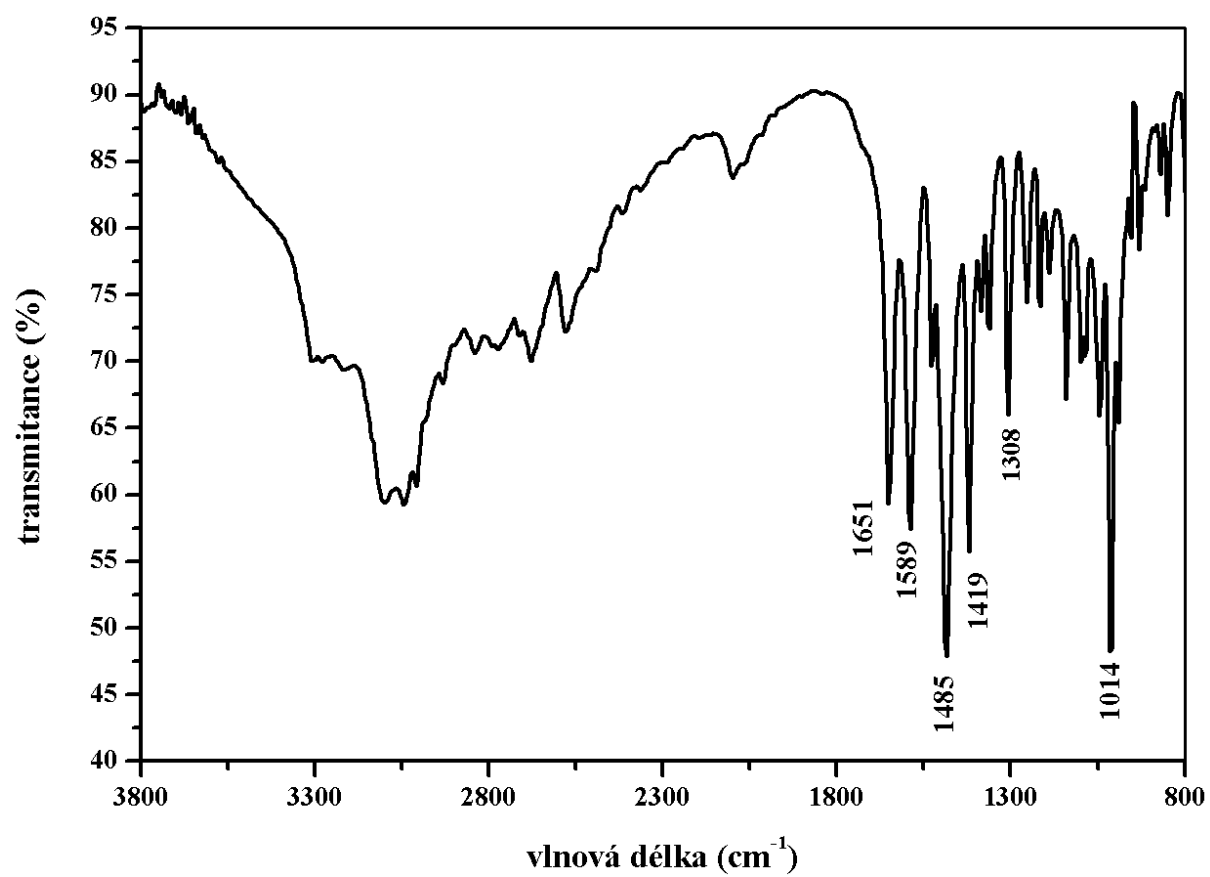


gHSQC NMR spektrum 3-PyrrCSO



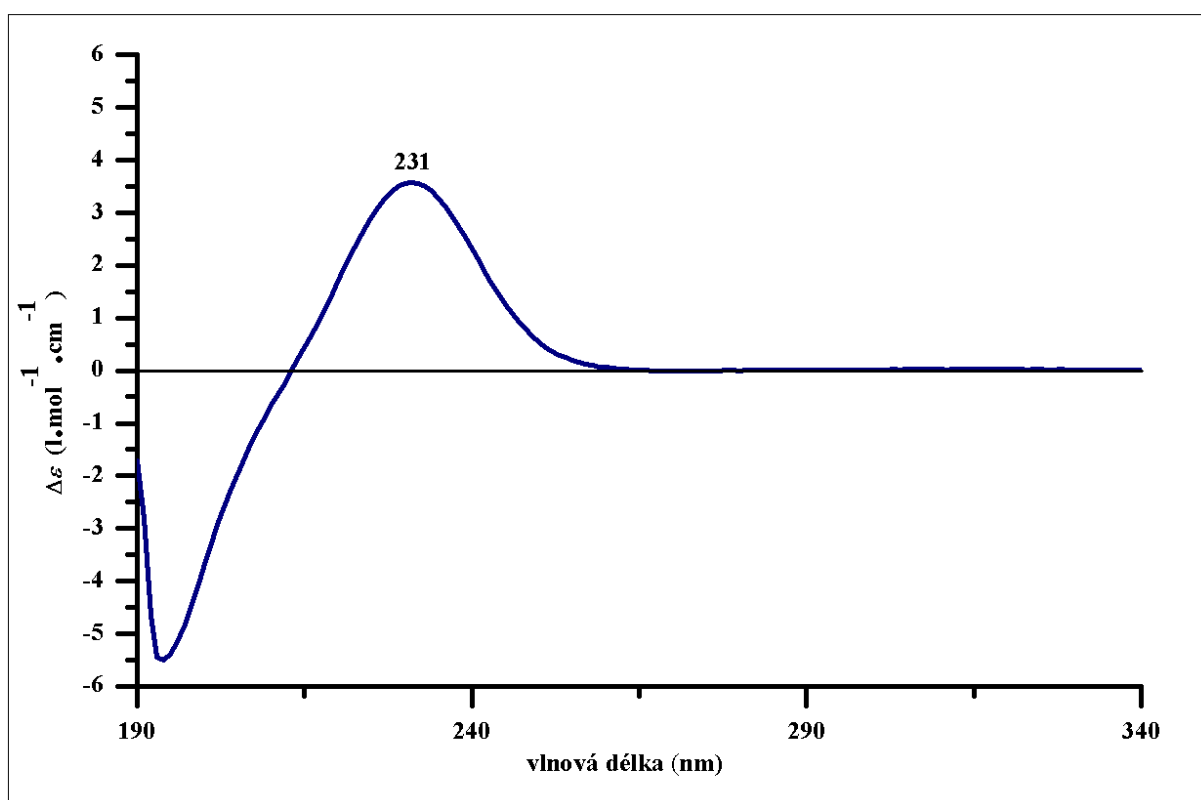
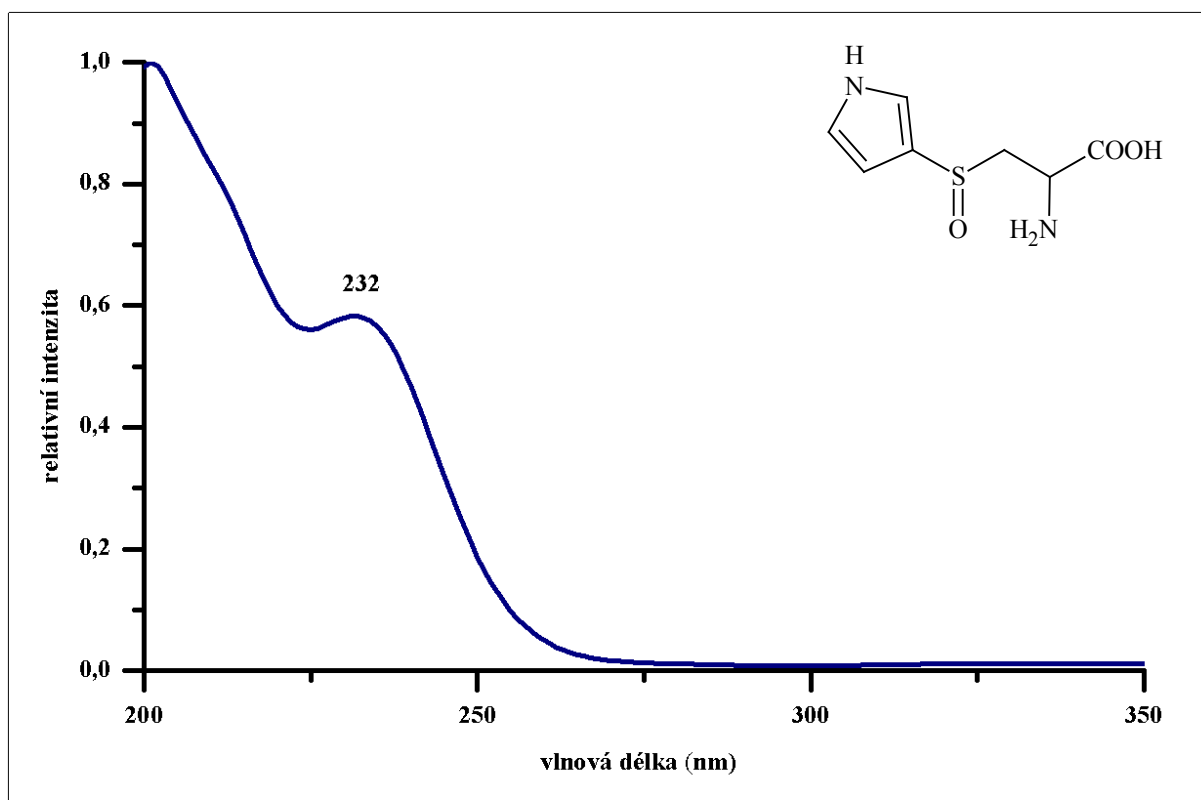
Příloha 7: IČ spektrum 3-PyrrCSO (22)

IČ spektrum 3-PyrrCSO



Příloha 8: UV a CD spektrum 3-PyrrCSO (22)

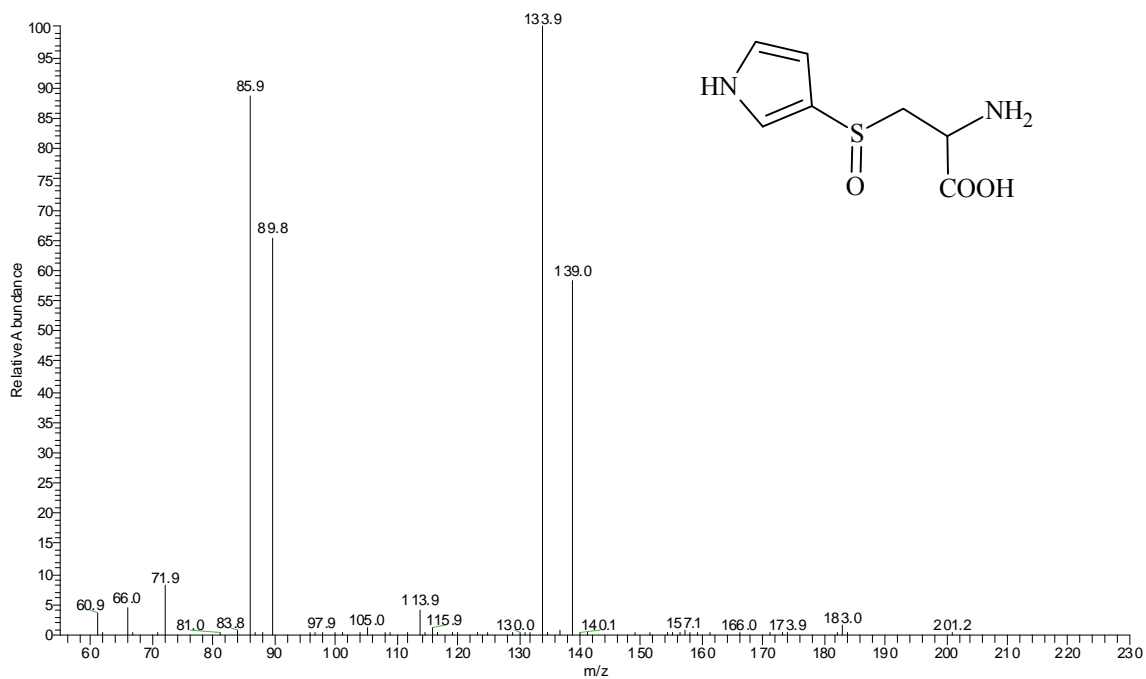
UV (nahore) a CD (dole) spektrum 3-PyrrCSO



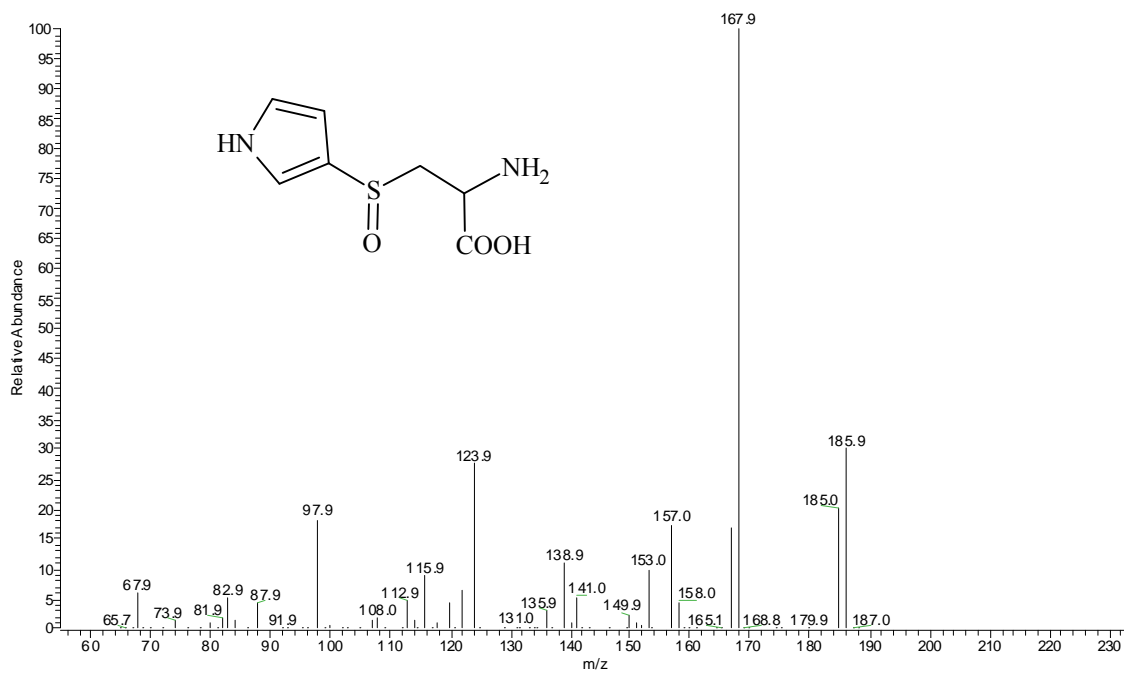
Příloha 9: MS/MS spektra 3-PyrrCSO (22)

MS/MS spektra 3-PyrrCSO

MS/MS spektrum iontu 201 (negativní ionizace)

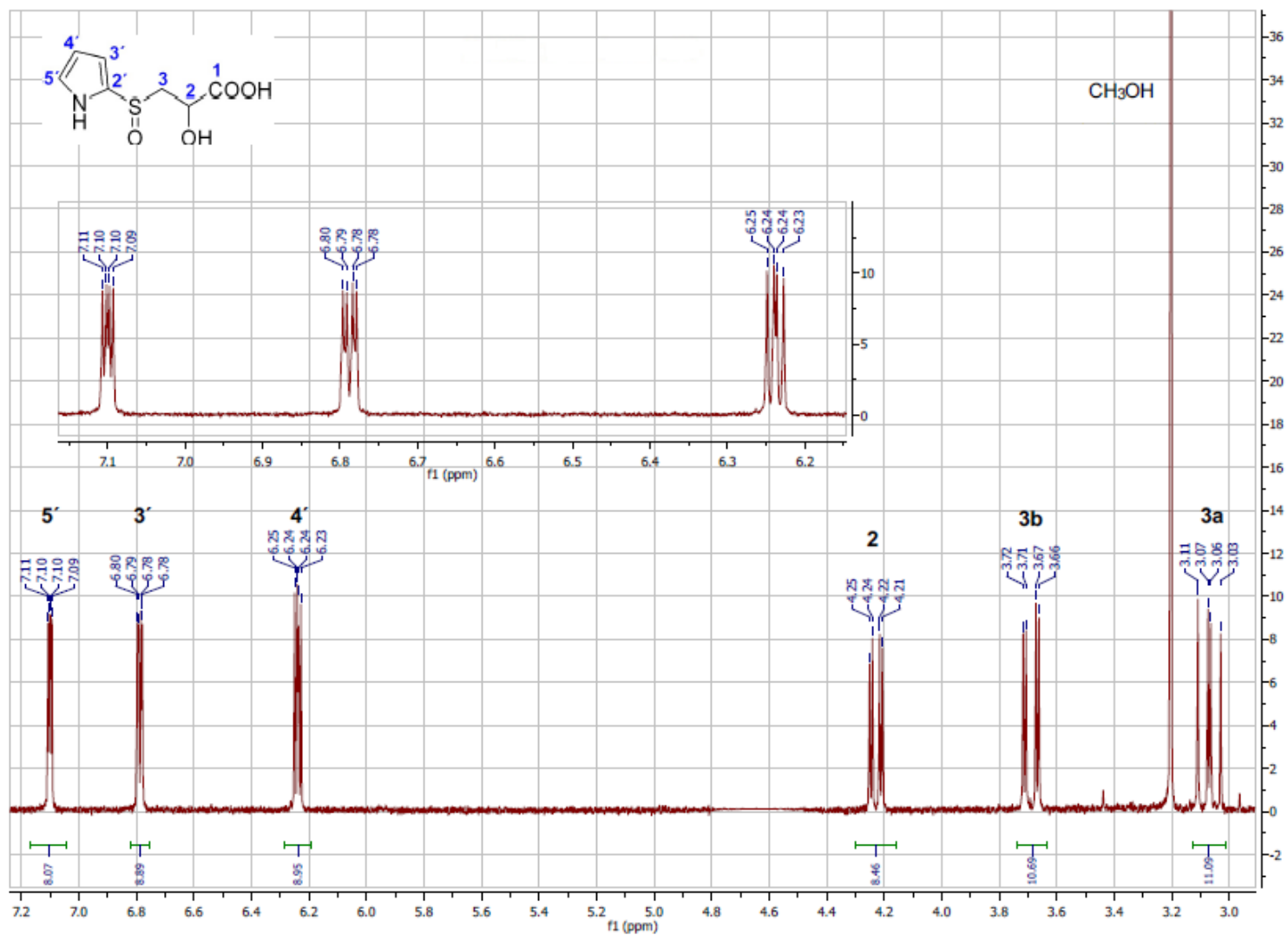


MS/MS spektrum iontu 203 (pozitivní ionizace)

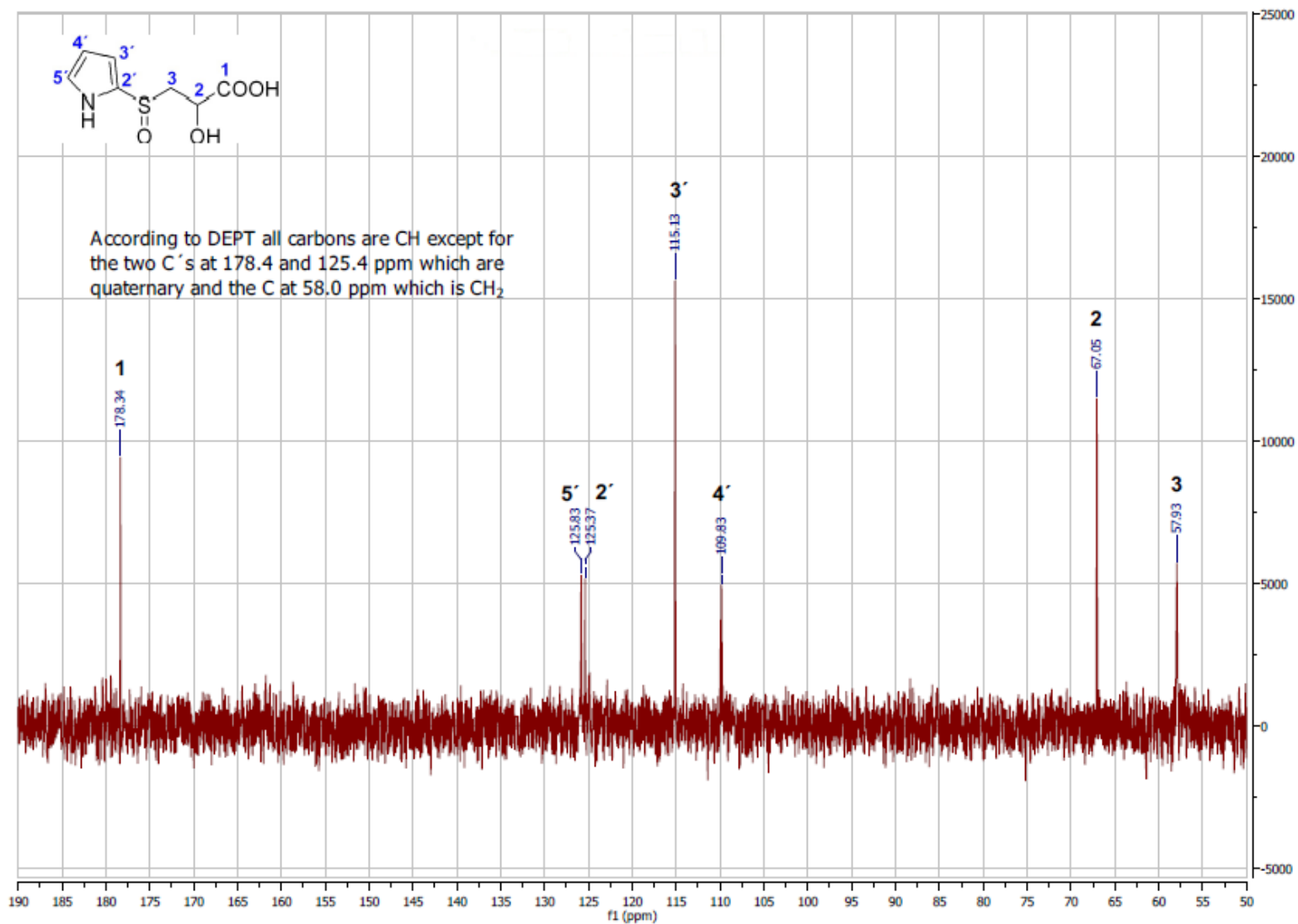


Příloha 10: ^1H NMR spektrum a ^{13}C NMR spektrum 2-PyrrSLA (**28**)

¹H NMR spektrum 2-PyrrSLA

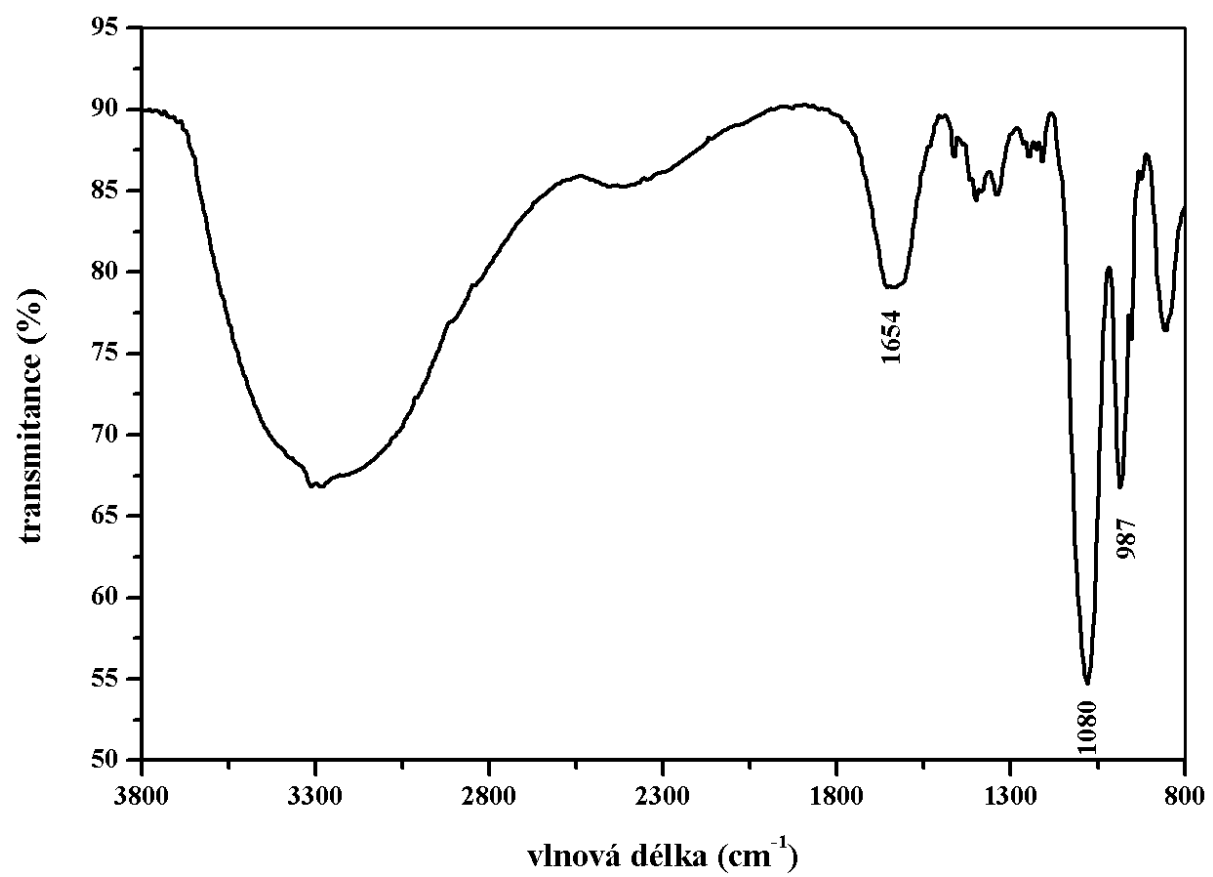


¹³C NMR spektrum 2-PyrrSLA



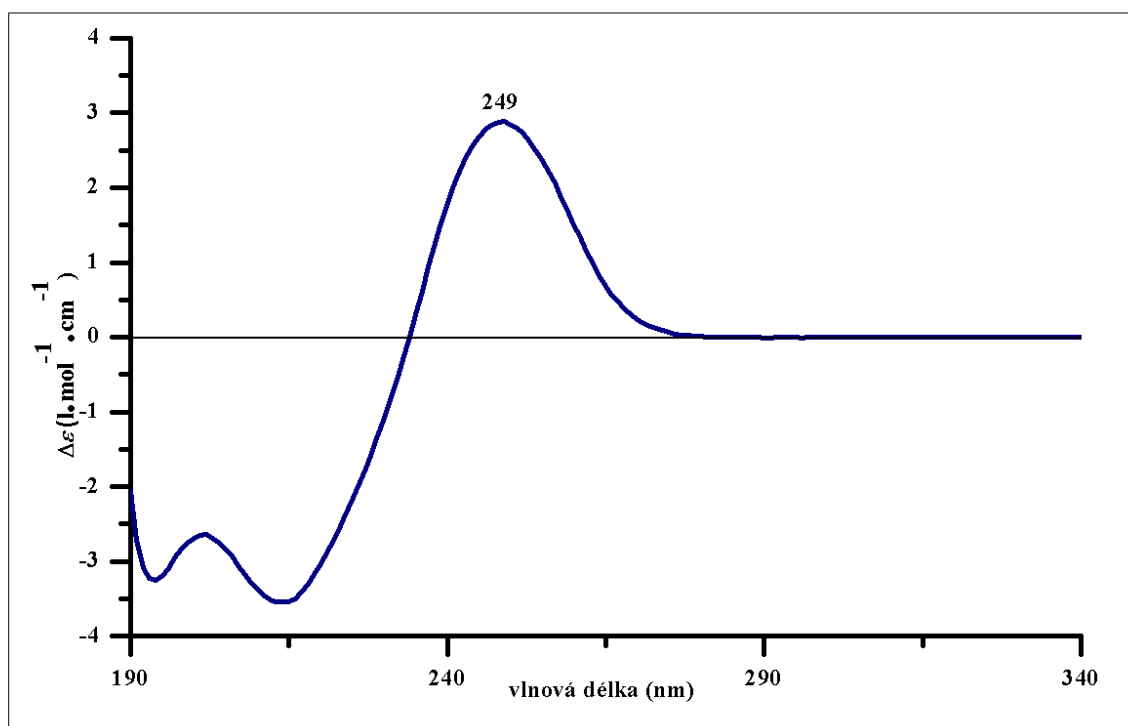
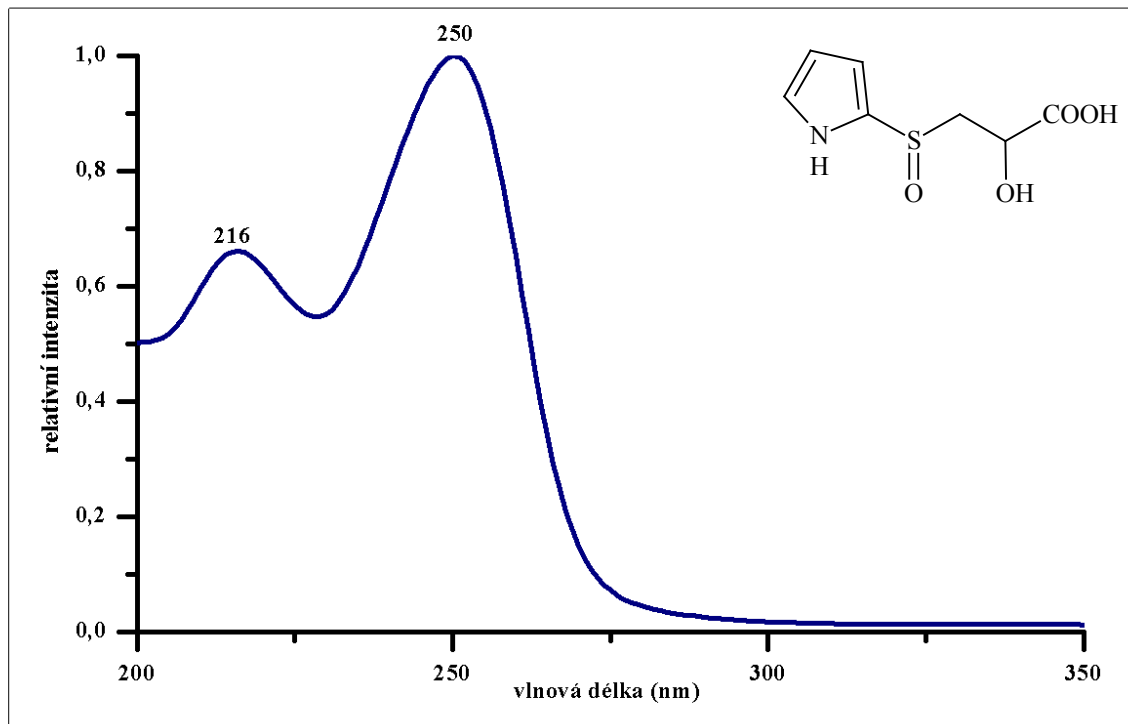
Příloha 11: IČ spektrum 2-PyrrSLA (28)

IČ spektrum 2-PyrrSLA



Příloha 12: UV and CD spektrum 2-PyrrSLA (28)

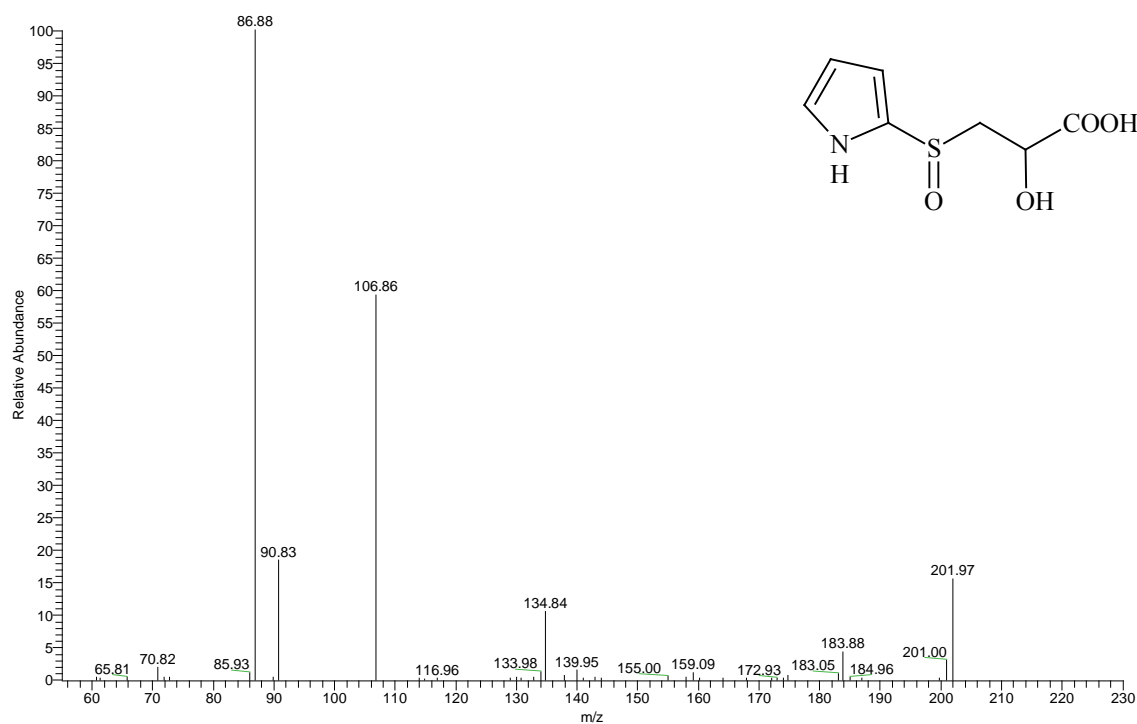
UV (nahore) a CD (dole) spektrum 2-PyrrSLA



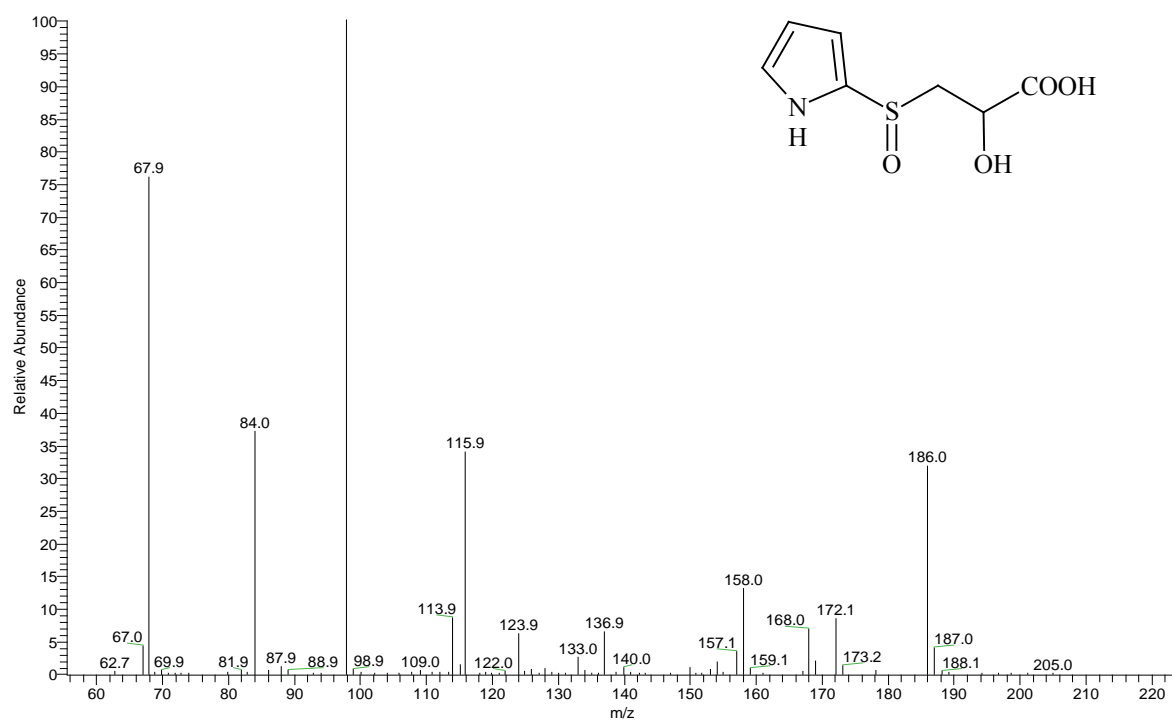
Příloha 13: MS/MS spektra 2-PyrrSLA (28)

MS/MS spektra 2-PyrrSLA

MS/MS spektrum iontu 202 (negativní ionizace)

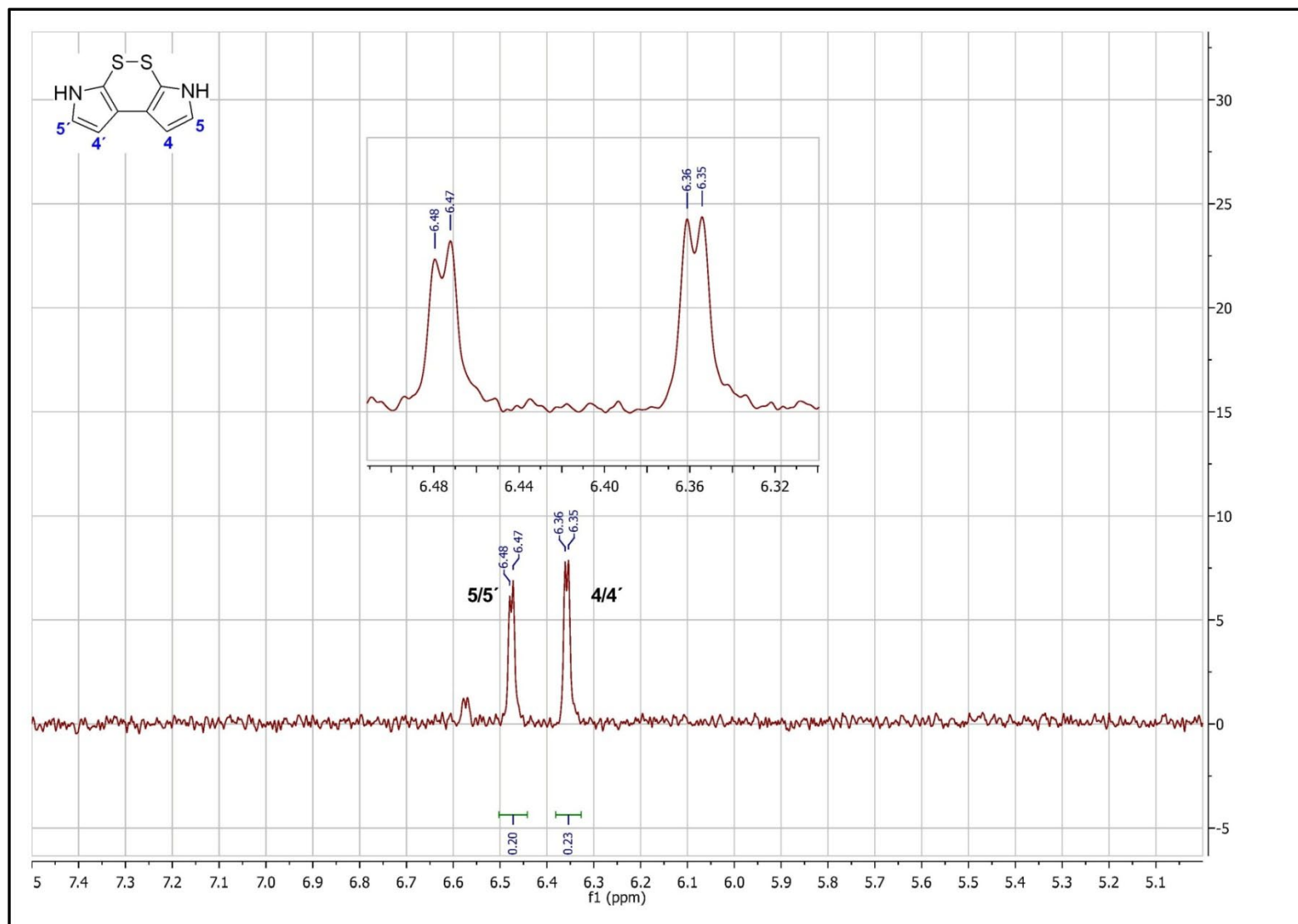


MS/MS spektrum iontu 204 (pozitivní ionizace)



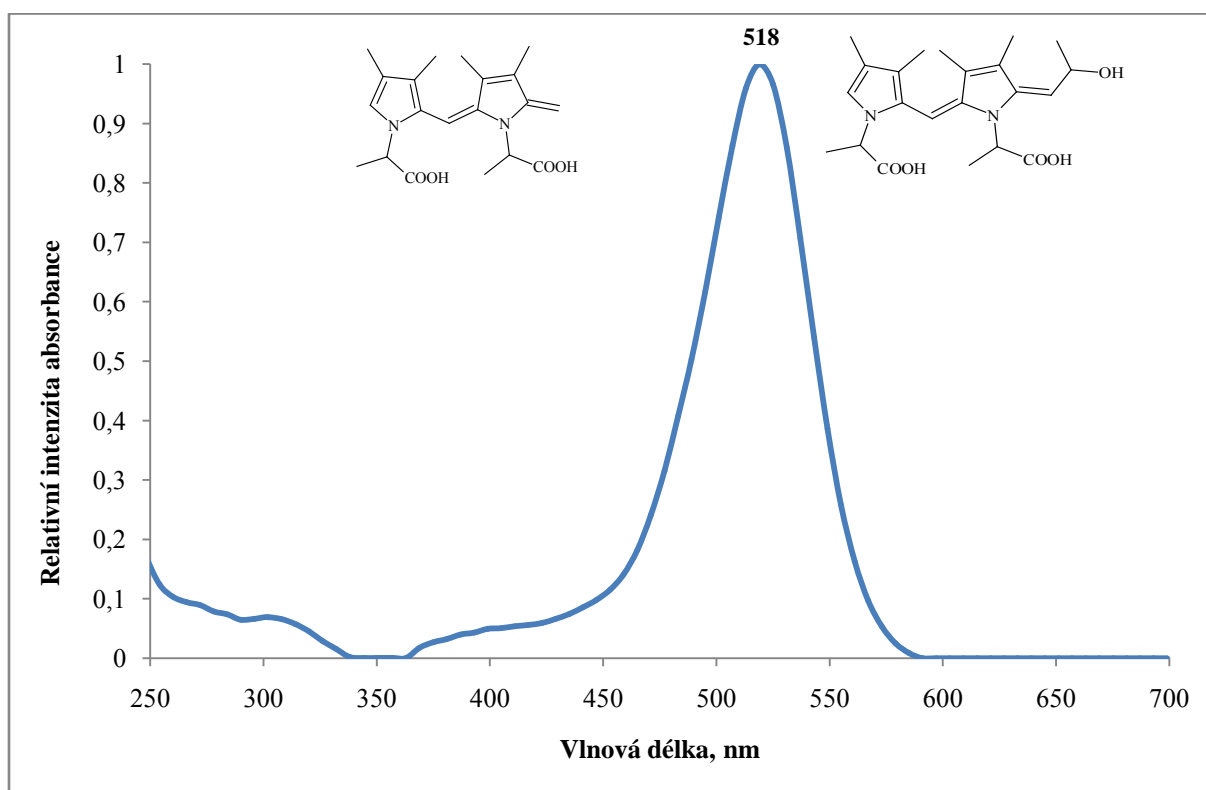
Příloha 14: ^1H NMR spektrum 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrolu (**31**)

^1H NMR spektrum 2,2'-epidithio-3,3'-dipyrrolu

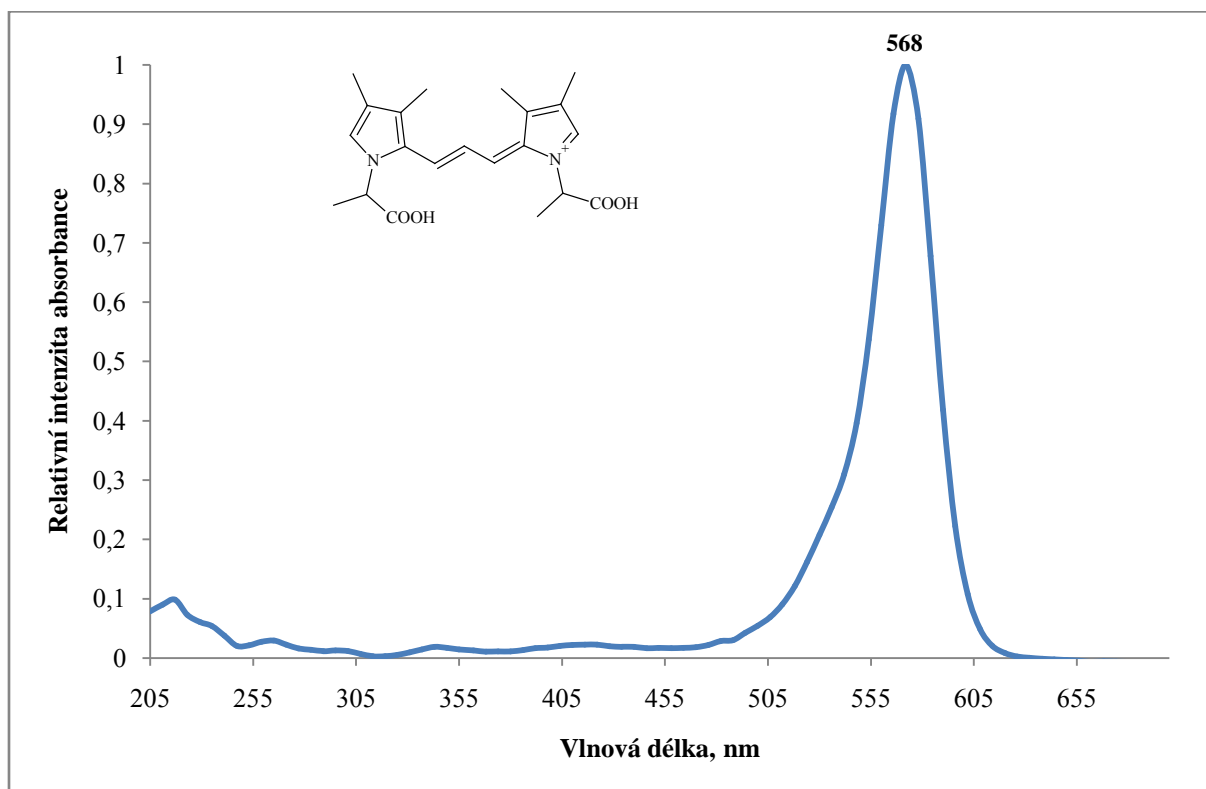


Příloha 15: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených
v cibuli a póru

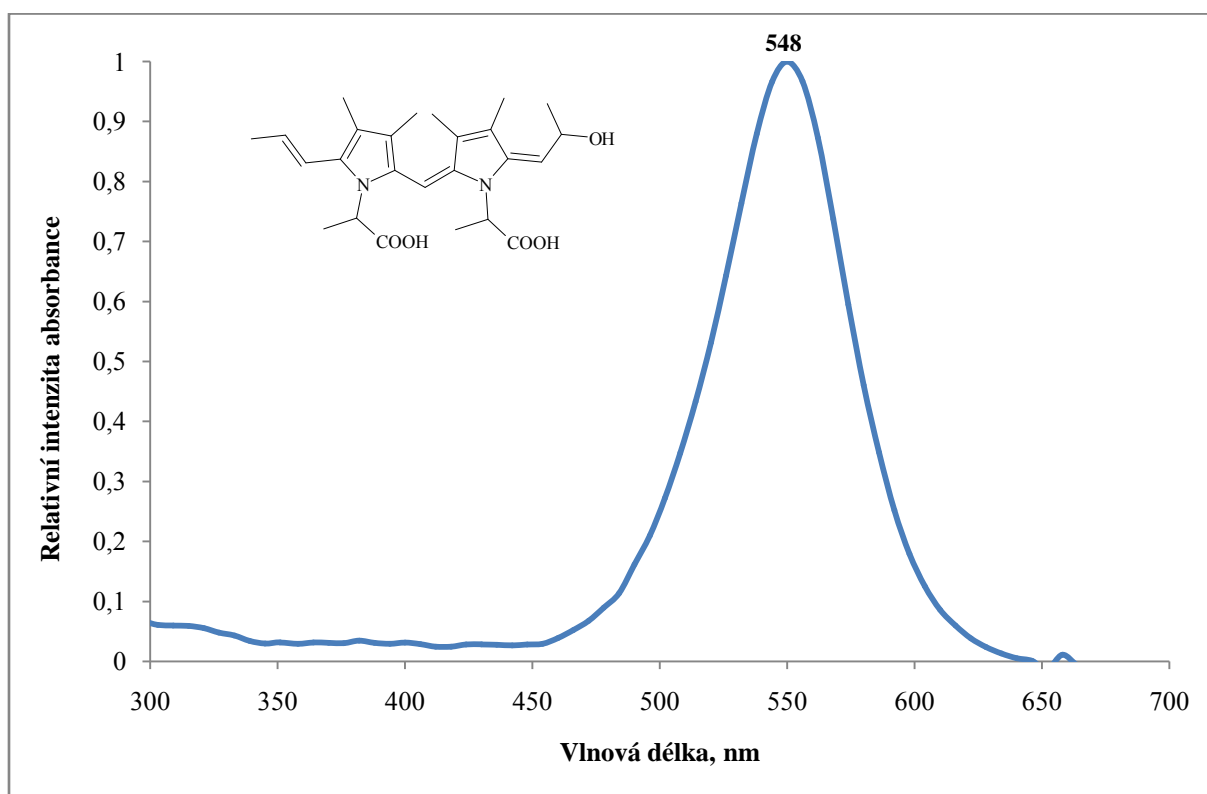
UV-Vis spektrum látek LO-358 a LO-402



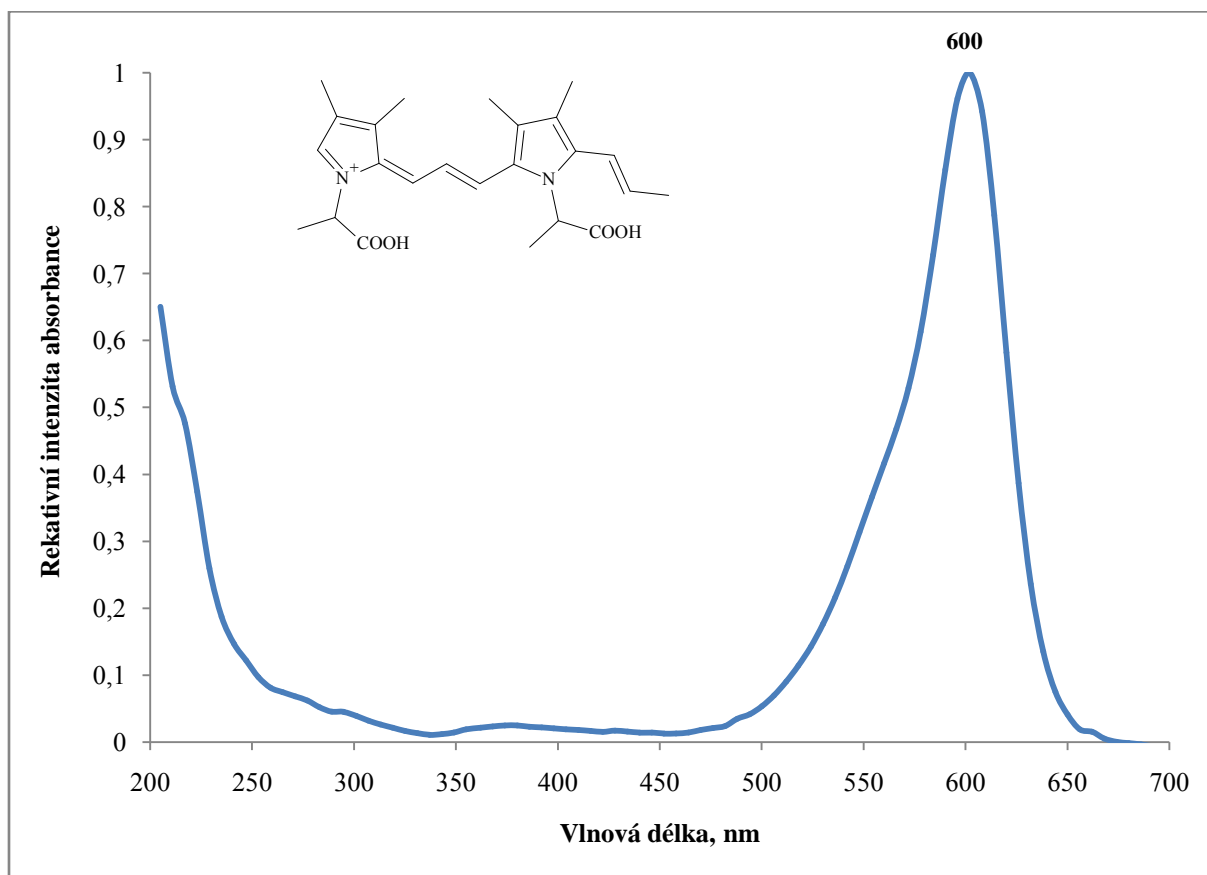
UV-Vis spektrum látky GLO-371



UV-Vis spektrum látky LO-442



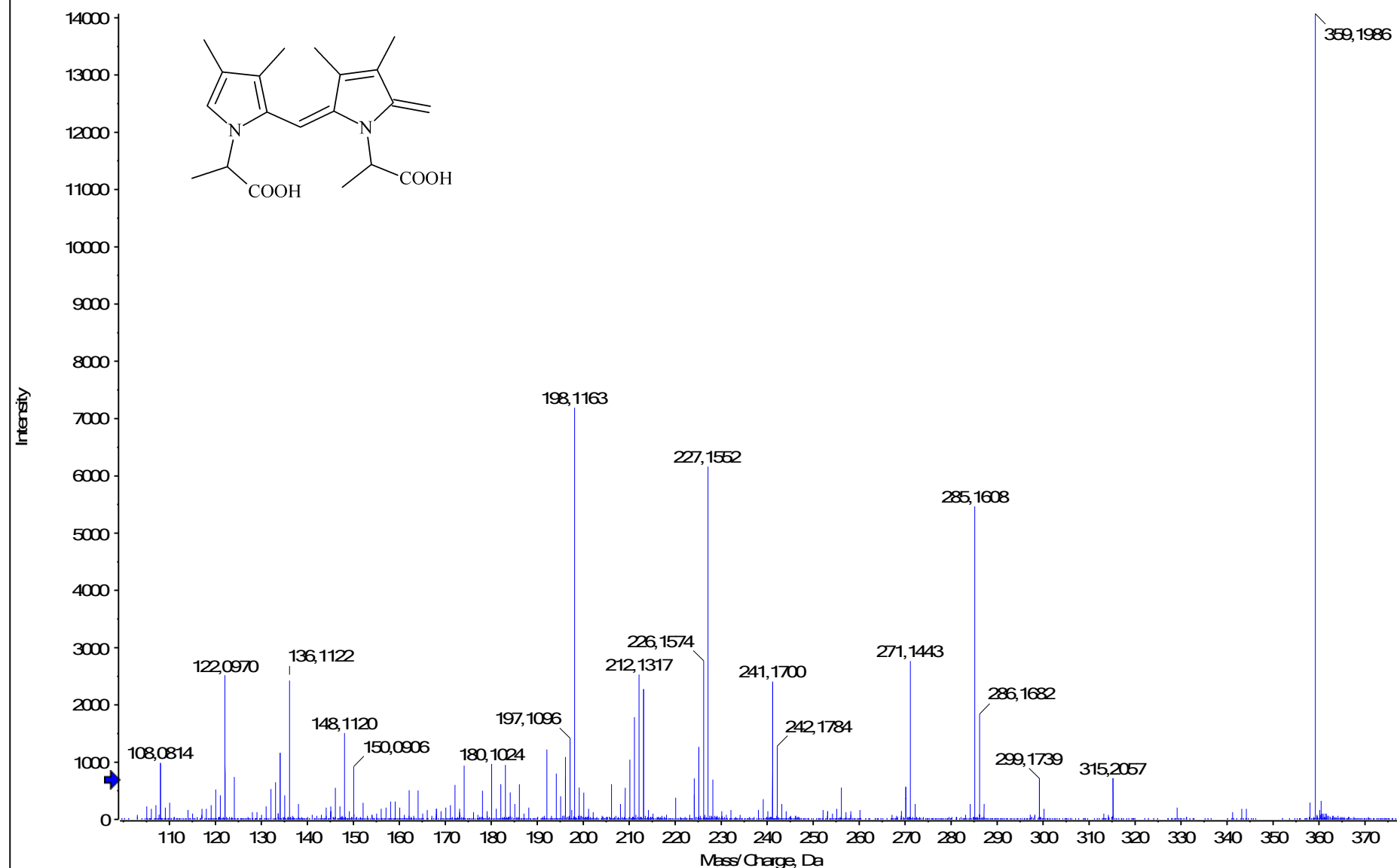
UV-Vis spektrum látky LO-411



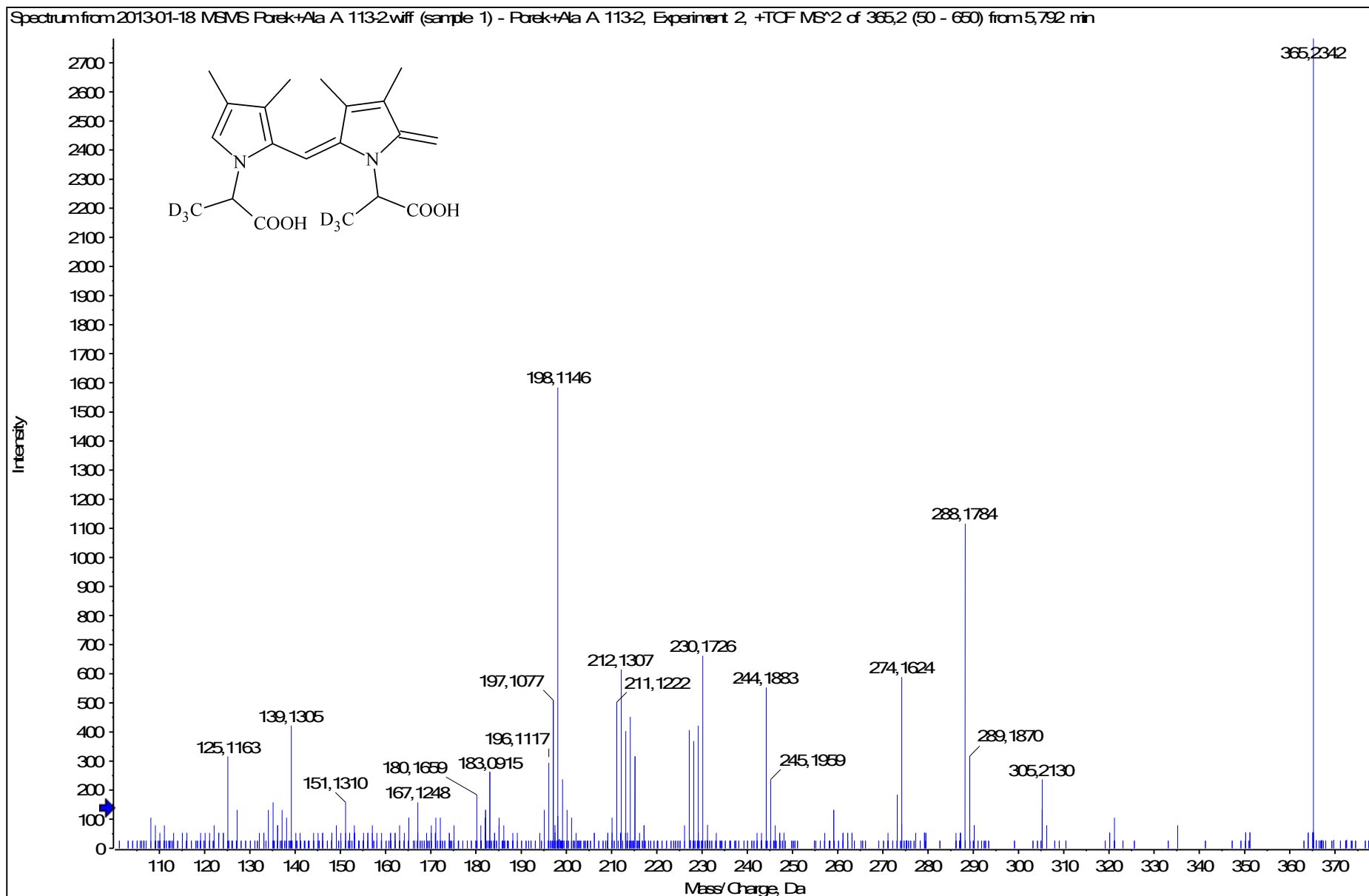
Příloha 16: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučenin vytvořených v cibuli a póru

HRMS/MS spektrum látky LO-358

Spectrum from Cibule zluta + Ala 2404.wiff (sample 1) - Cibule zluta + Ala 2404, Experiment 7, +TOF MS² (50 - 700) from 5,925 min
Precursor: 359,2 Da, CE 35,0

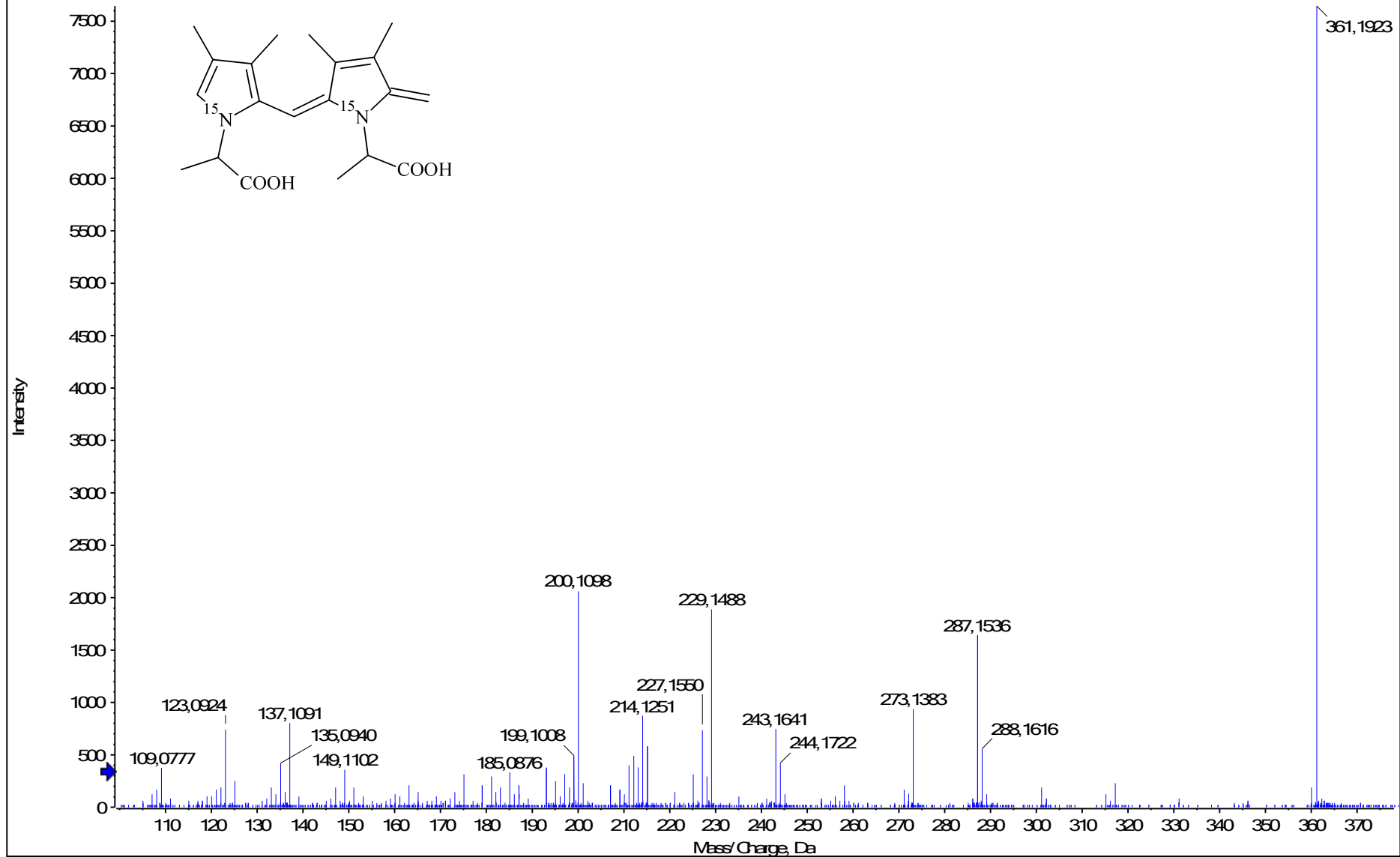


HRMS/MS spektrum látky LO-358

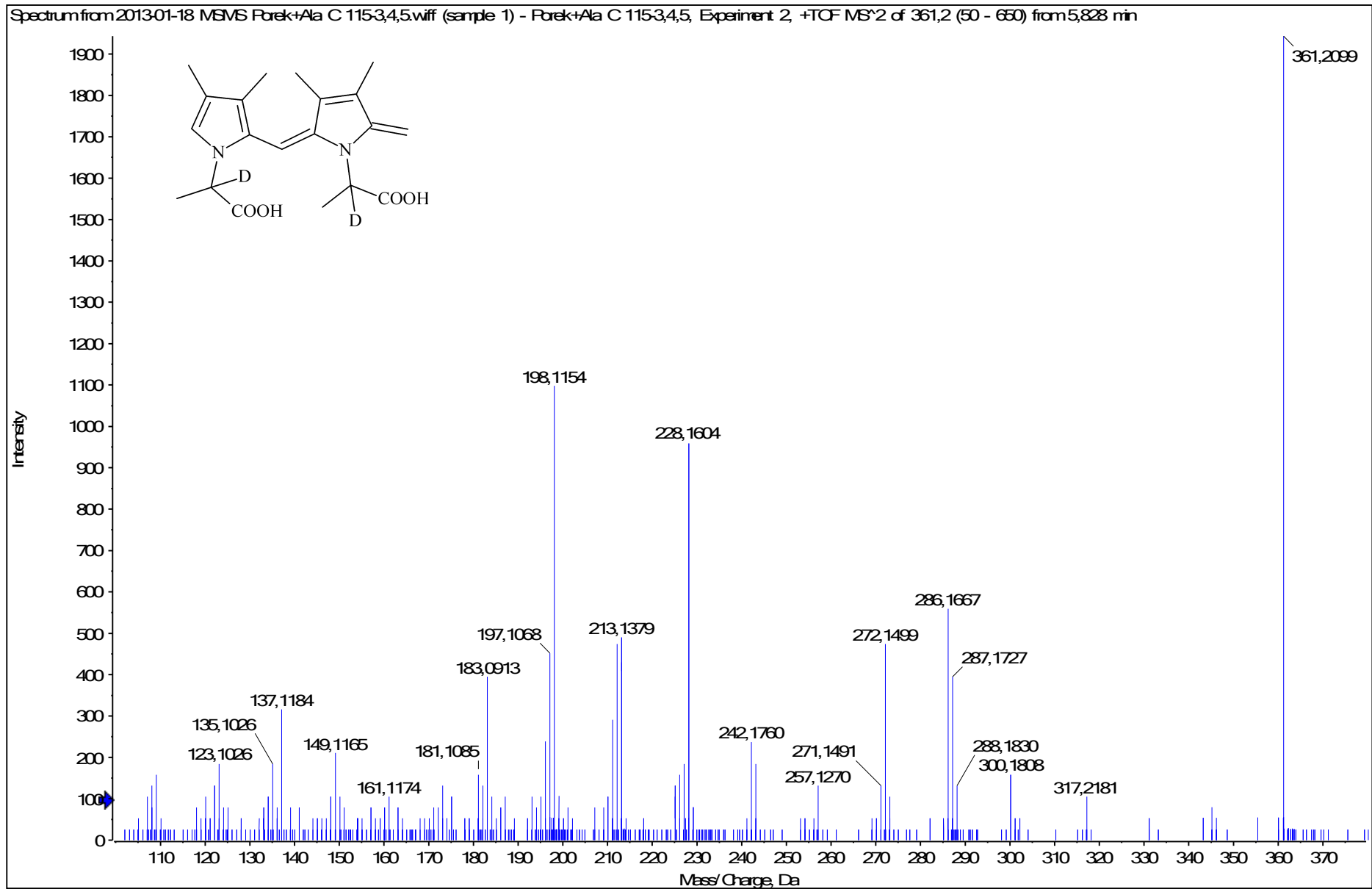


HRMS/MS spektrum látky LO-358

Spectrum from Cibule + Ala Bwiff (sample 1) - Cibule + Ala B, Experiment 8, +TOF MS² (50 - 700) from 5,908 min
Precursor: 361,2 Da, CE 35,0

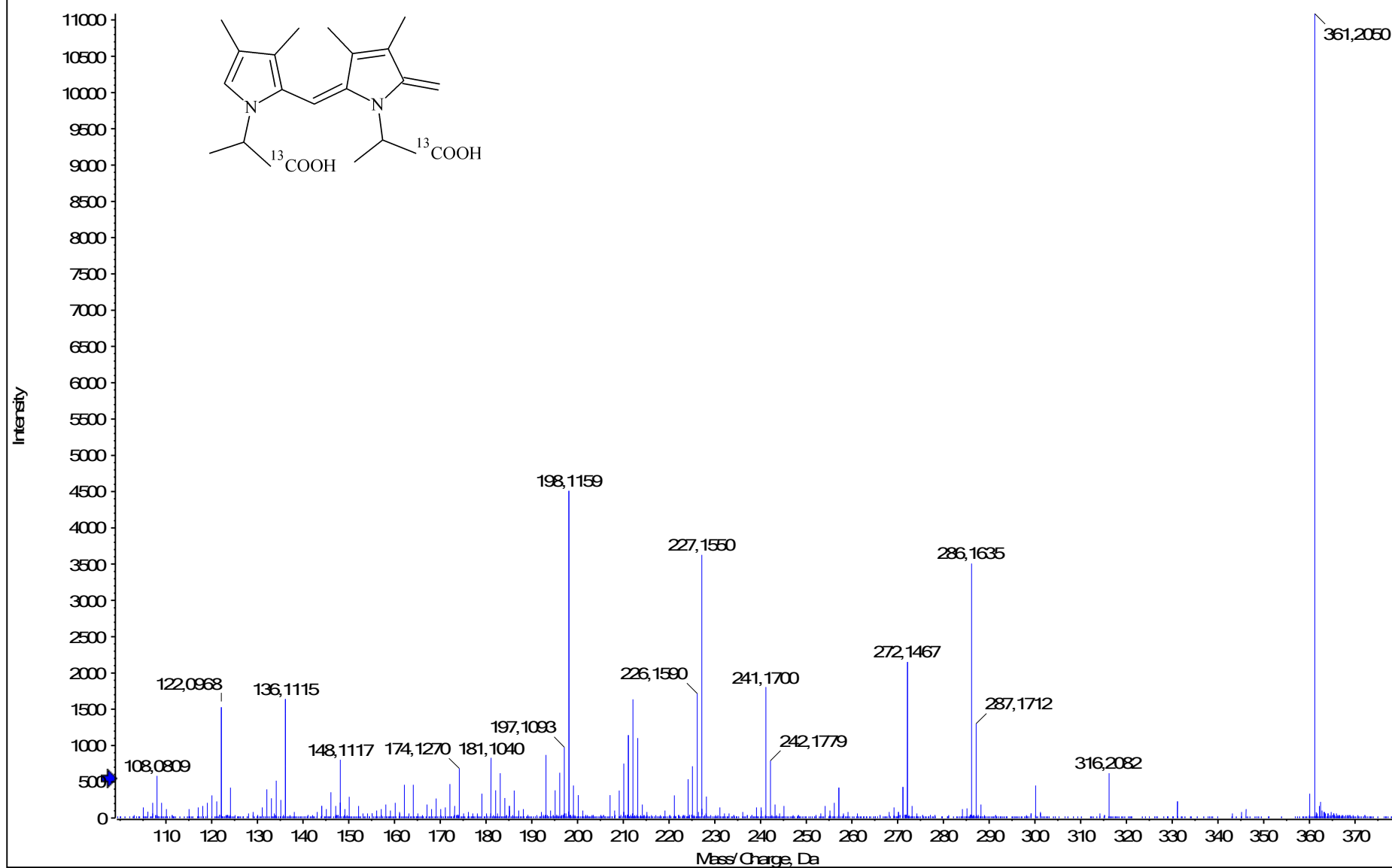


HRMS/MS spektrum látky LO-358

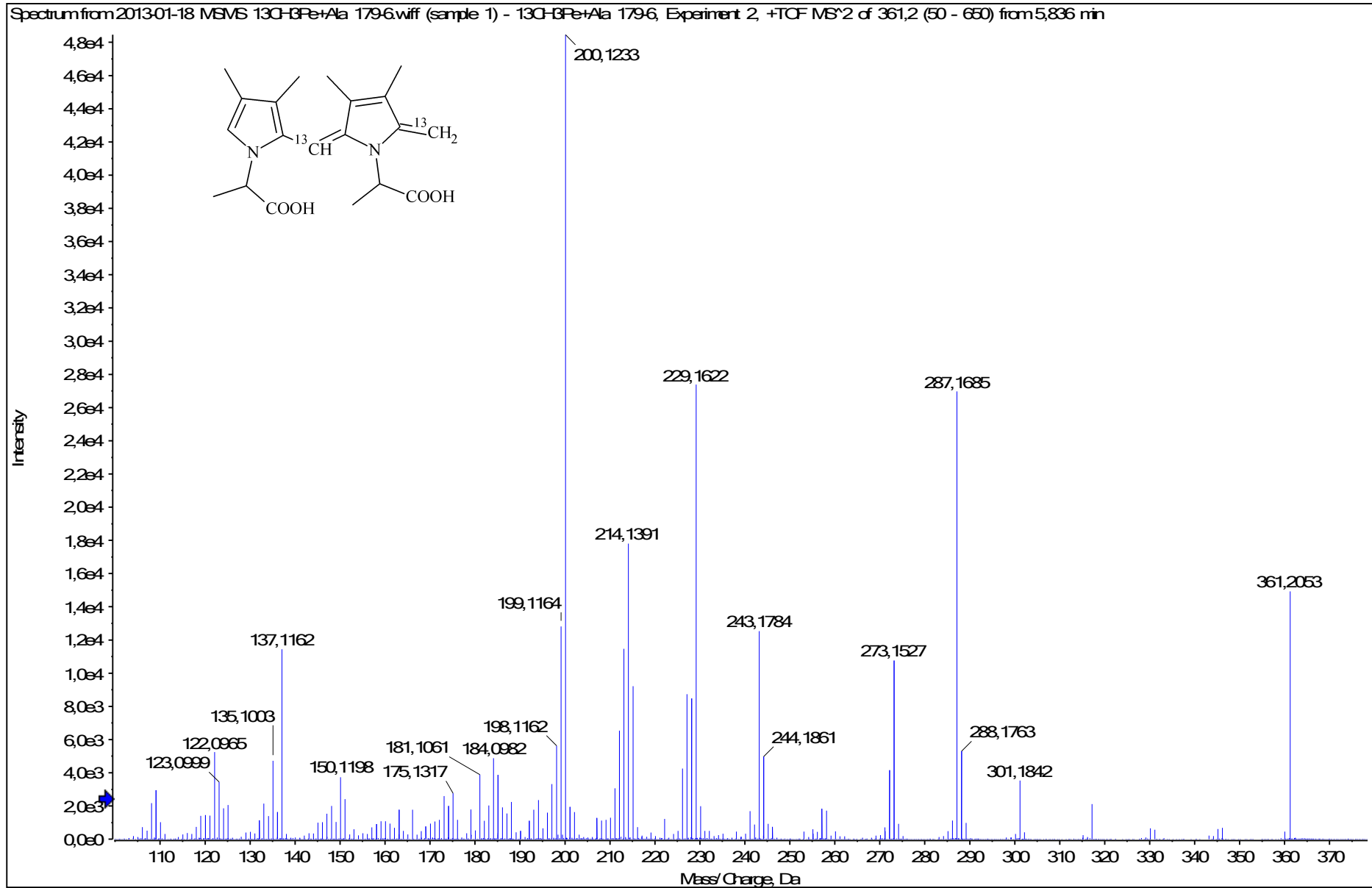


HRMS/MS spektrum látky LO-358

Spectrum from Cibule + Ala D.wiff (sample 1) - Cibule + Ala D, Experiment 4, +TOF MS² (50 - 700) from 5,907 min
Precursor: 361,2 Da, CE 35,0

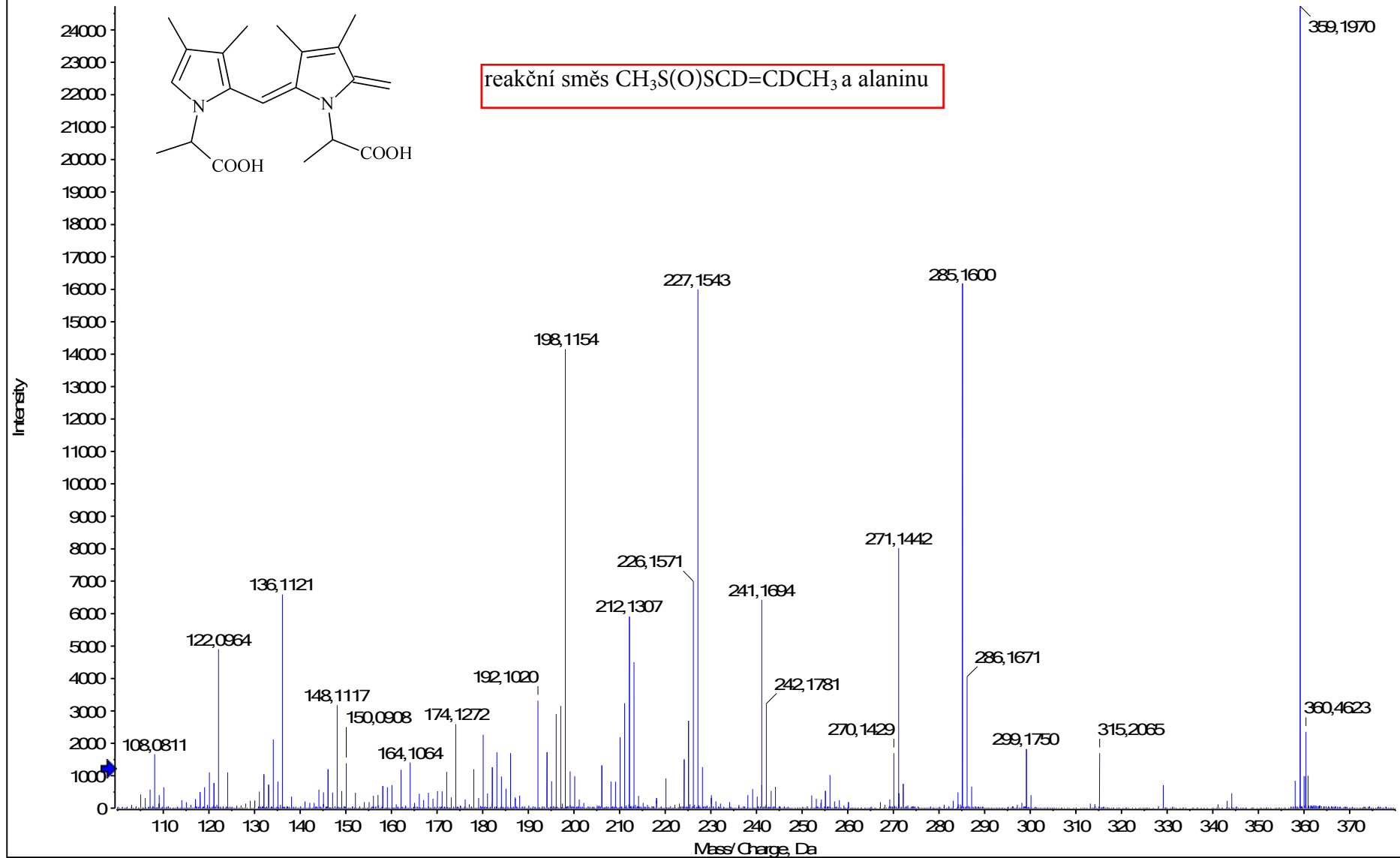


HRMS/MS spektrum látky LO-358

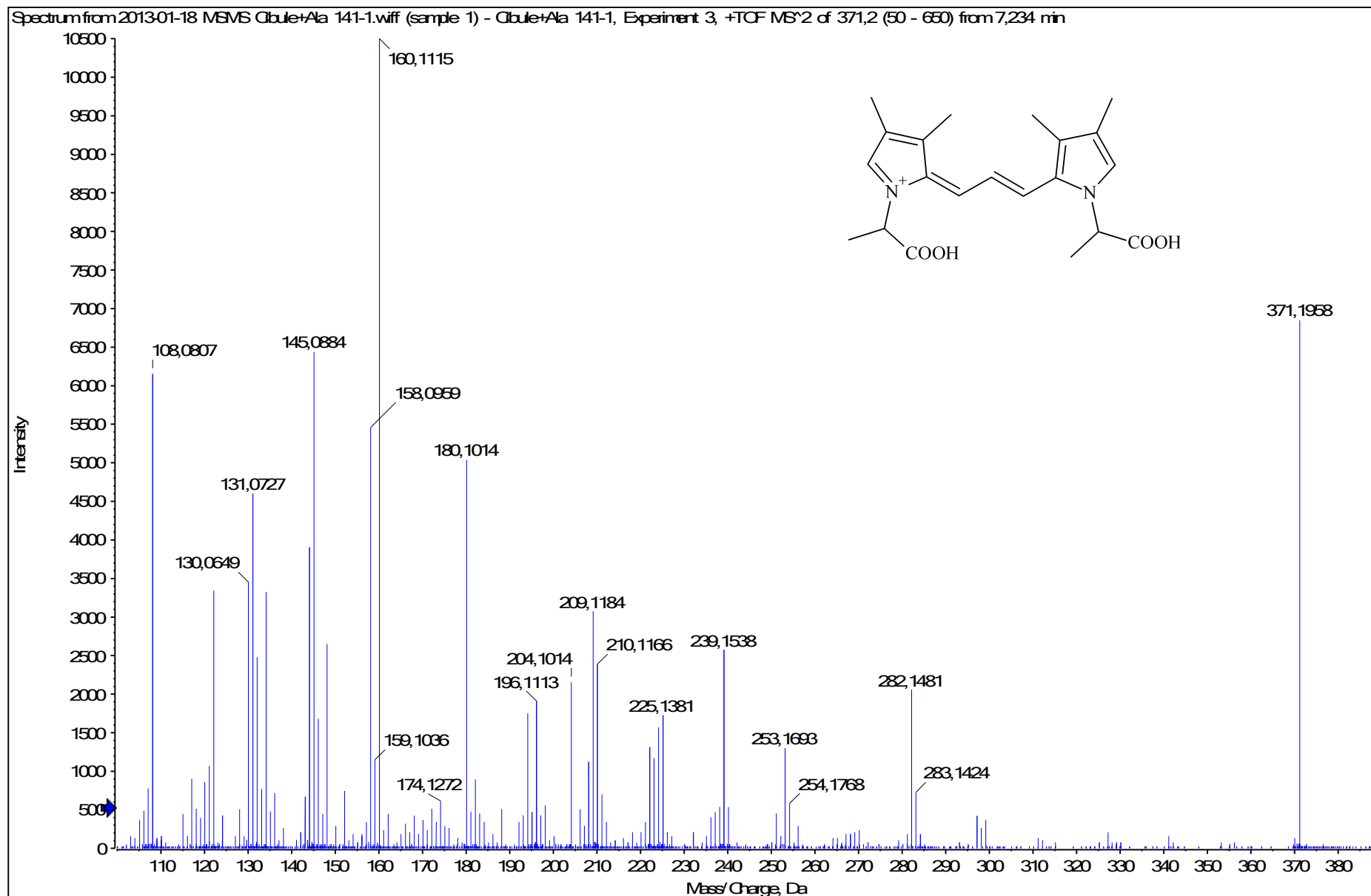


HRMS/MS spektrum látky LO-358

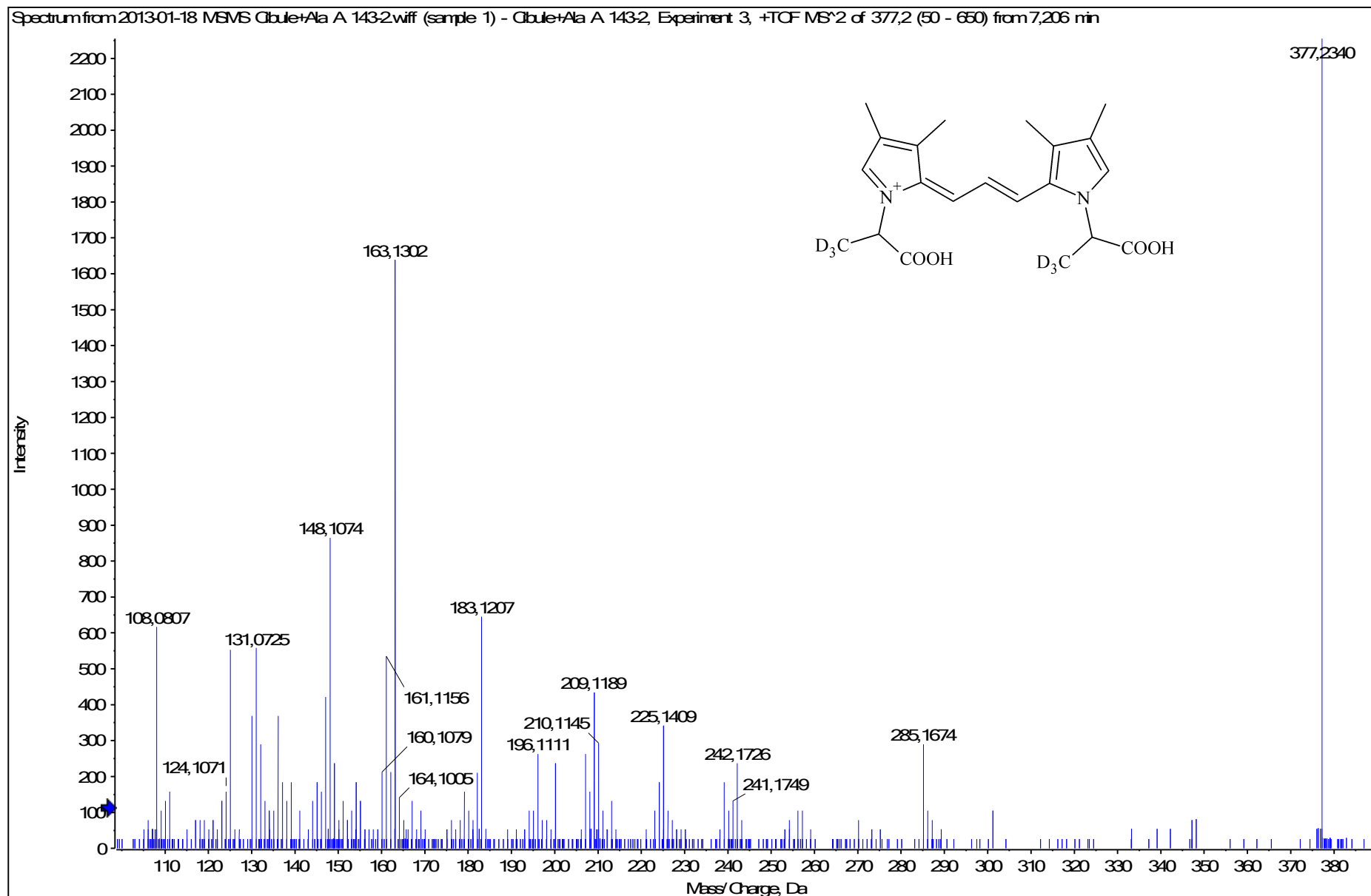
Spectrum from 2012-12-19 D2MePe + Ala wiff (sample 1) - D2MePe + Ala (222), Experiment 6, +TOF MS² (50 - 800) from 5,819 min
Precursor: 359,2 Da, CE 35,0



HRMS/MS spektrum látky GLO-371

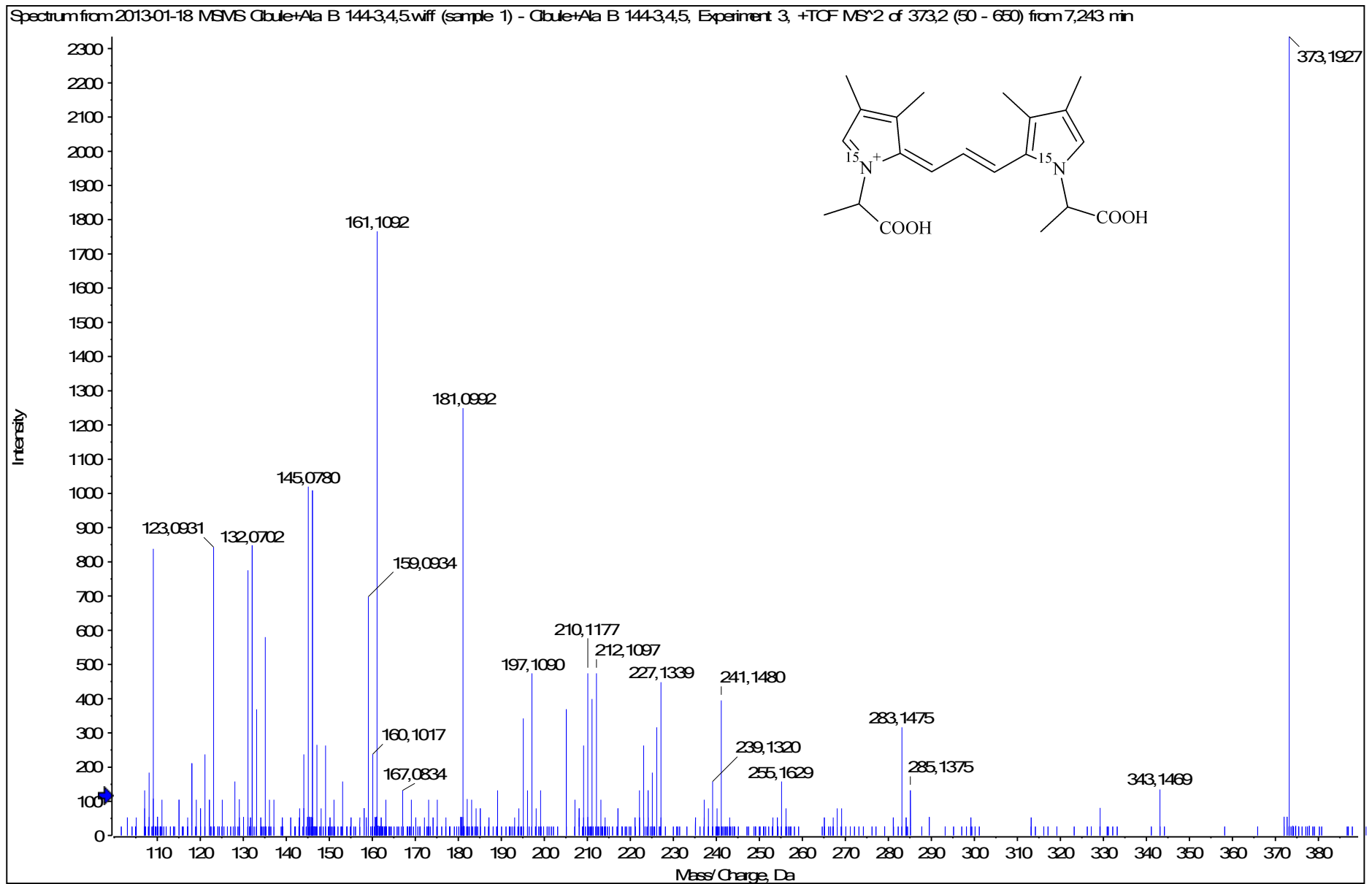


HRMS/MS spektrum látky GLO-371

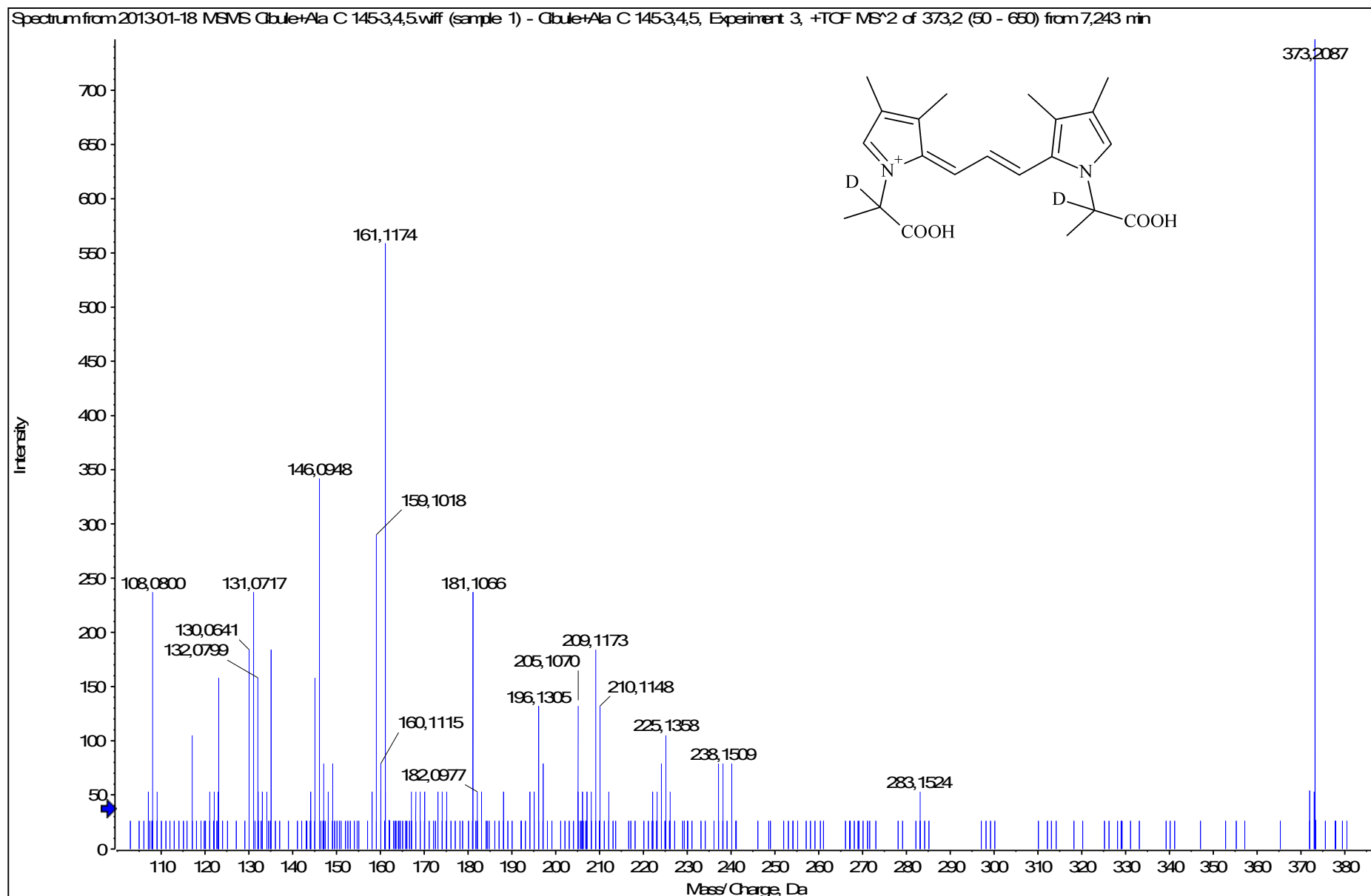


11.2.2013 18:25:08

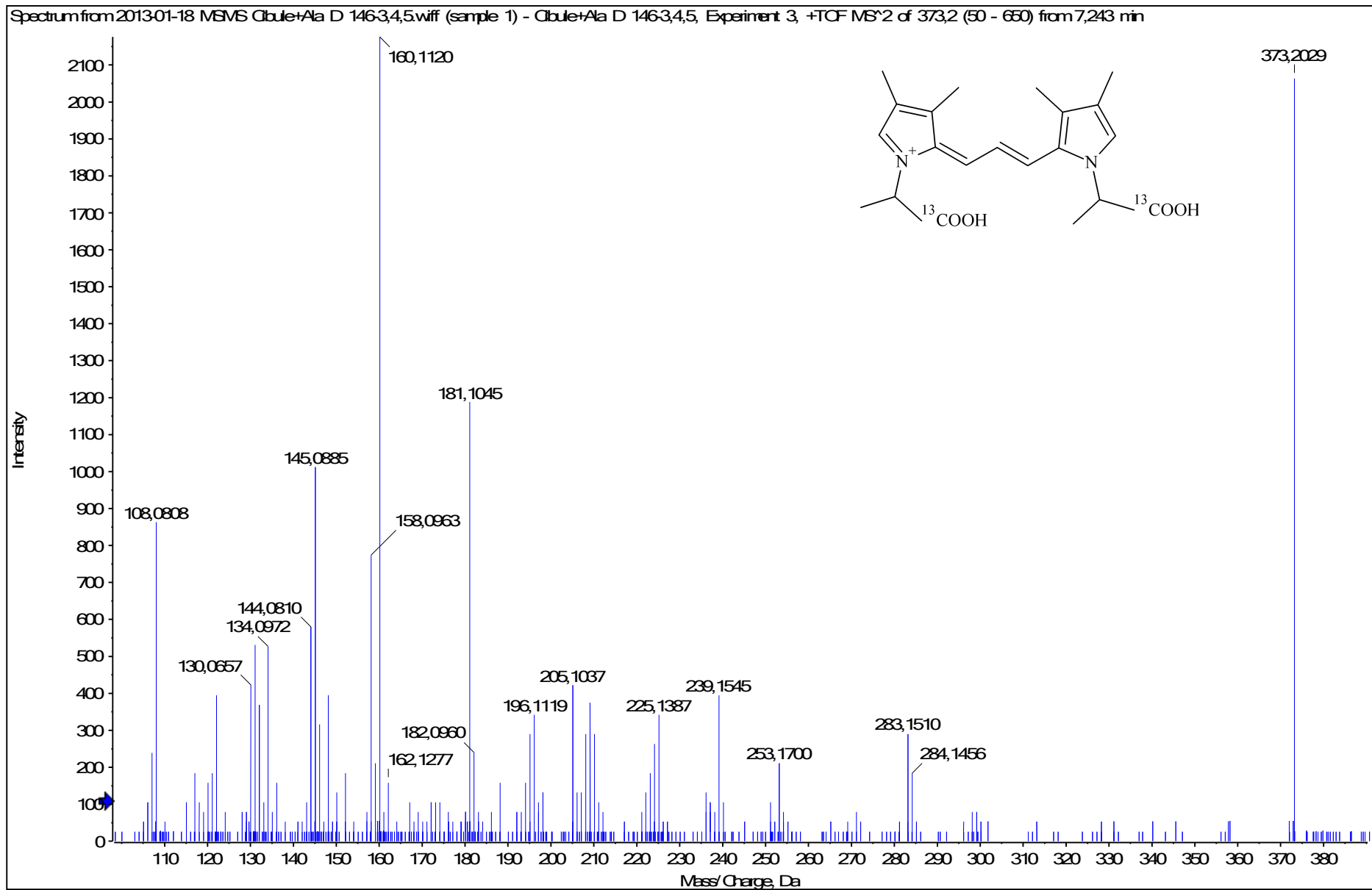
HRMS/MS spektrum látky GLO-371



HRMS/MS spektrum látky GLO-371

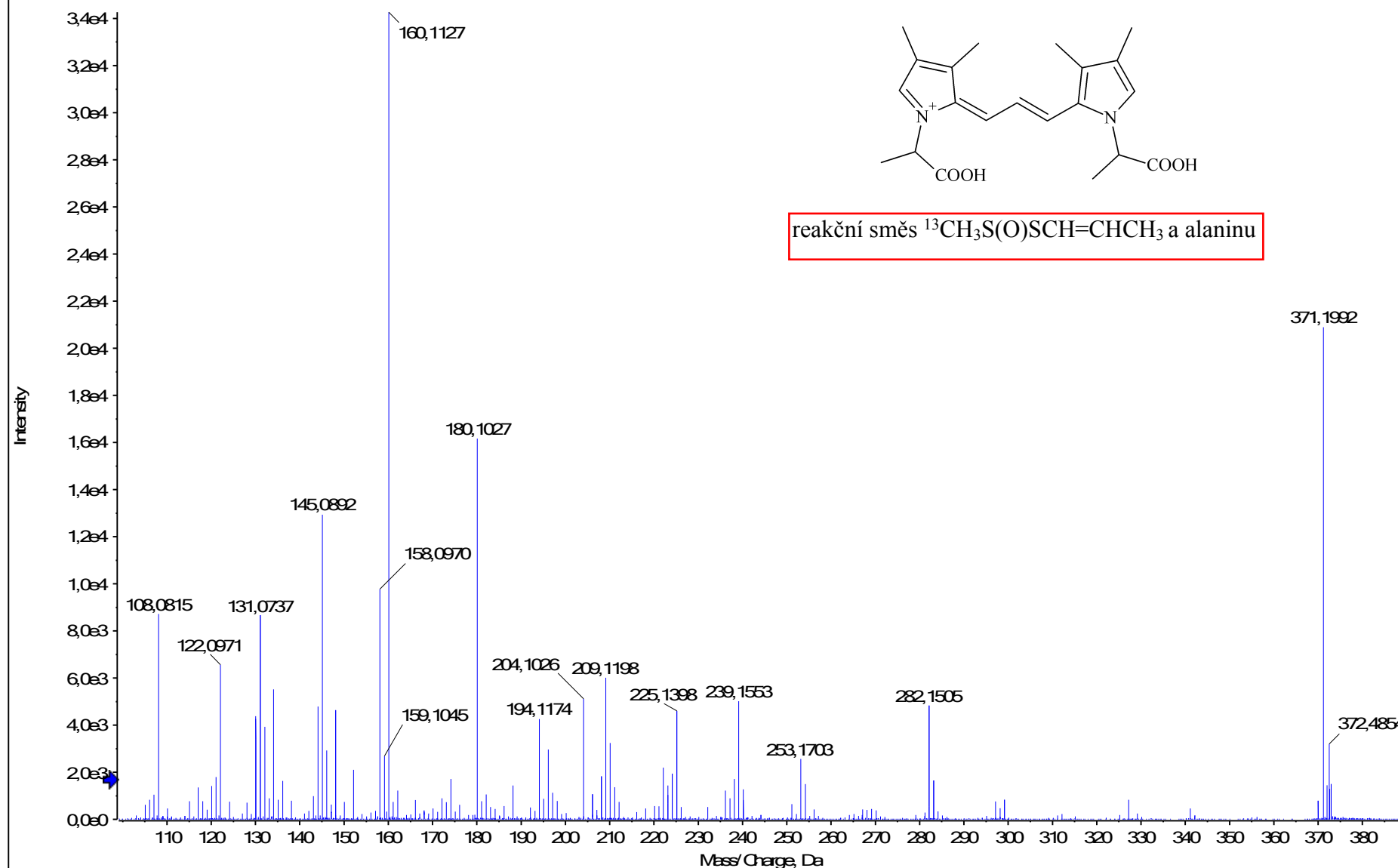


HRMS/MS spektrum látky GLO-371

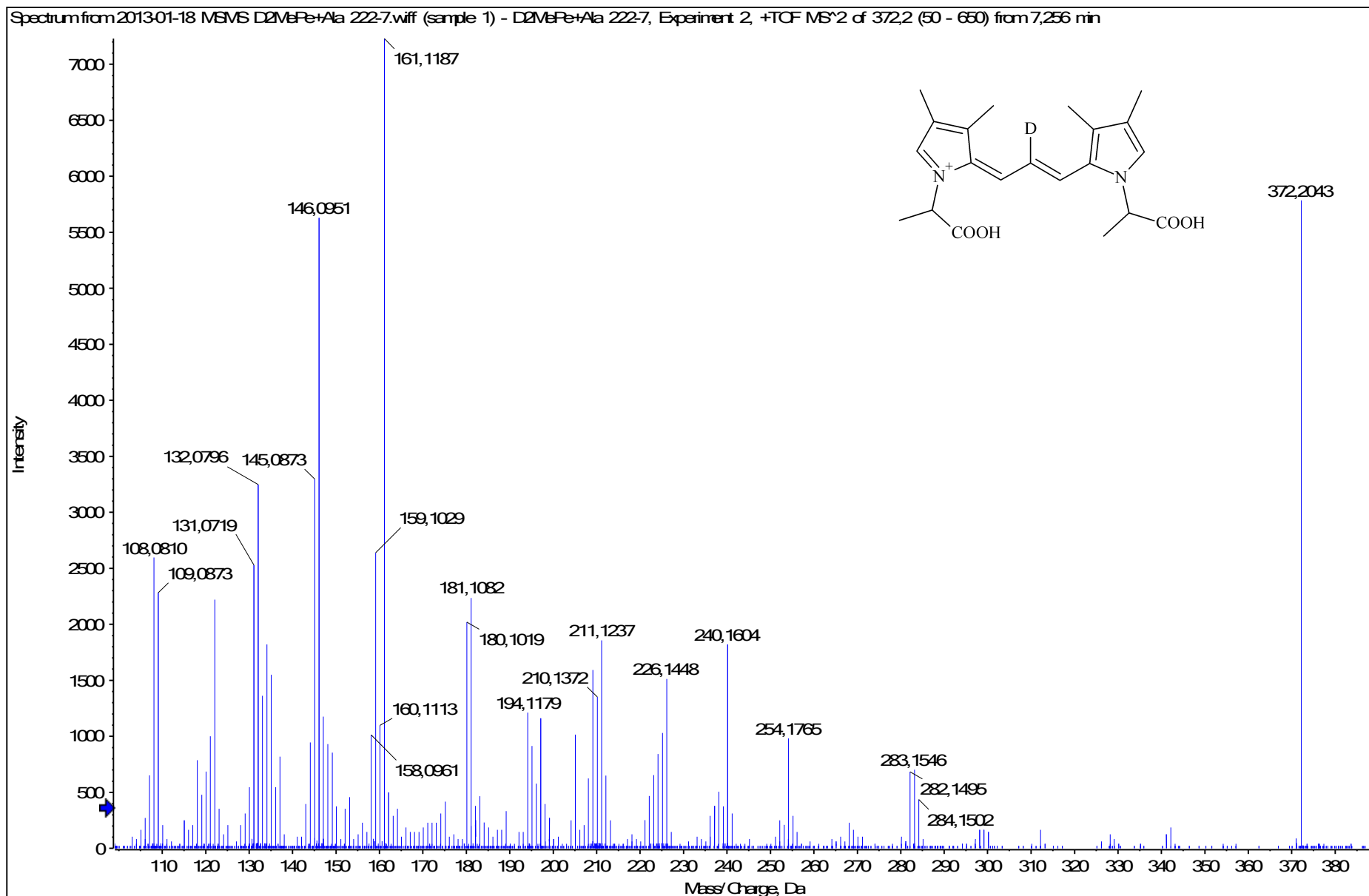


HRMS/MS spektrum látky GLO-371

Spectrum from 2012-11-29 43 ^{13}C -BPe + Alawiff (sample 1) - ^{13}C -BPe + Ala, Experiment 6, +TOF MS² (50 - 800) from 7,355 min
Precursor: 371,2 Da, CE 35,0

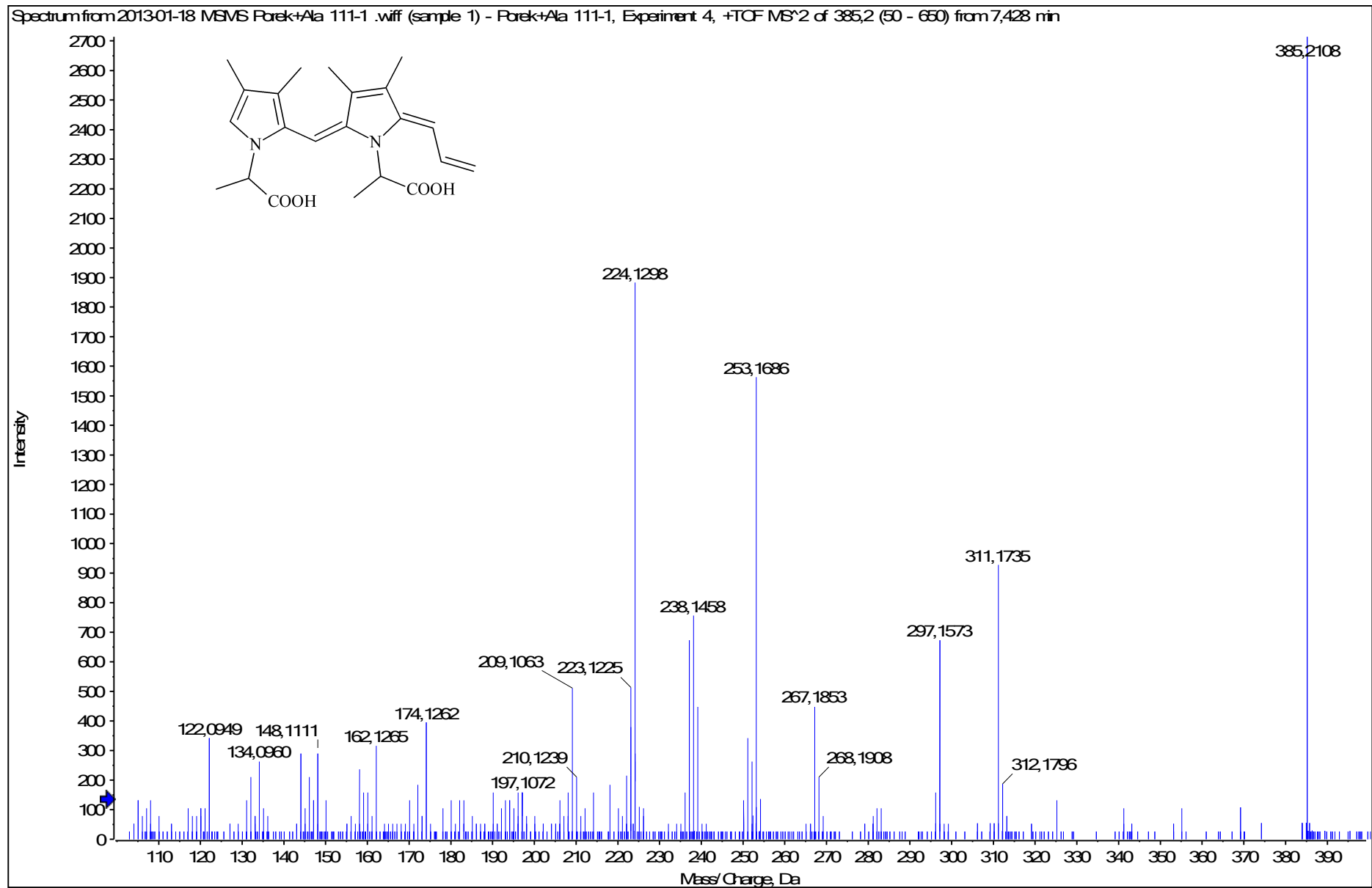


HRMS/MS spektrum látky GLO-371

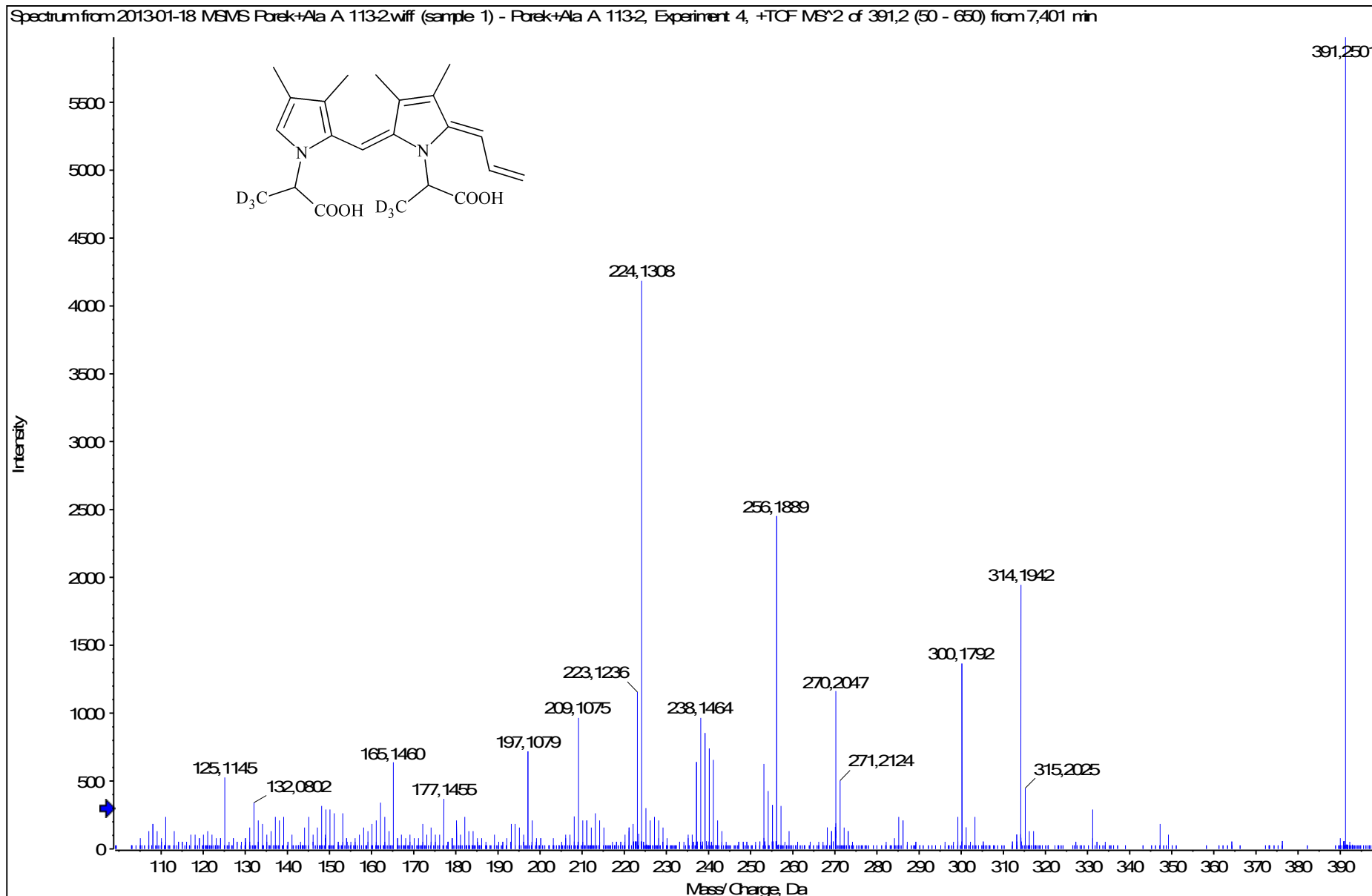


11.2.2013 18:34:09

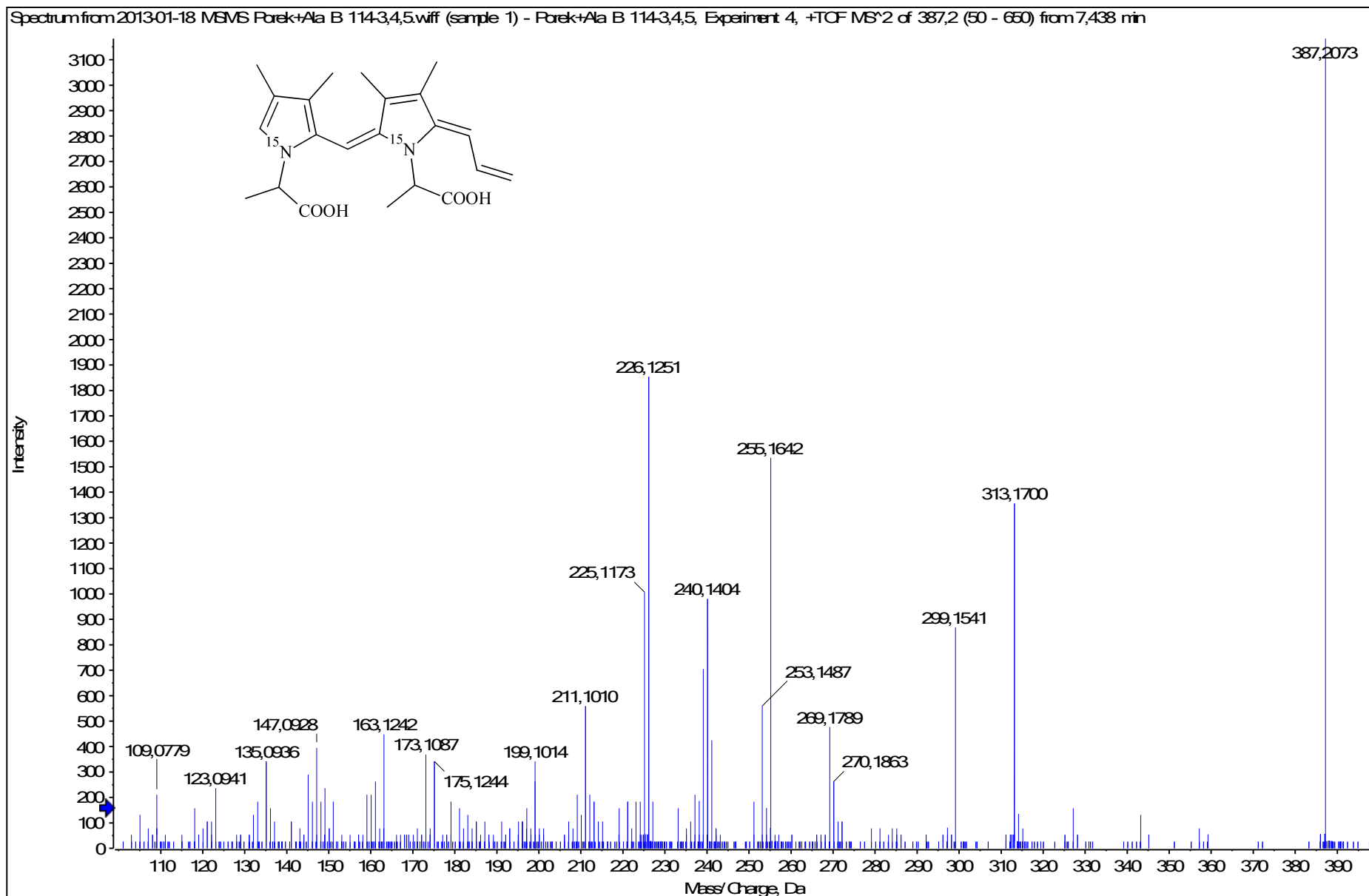
HRMS/MS spektrum látky LO-384



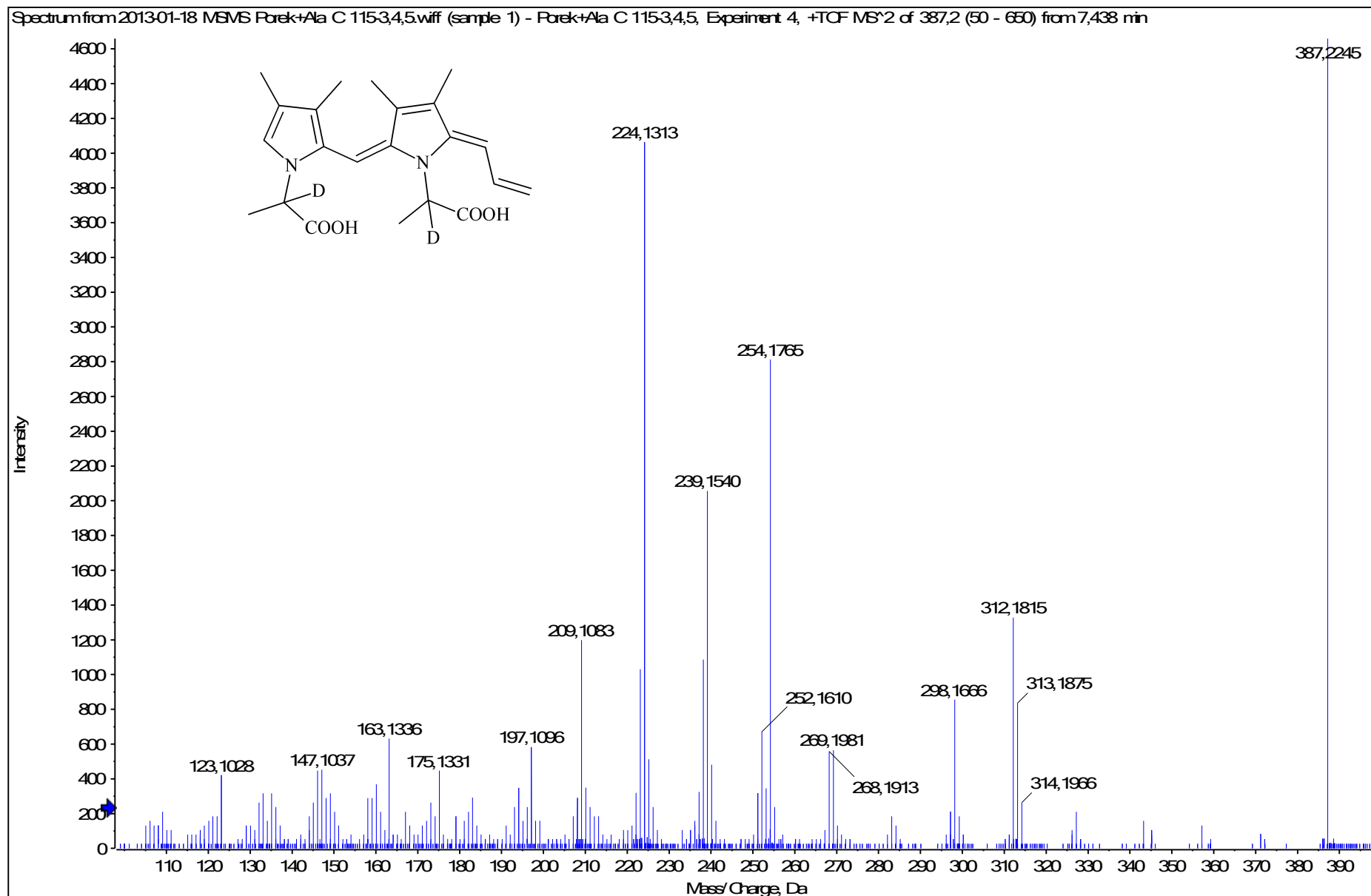
HRMS/MS spektrum látky LO-384



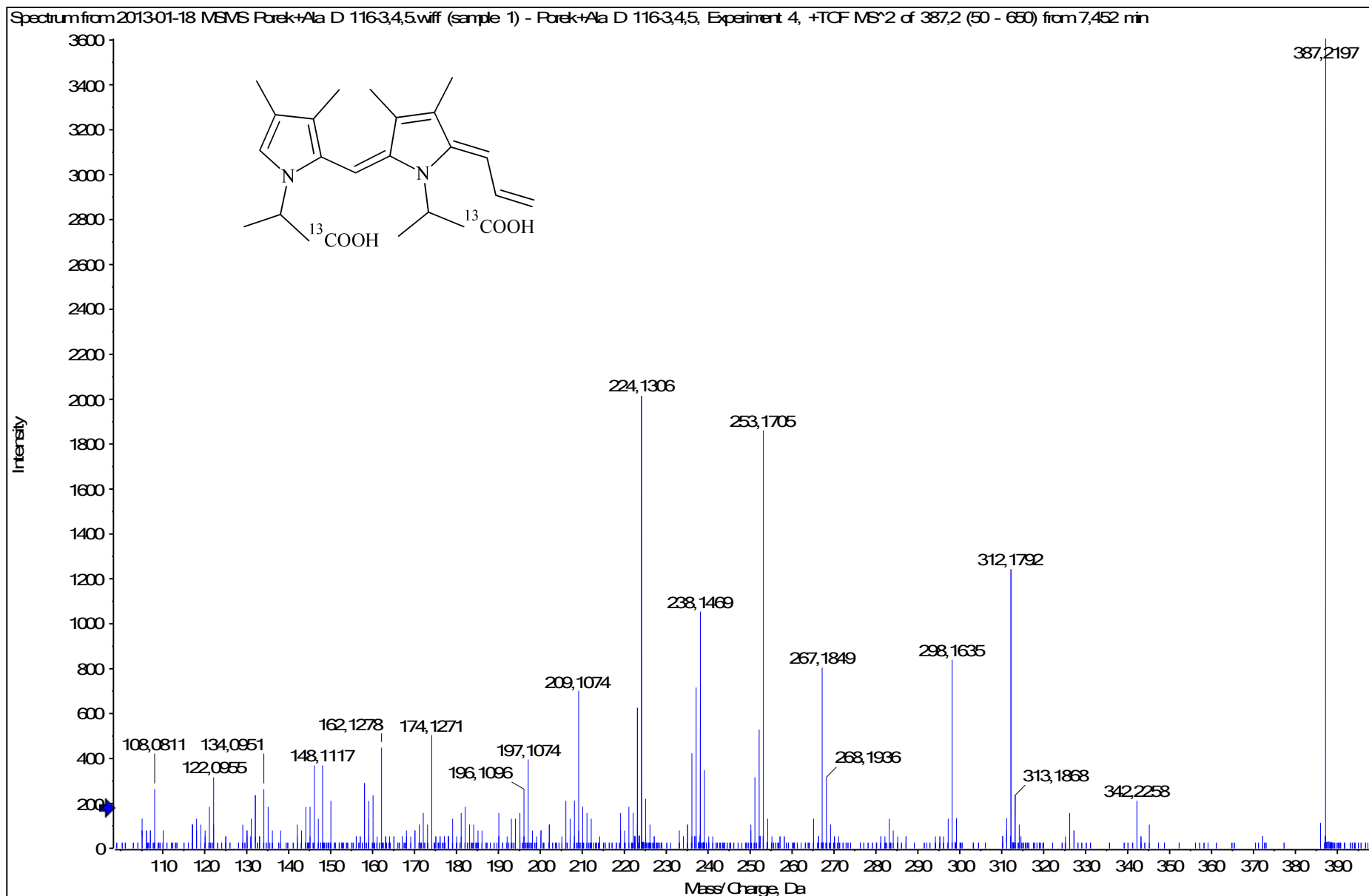
HRMS/MS spektrum látky LO-384



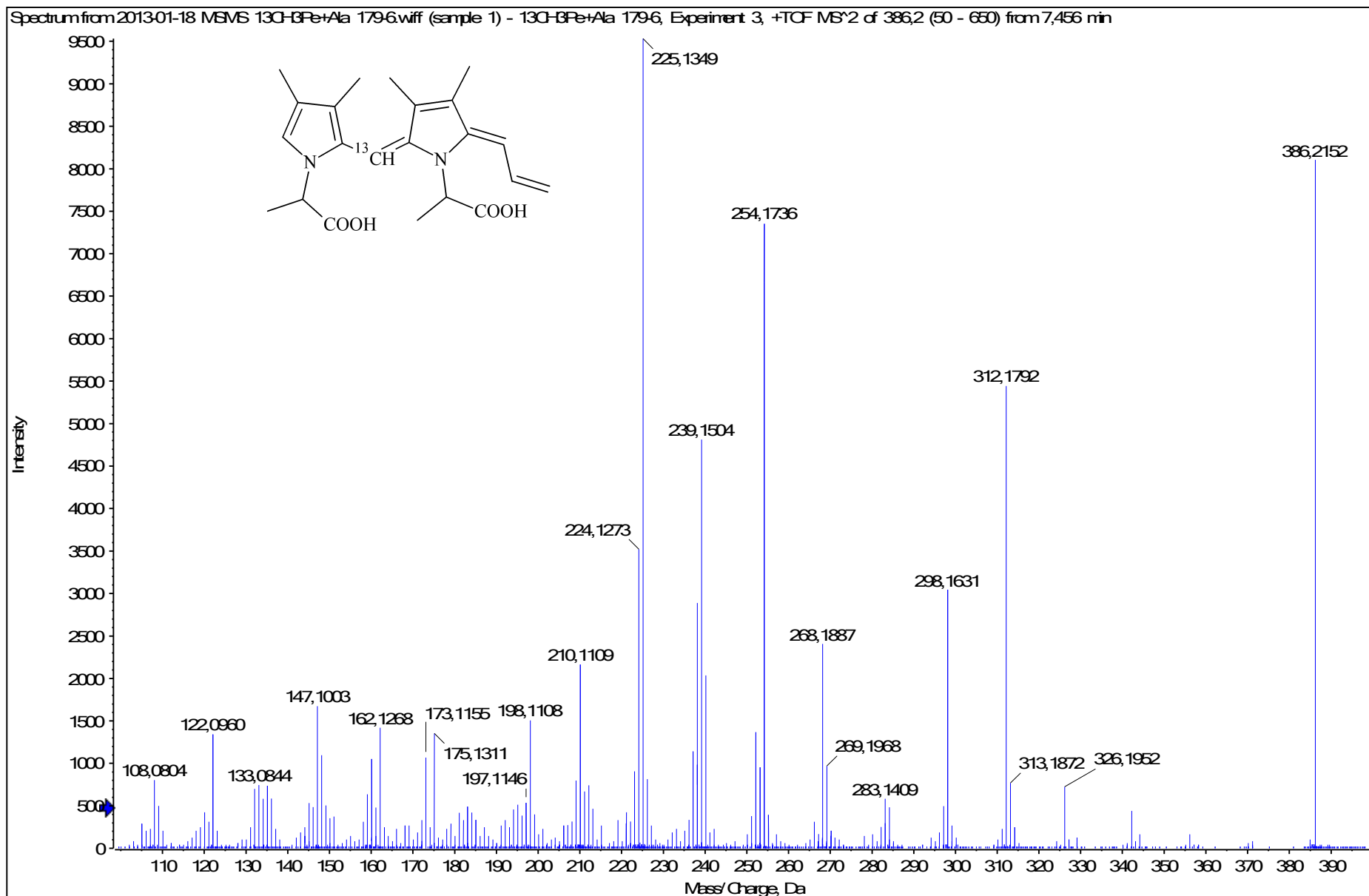
HRMS/MS spektrum látky LO-384



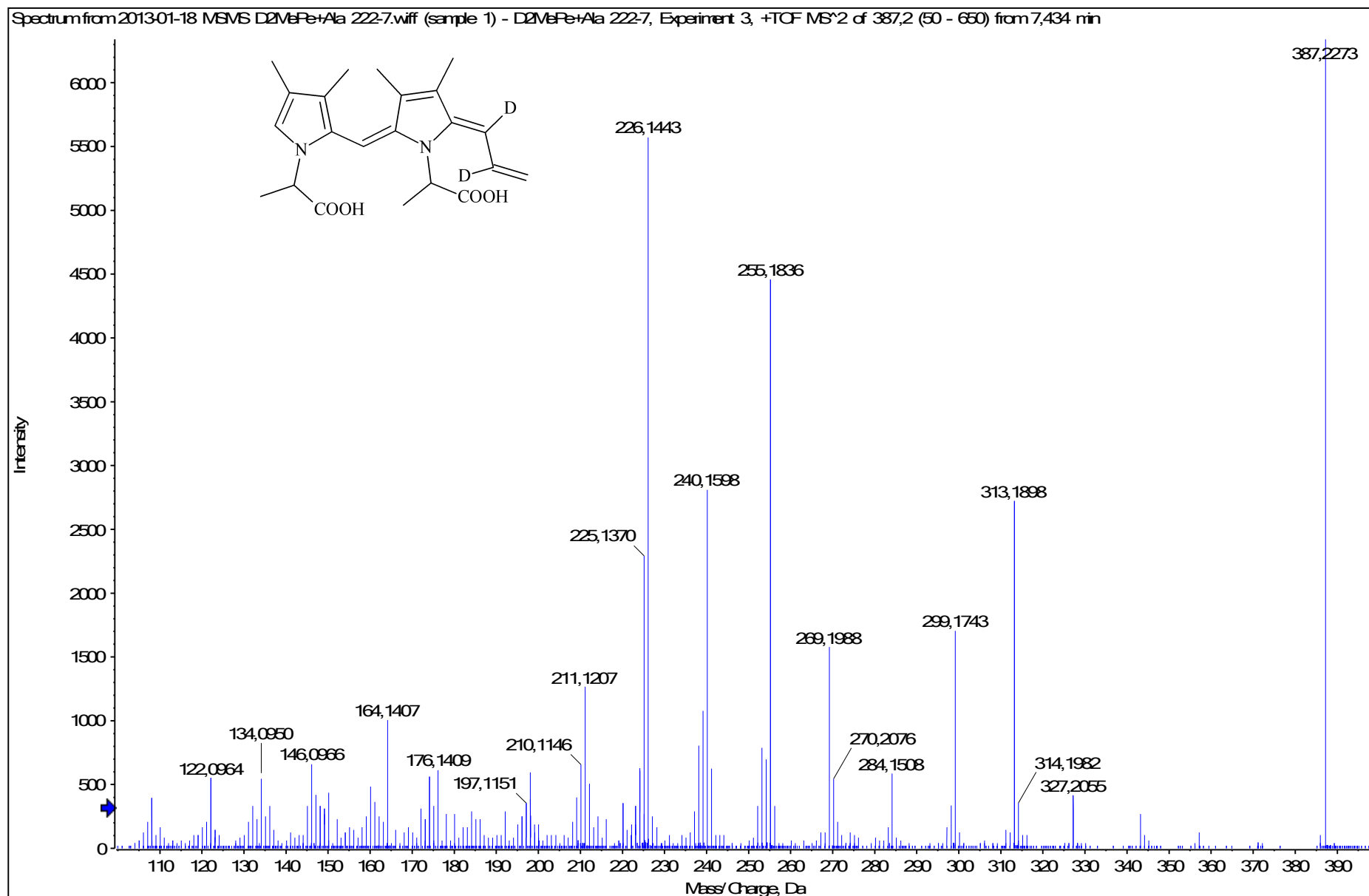
HRMS/MS spektrum látky LO-384



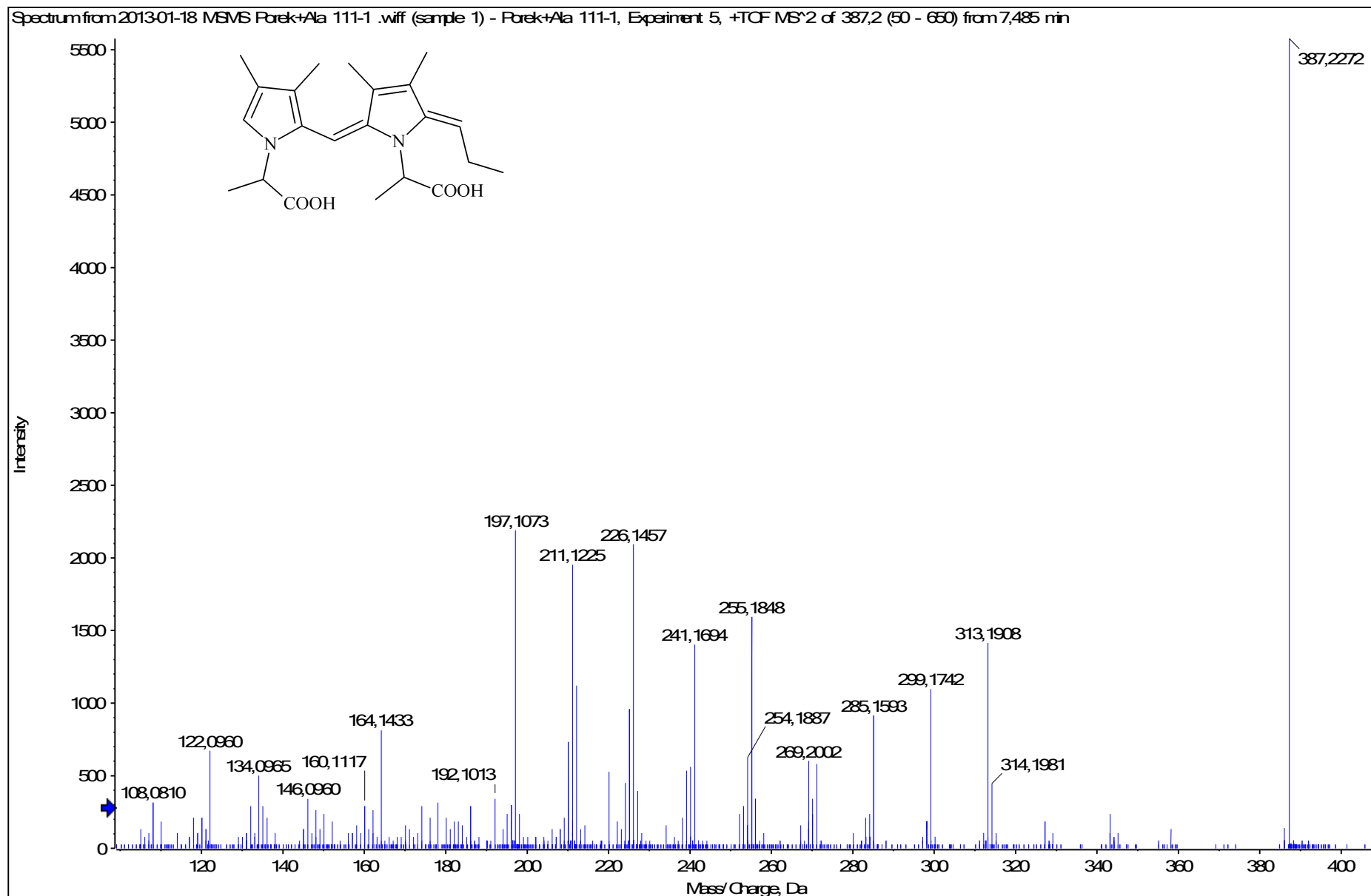
HRMS/MS spektrum látky LO-384



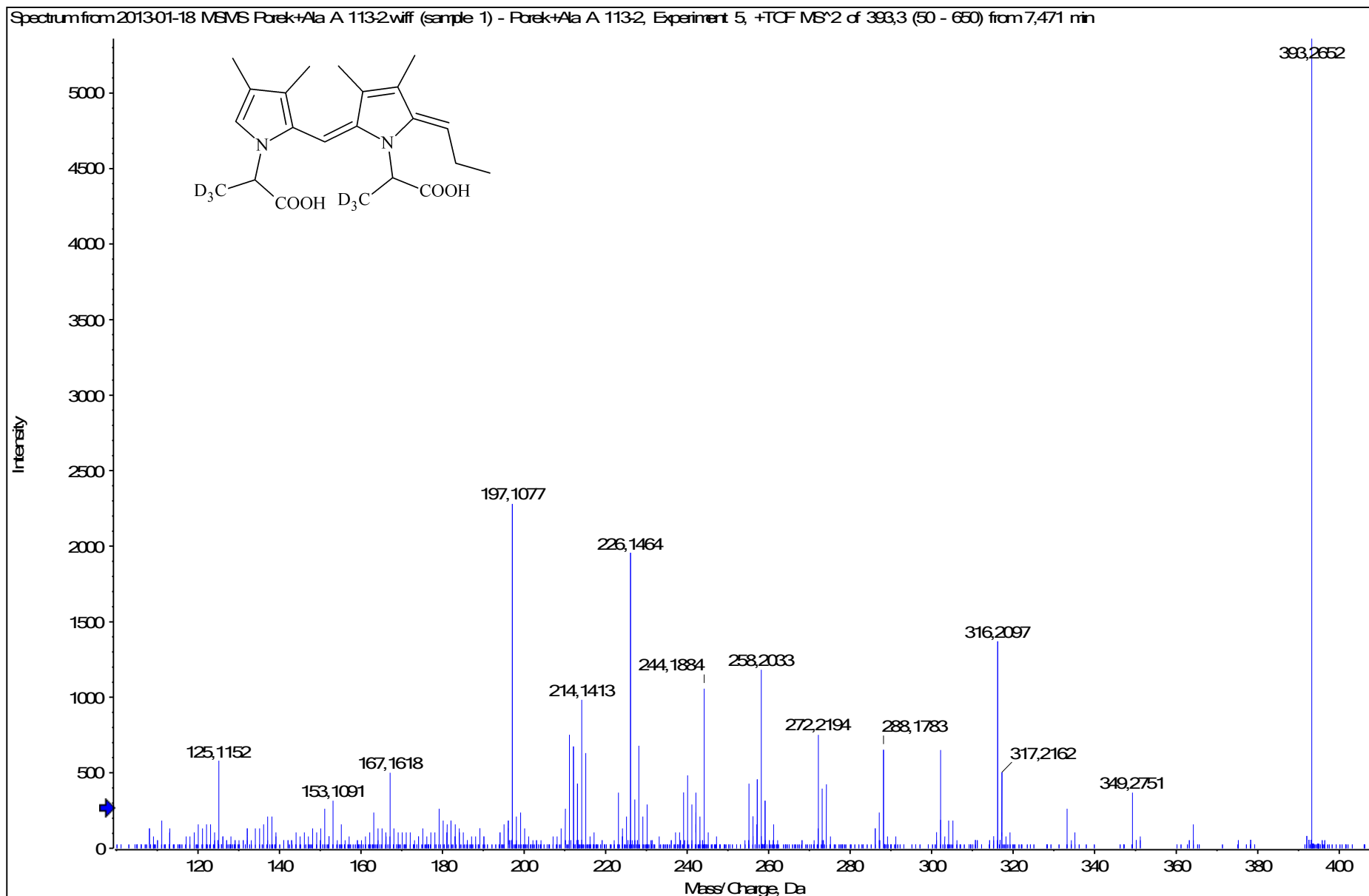
HRMS/MS spektrum látky LO-384



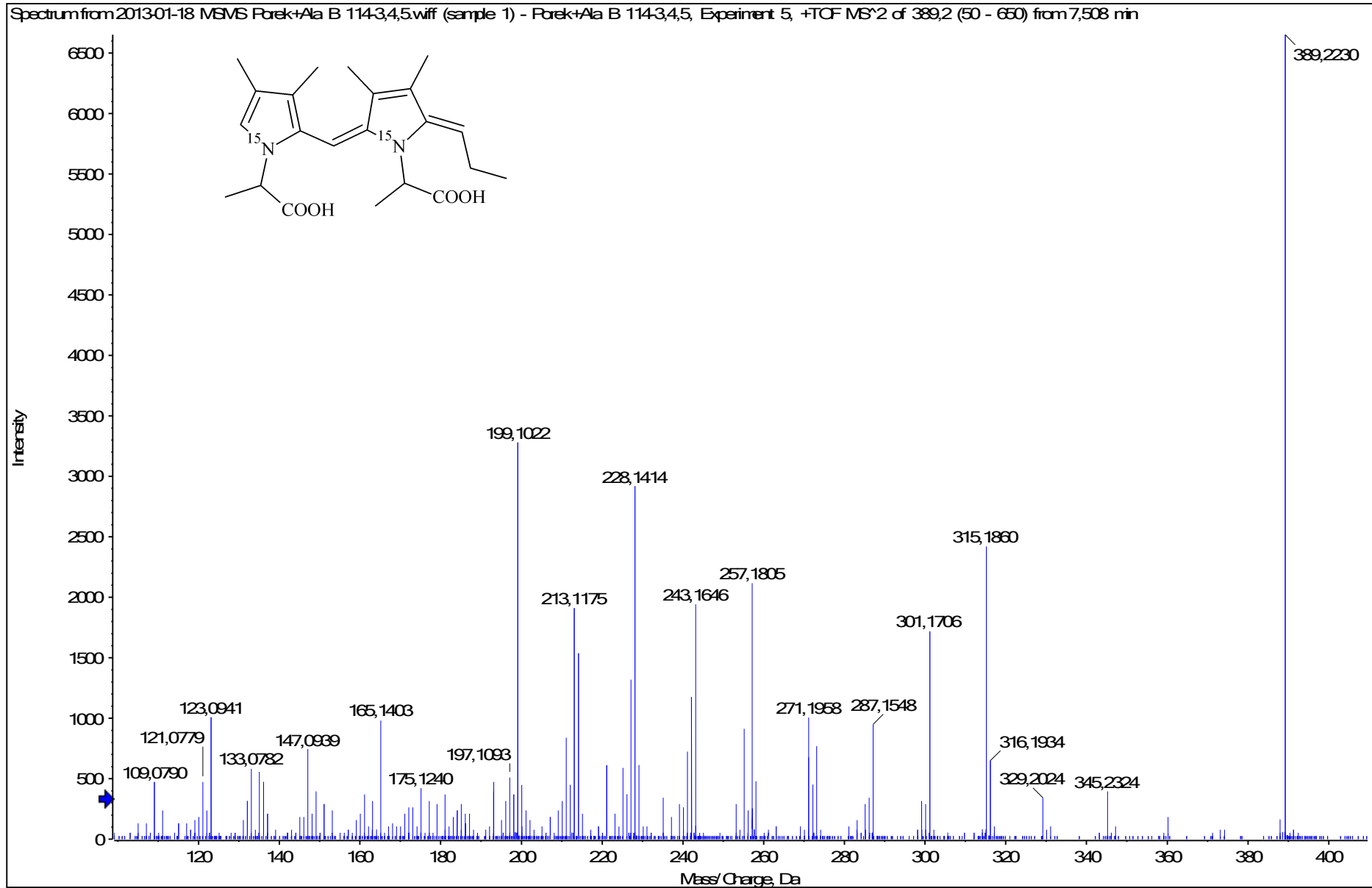
HRMS/MS spektrum látky LO-386



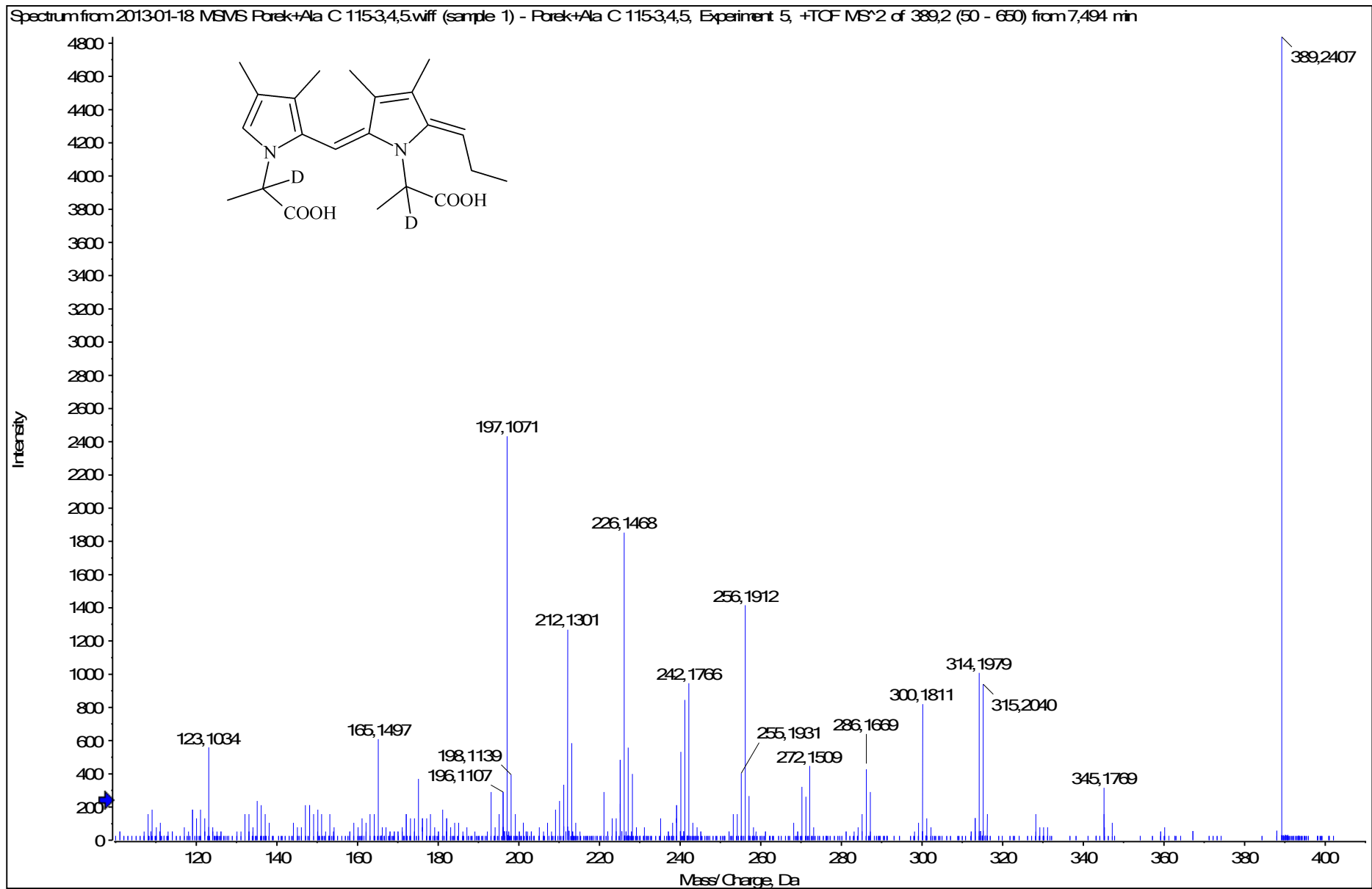
HRMS/MS spektrum látky LO-386



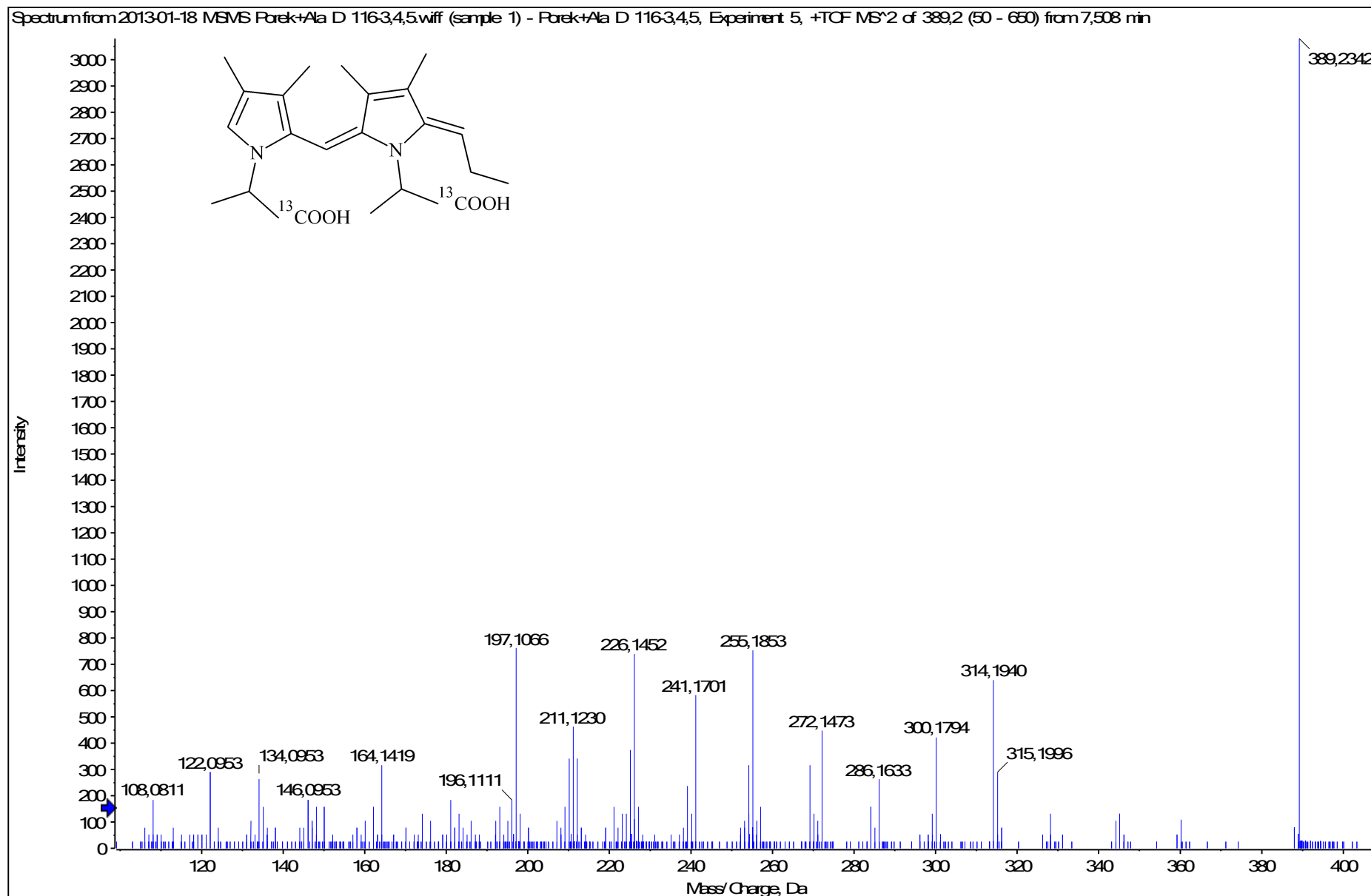
HRMS/MS spektrum látky LO-386



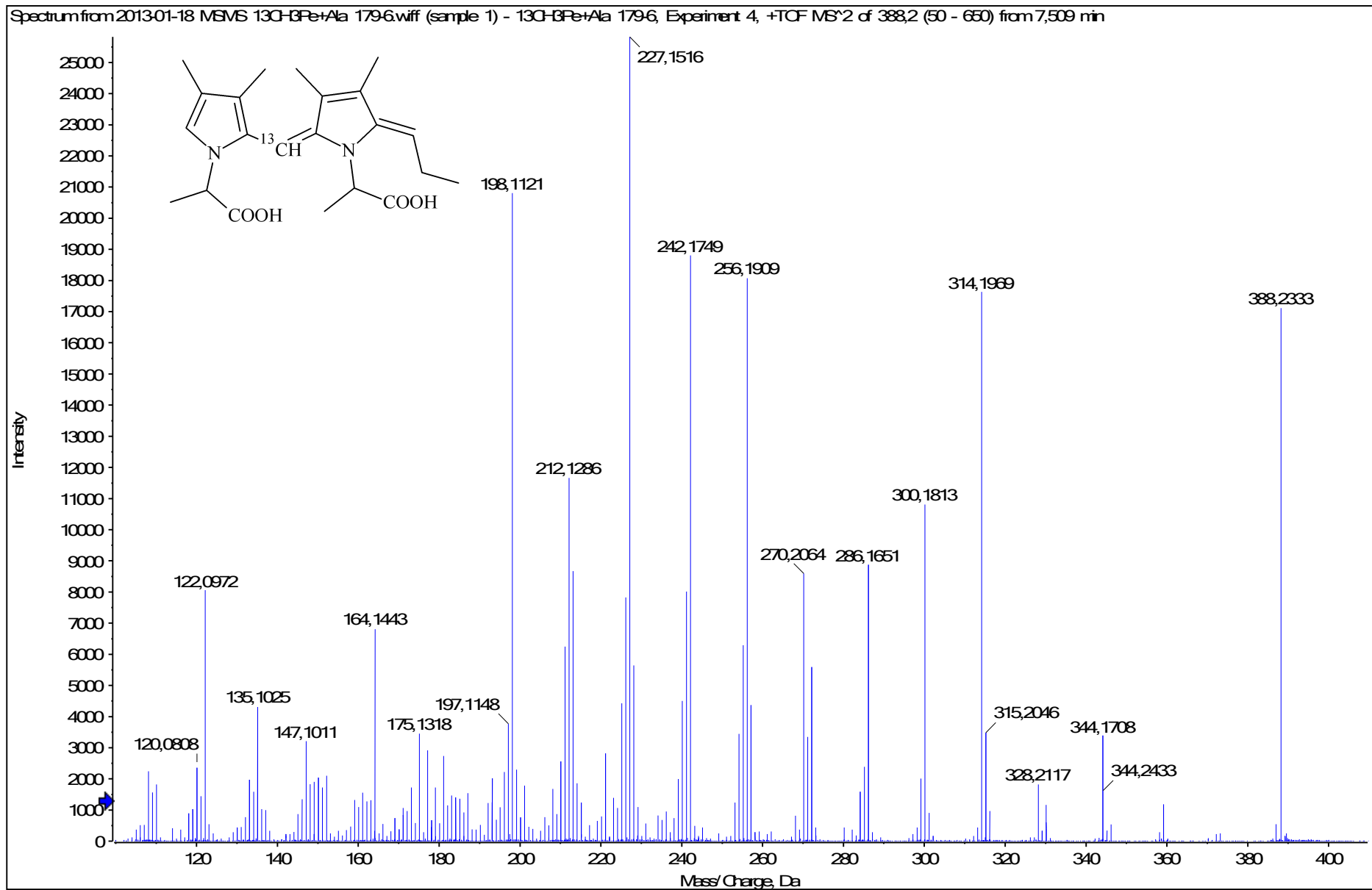
HRMS/MS spektrum látky LO-386



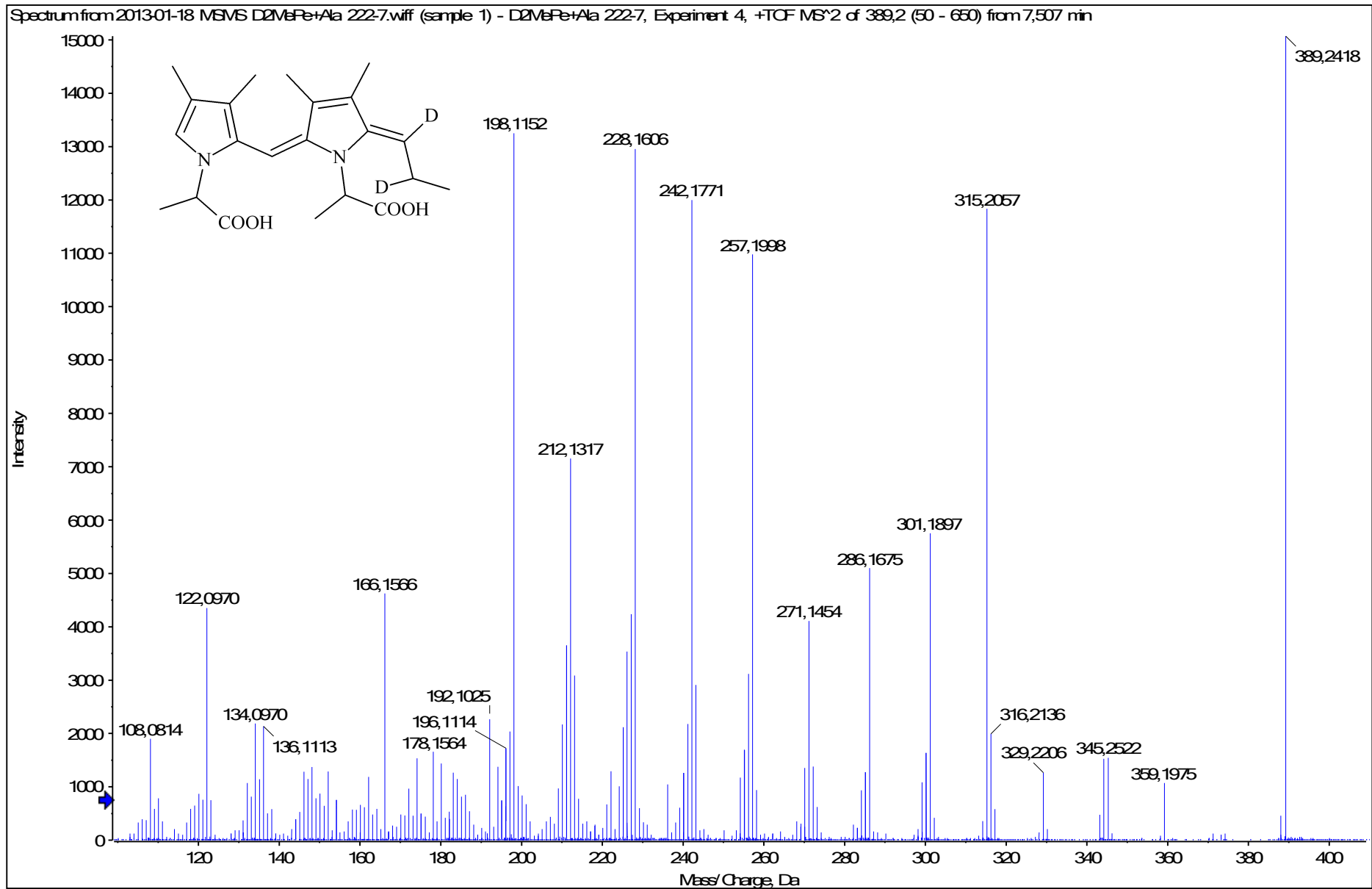
HRMS/MS spektrum látky LO-386



HRMS/MS spektrum látky LO-386

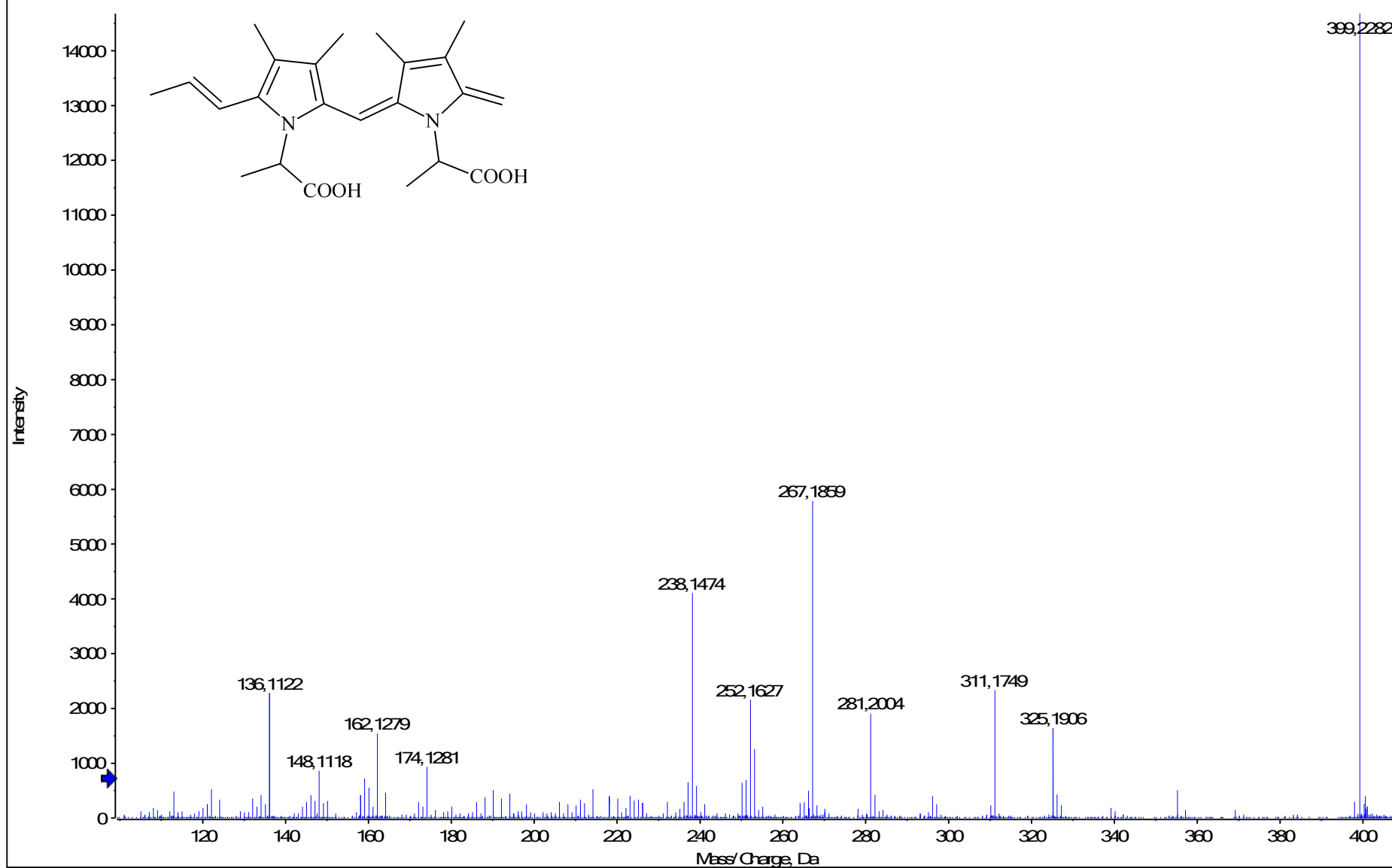


HRMS/MS spektrum látky LO-386

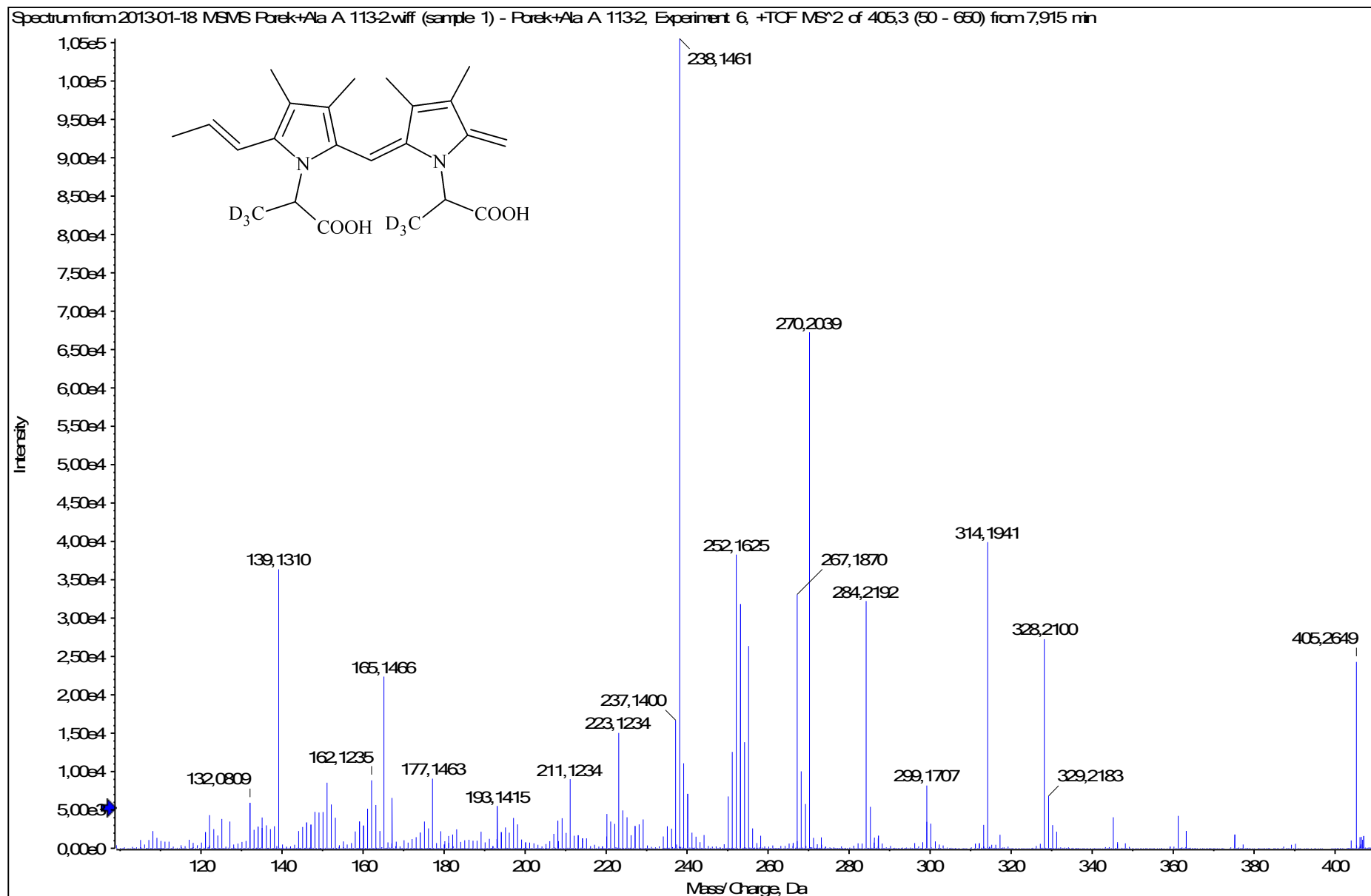


HRMS/MS spektrum látky LO-398

Spectrum from Cibule zluta + Ala 1605.wiff (sample 1) - Cibule zluta + Ala 1605, Experiment 7, +TOF MS² (50 - 700) from 7,949 min
Precursor: 399,0 Da, CE 35,0

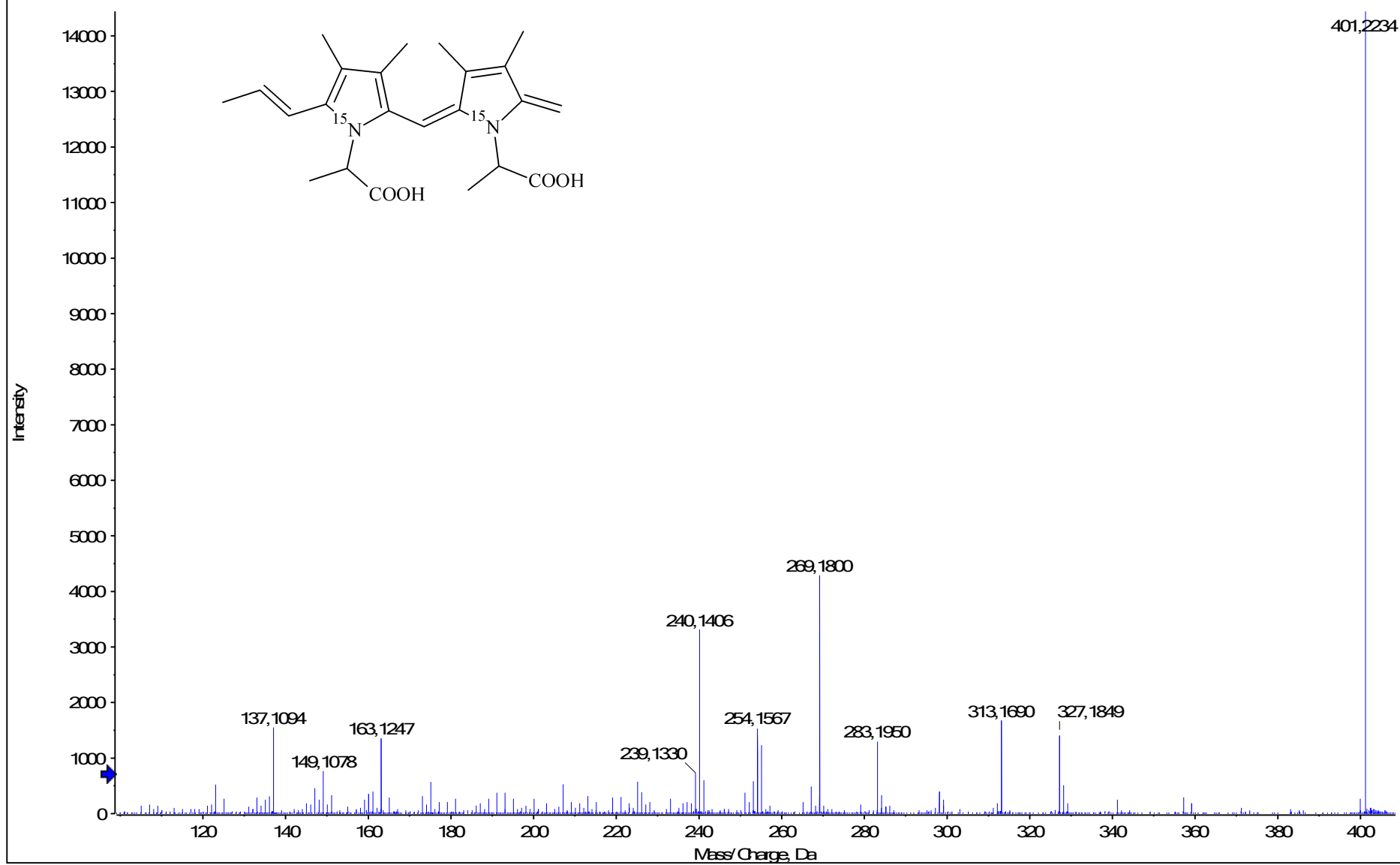


HRMS/MS spektrum látky LO-398



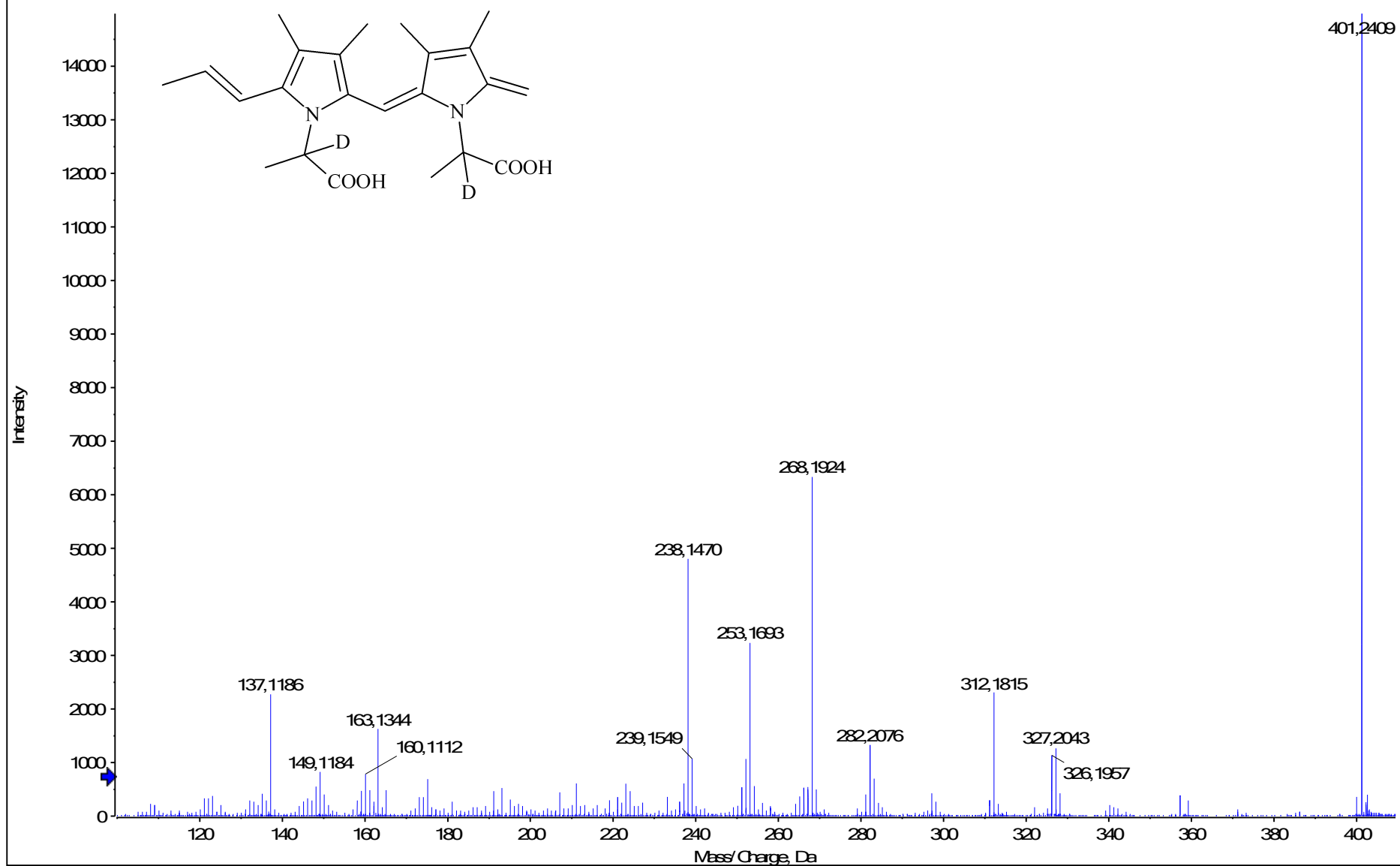
HRMS/MS spektrum látky LO-398

Spectrum from 2012-11-29 04 For + Ala B wiff (sample 1) - For + Ala B, Experiment 6, +TCF MS² (50 - 800) from 7,878 min
Precursor: 401,2 Da, CE 35,0

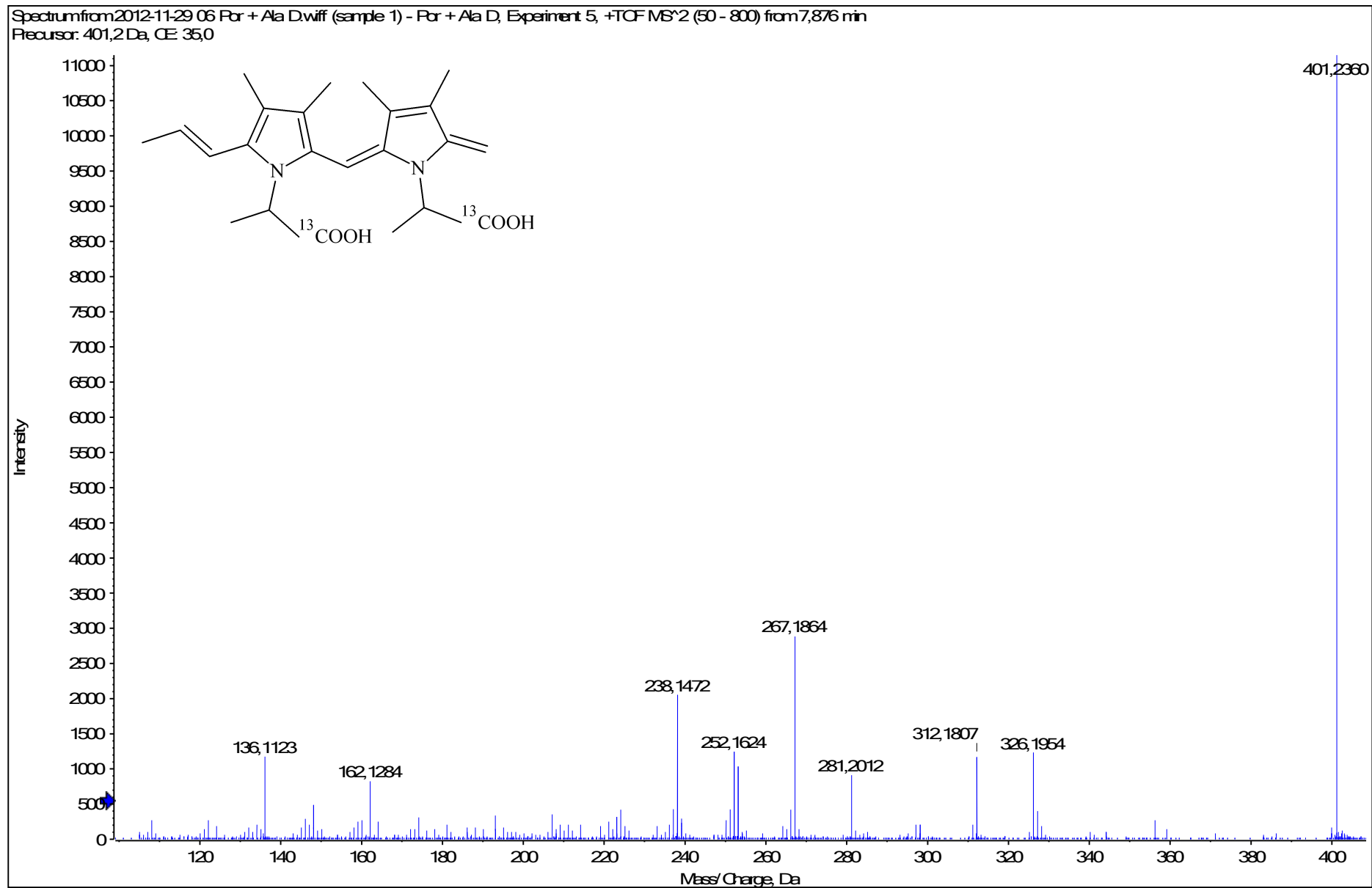


HRMS/MS spektrum látky LO-398

Spectrum from Cibule + Ala Cwiff (sample 1) - Cibule + Ala C, Experiment 8, +TOF MS² (50 - 700) from 8,014 min
Precursor: 401,2 Da, CE 35,0

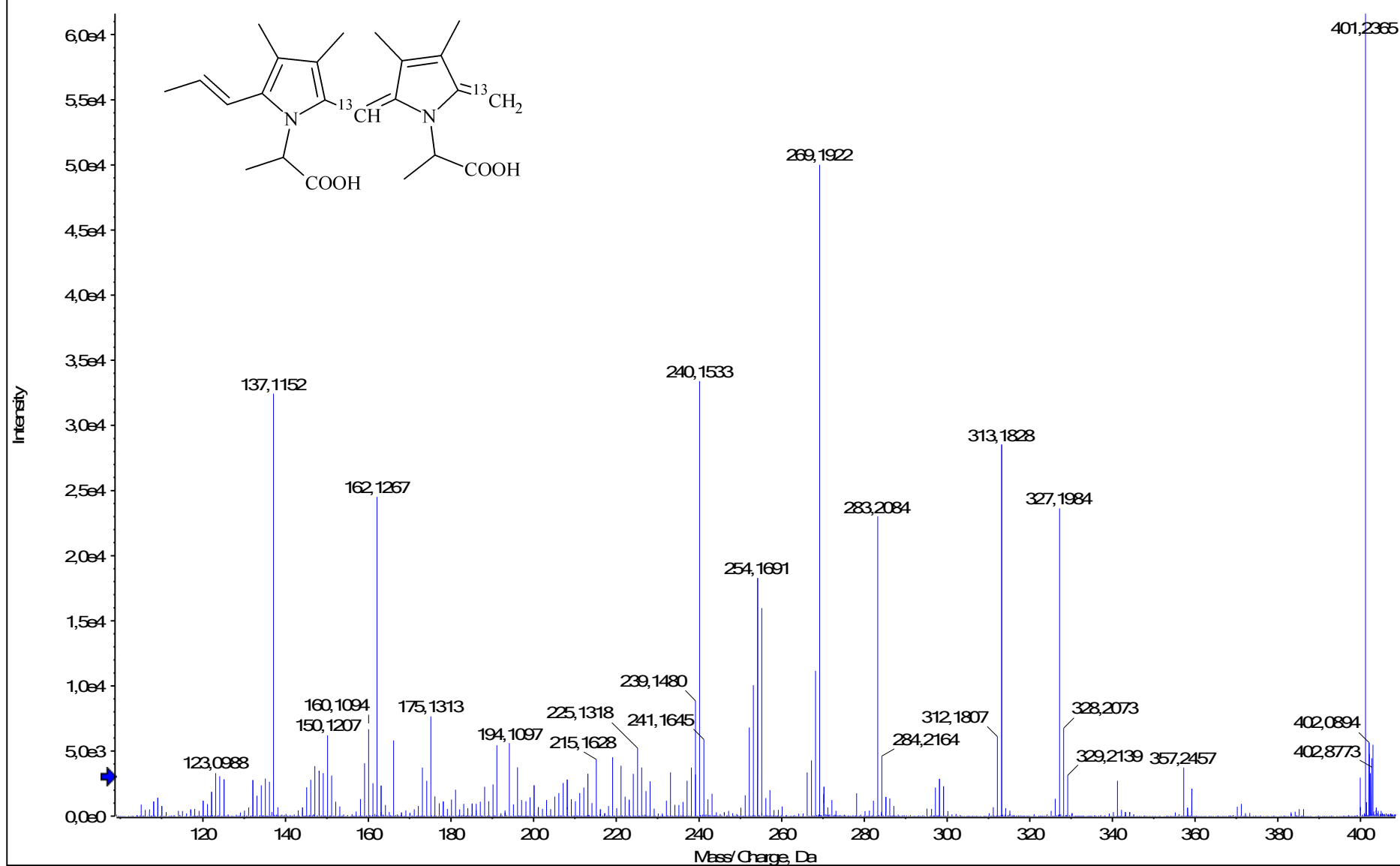


HRMS/MS spektrum látky LO-398



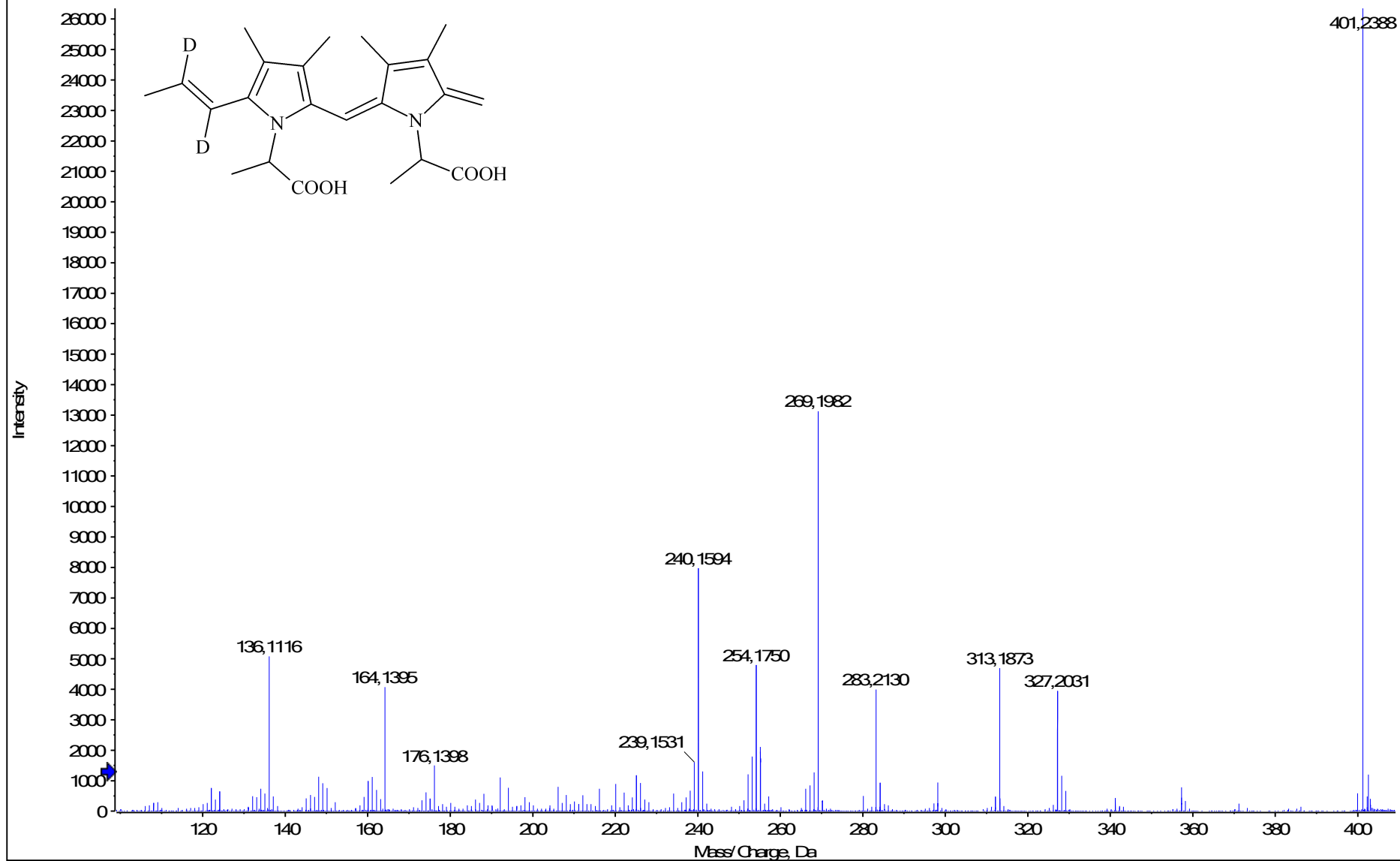
HRMS/MS spektrum látky LO-398

Spectrum from 2012-11-29 43 ¹³C-BPe + Alawiff (sample 1) - ¹³C-BPe + Ala, Experiment 5, +TOF MS² (50 - 800) from 7,894 min
Precursor: 401,2 Da, CE 35,0

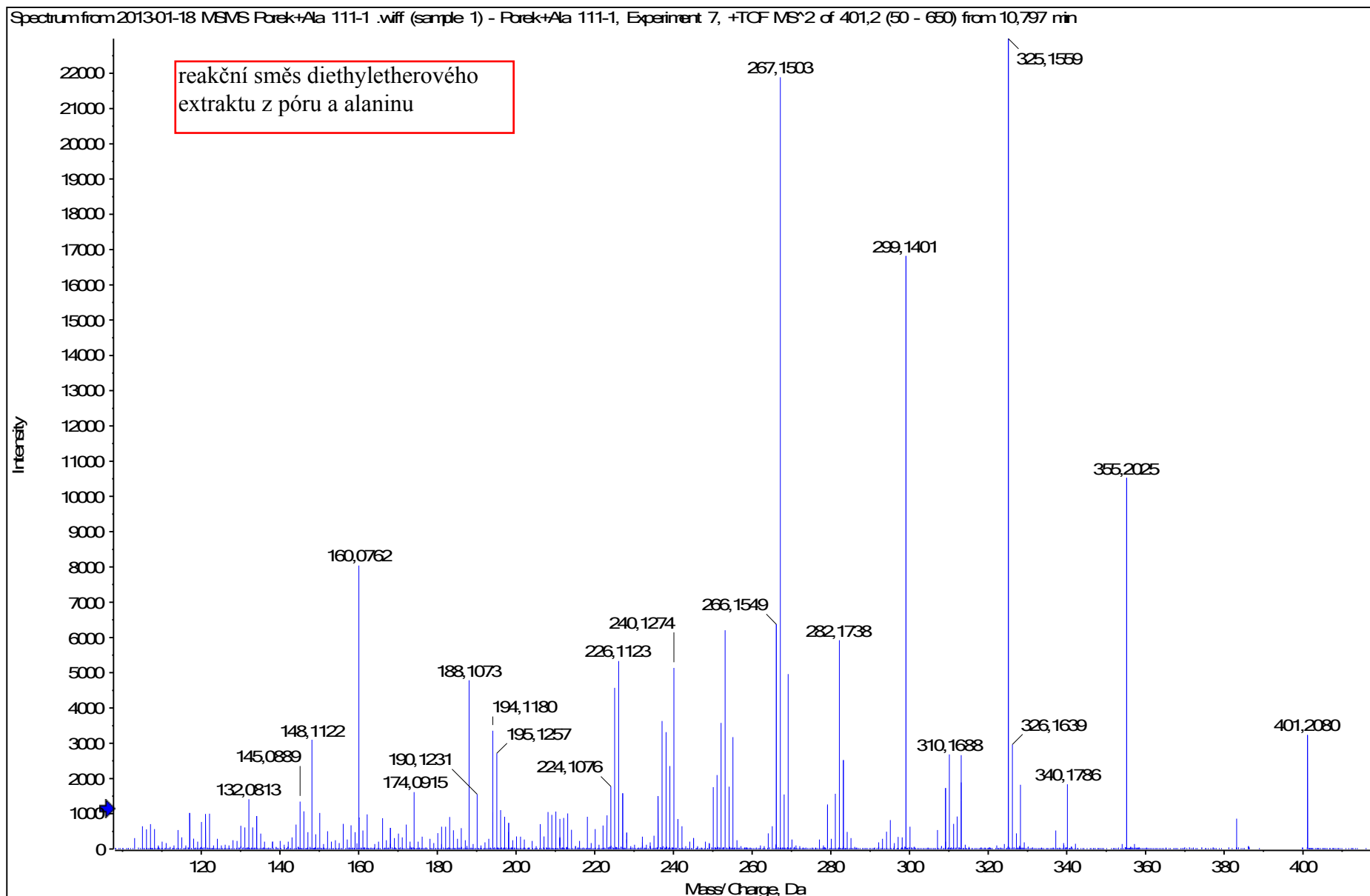


HRMS/MS spektrum látky LO-398

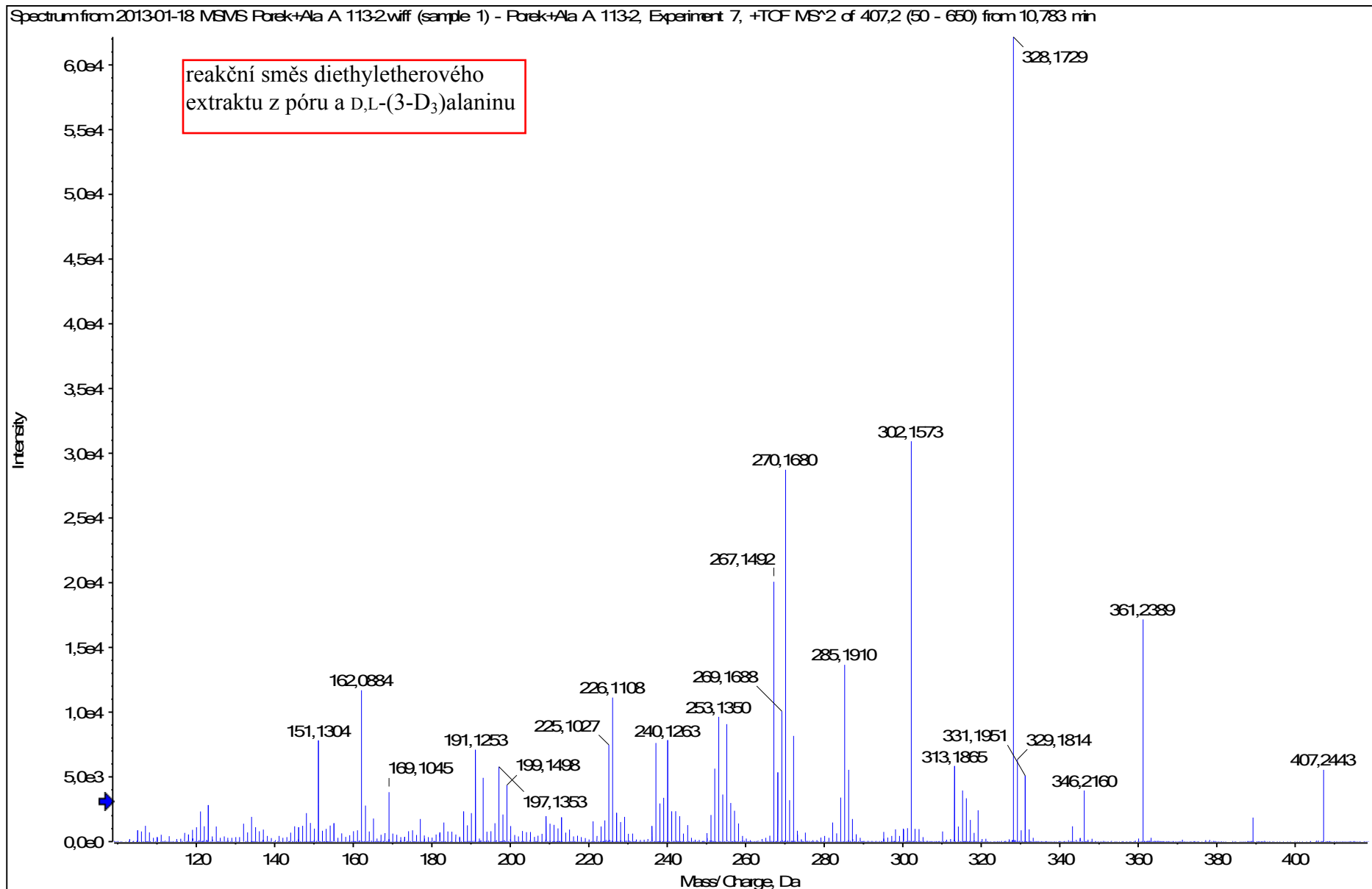
Spectrum from 2012-12-19 D2MePe + Ala.wiff (sample 1) - D2MePe + Ala (222), Experiment 5, +TOF MS² (50 - 800) from 7,937 min
Precursor: 401,2 Da, CE 35,0



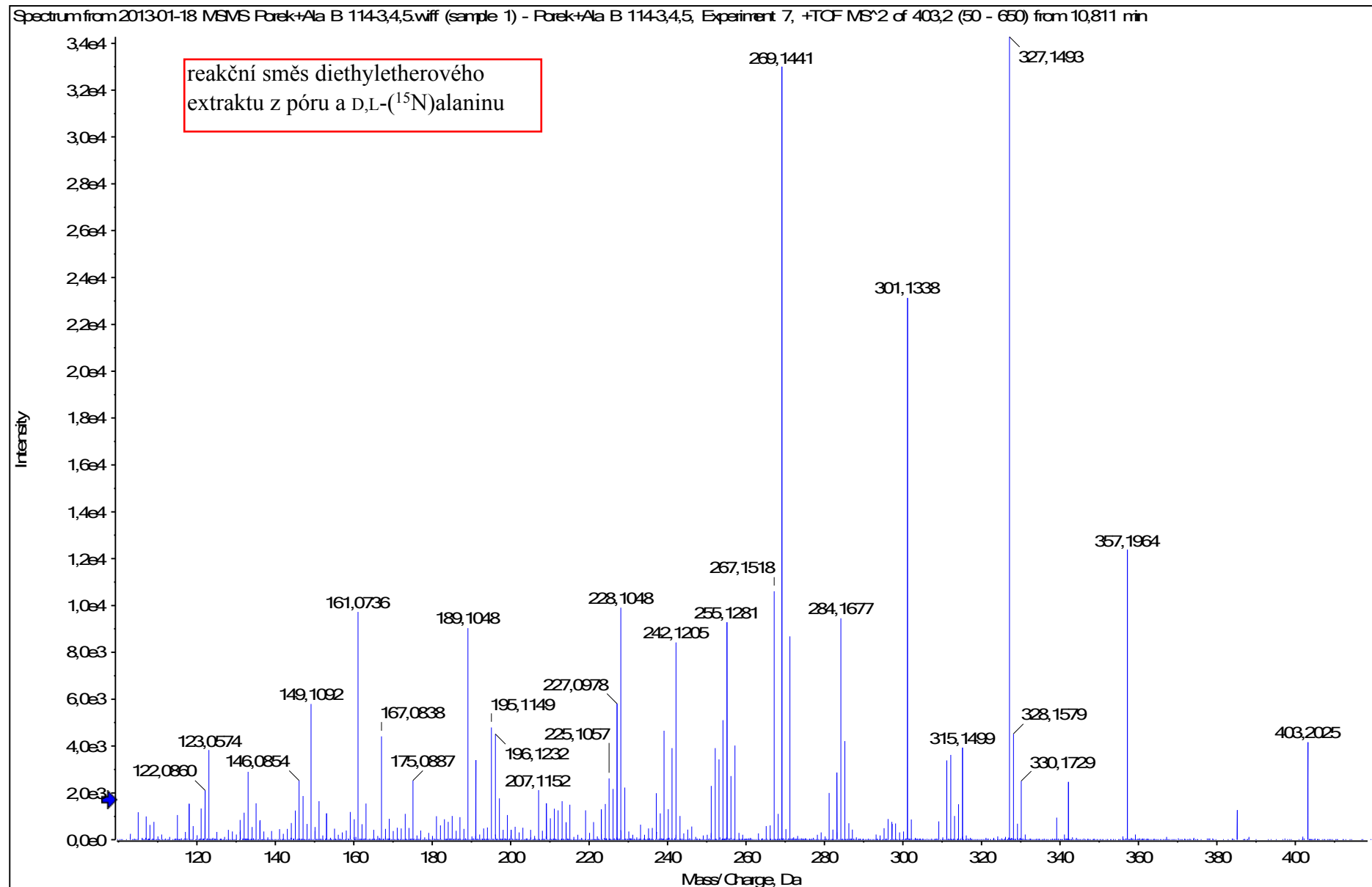
HRMS/MS spektrum látky L-401



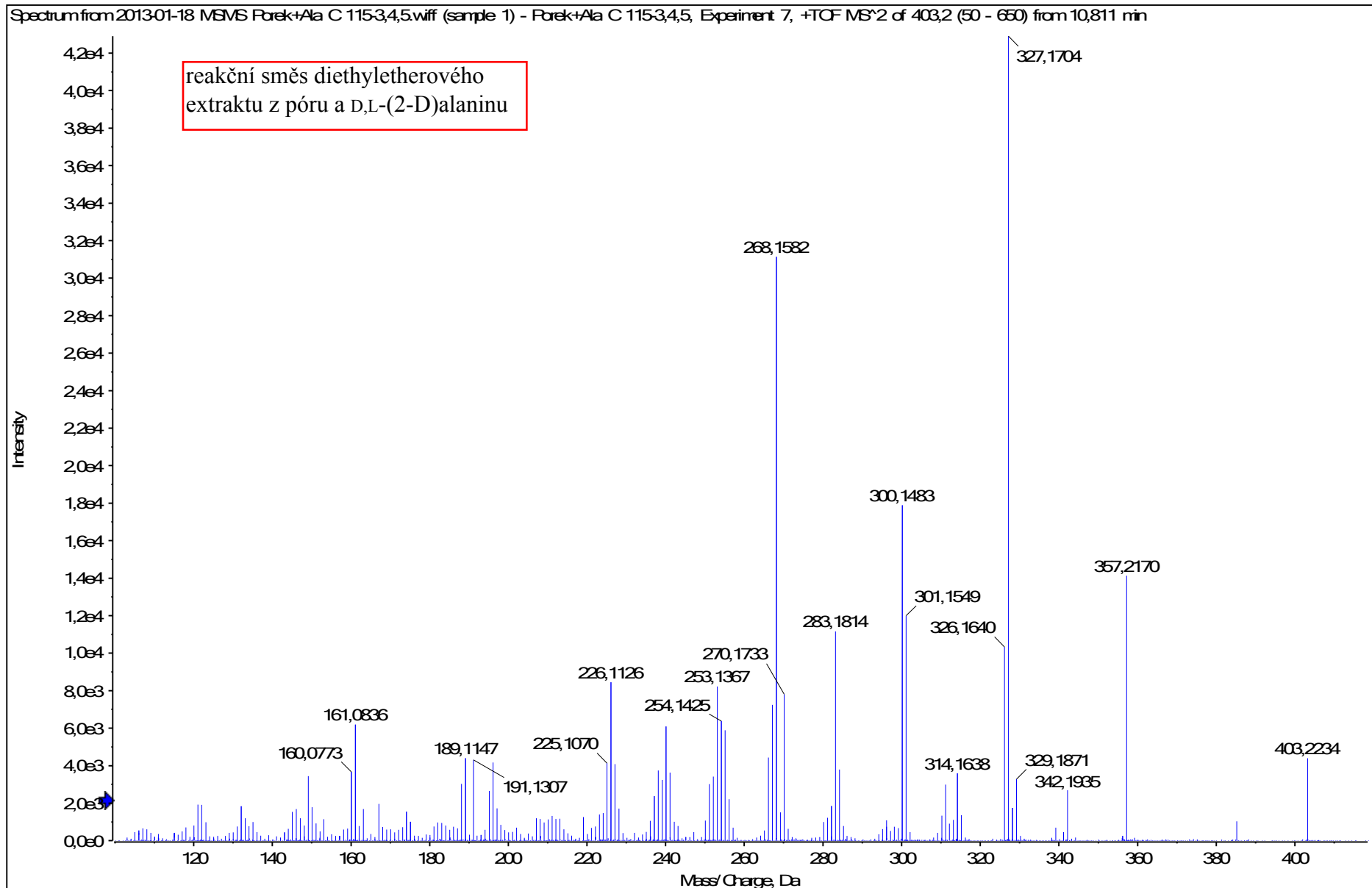
HRMS/MS spektrum látky L-401



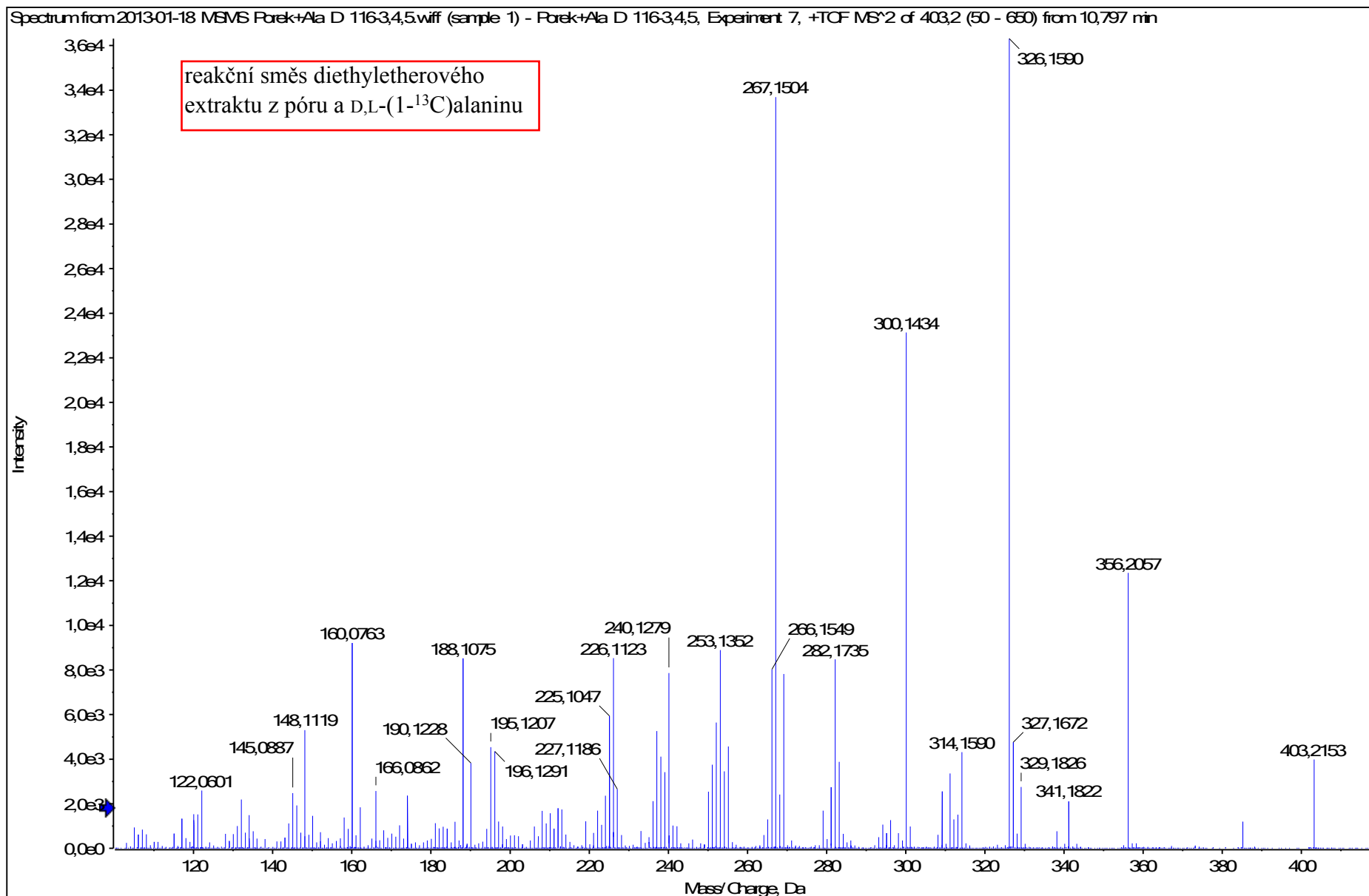
HRMS/MS spektrum látky L-401



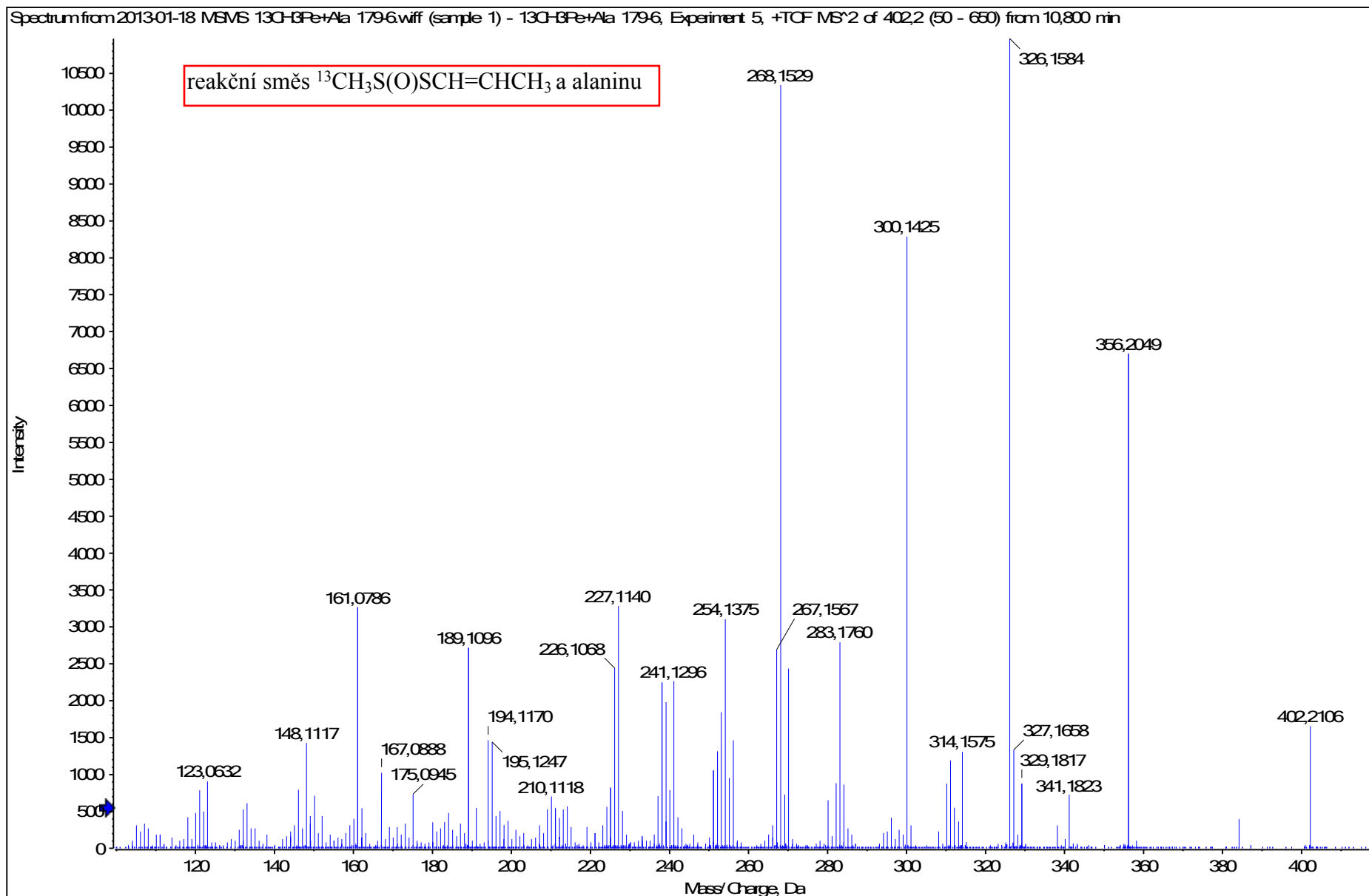
HRMS/MS spektrum látky L-401



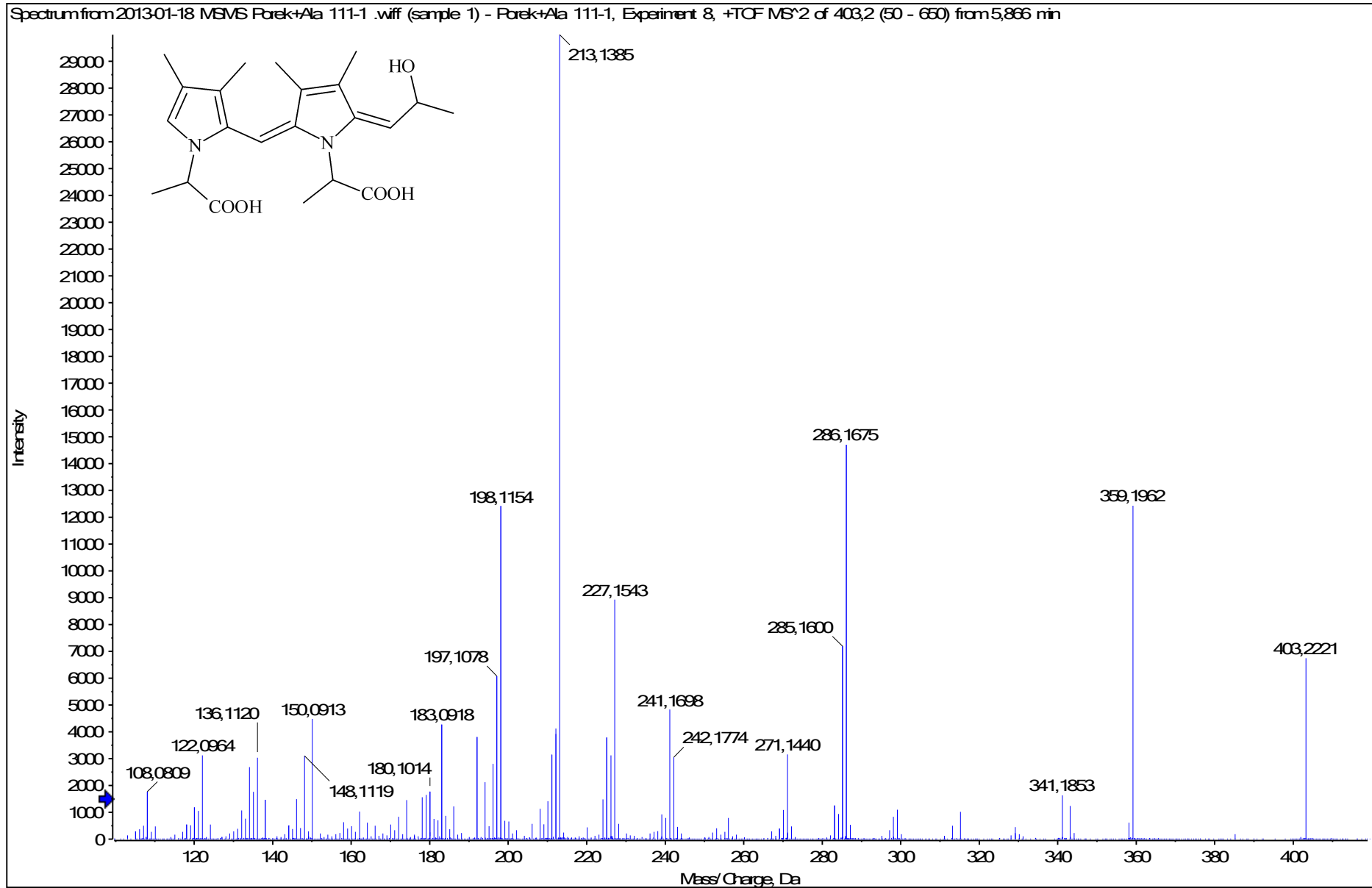
HRMS/MS spektrum látky L-401



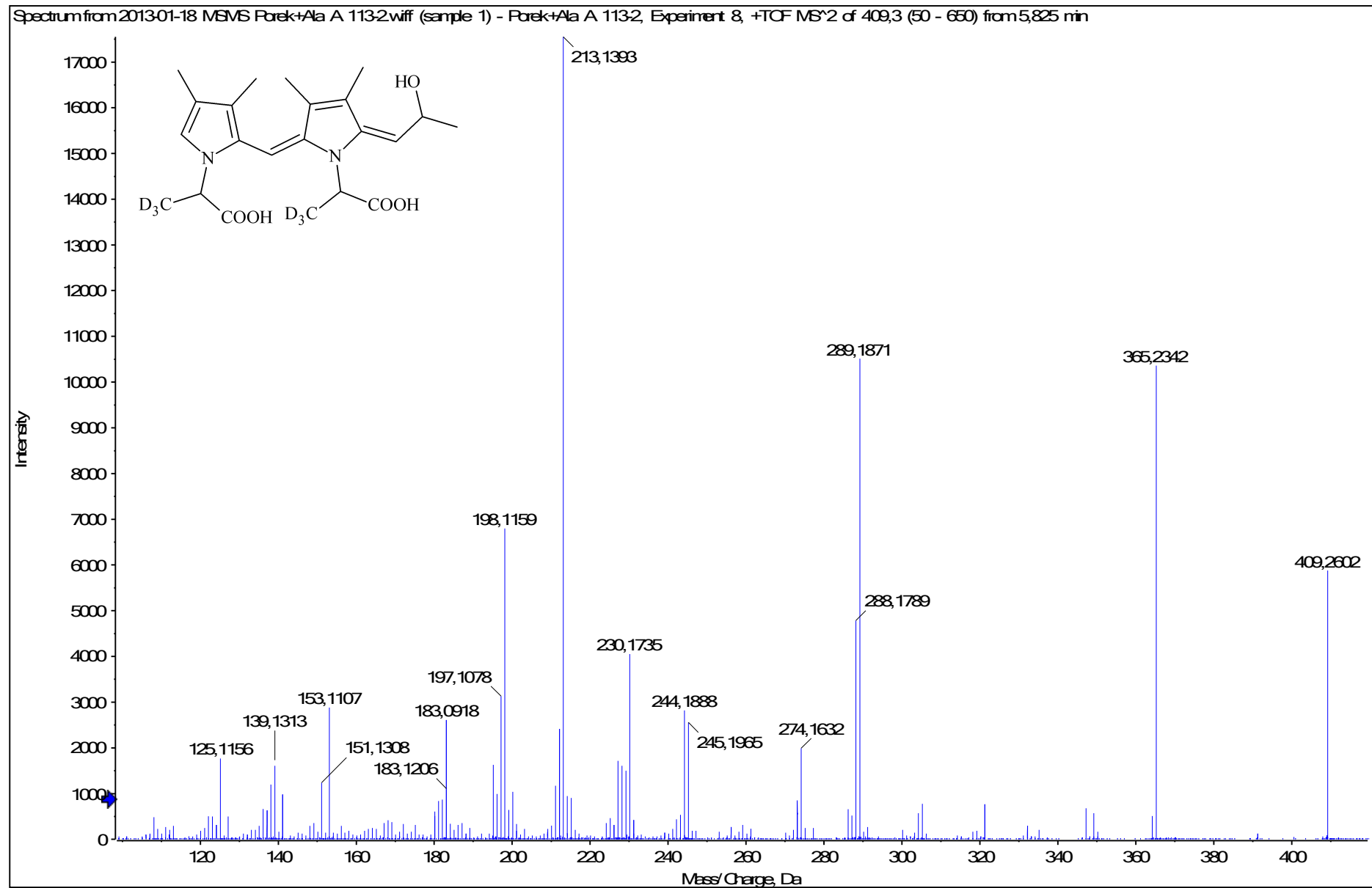
HRMS/MS spektrum látky L-401



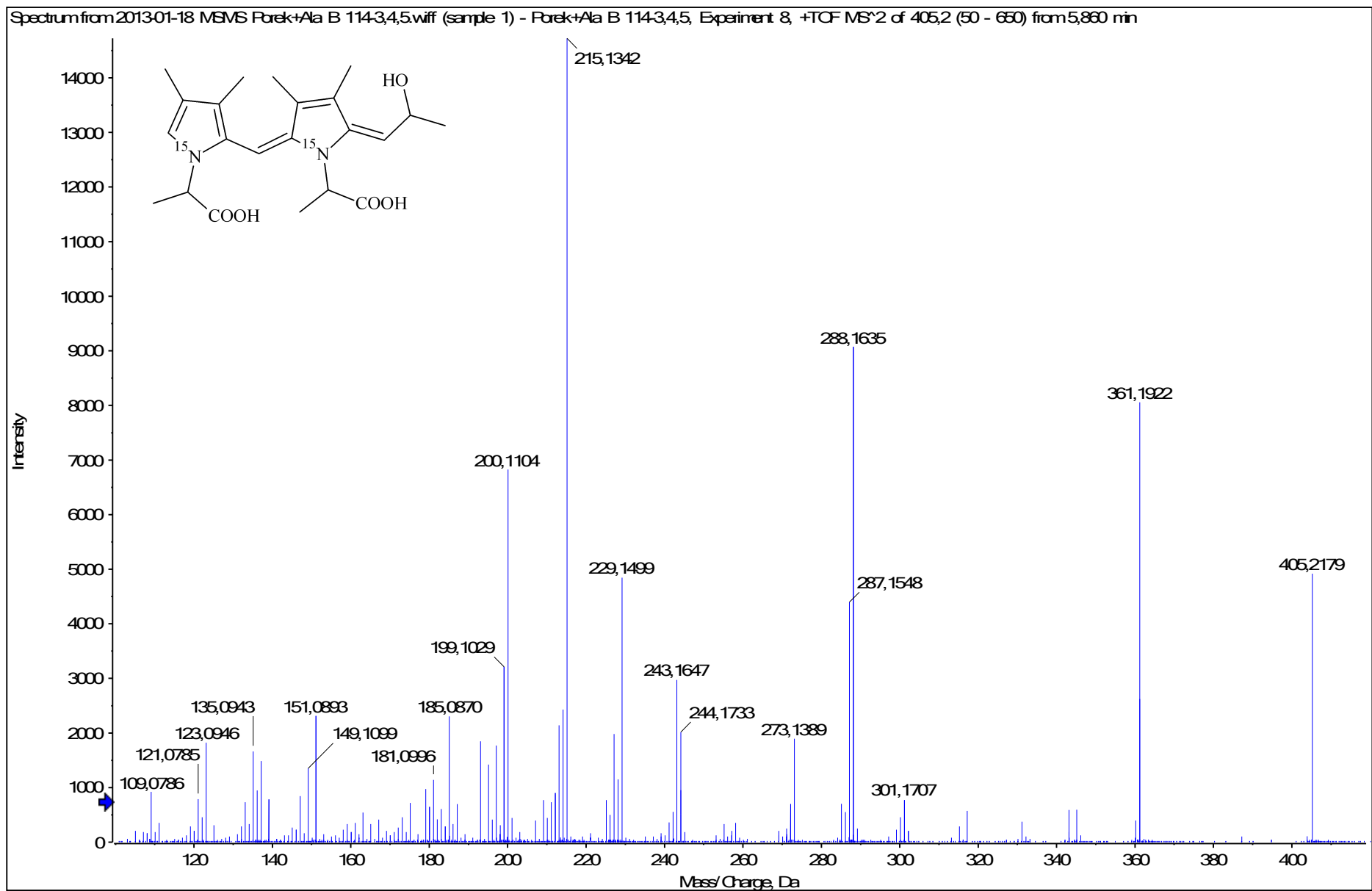
HRMS/MS spektrum látky LO-402



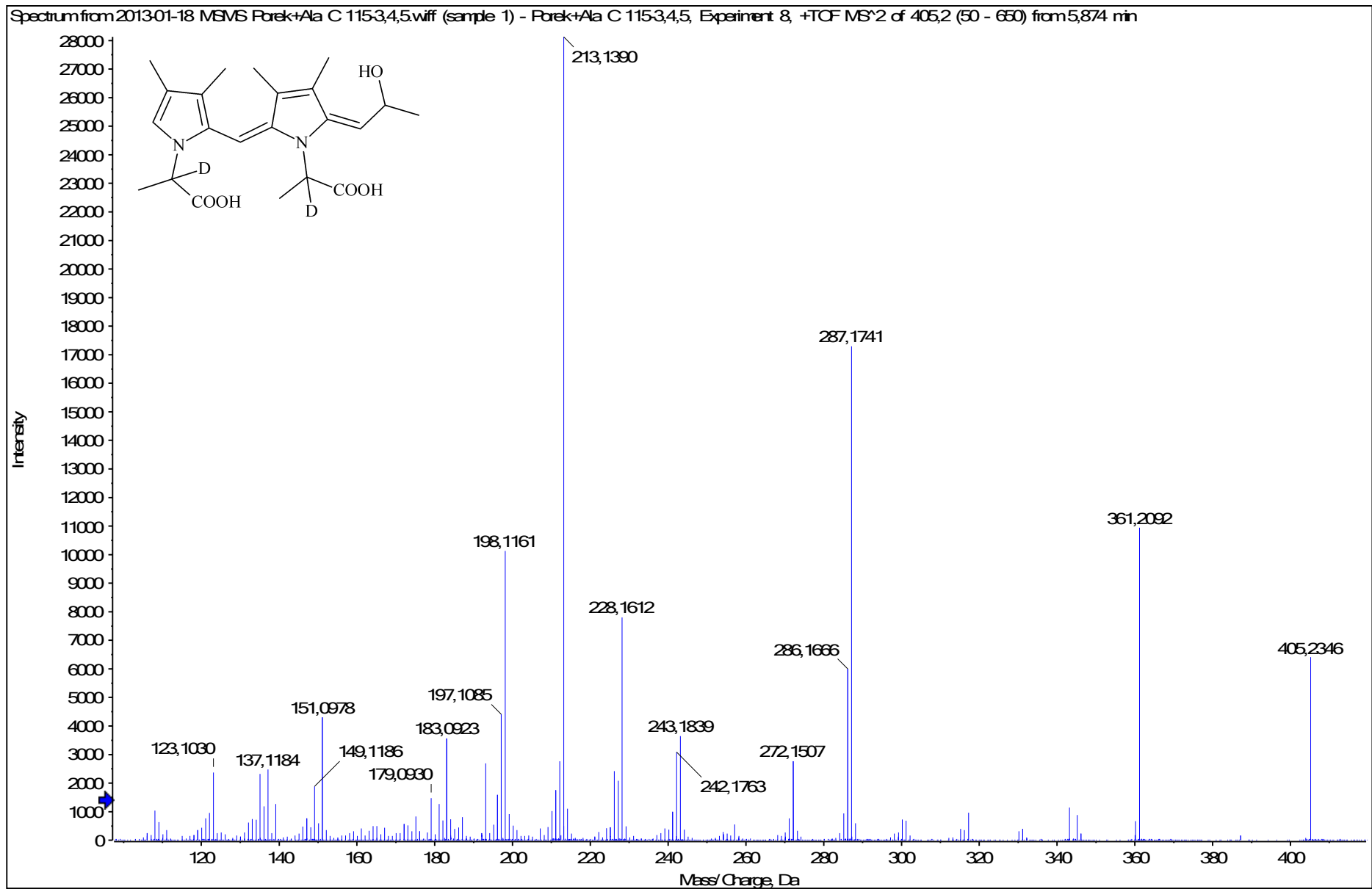
HRMS/MS spektrum látky LO-402



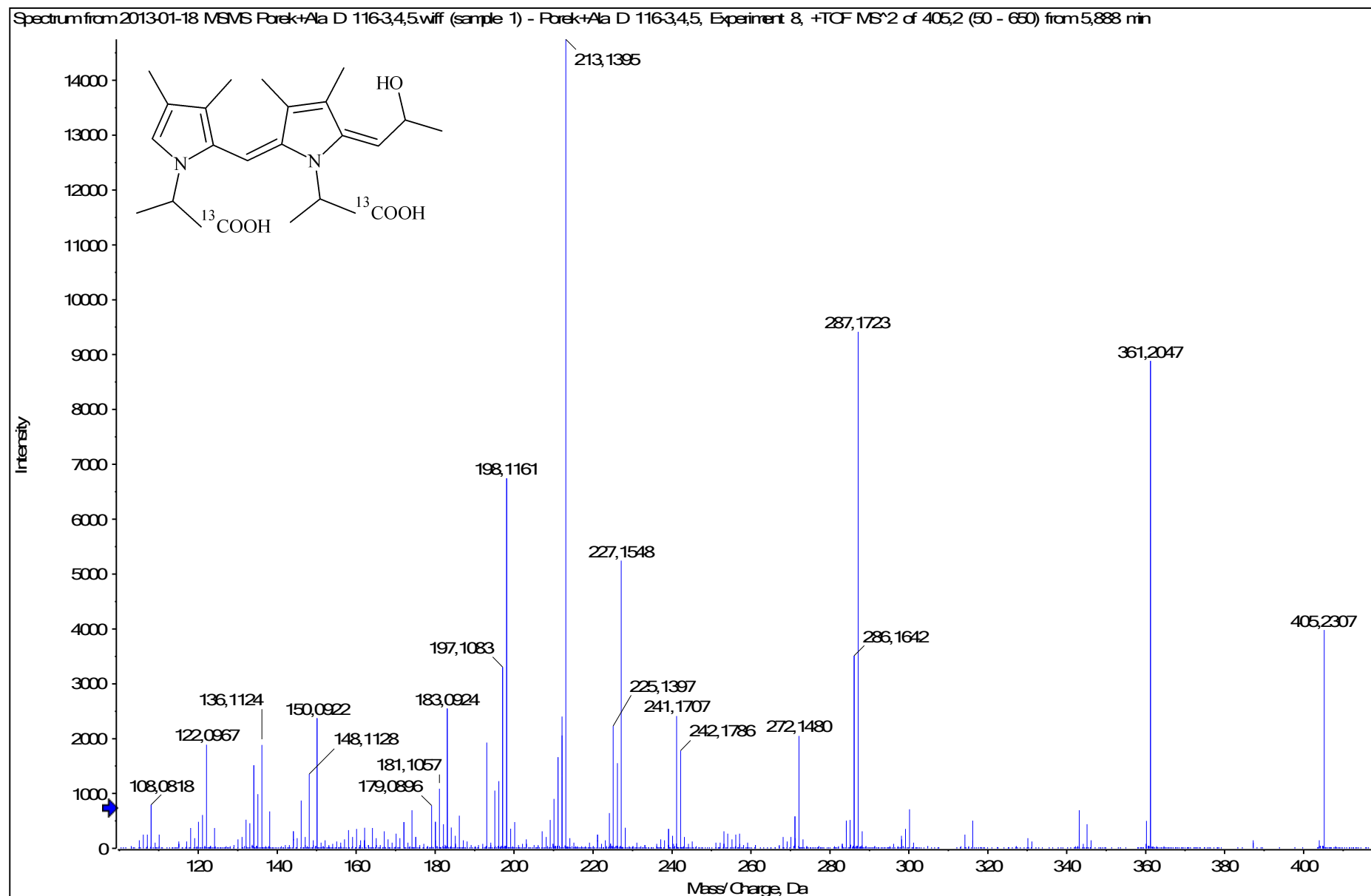
HRMS/MS spektrum látky LO-402



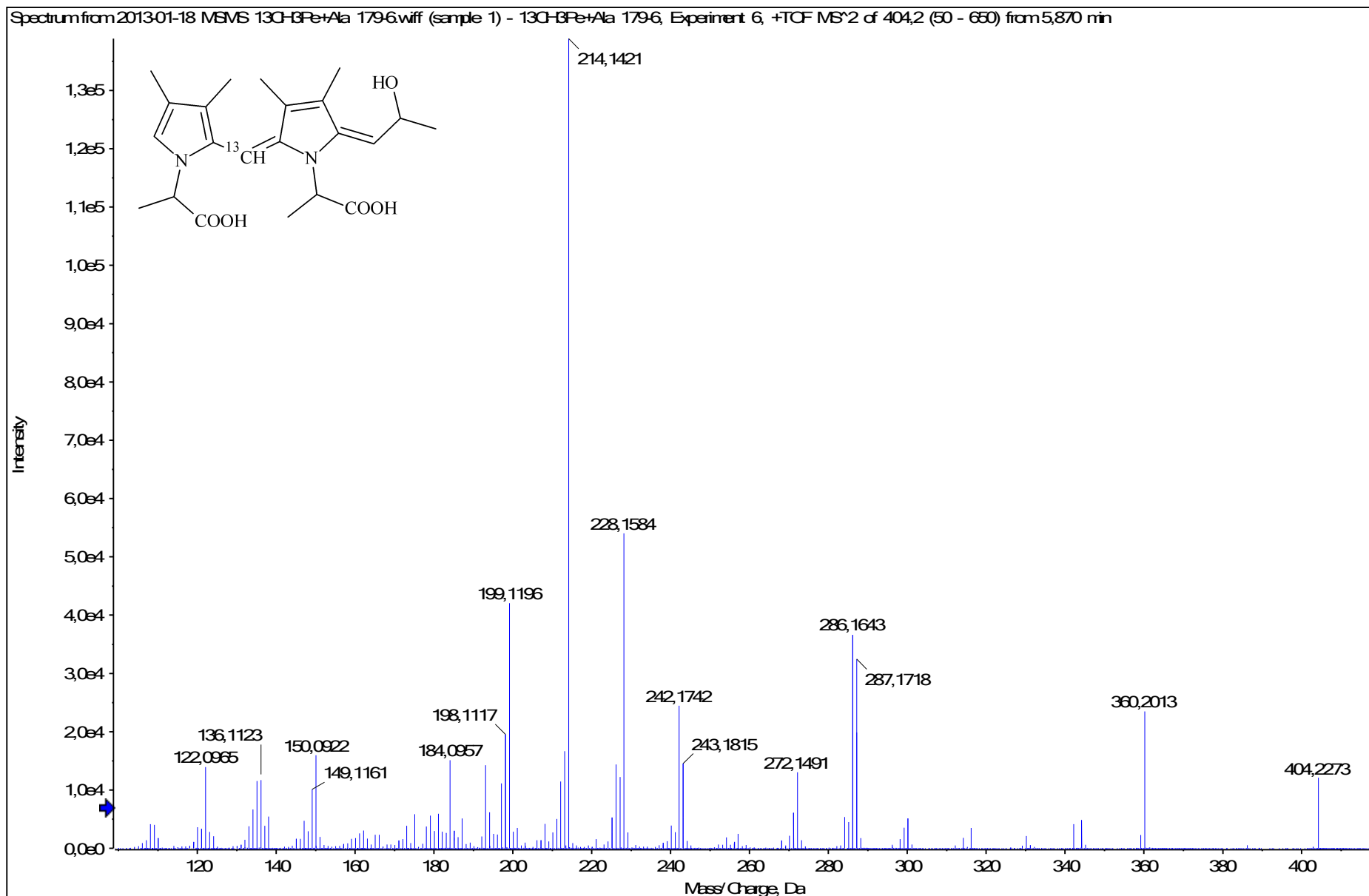
HRMS/MS spektrum látky LO-402



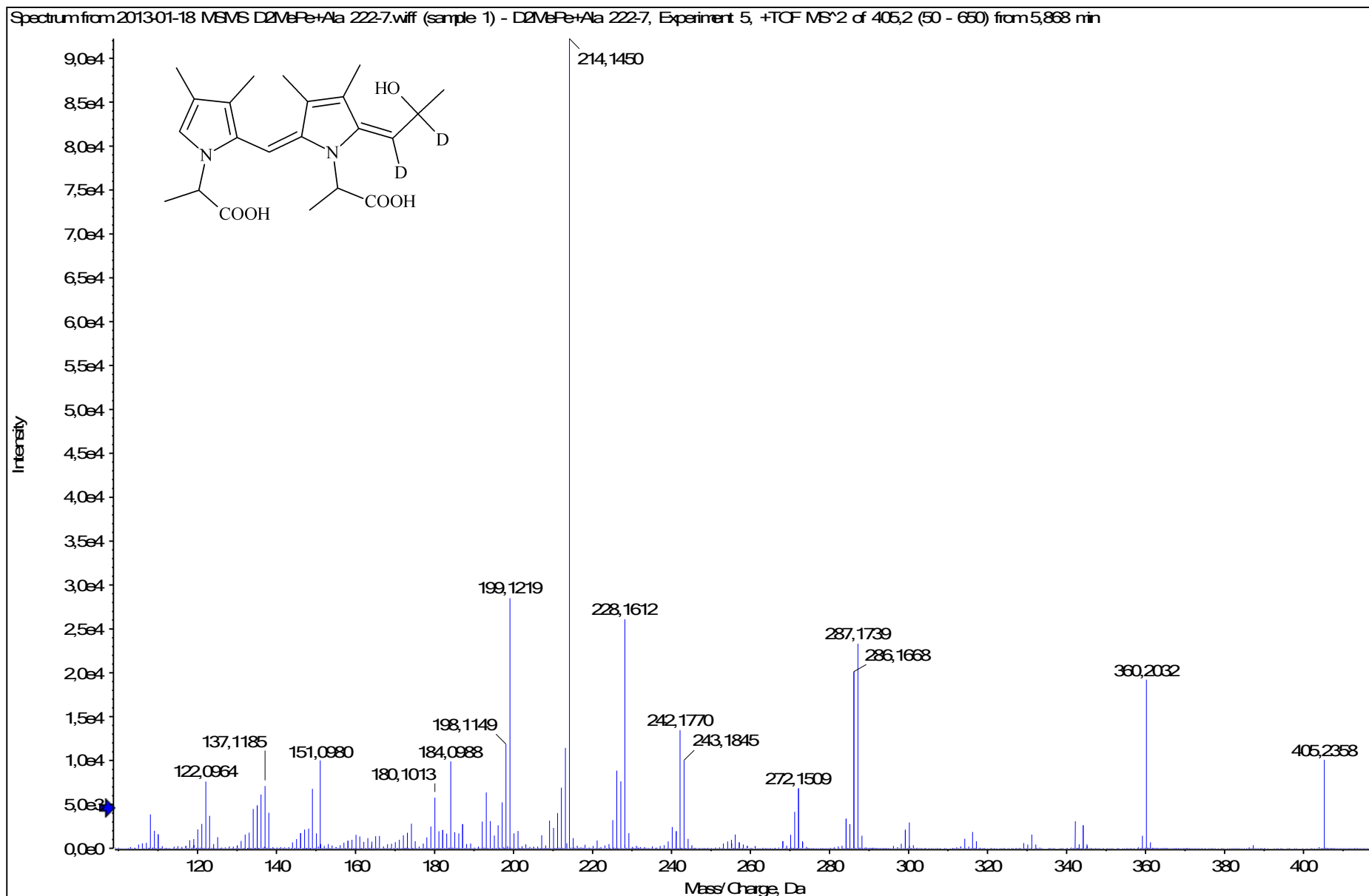
HRMS/MS spektrum látky LO-402



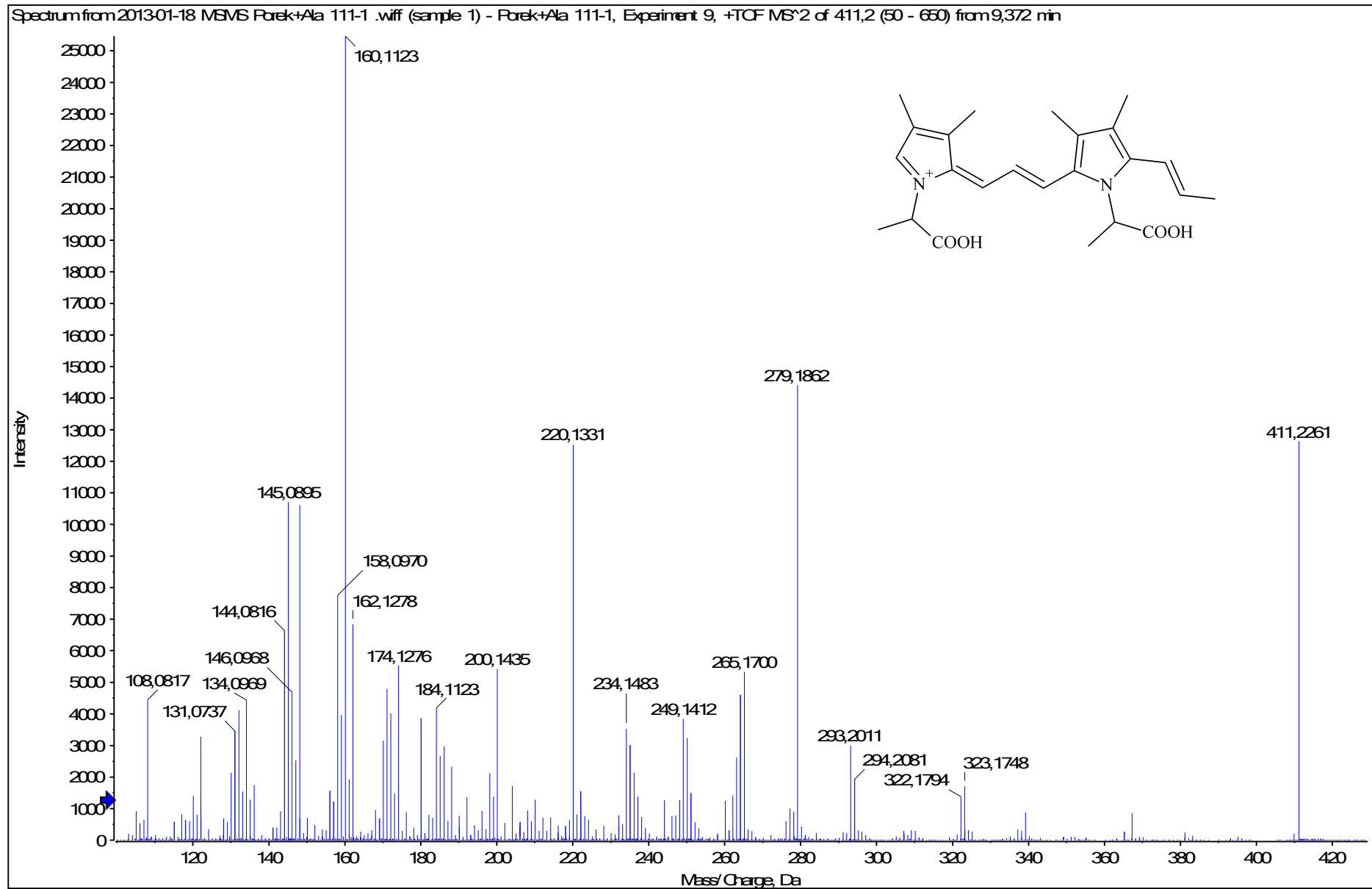
HRMS/MS spektrum látky LO-402



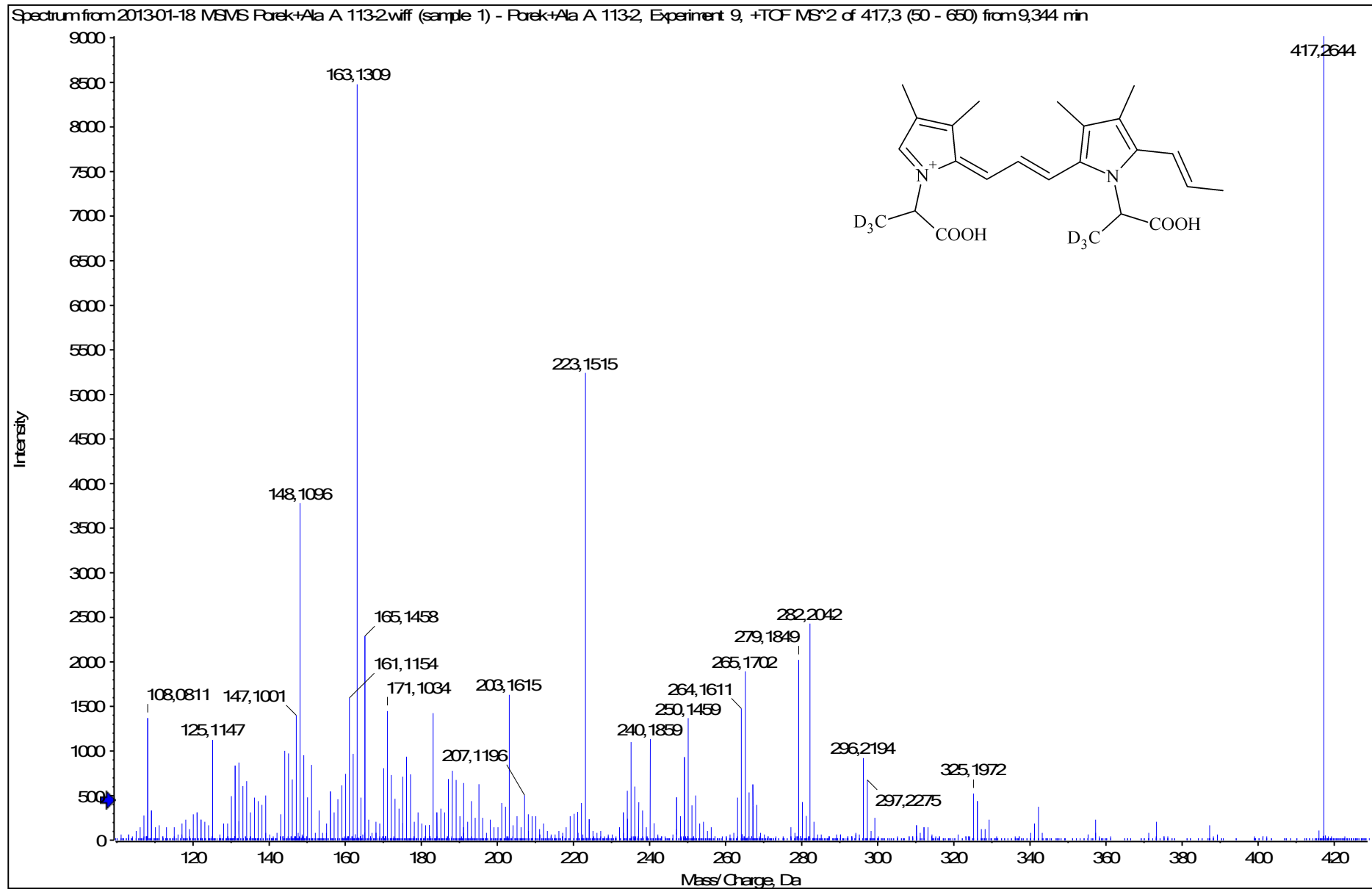
HRMS/MS spektrum látky LO-402



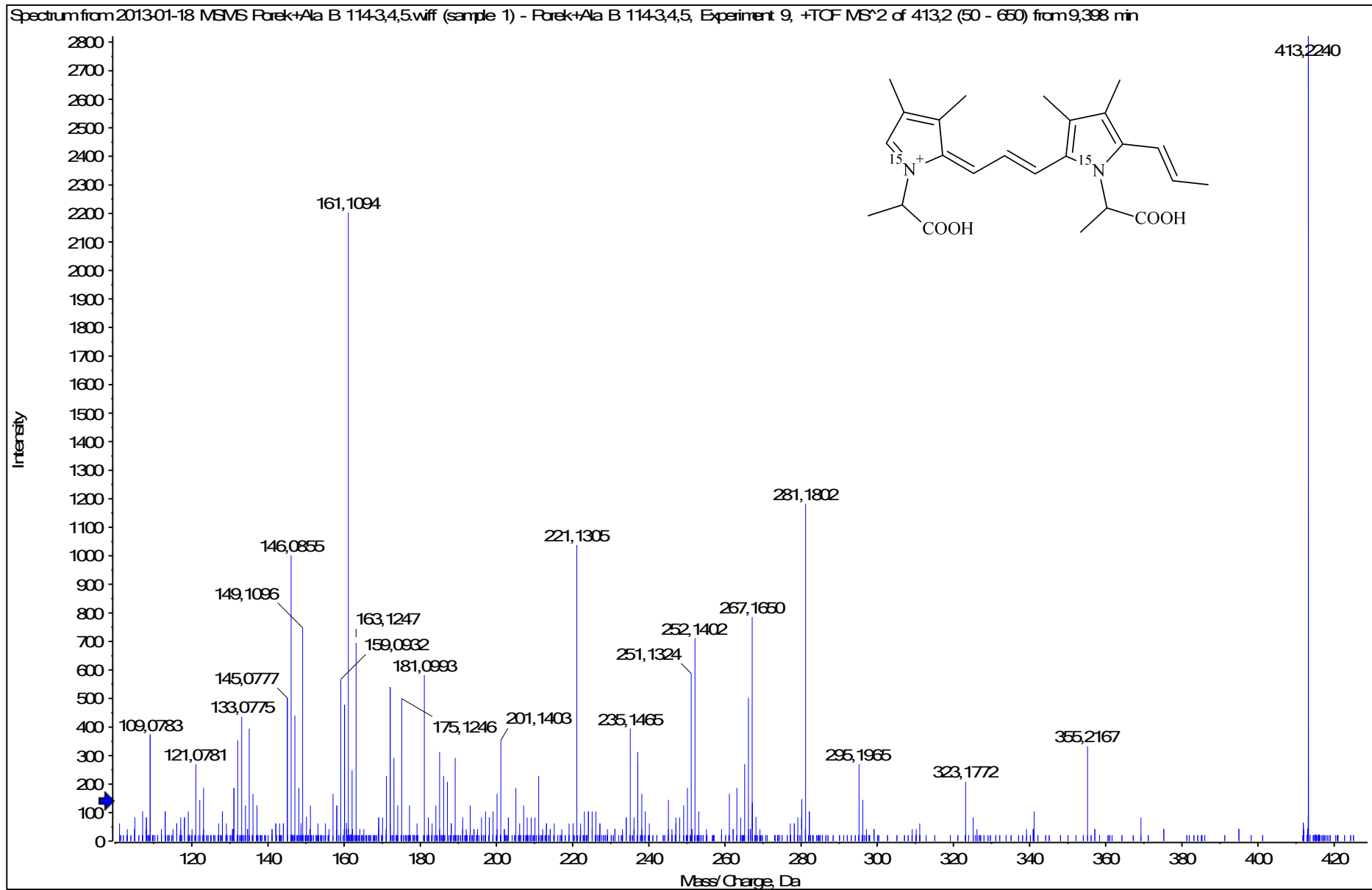
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



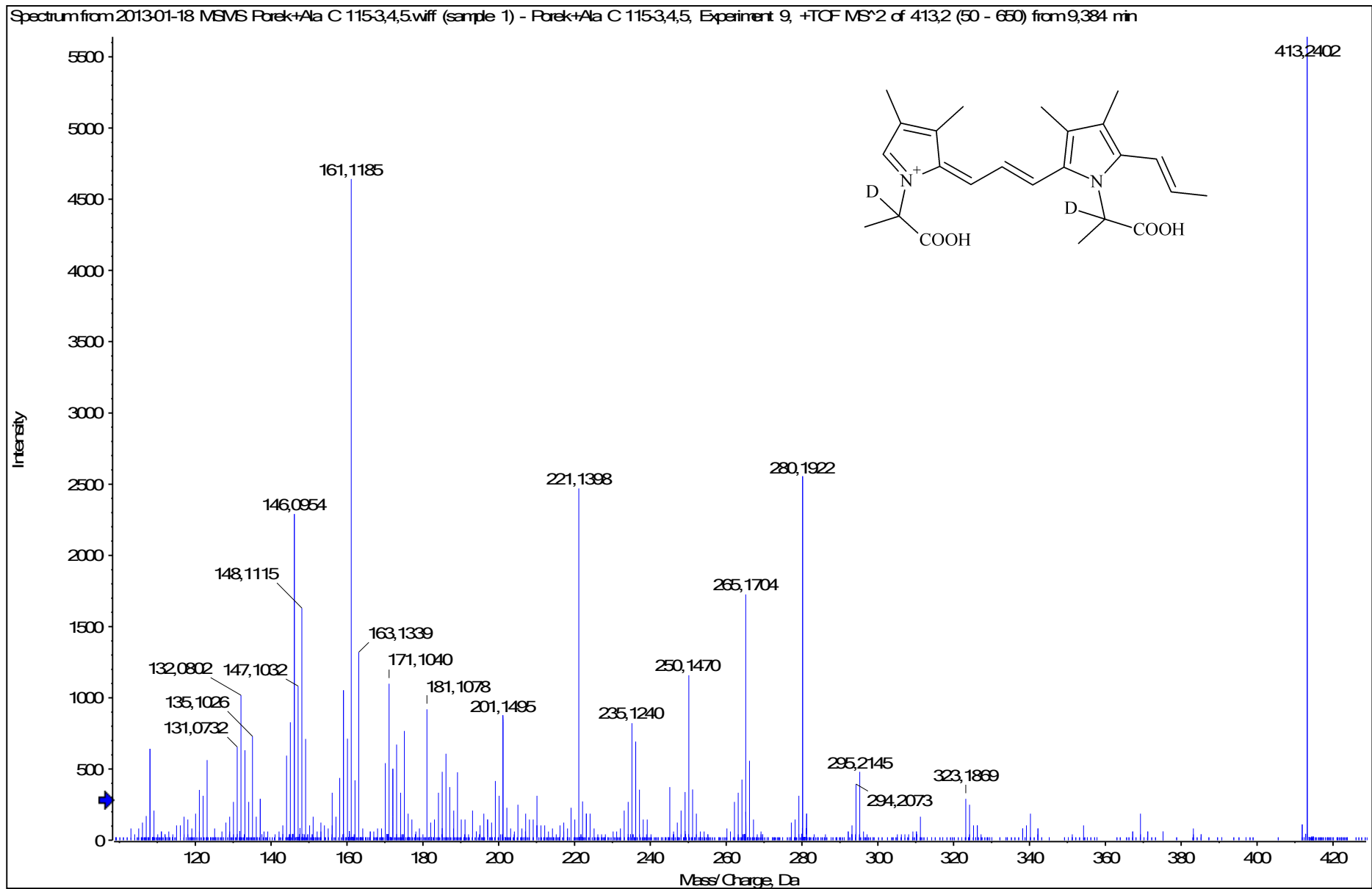
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



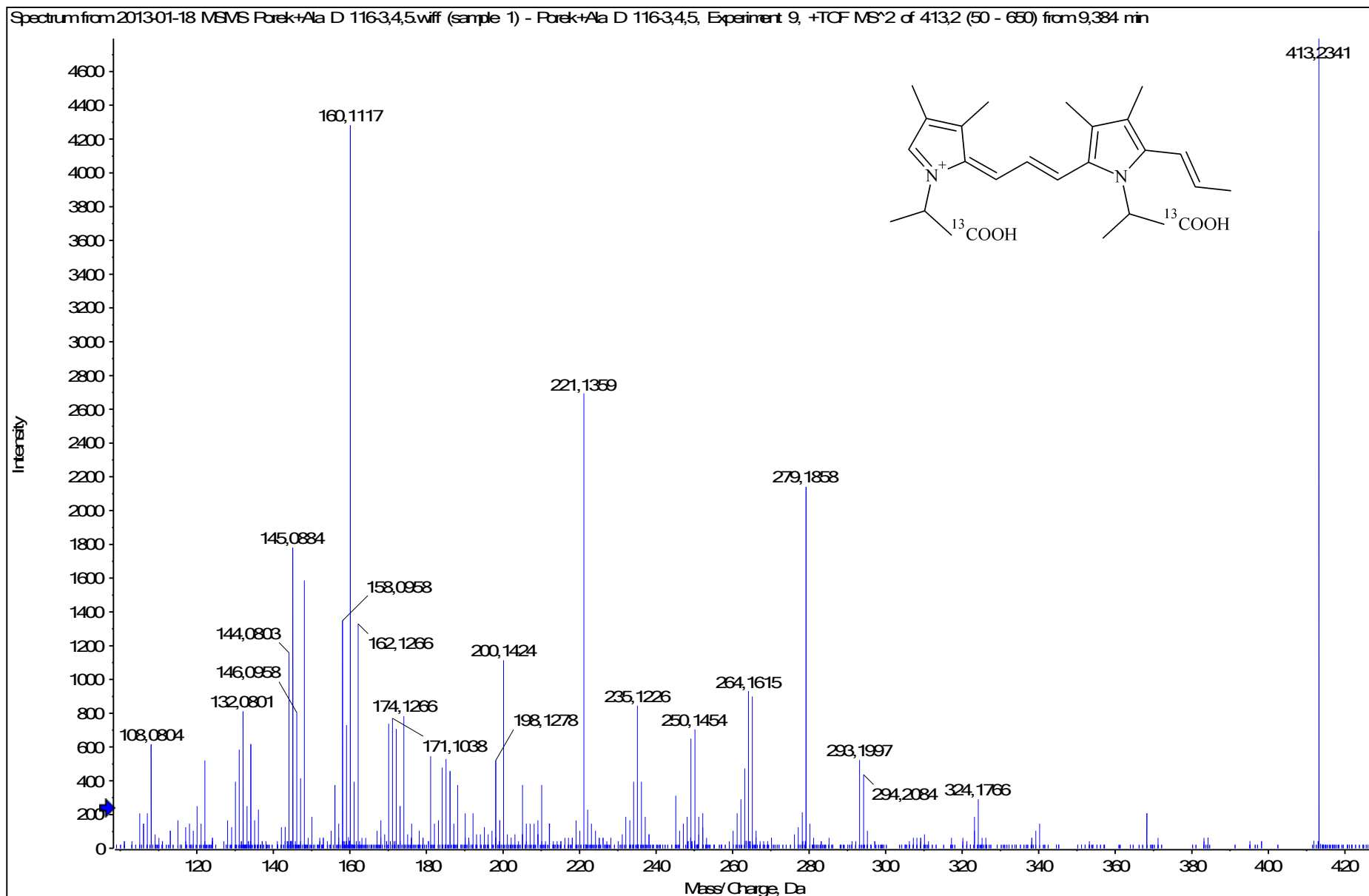
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



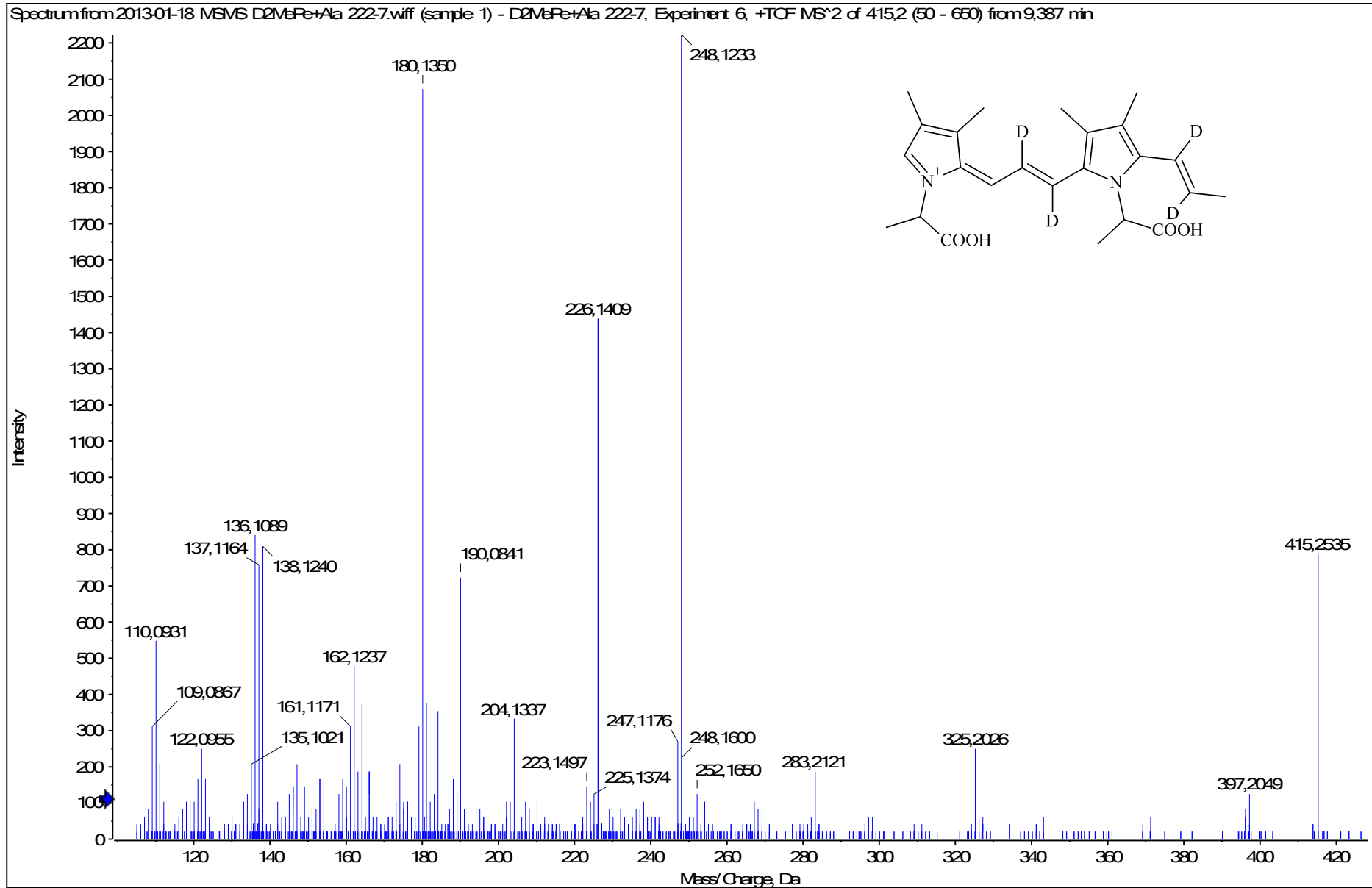
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



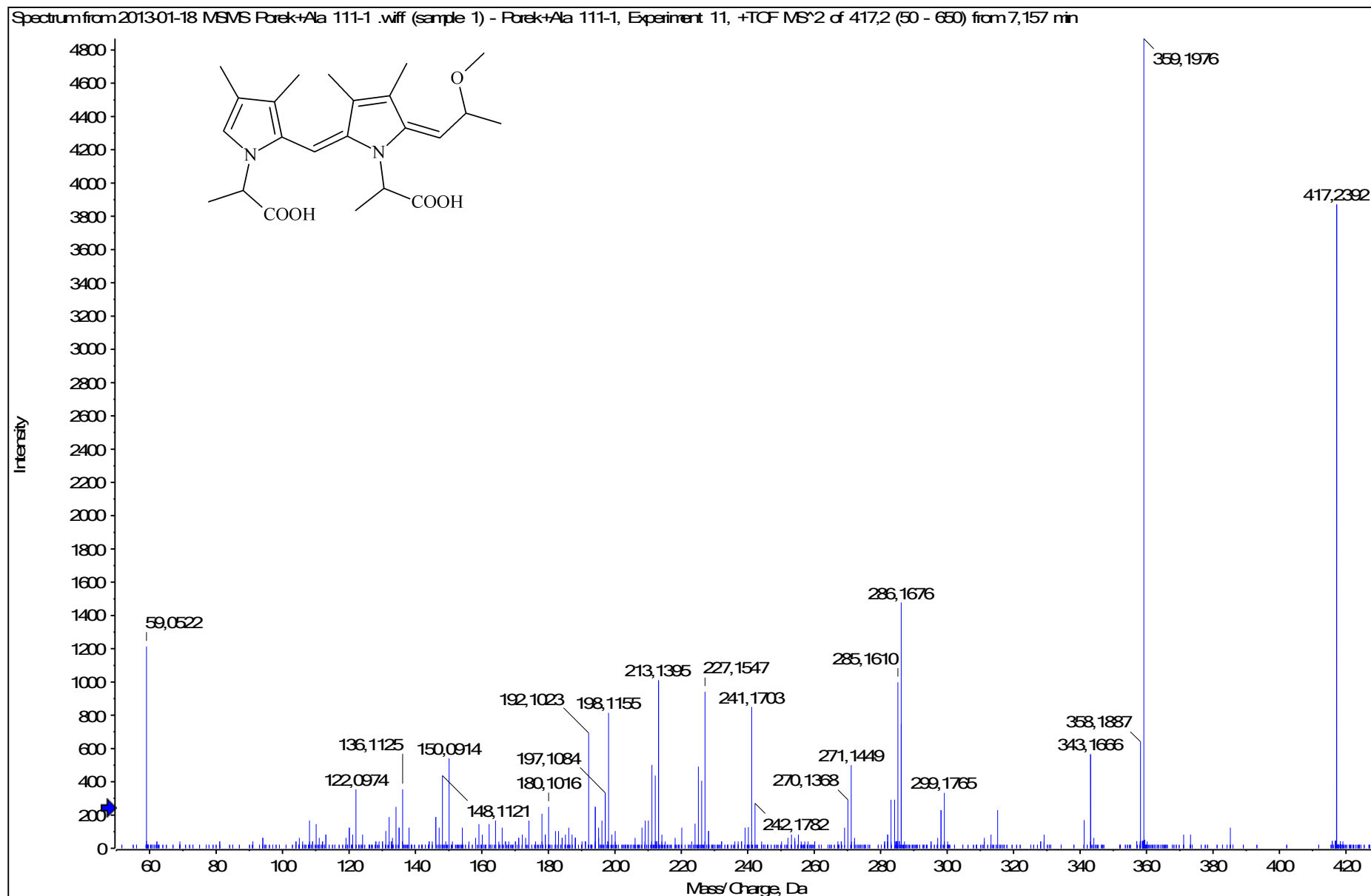
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



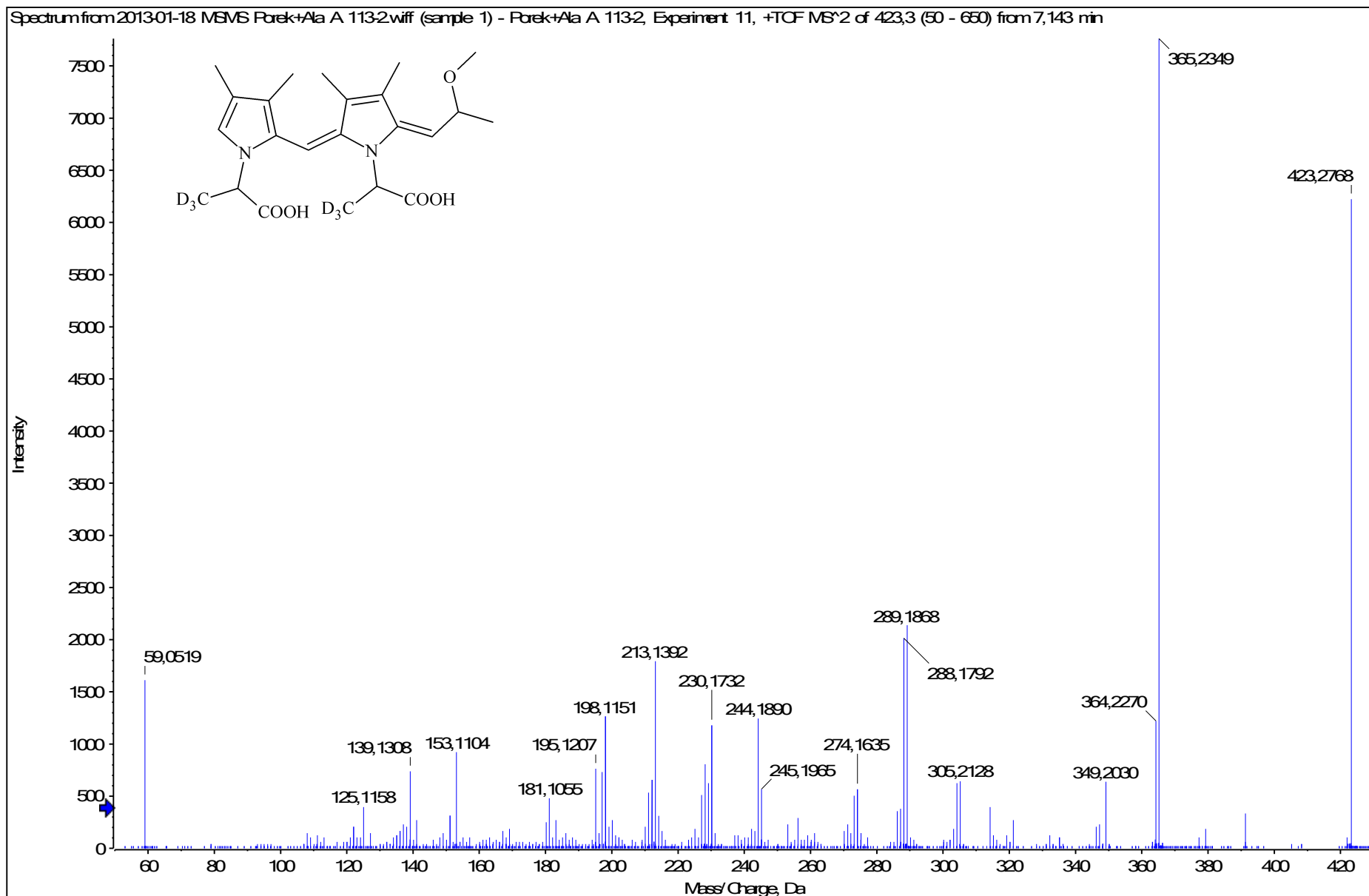
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



HRMS/MS spektrum látky LO-416

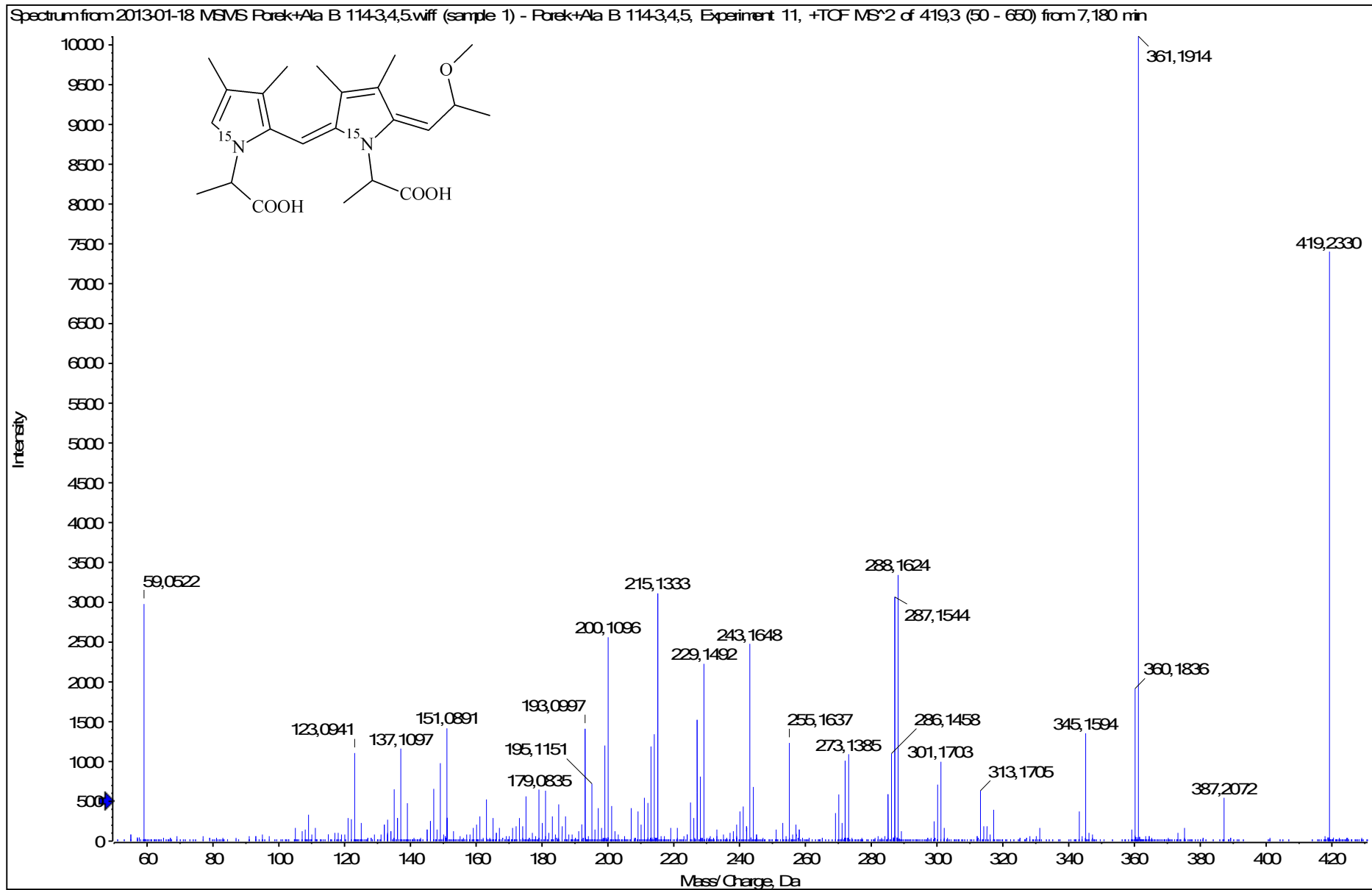


HRMS/MS spektrum látky LO-416

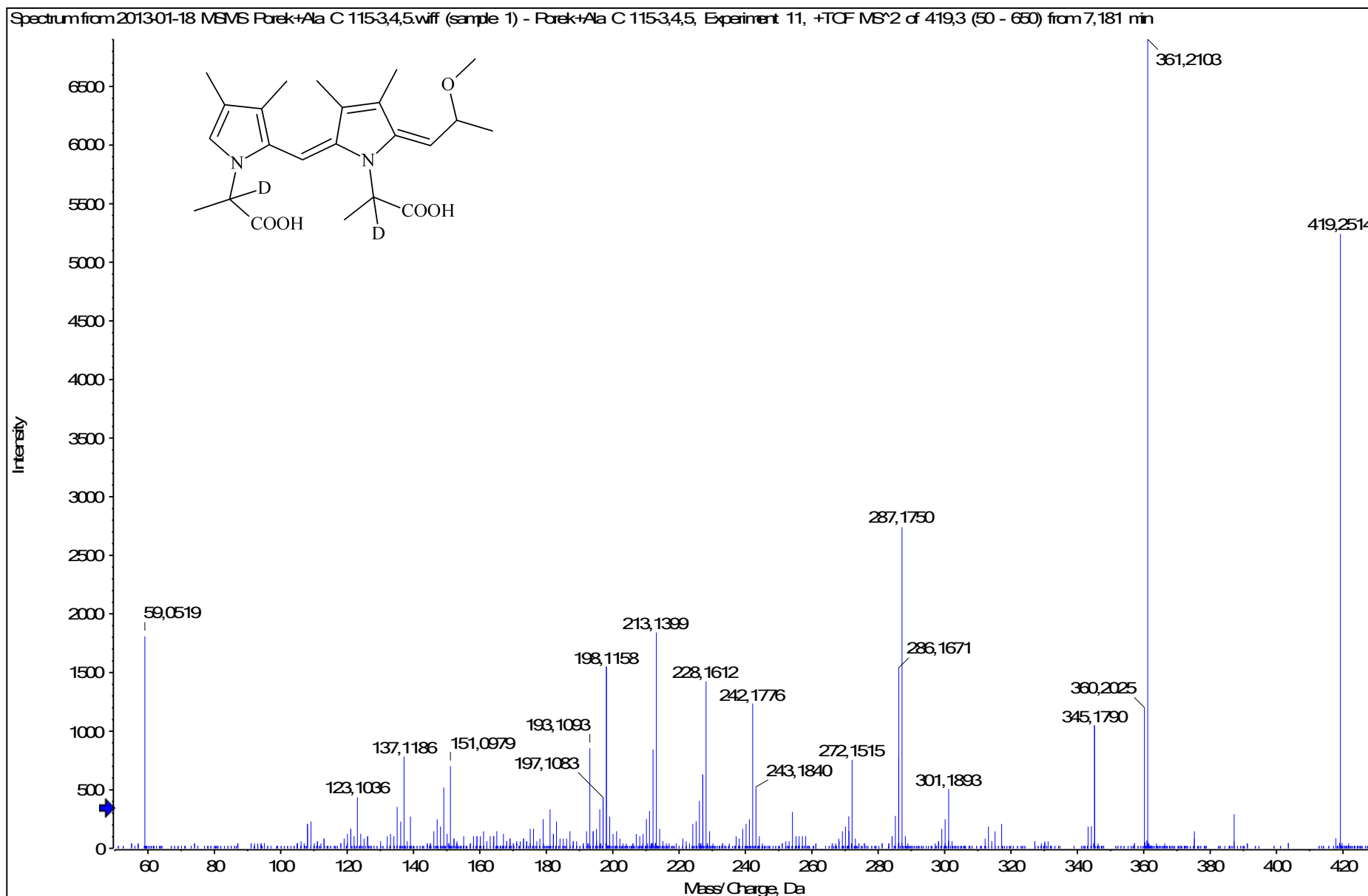


11.2.2013 17:52:08

HRMS/MS spektrum látky LO-416

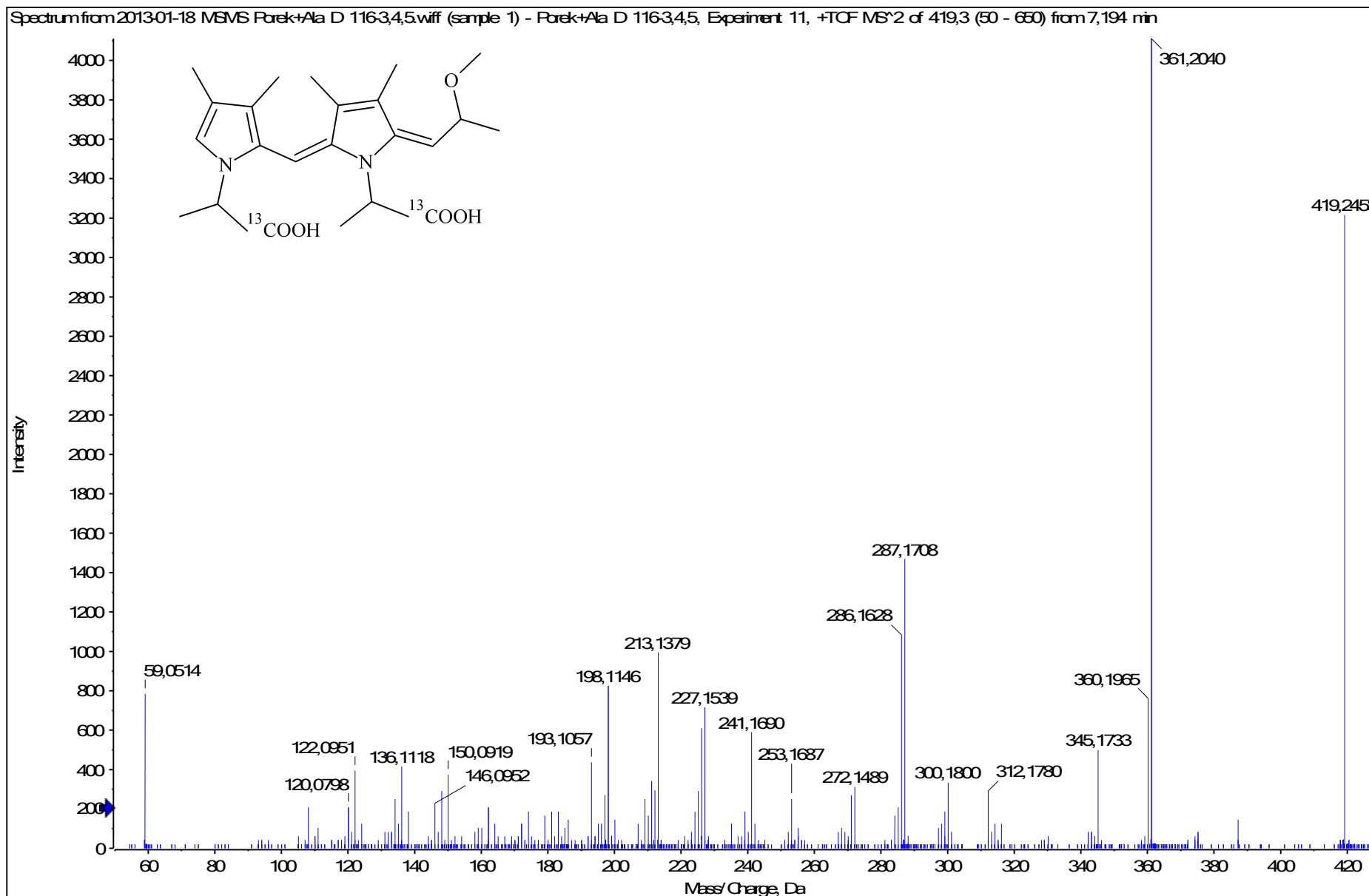


HRMS/MS spektrum látky LO-416

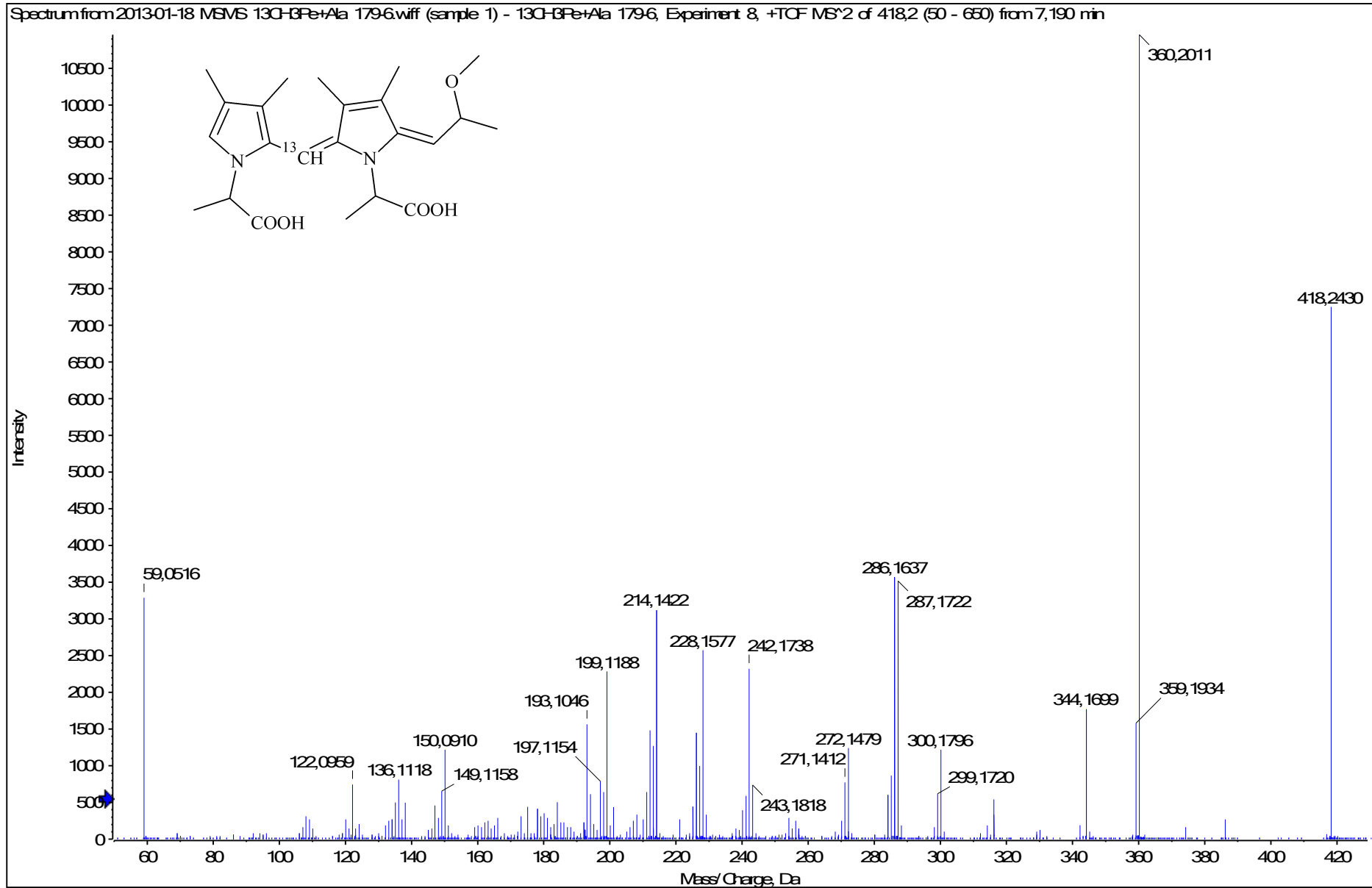


11.2.2013 17:53:50

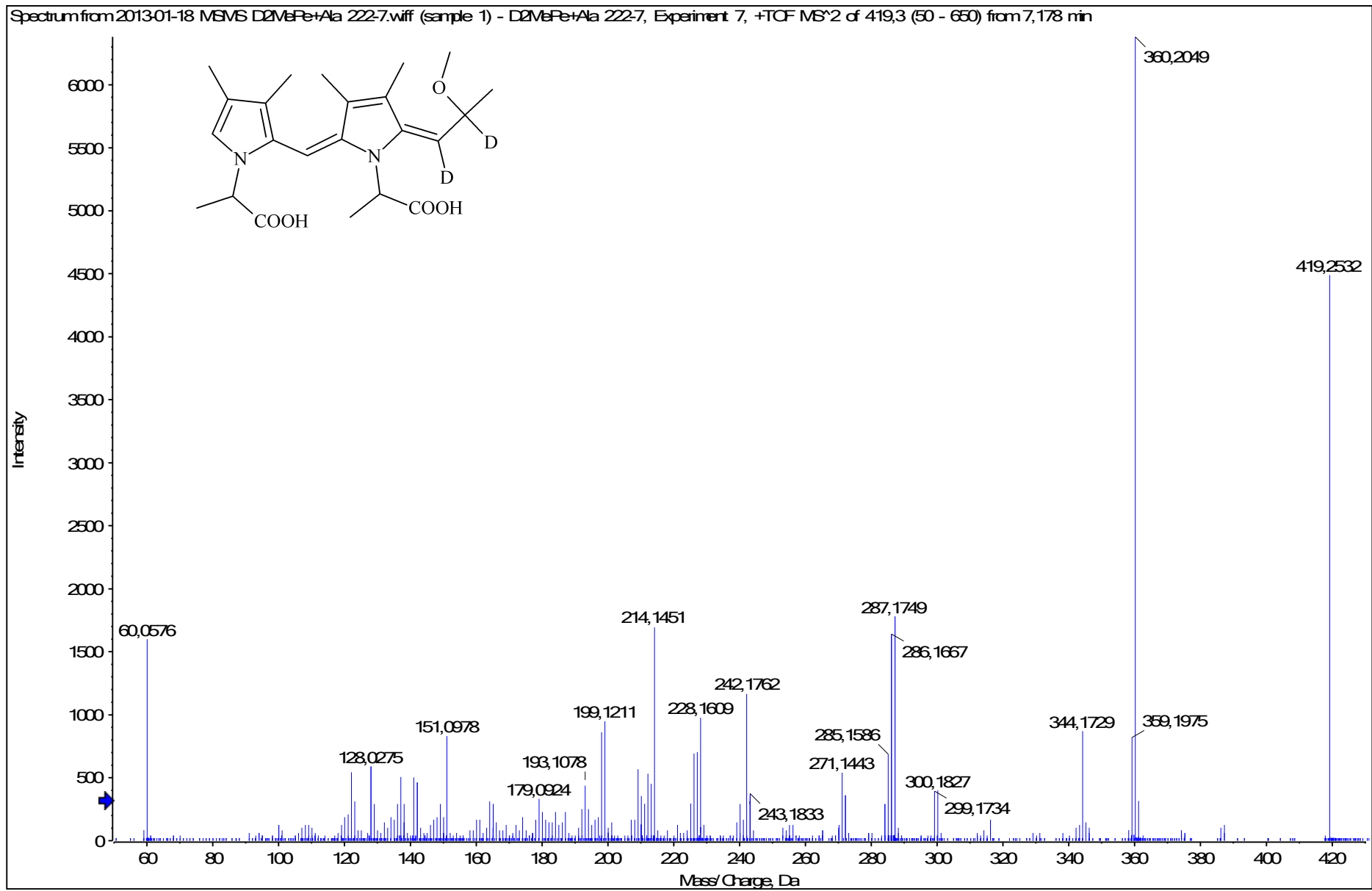
HRMS/MS spektrum látky LO-416



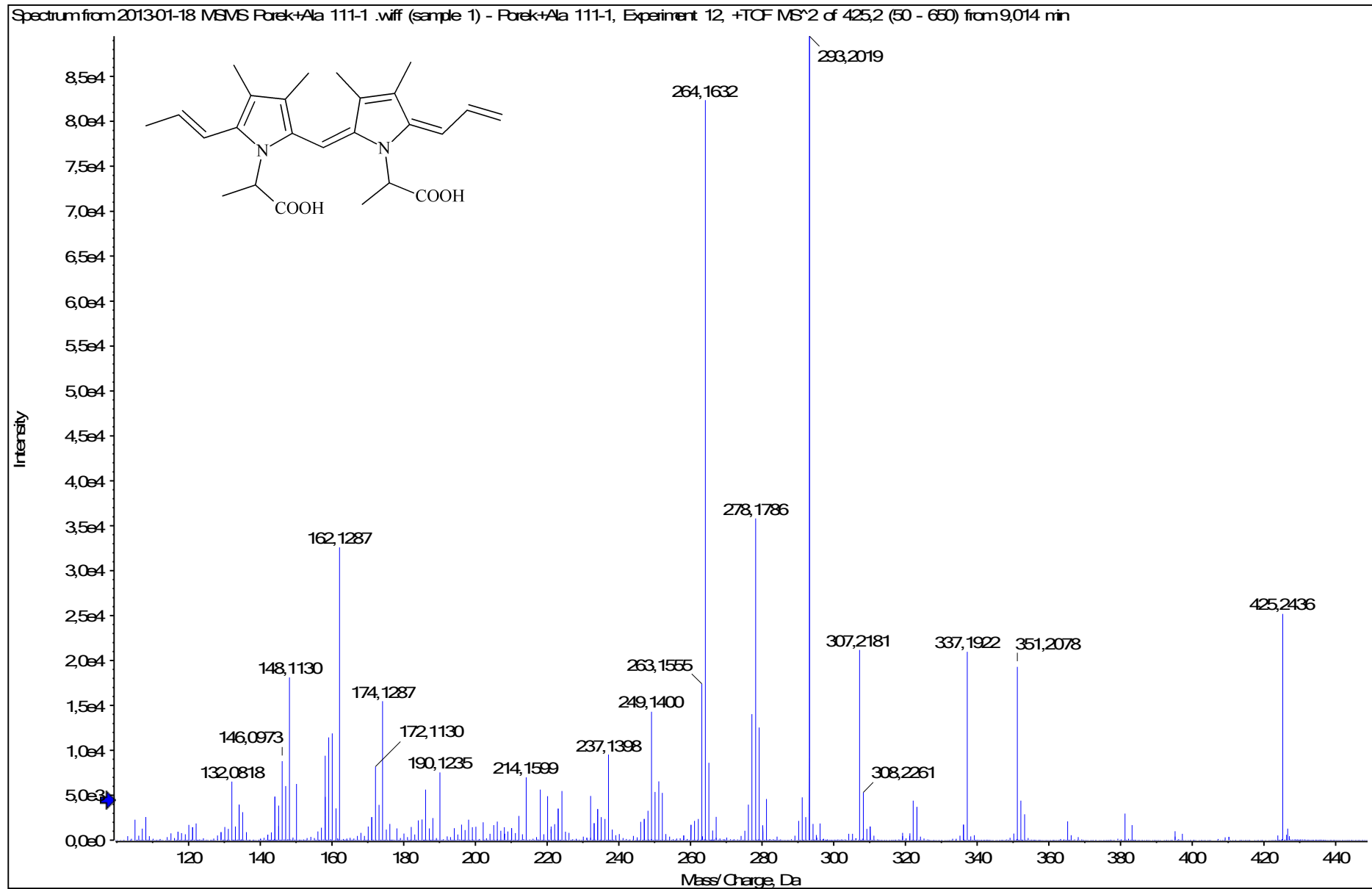
HRMS/MS spektrum látky LO-416



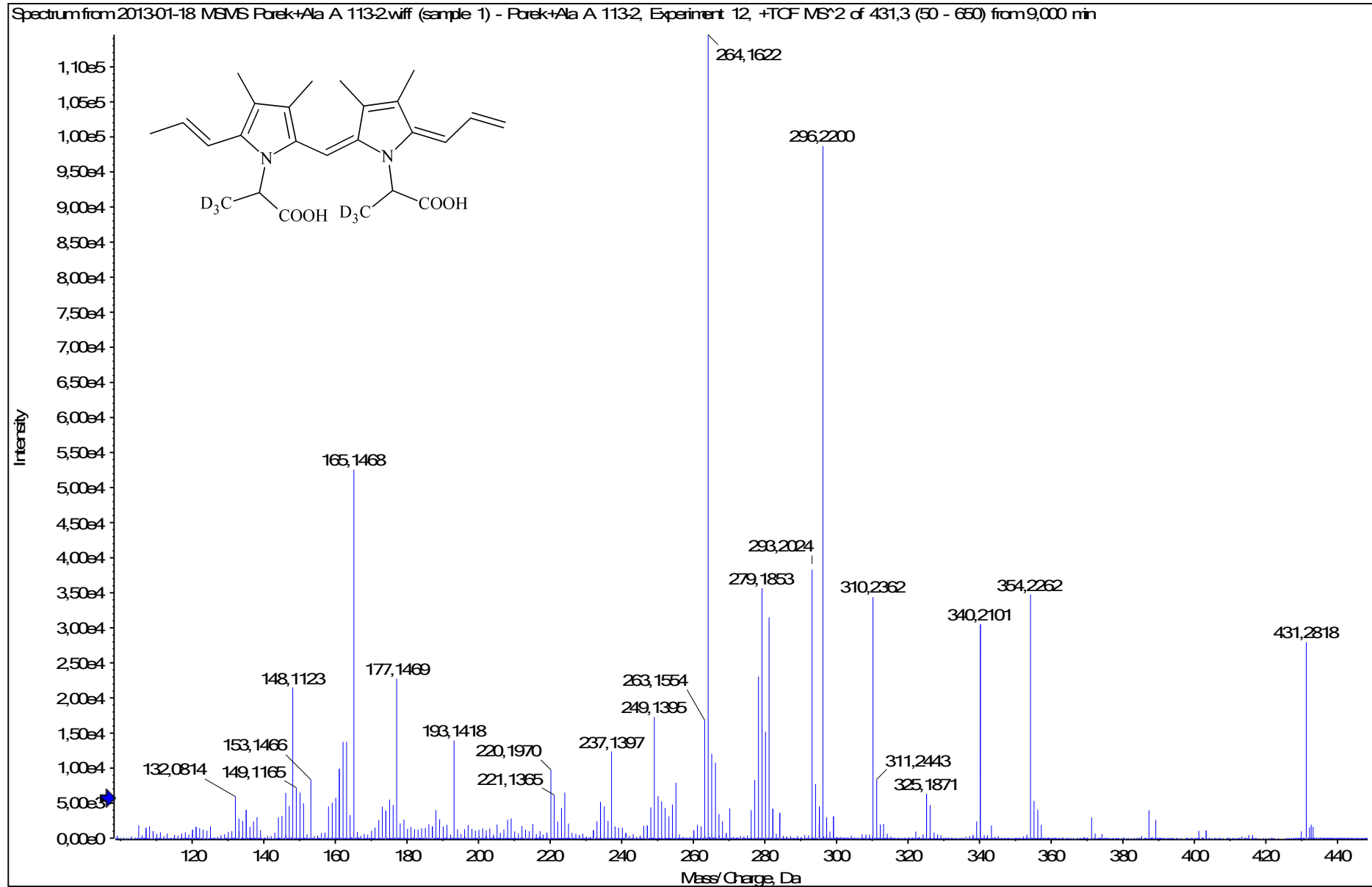
HRMS/MS spektrum látky LO-416



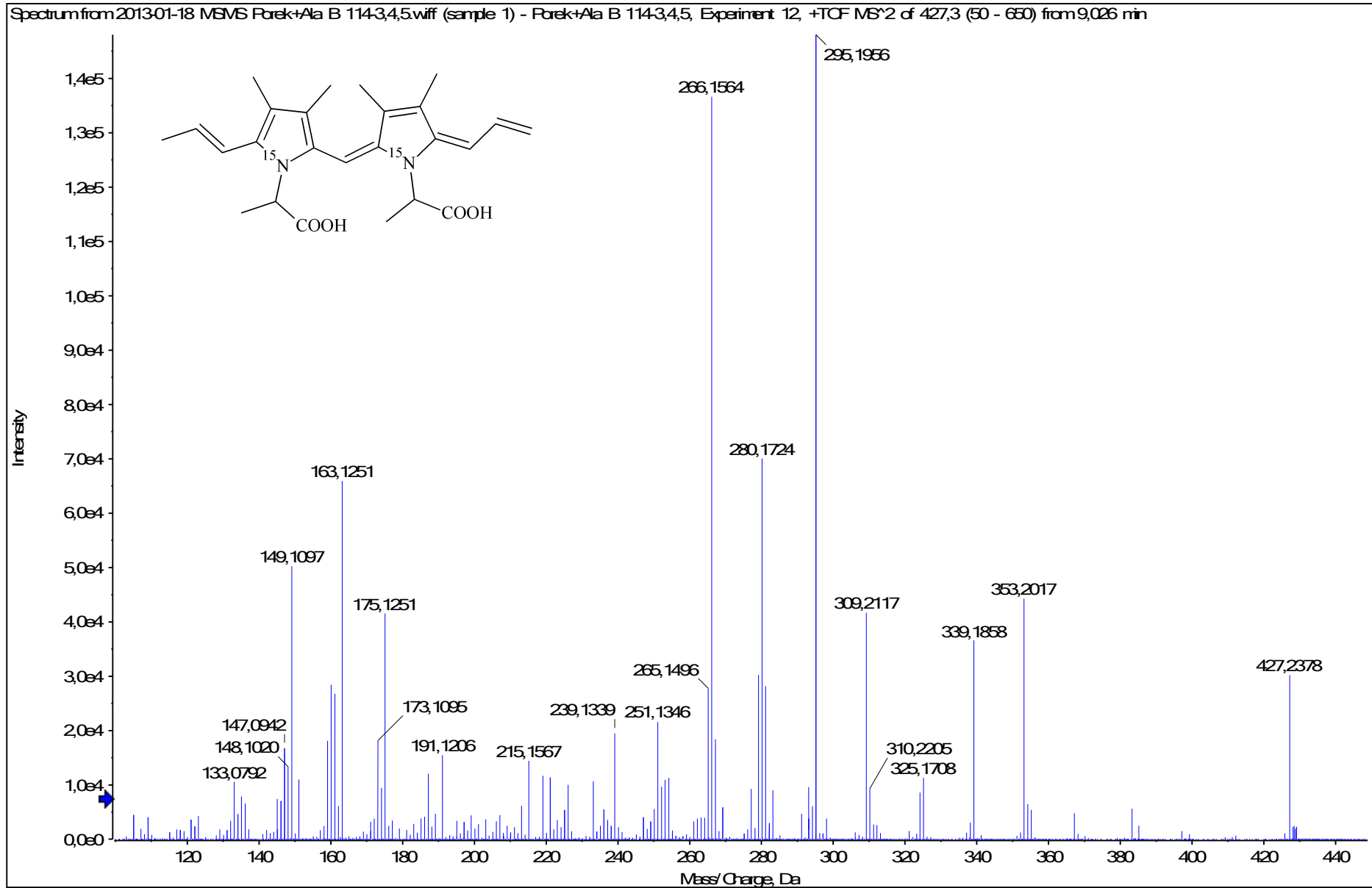
HRMS/MS spektrum látky LO-424



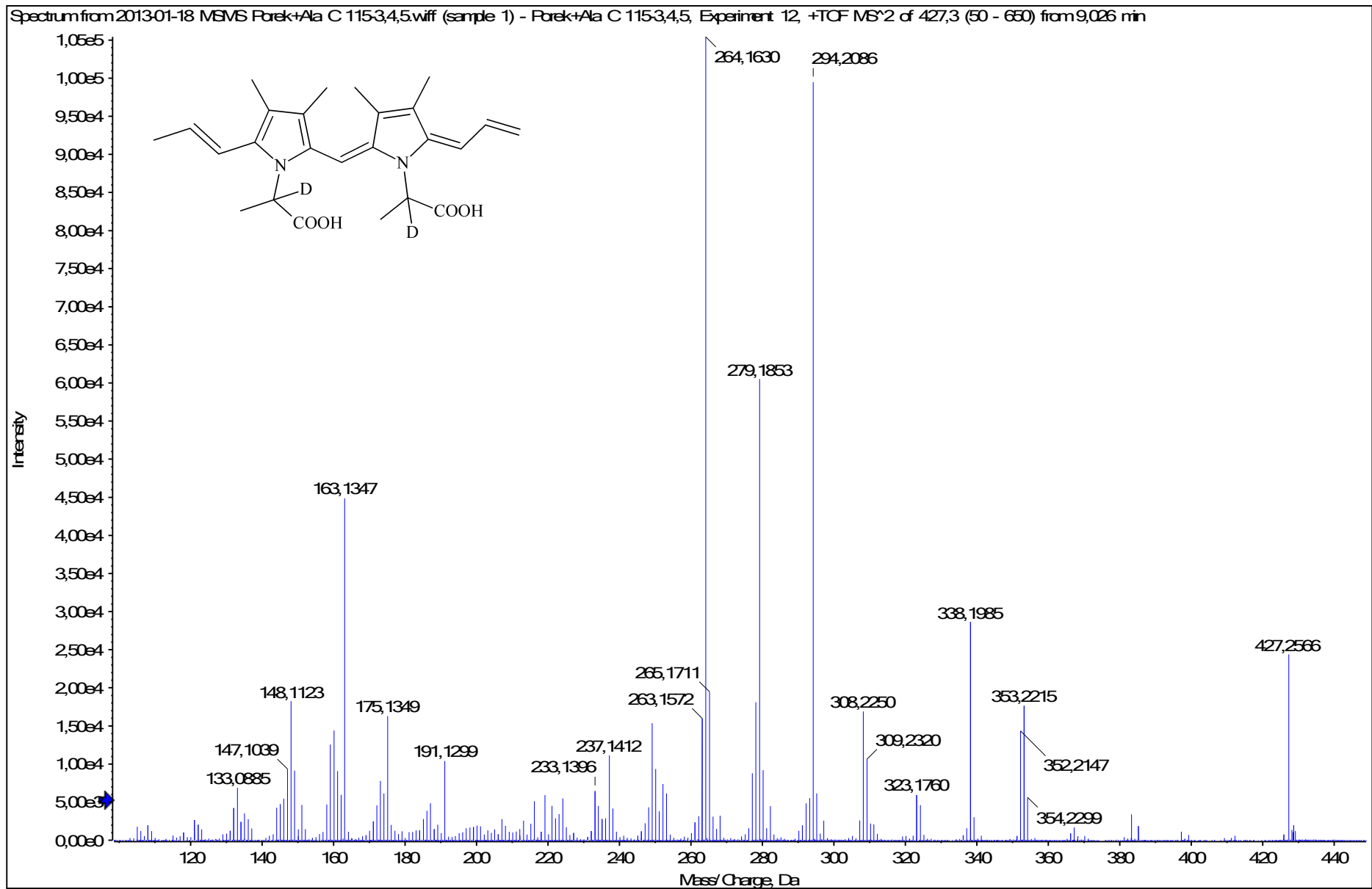
HRMS/MS spektrum látky LO-424



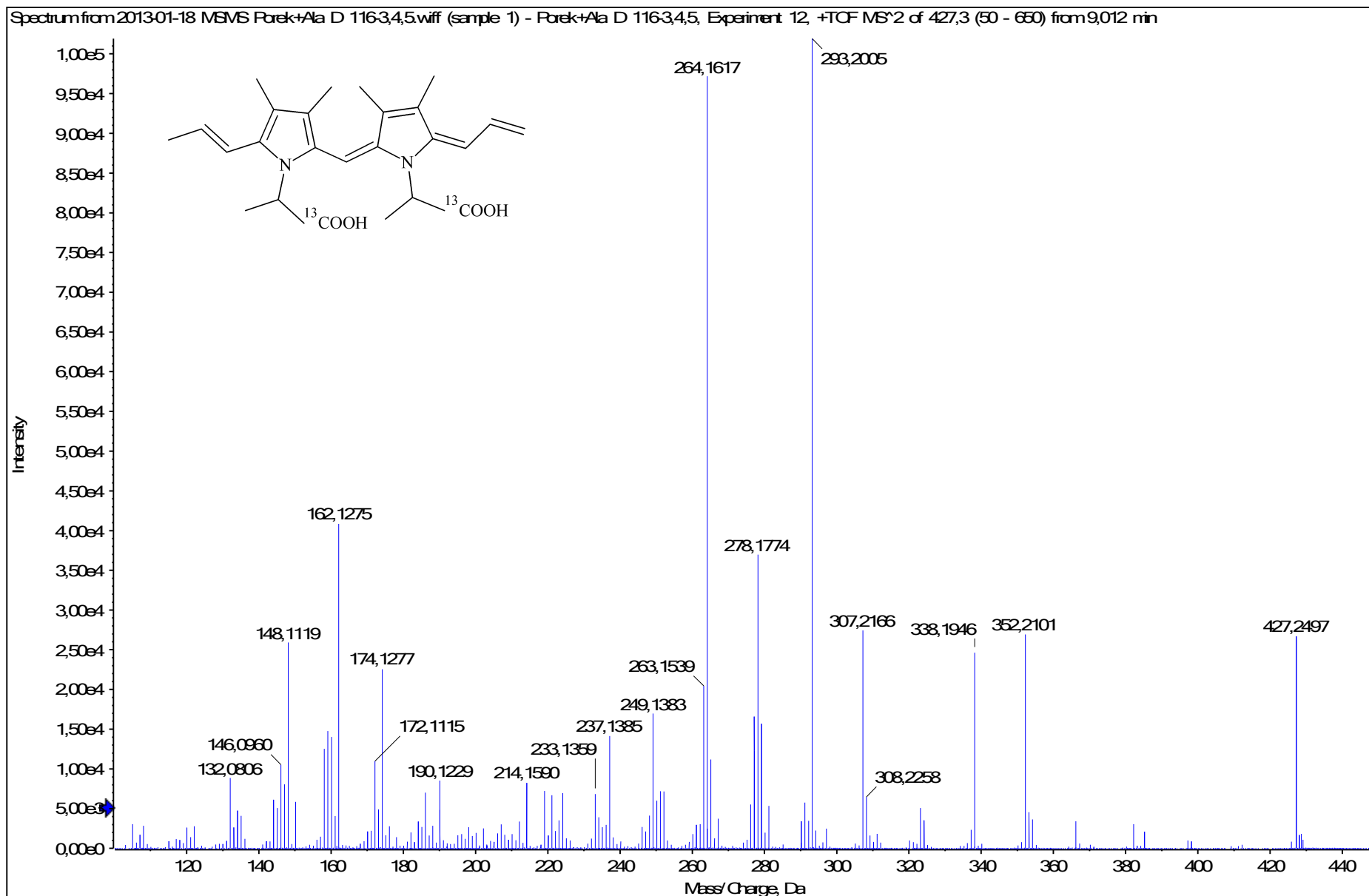
HRMS/MS spektrum látky LO-424



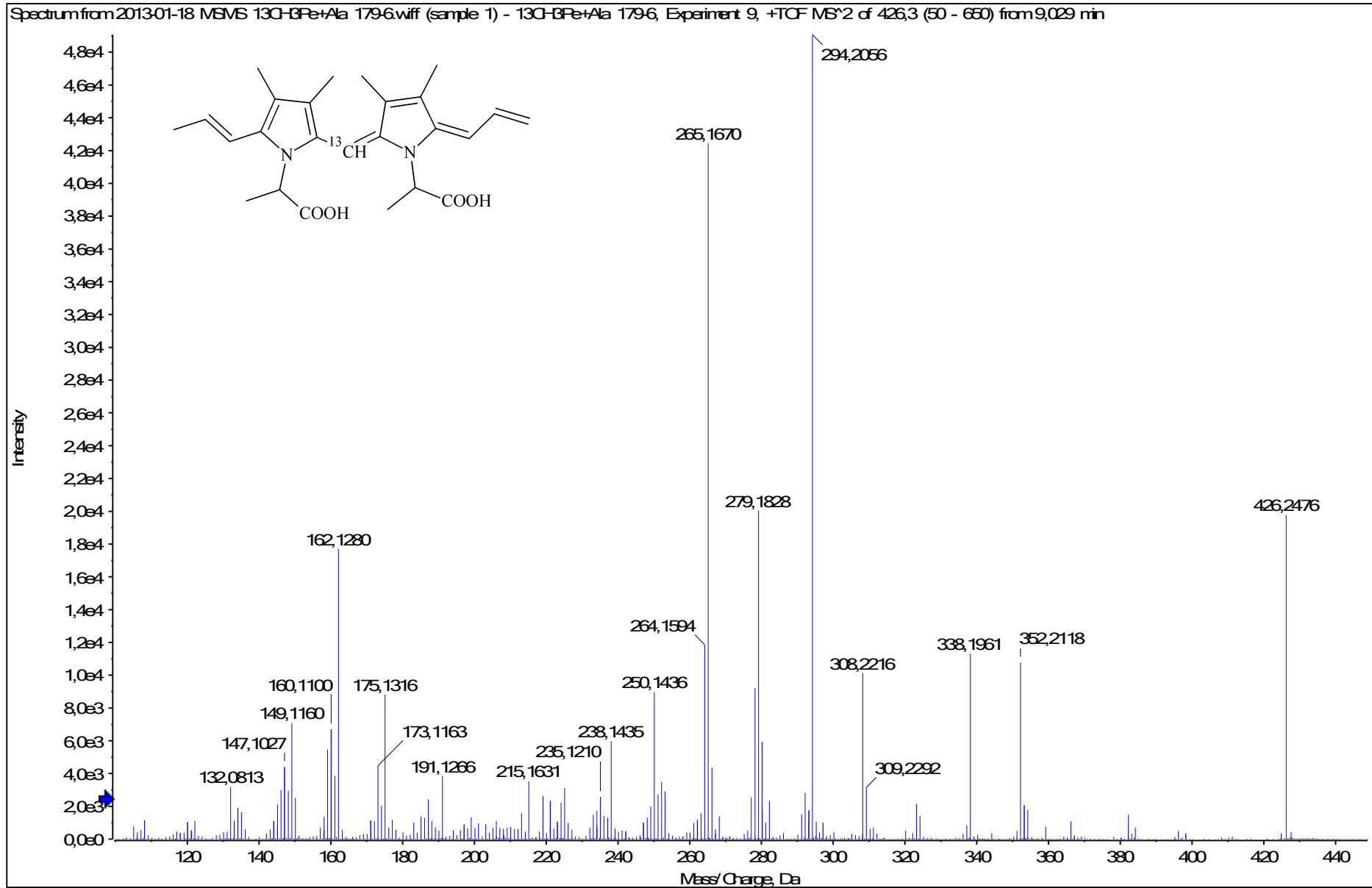
HRMS/MS spektrum látky LO-424



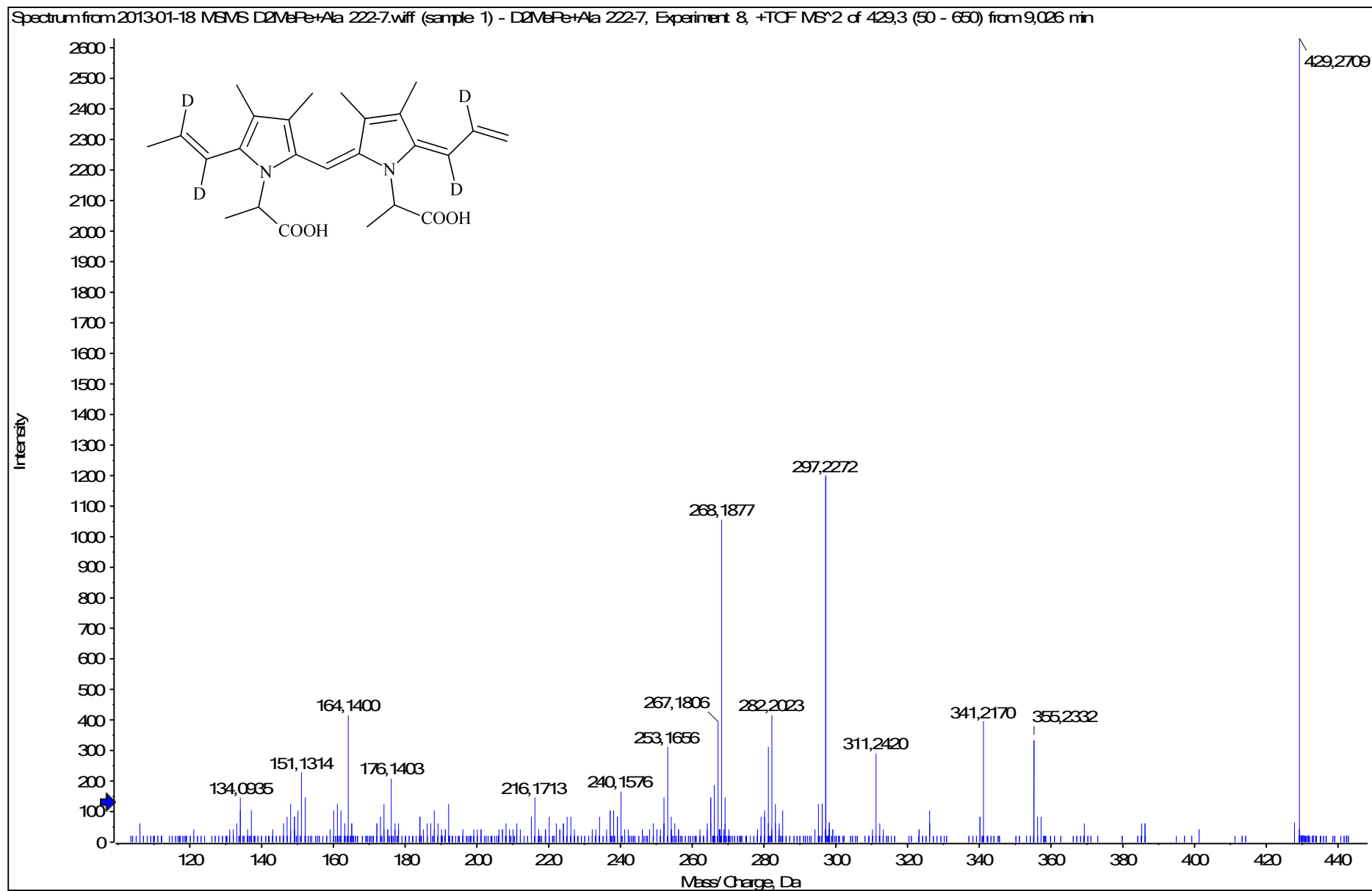
HRMS/MS spektrum látky LO-424



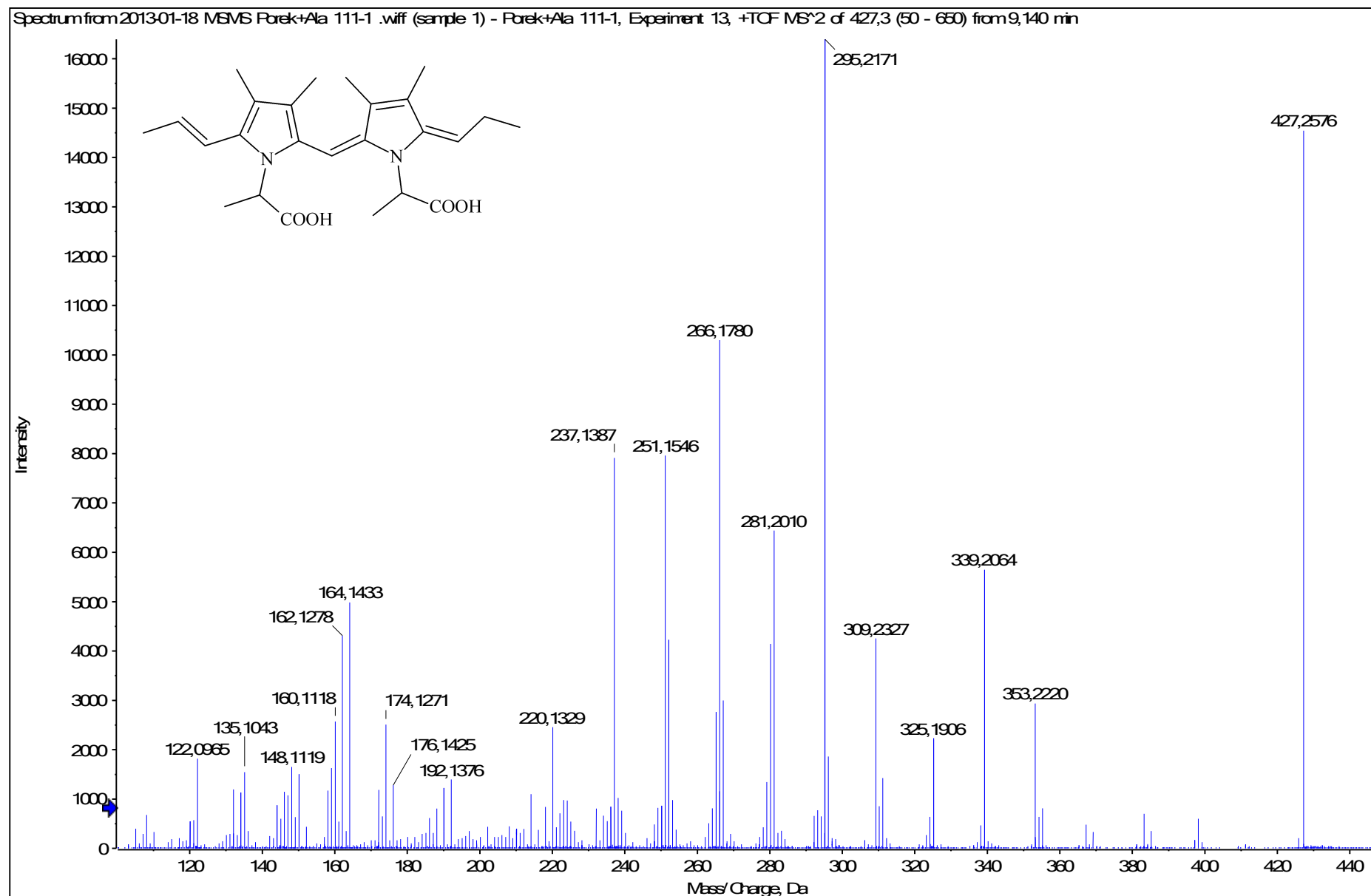
HRMS/MS spektrum látky LO-424



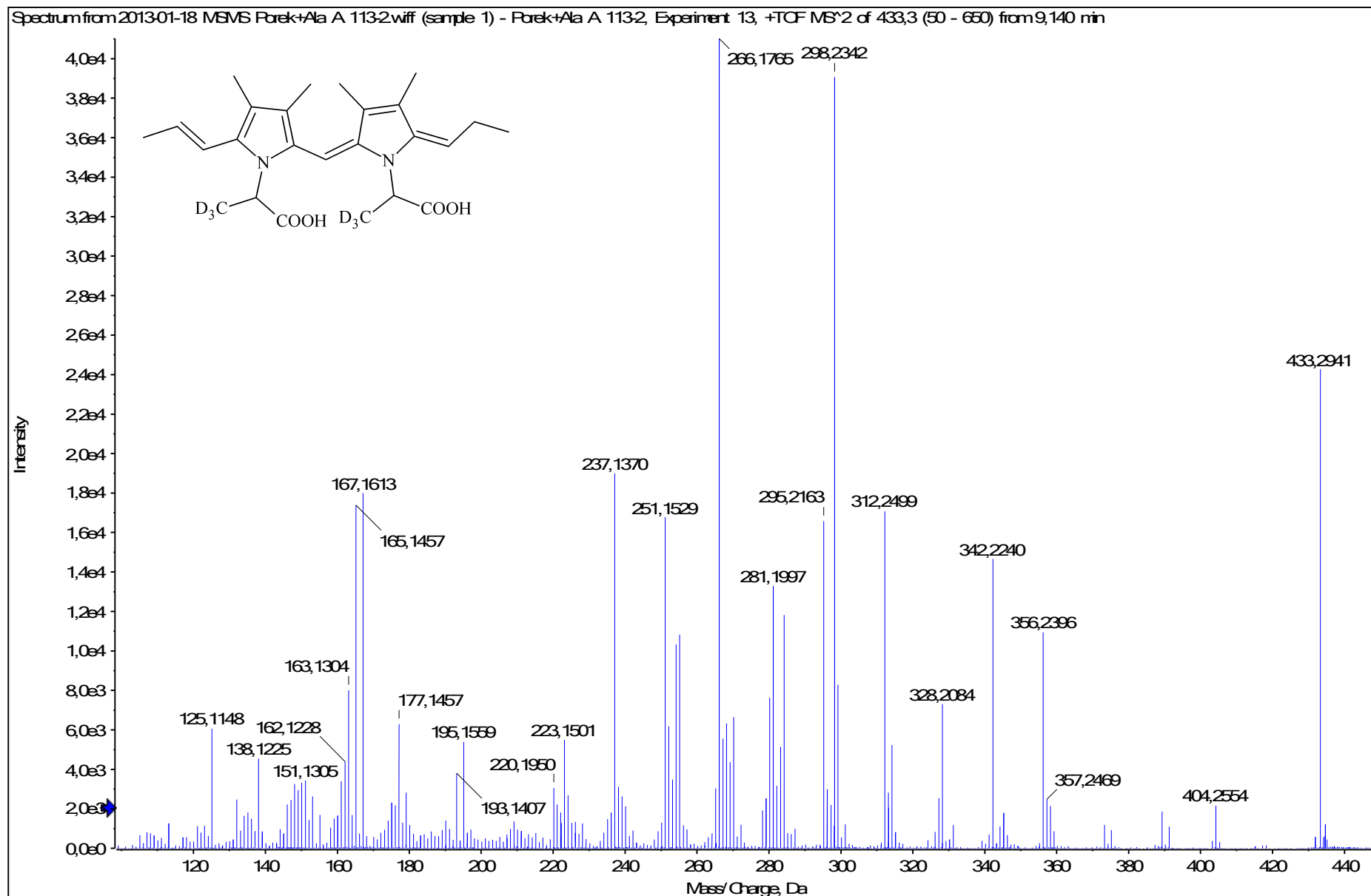
HRMS/MS spektrum látky LO-424



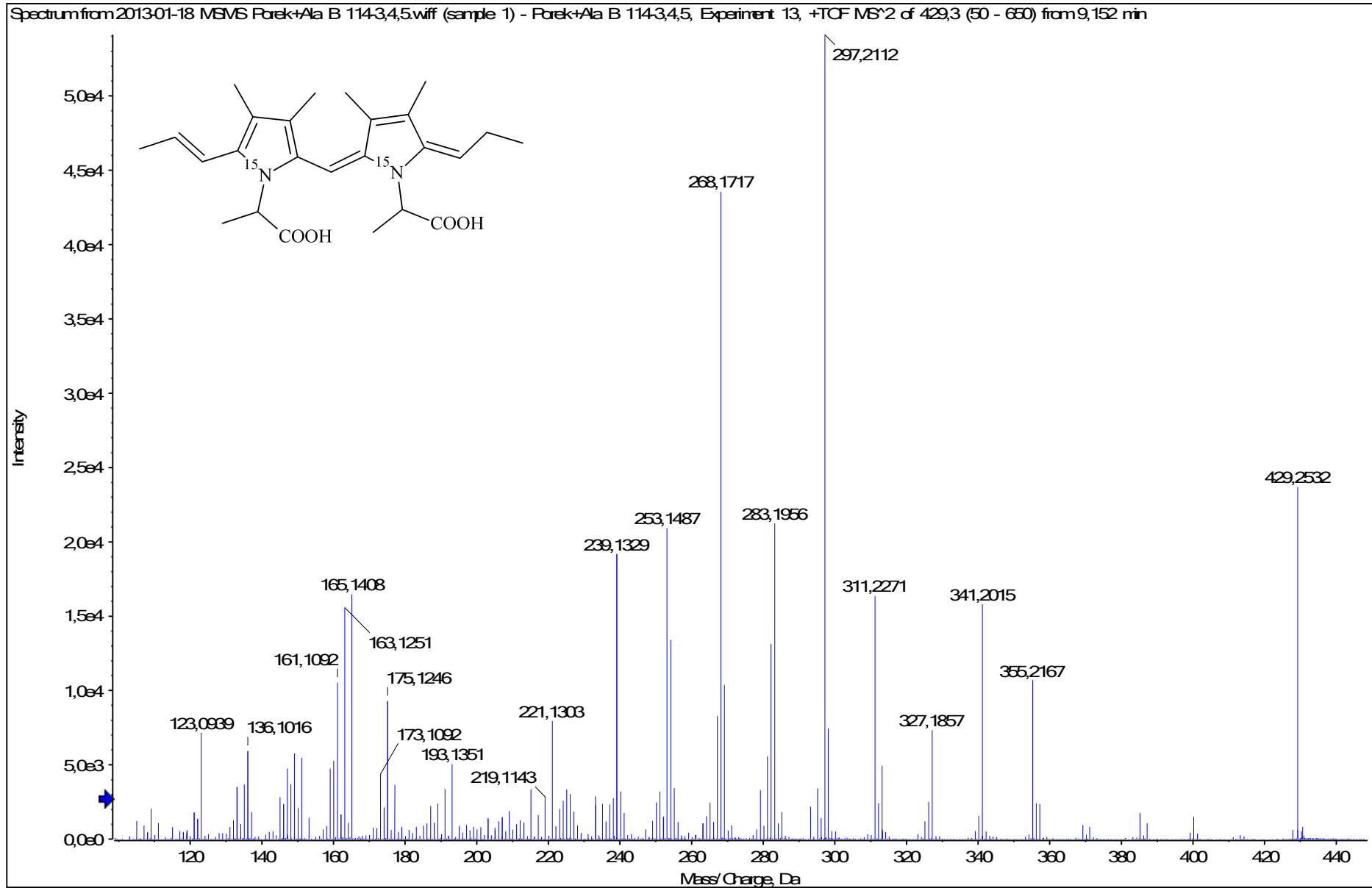
HRMS/MS spektrum látky LO-426



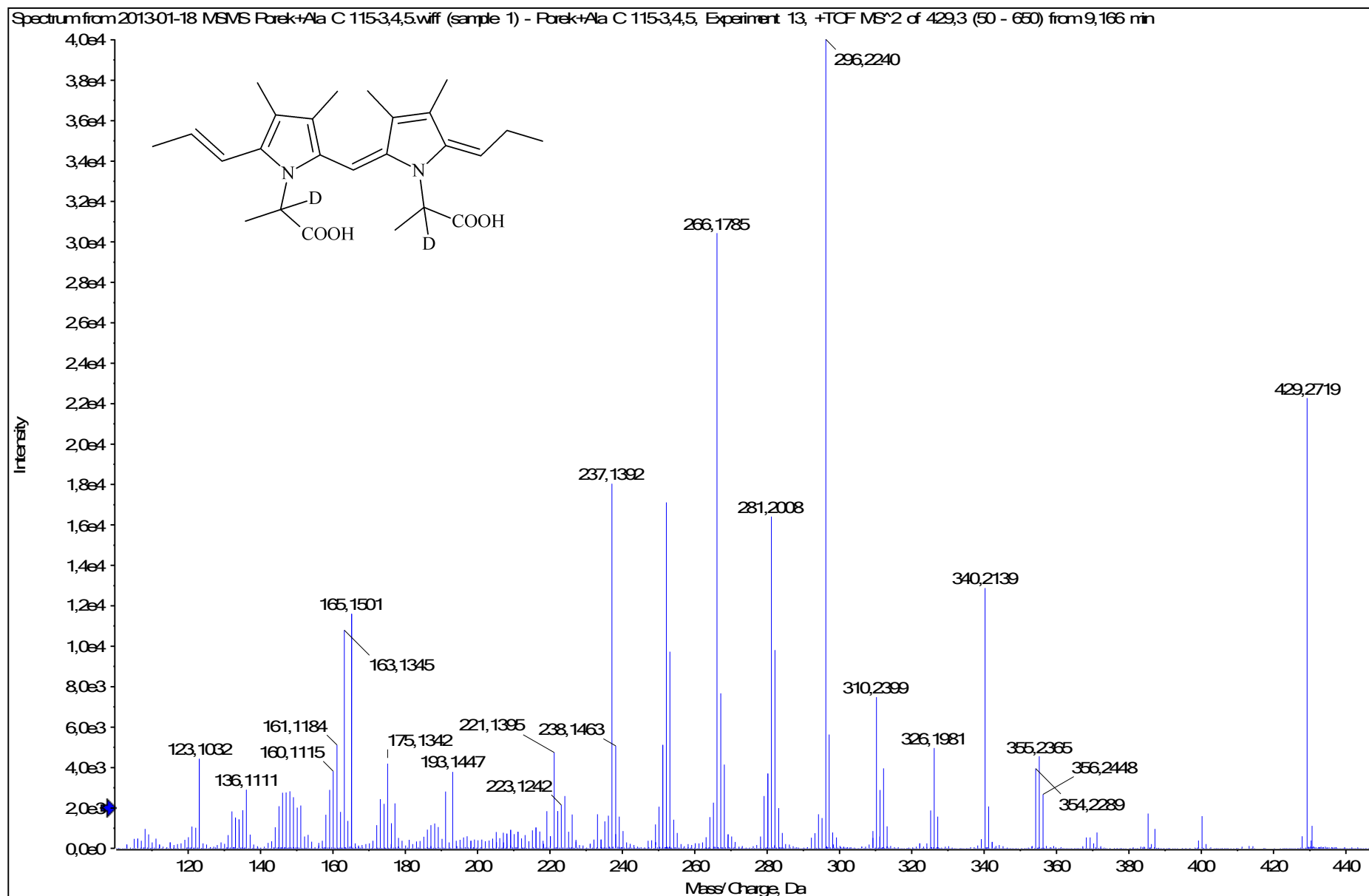
HRMS/MS spektrum látky LO-426



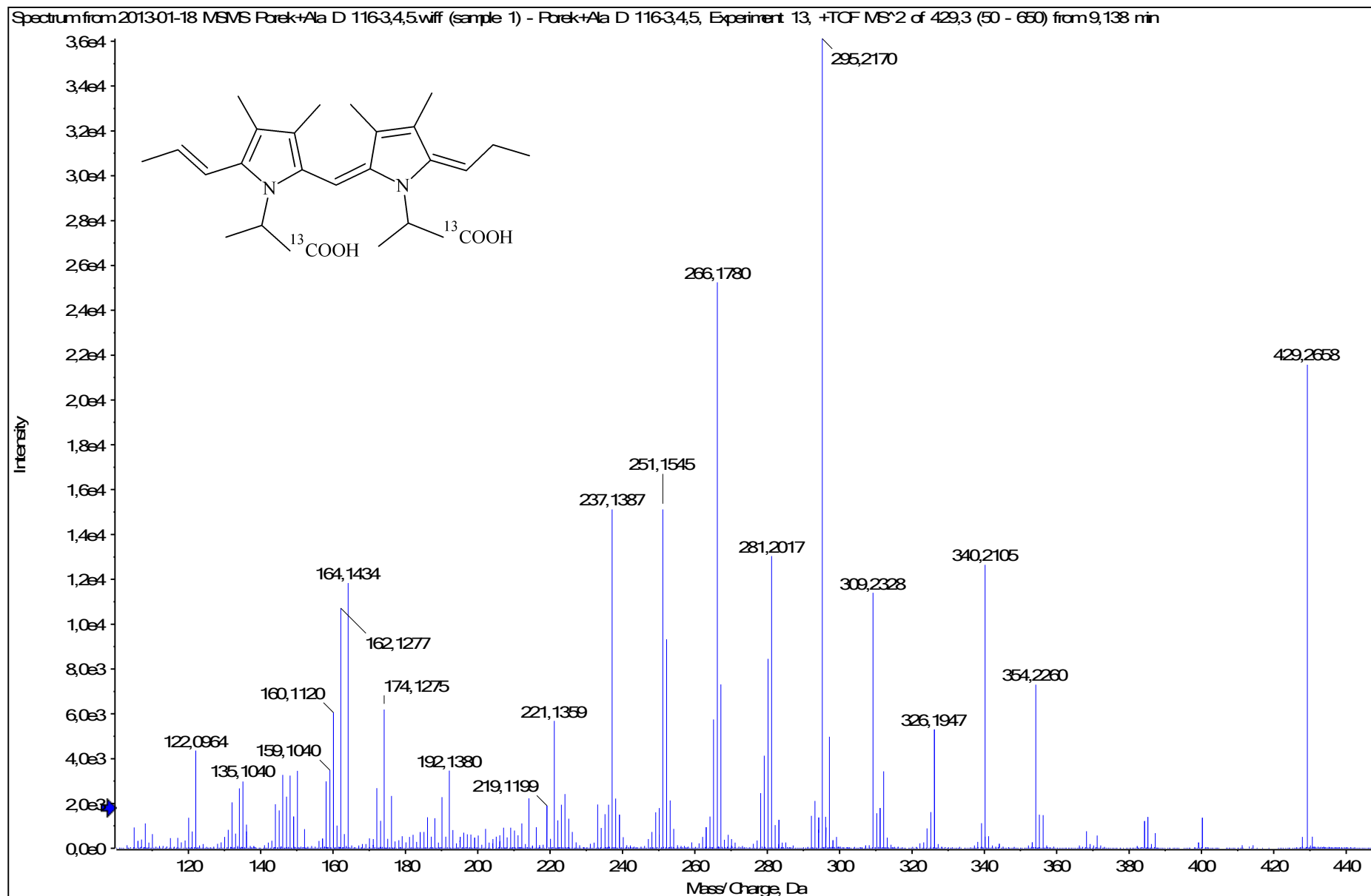
HRMS/MS spektrum látky LO-426



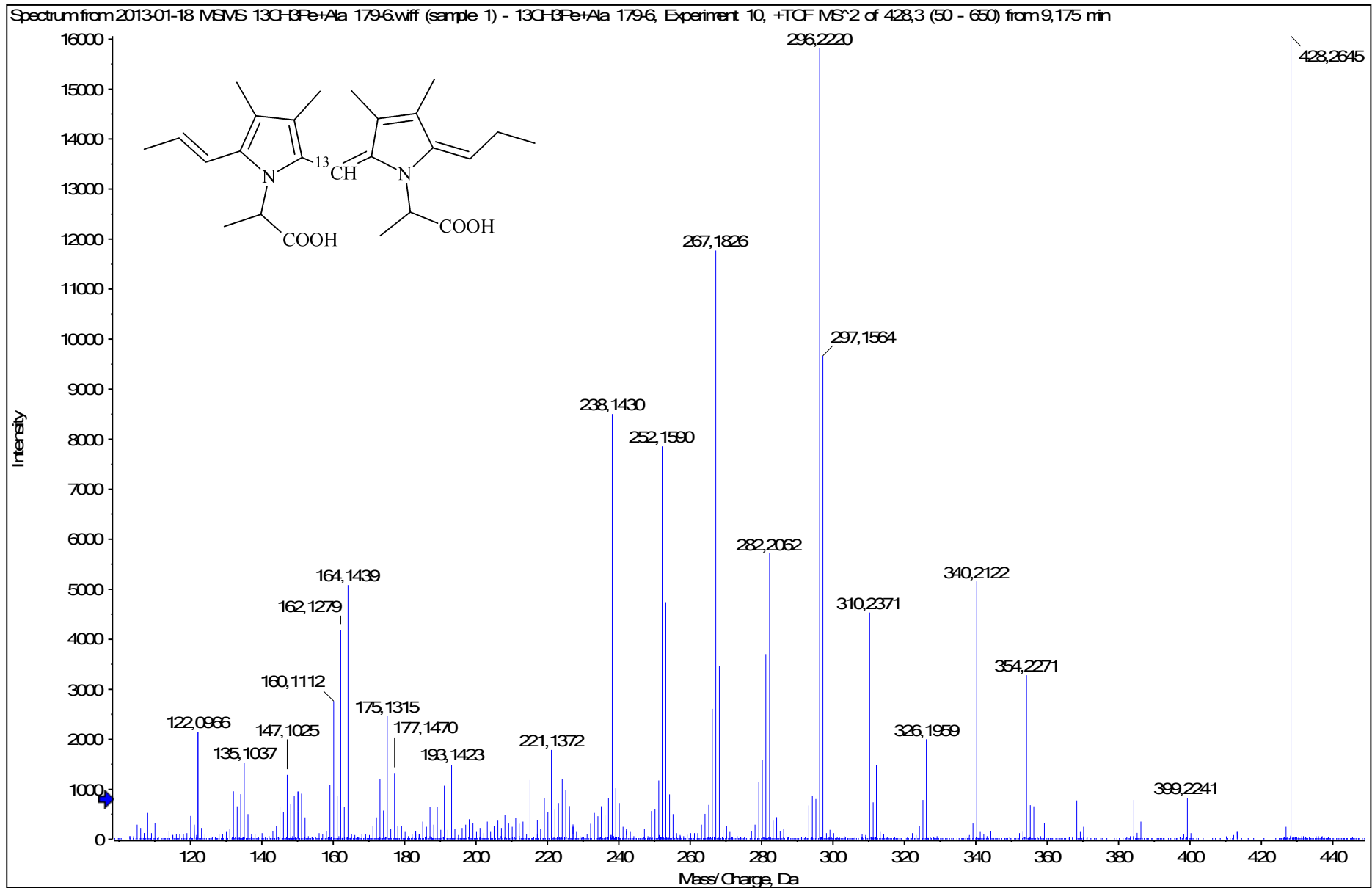
HRMS/MS spektrum látky LO-426



HRMS/MS spektrum látky LO-426

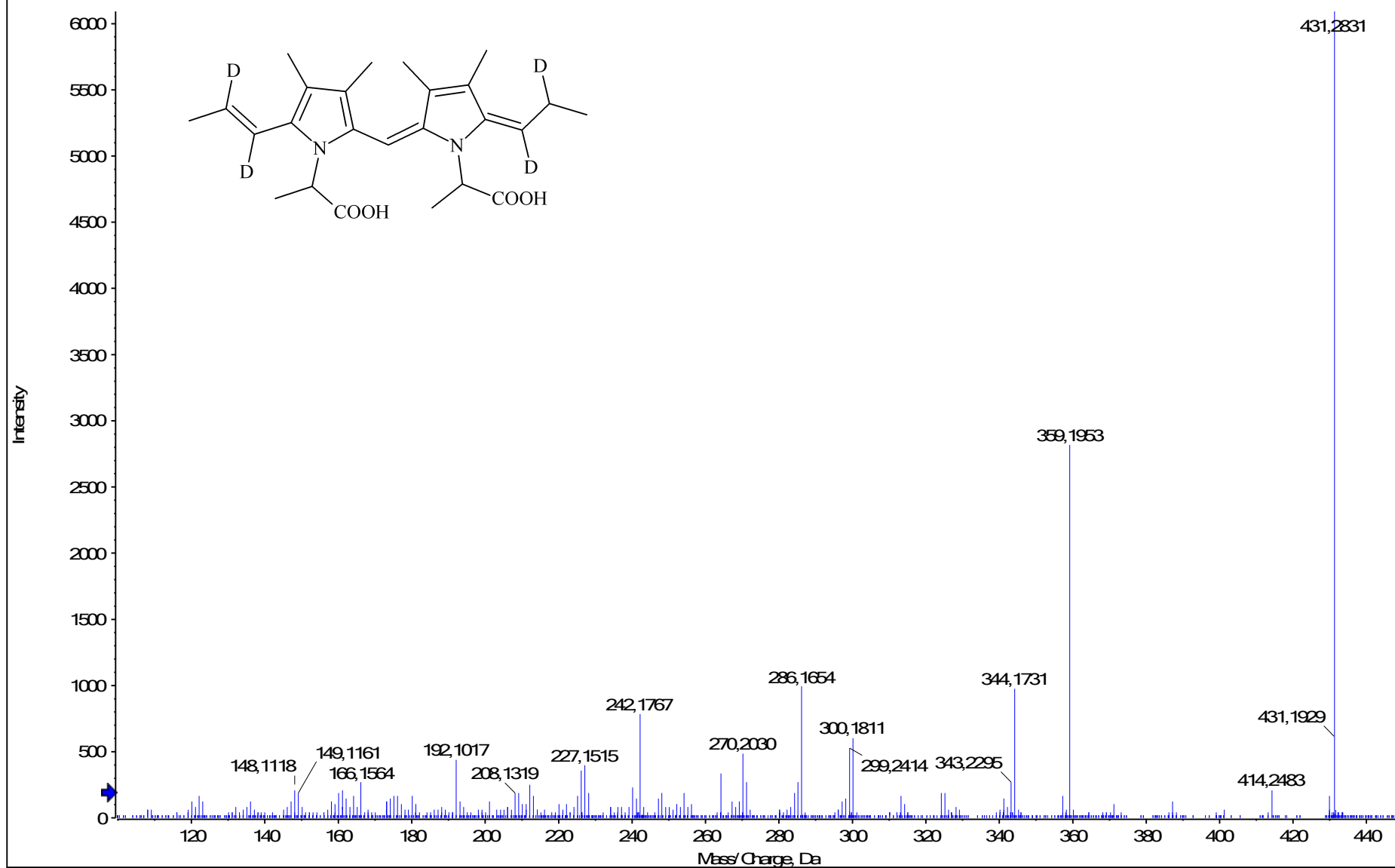


HRMS/MS spektrum látky LO-426

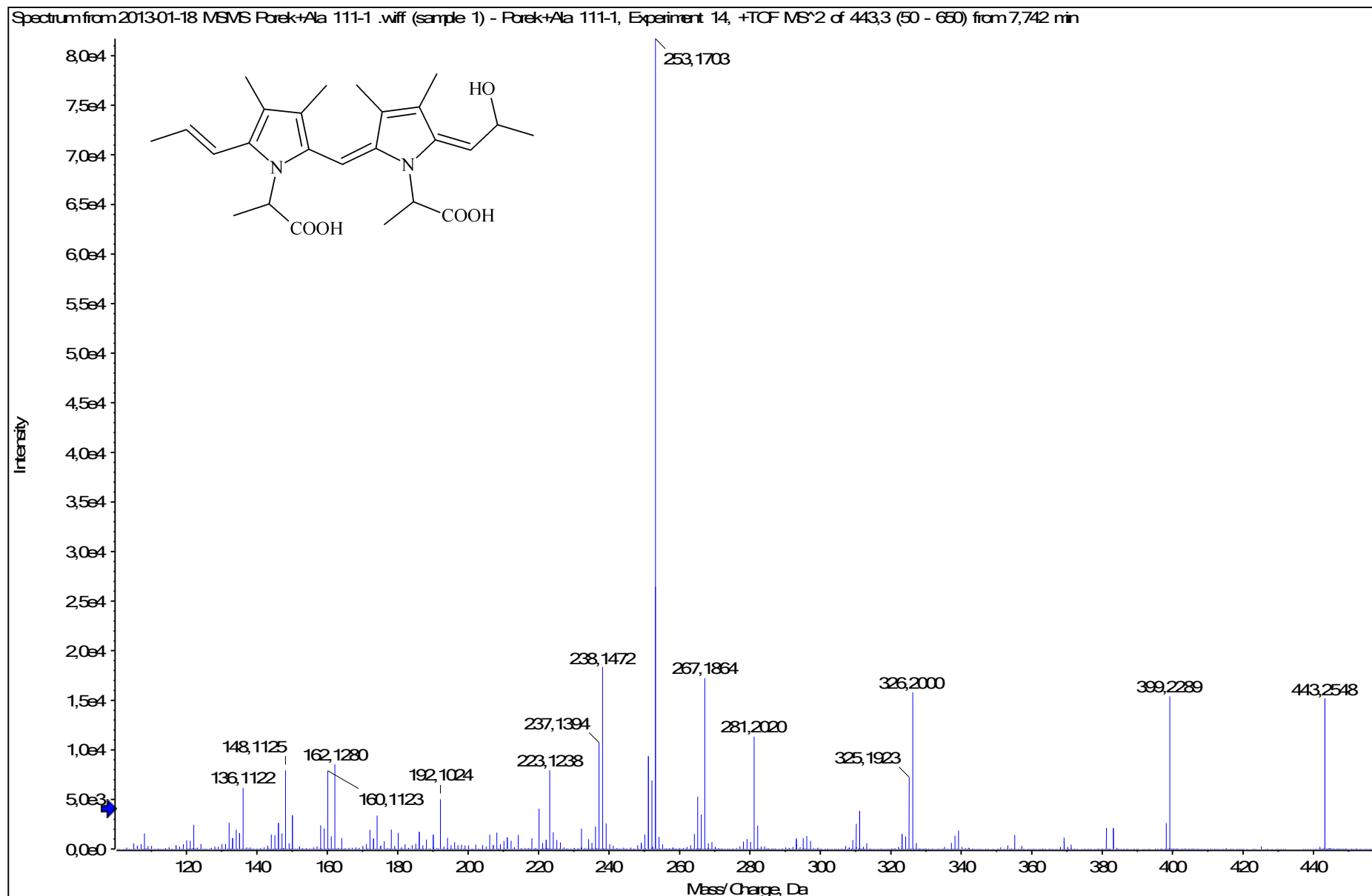


HRMS/MS spektrum látky LO-426

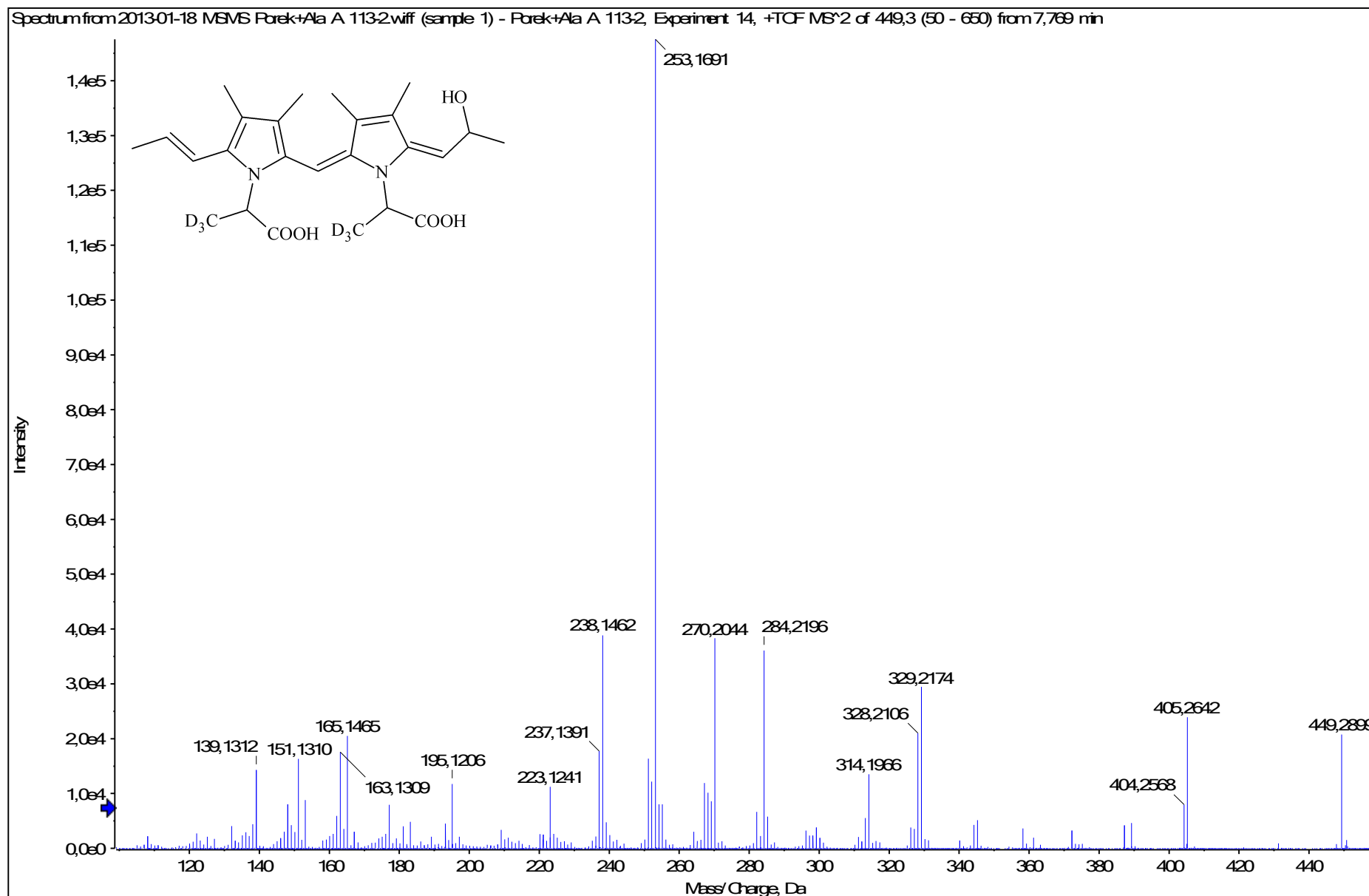
Spectrum from 2012-12-19 D2MePe + Alawiff (sample 1) - D2MePe + Ala (222), Experiment 6, +TOF MS² (50 - 800) from 9,148 min
Precursor: 431,3 Da, CE 35,0



HRMS/MS spektrum látky LO-442

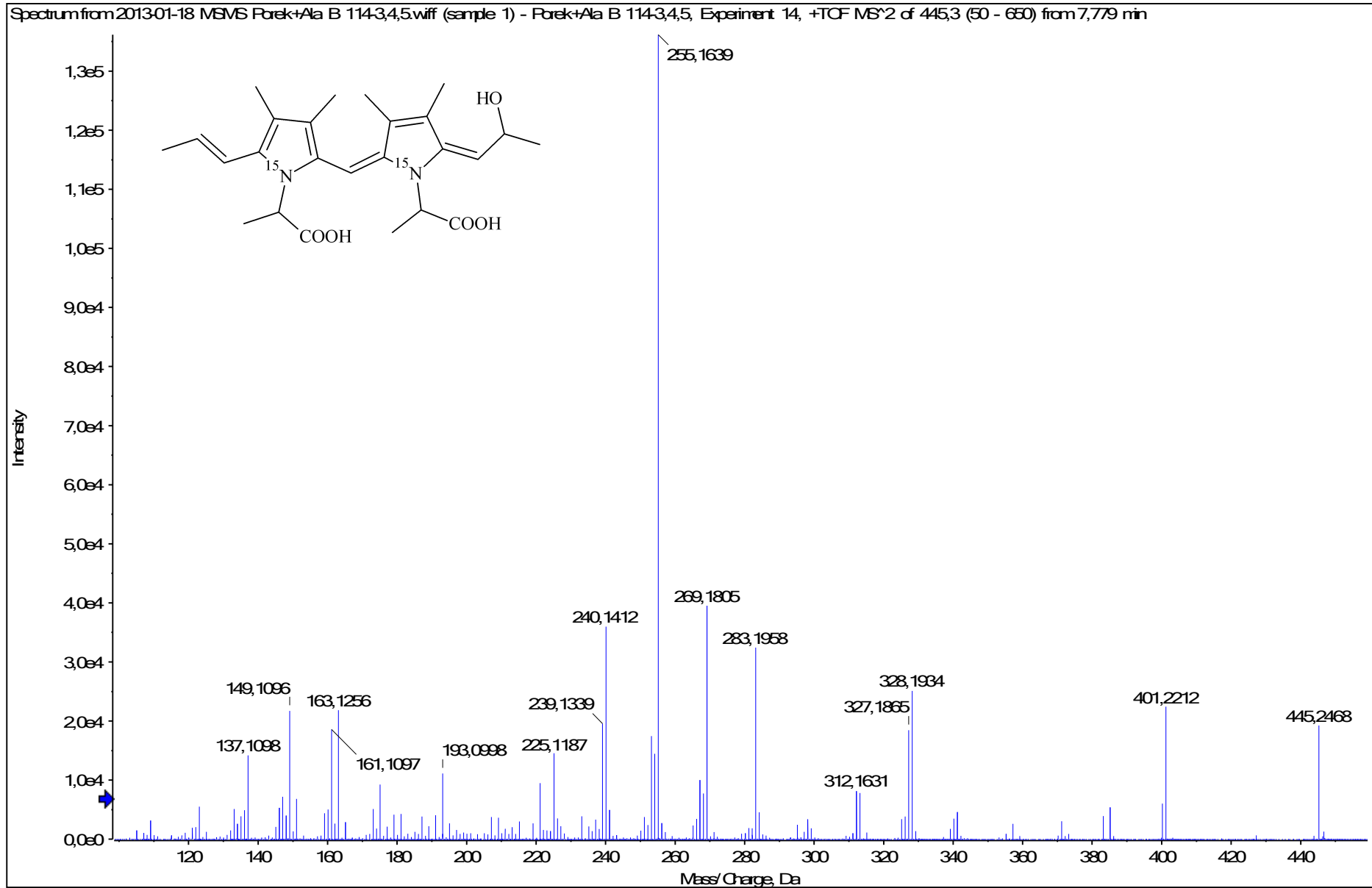


HRMS/MS spektrum látky LO-442

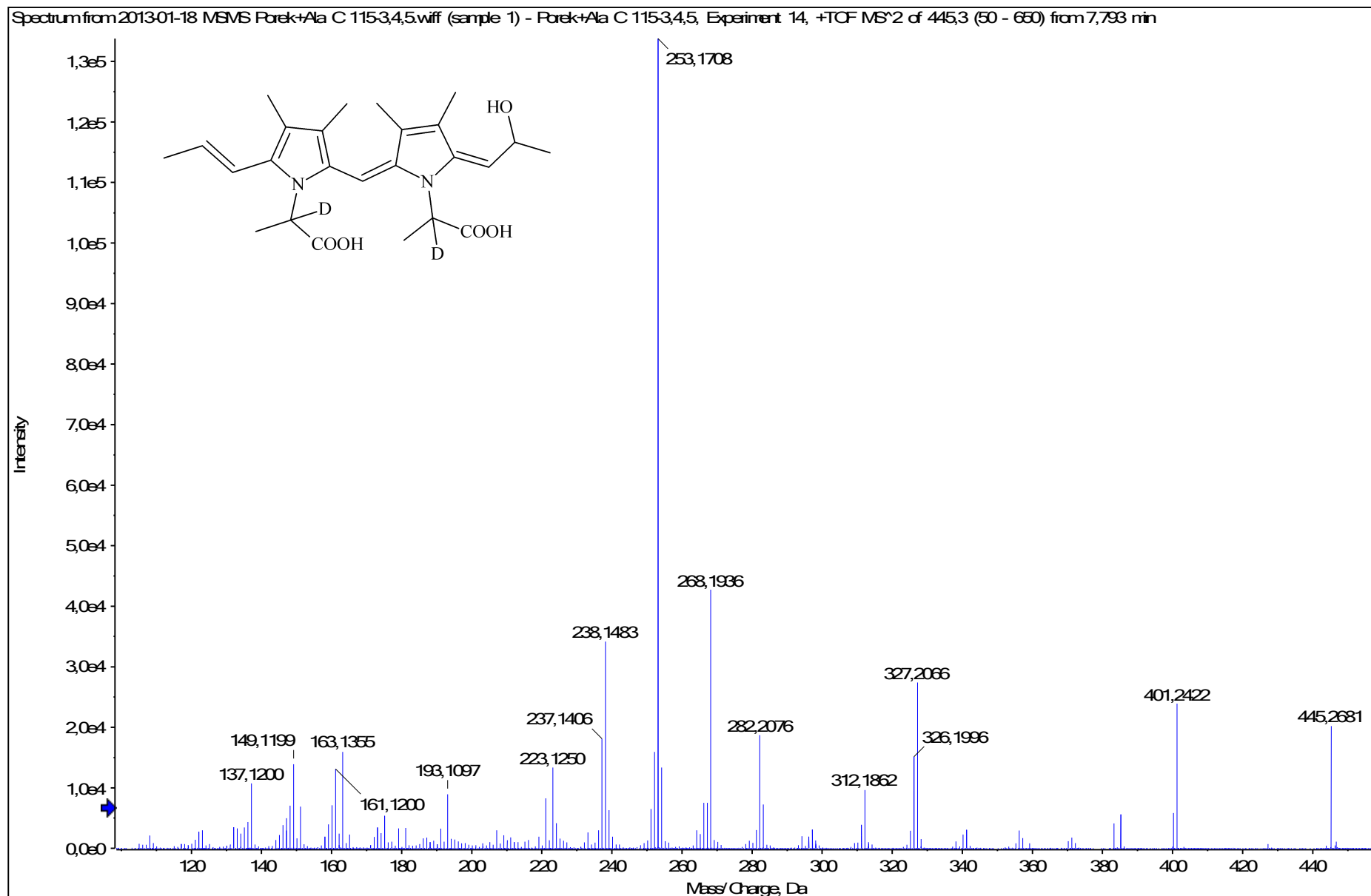


11.2.2013 18:52:36

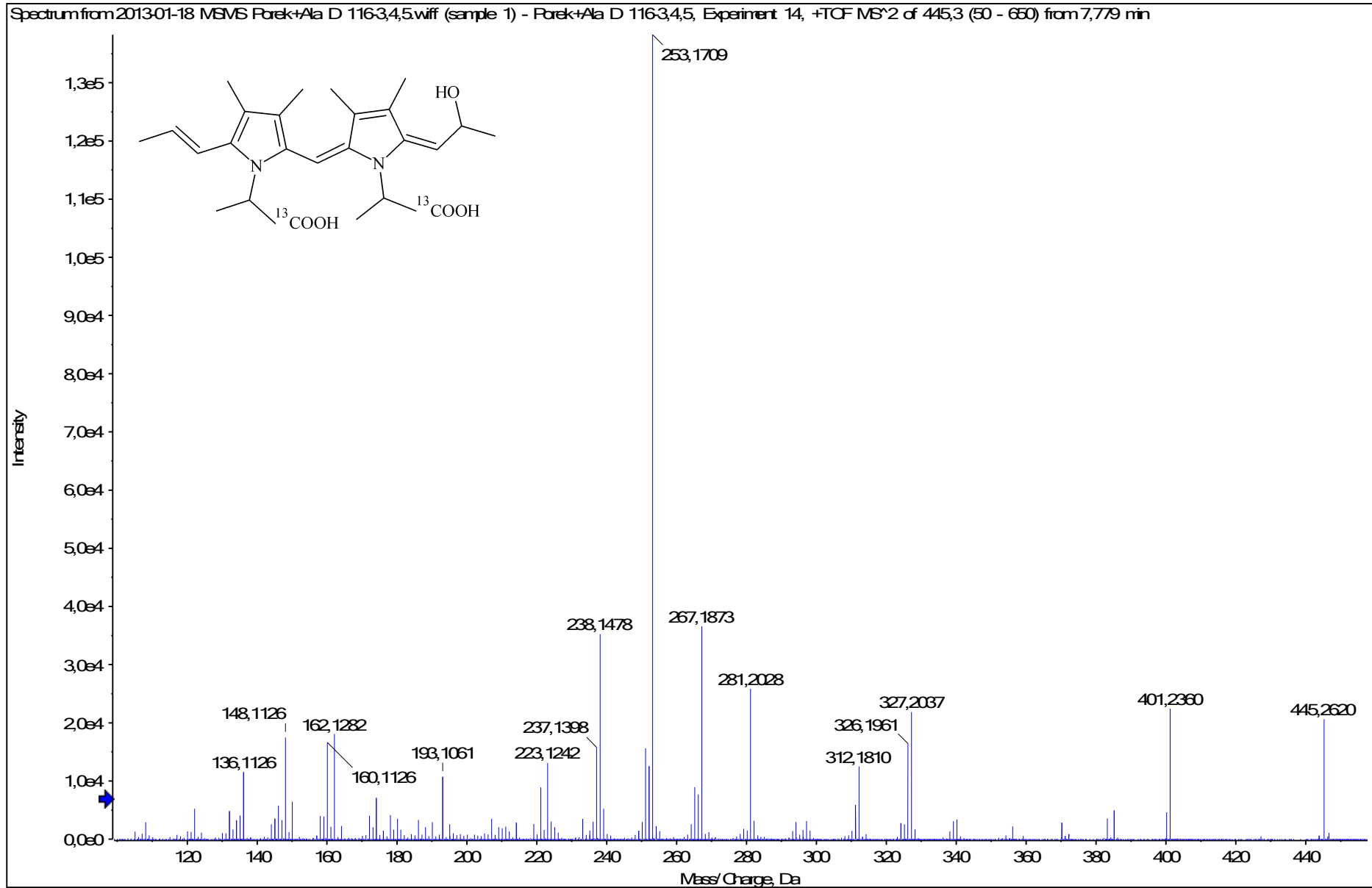
HRMS/MS spektrum látky LO-442



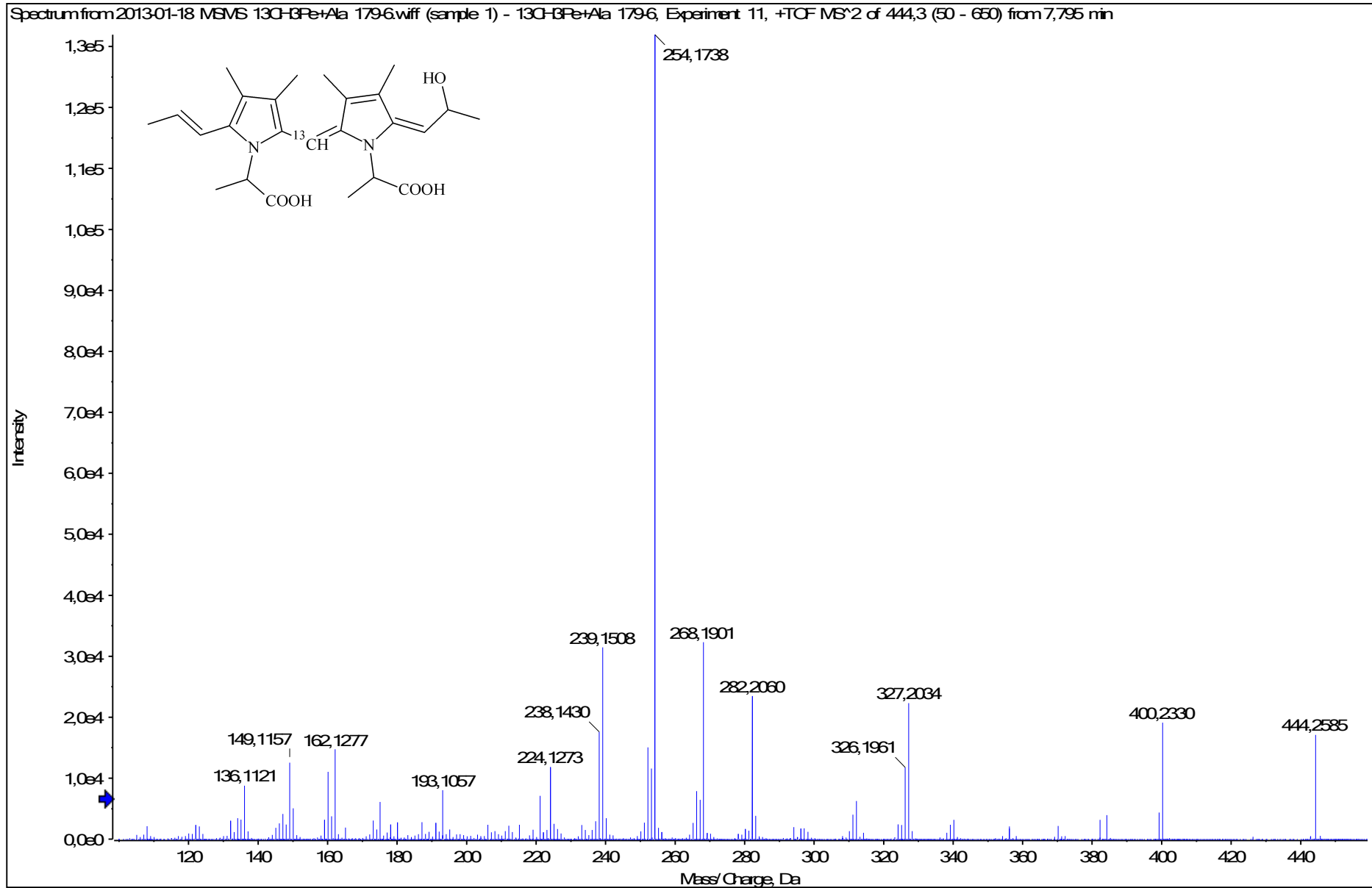
HRMS/MS spektrum látky LO-442



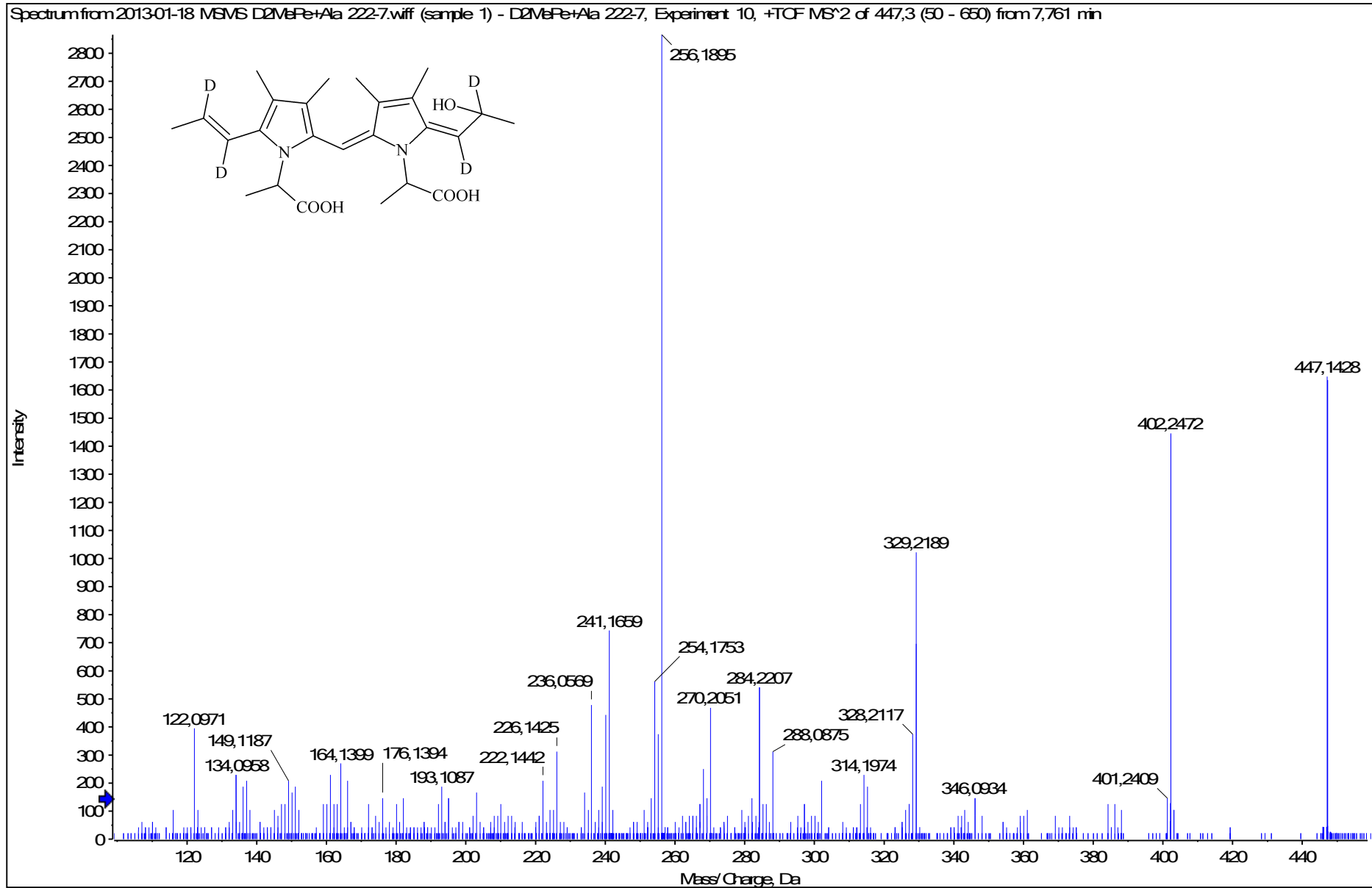
HRMS/MS spektrum látky LO-442



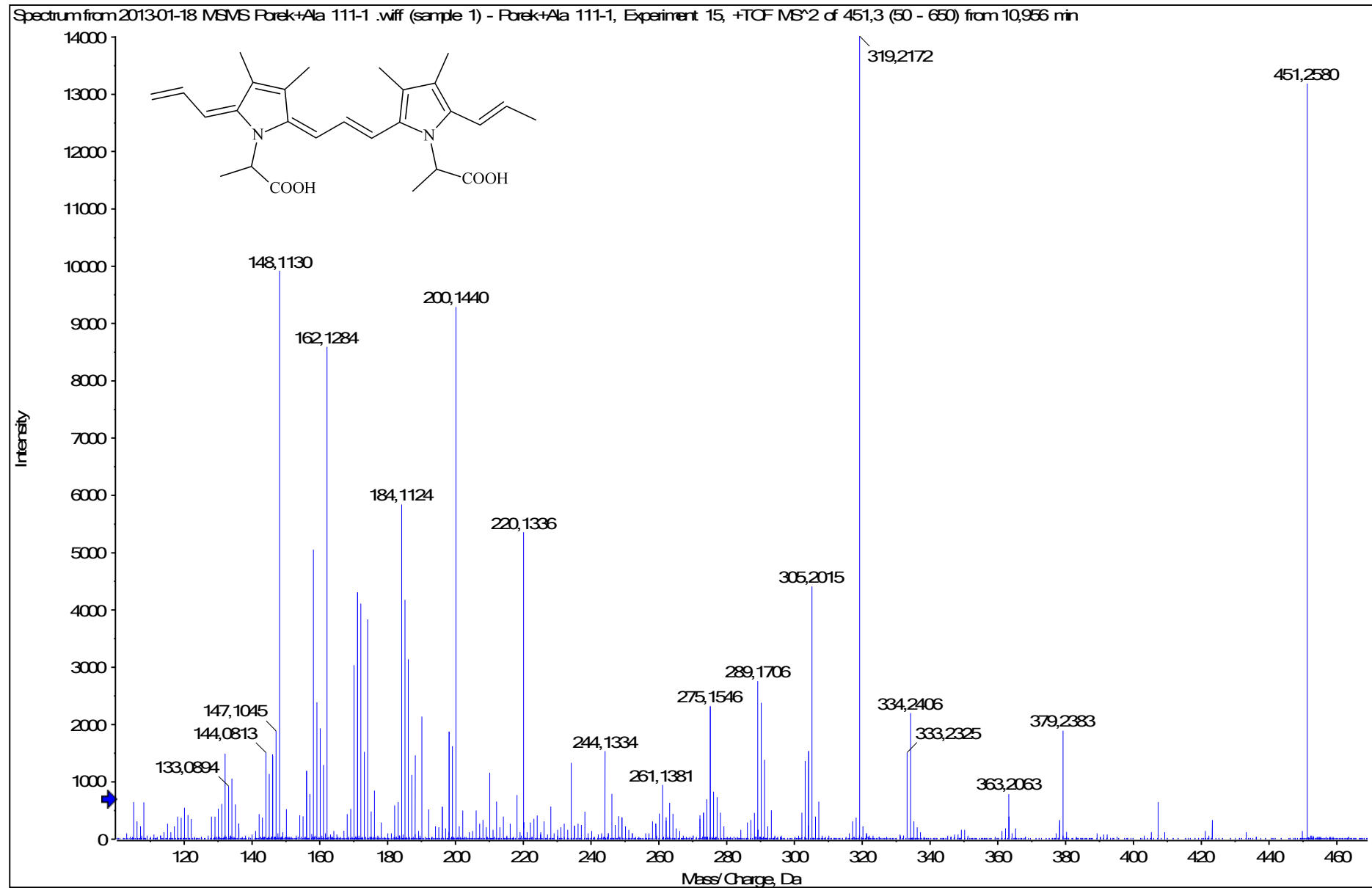
HRMS/MS spektrum látky LO-442



HRMS/MS spektrum látky LO-442

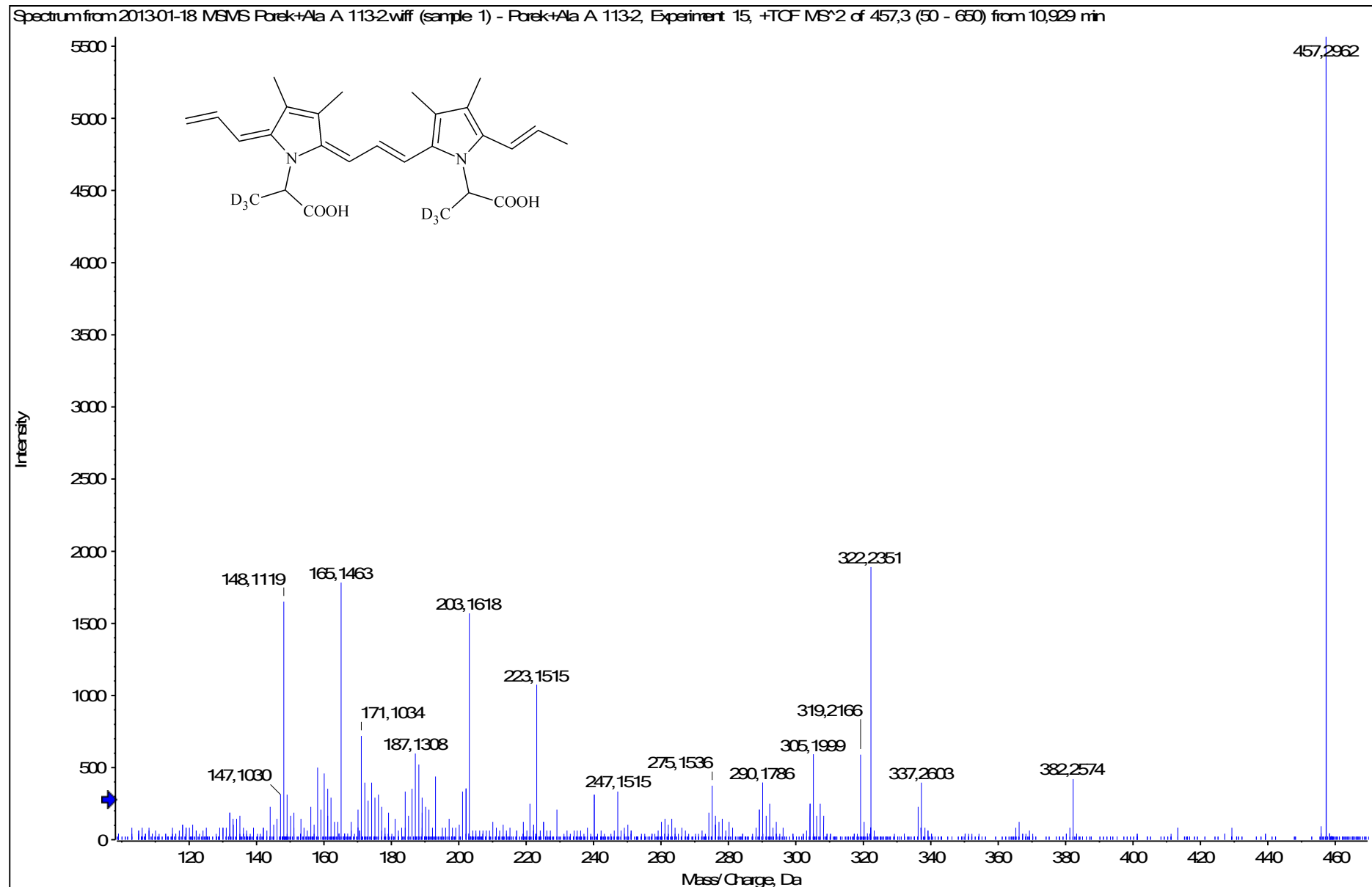


HRMS/MS spektrum látky LO-450

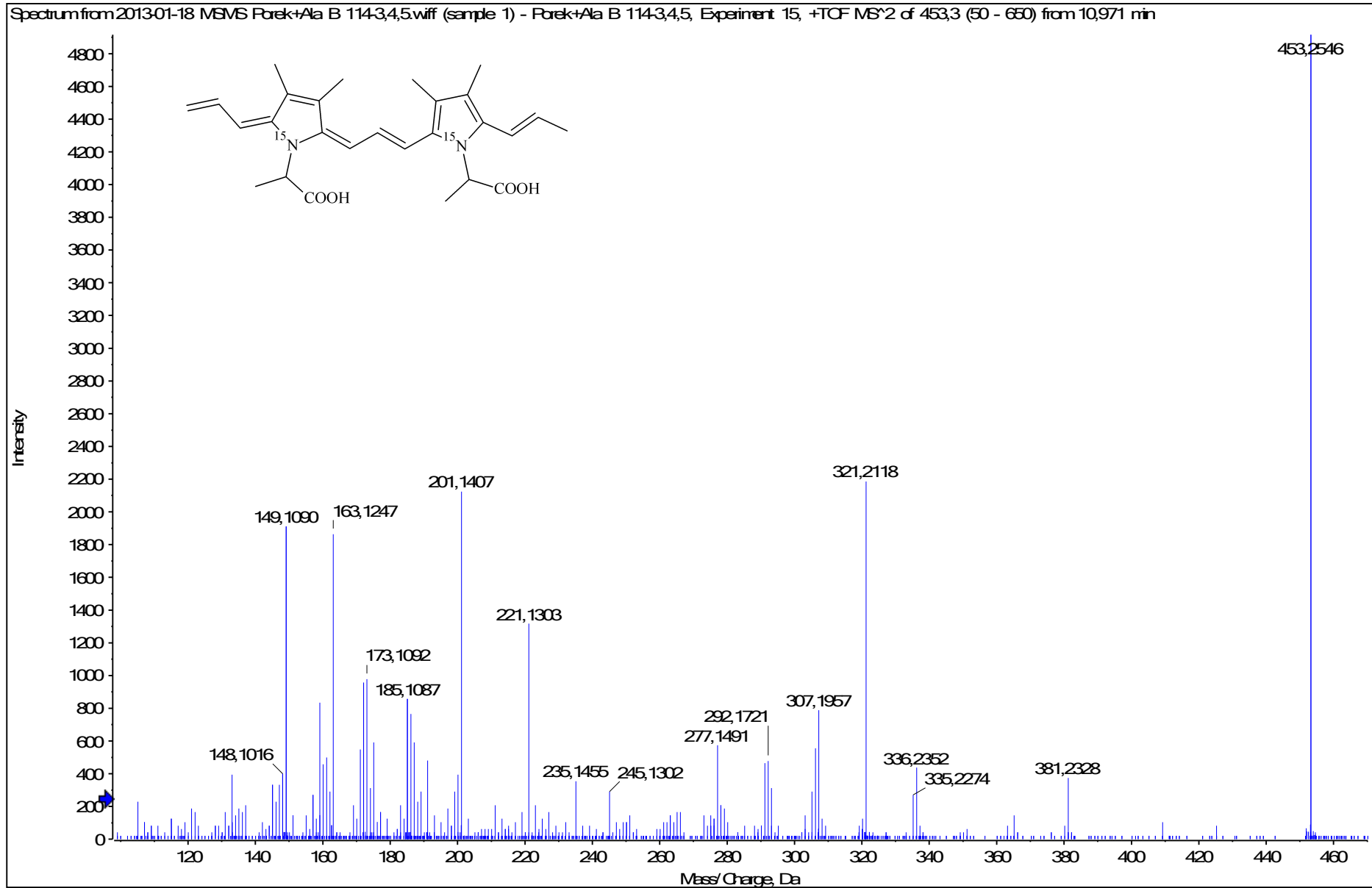


11.2.2013 19:53:08

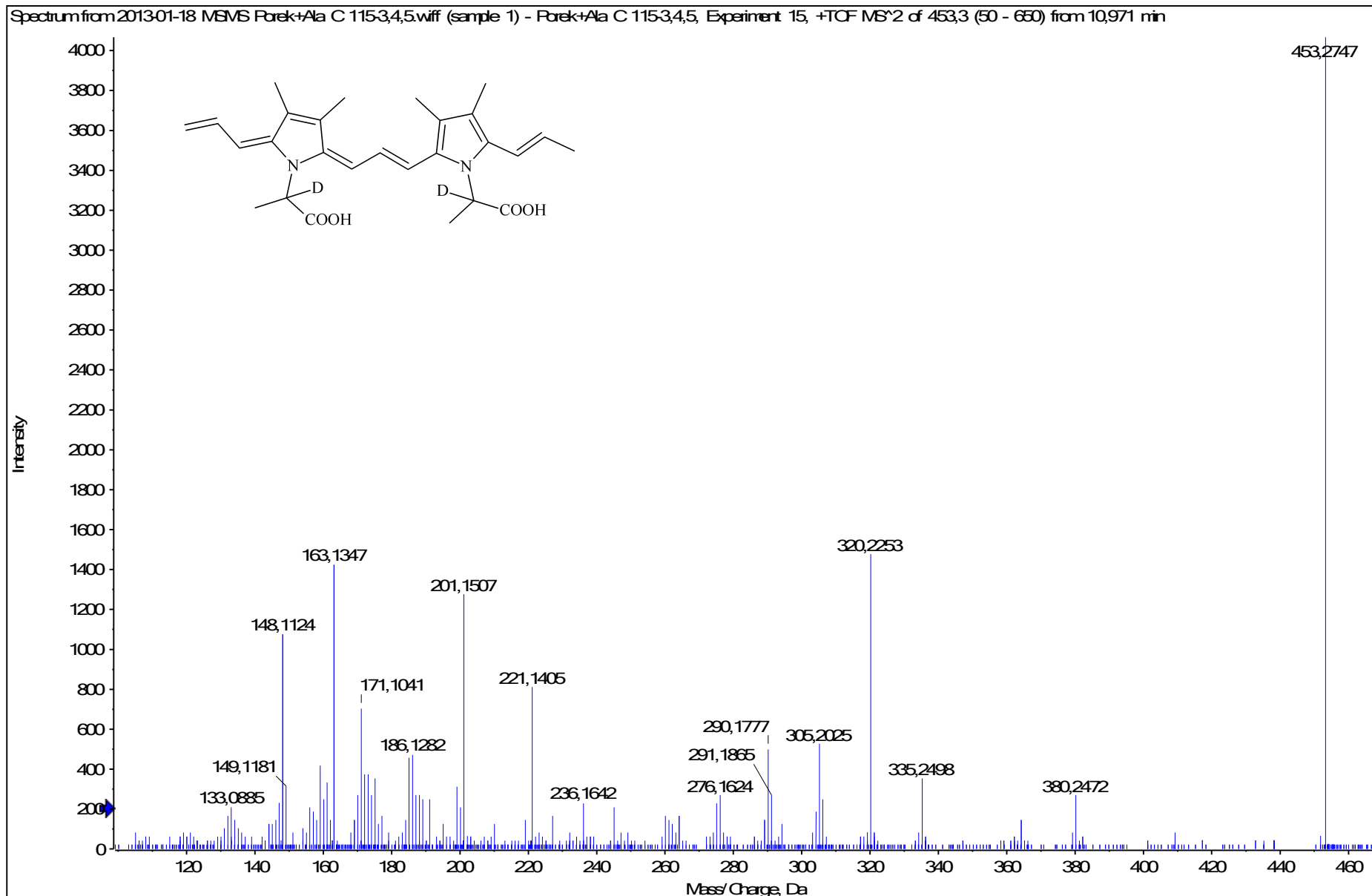
HRMS/MS spektrum látky LO-450



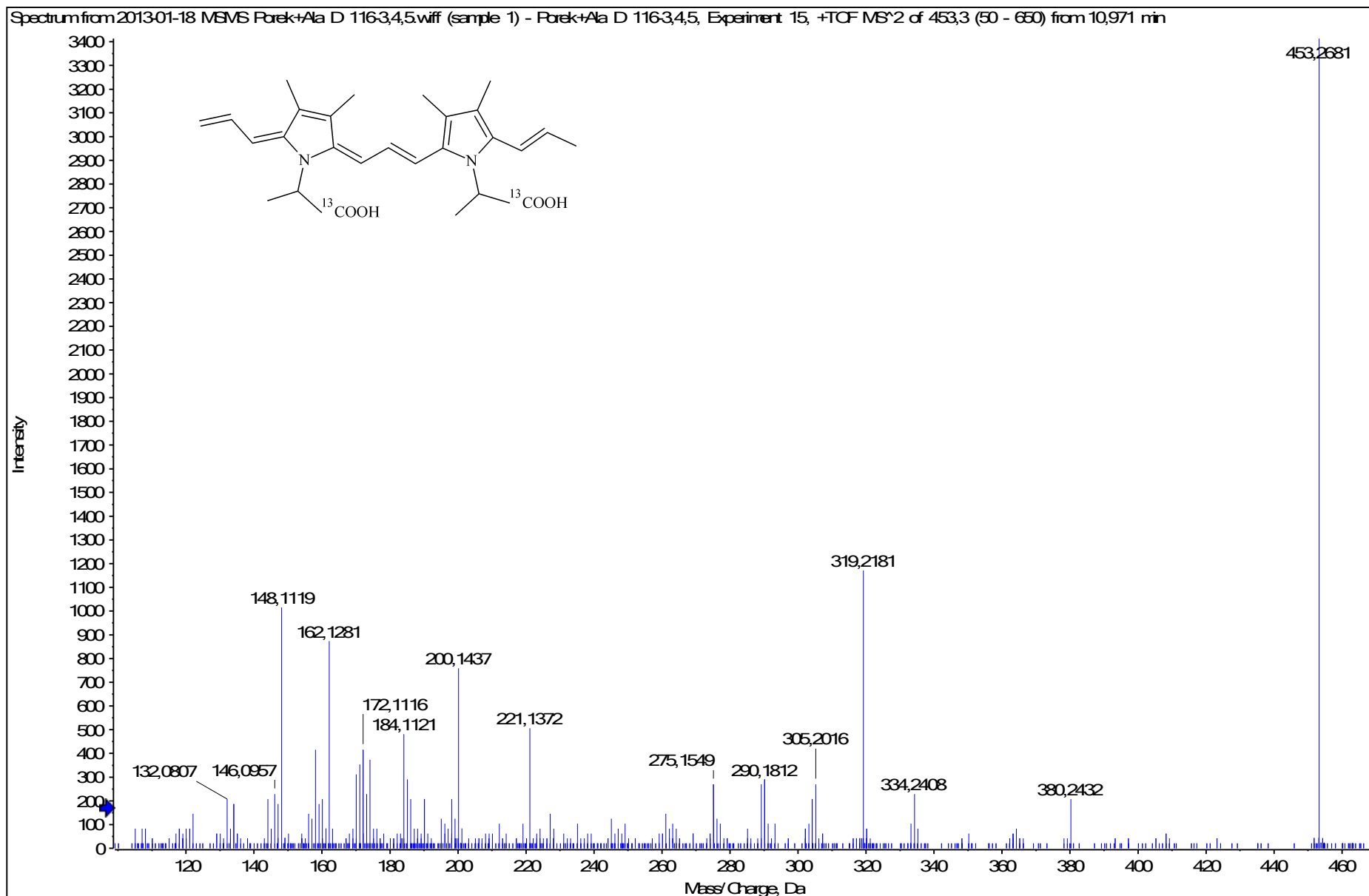
HRMS/MS spektrum látky LO-450



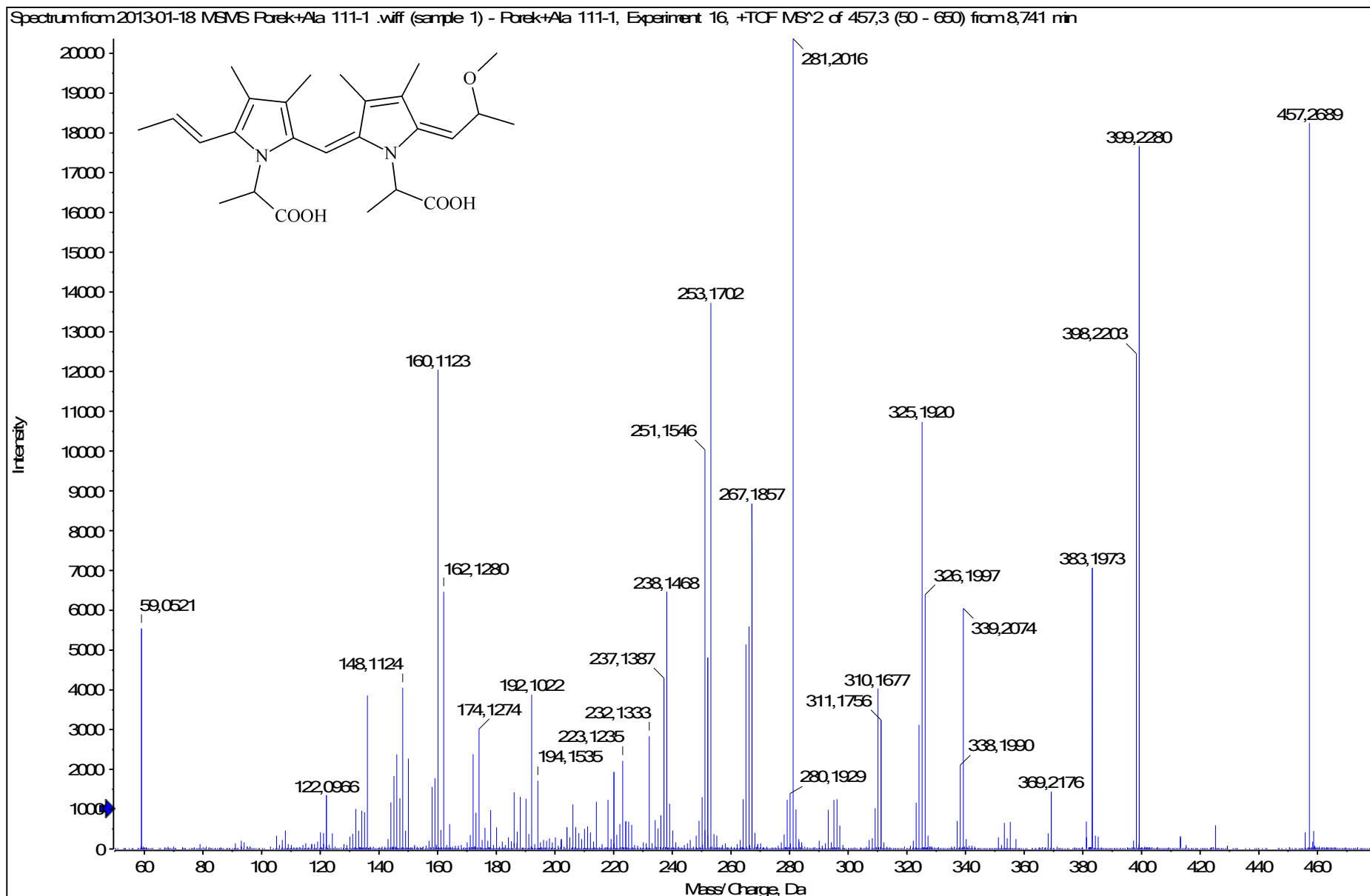
HRMS/MS spektrum látky LO-450



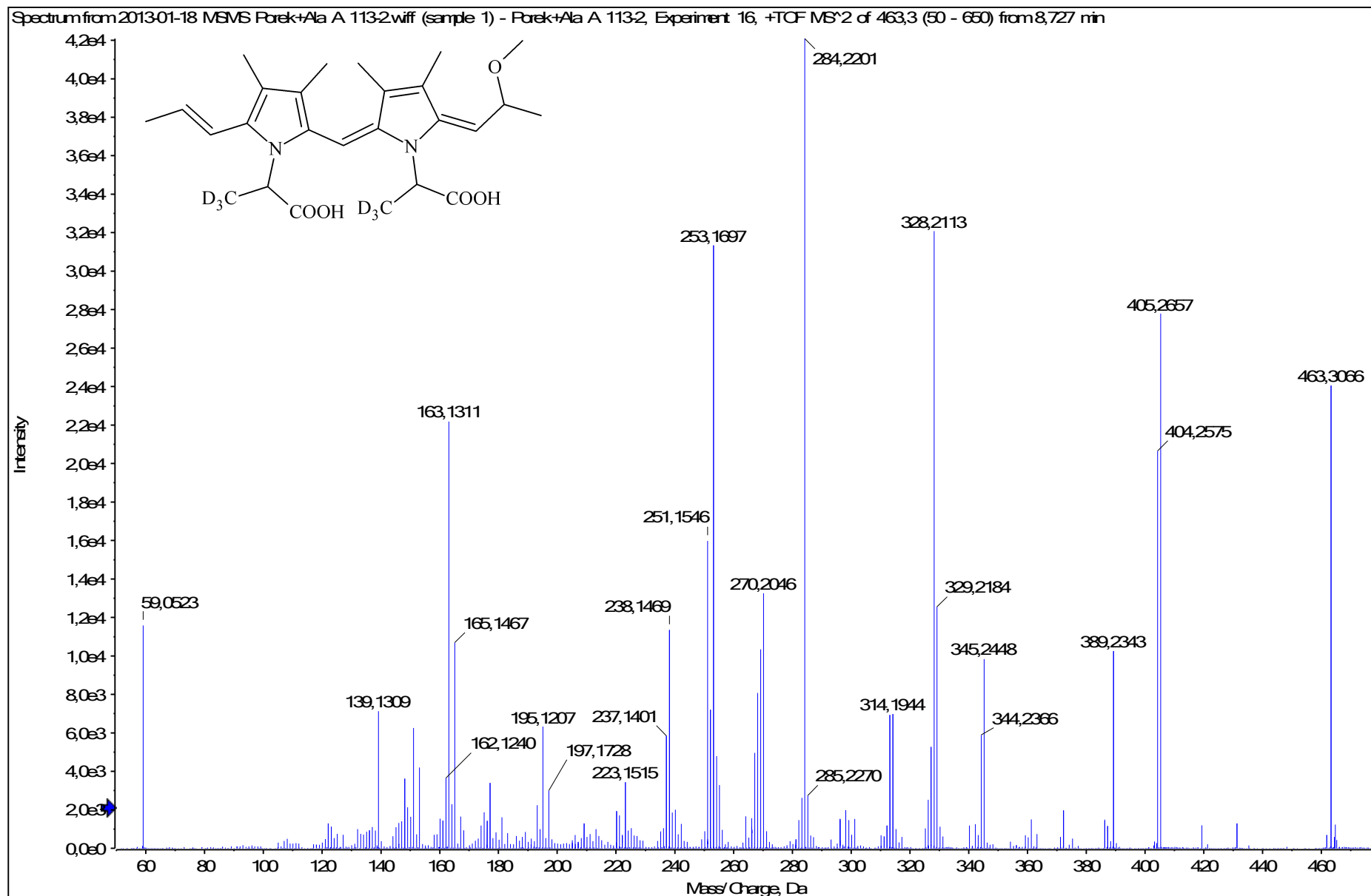
HRMS/MS spektrum látky LO-450



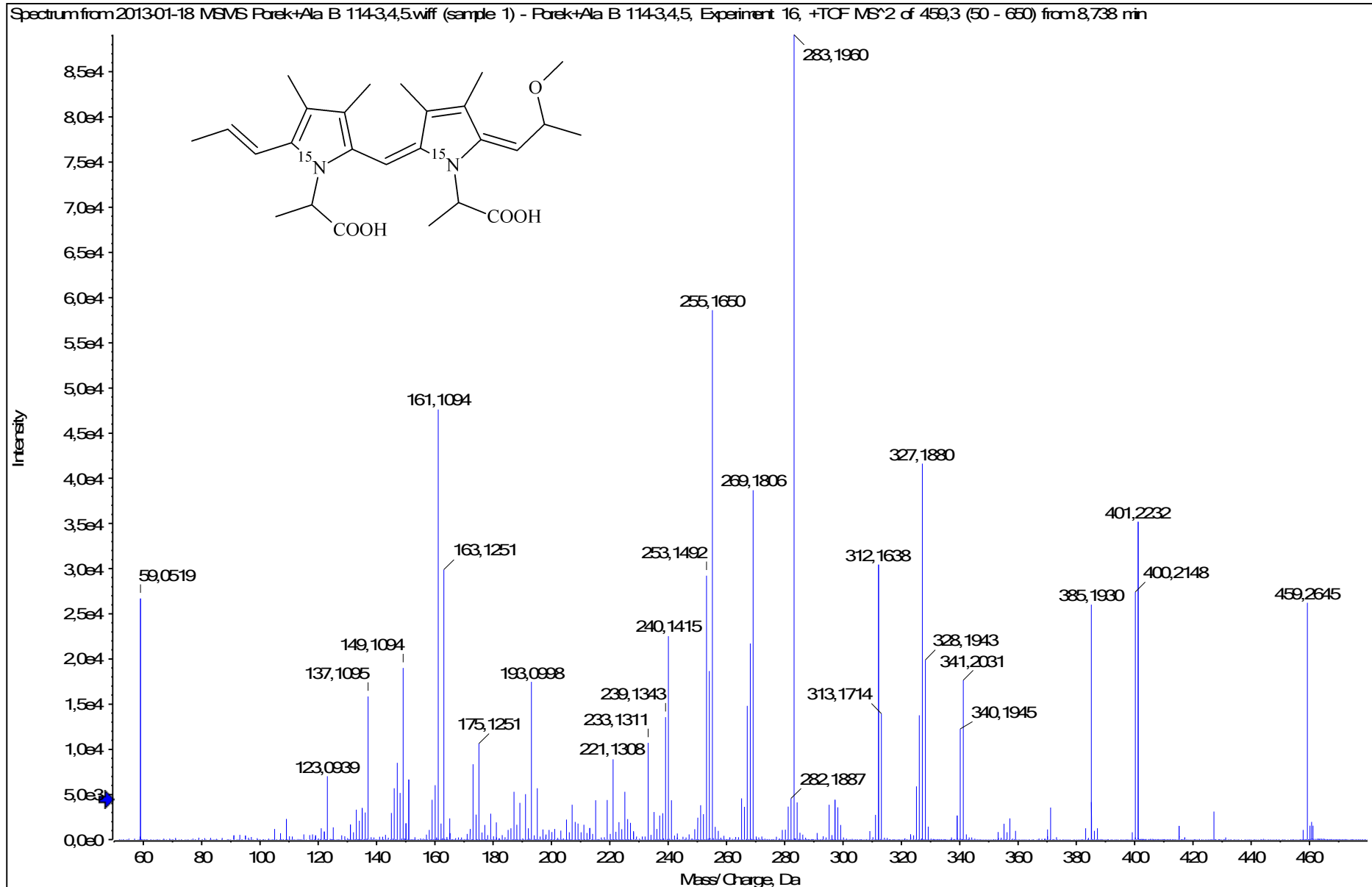
HRMS/MS spektrum látky LO-456



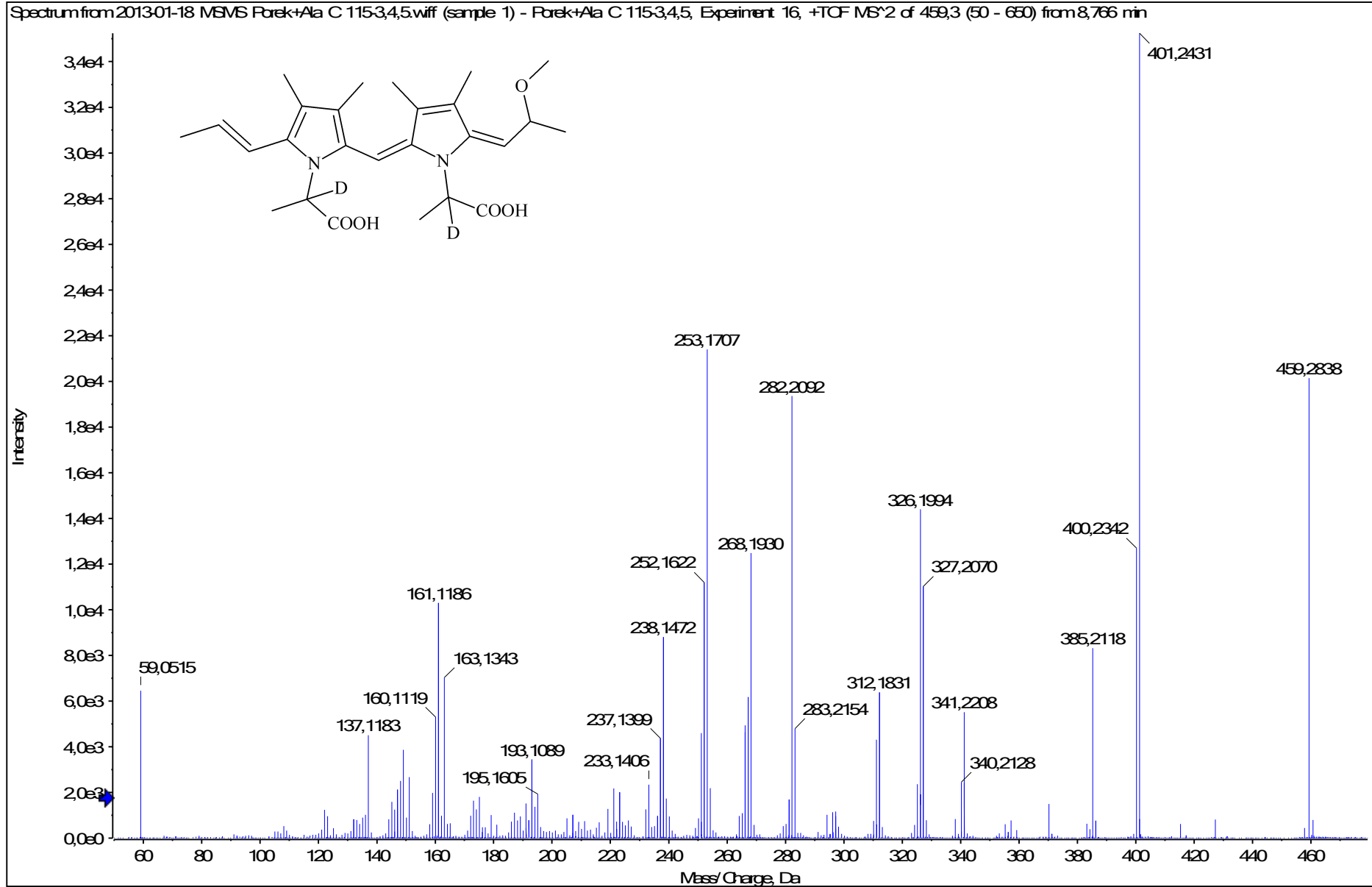
HRMS/MS spektrum látky LO-456



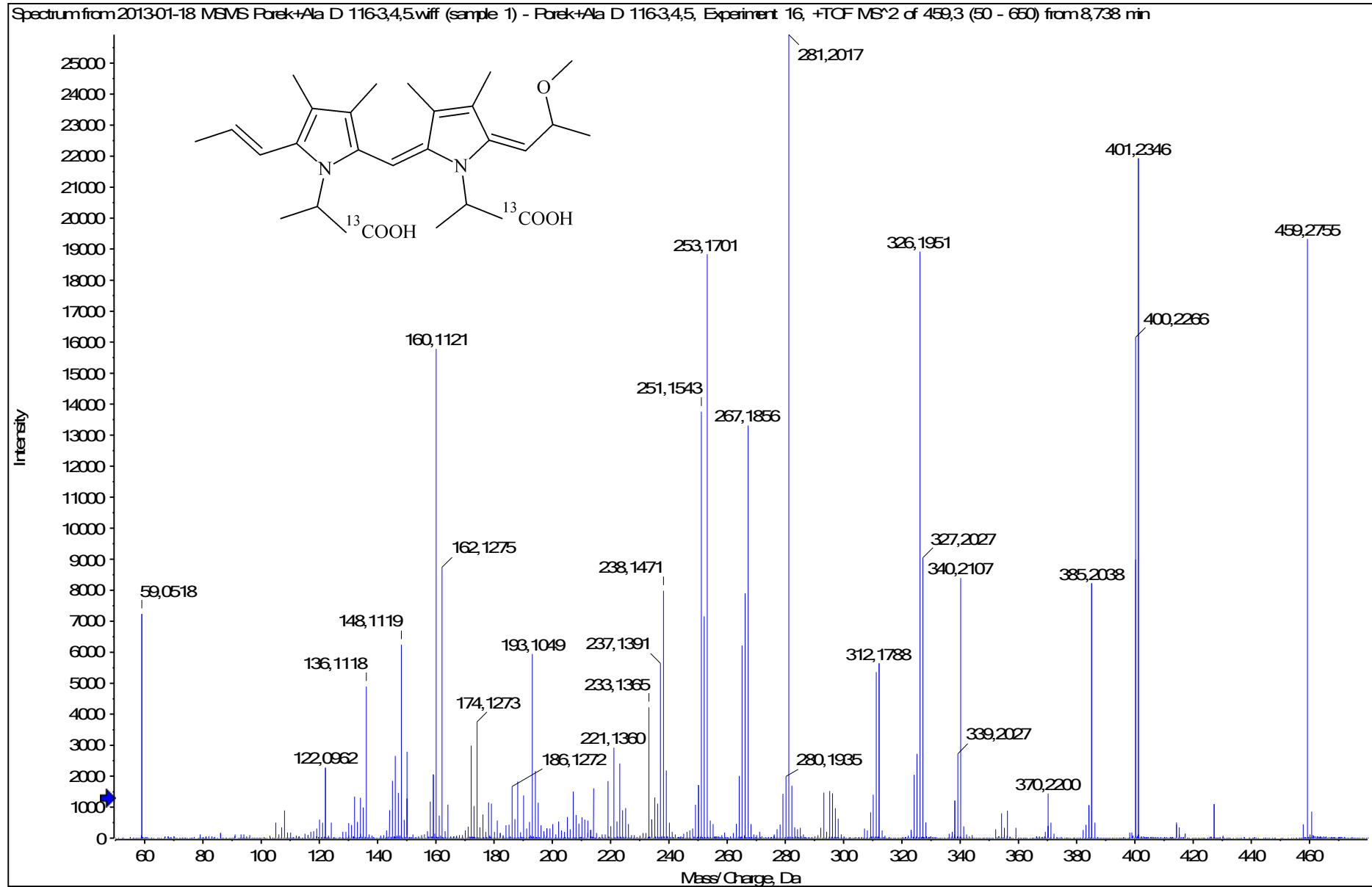
HRMS/MS spektrum látky LO-456



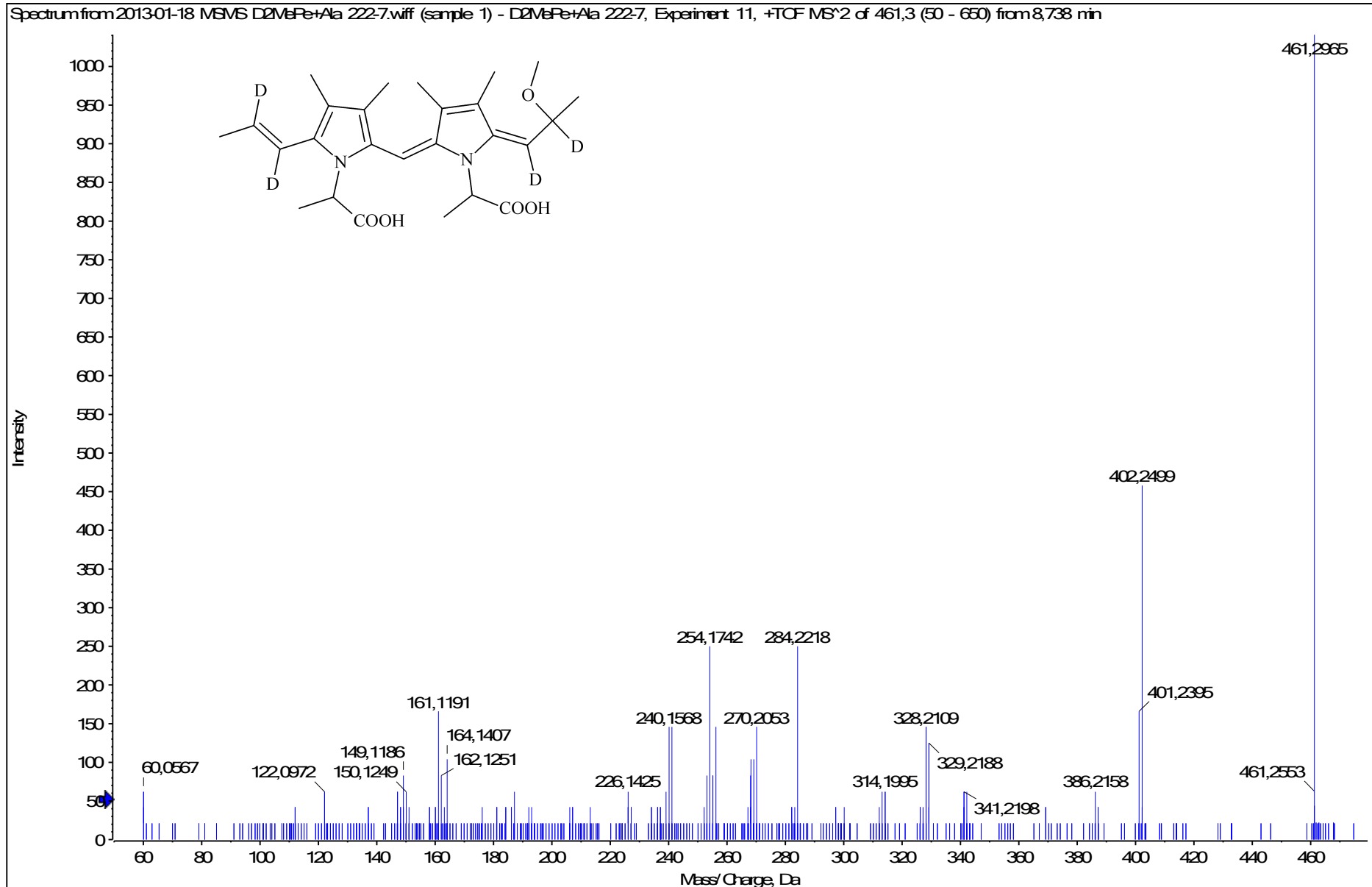
HRMS/MS spektrum látky LO-456



HRMS/MS spektrum látky LO-456

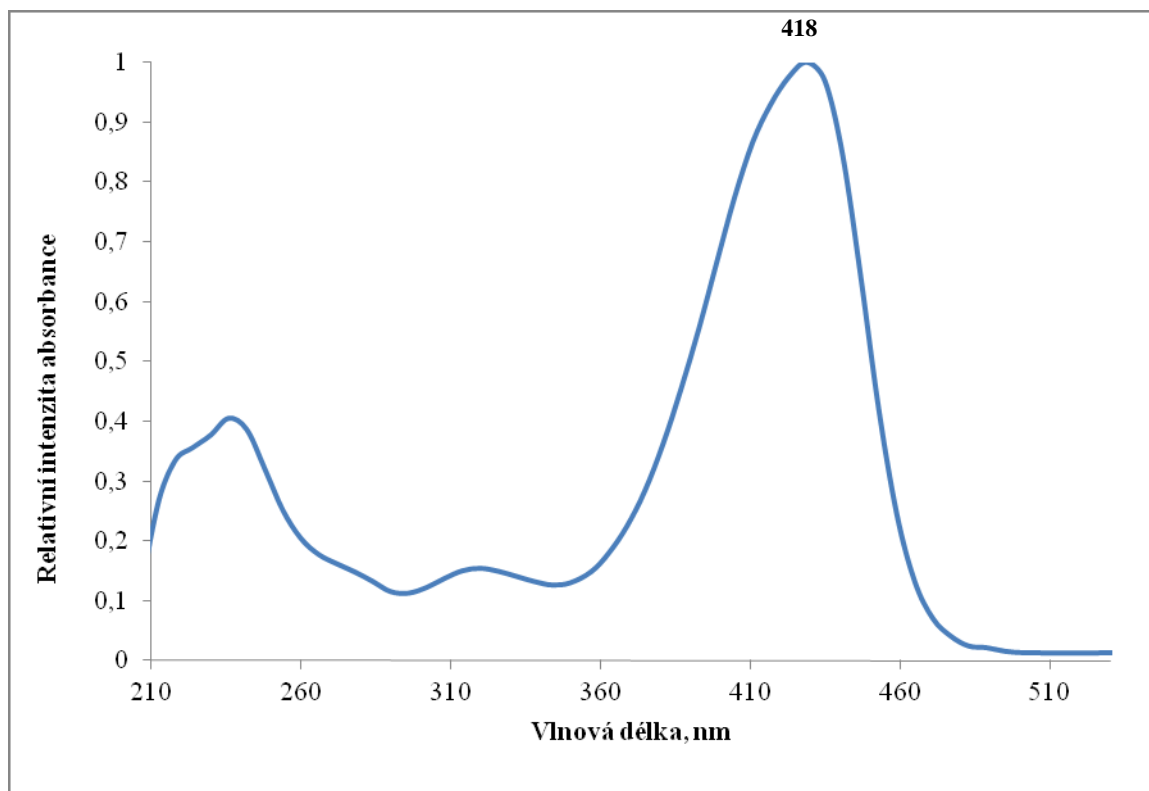


HRMS/MS spektrum látky LO-456

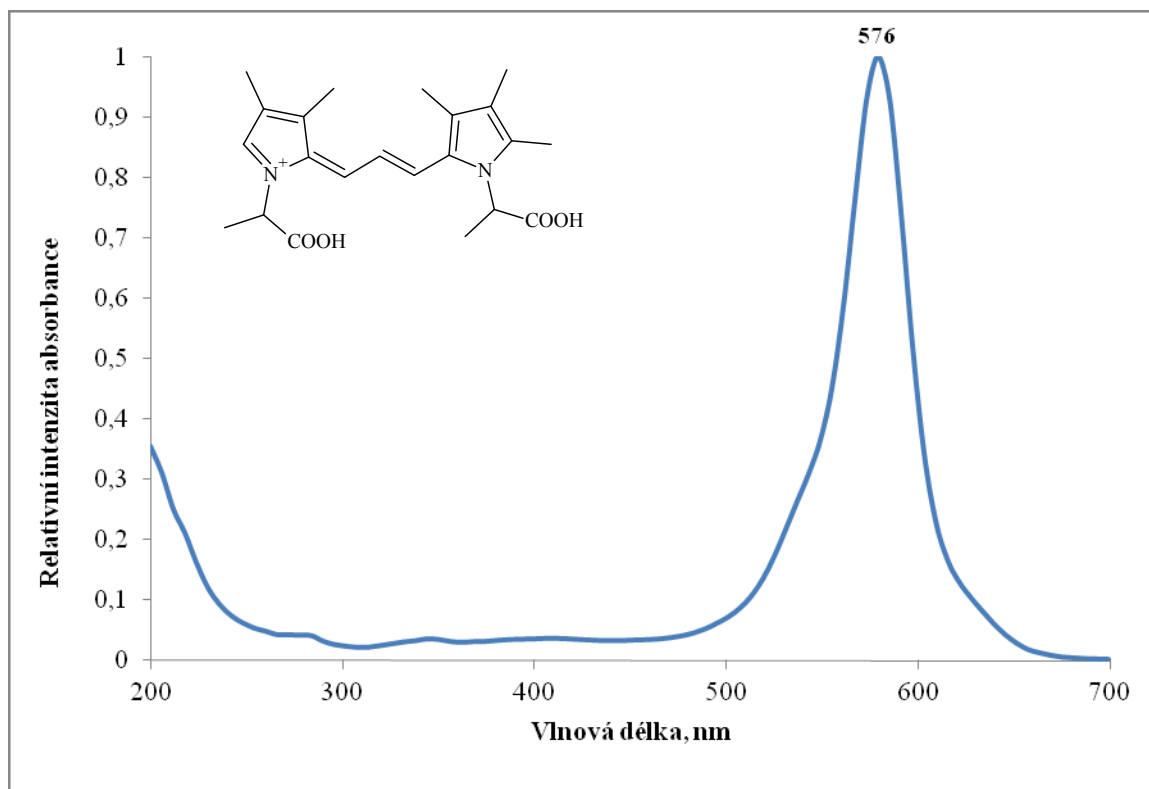


Příloha 17: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených
v česneku

UV-Vis spektrum látky G-276

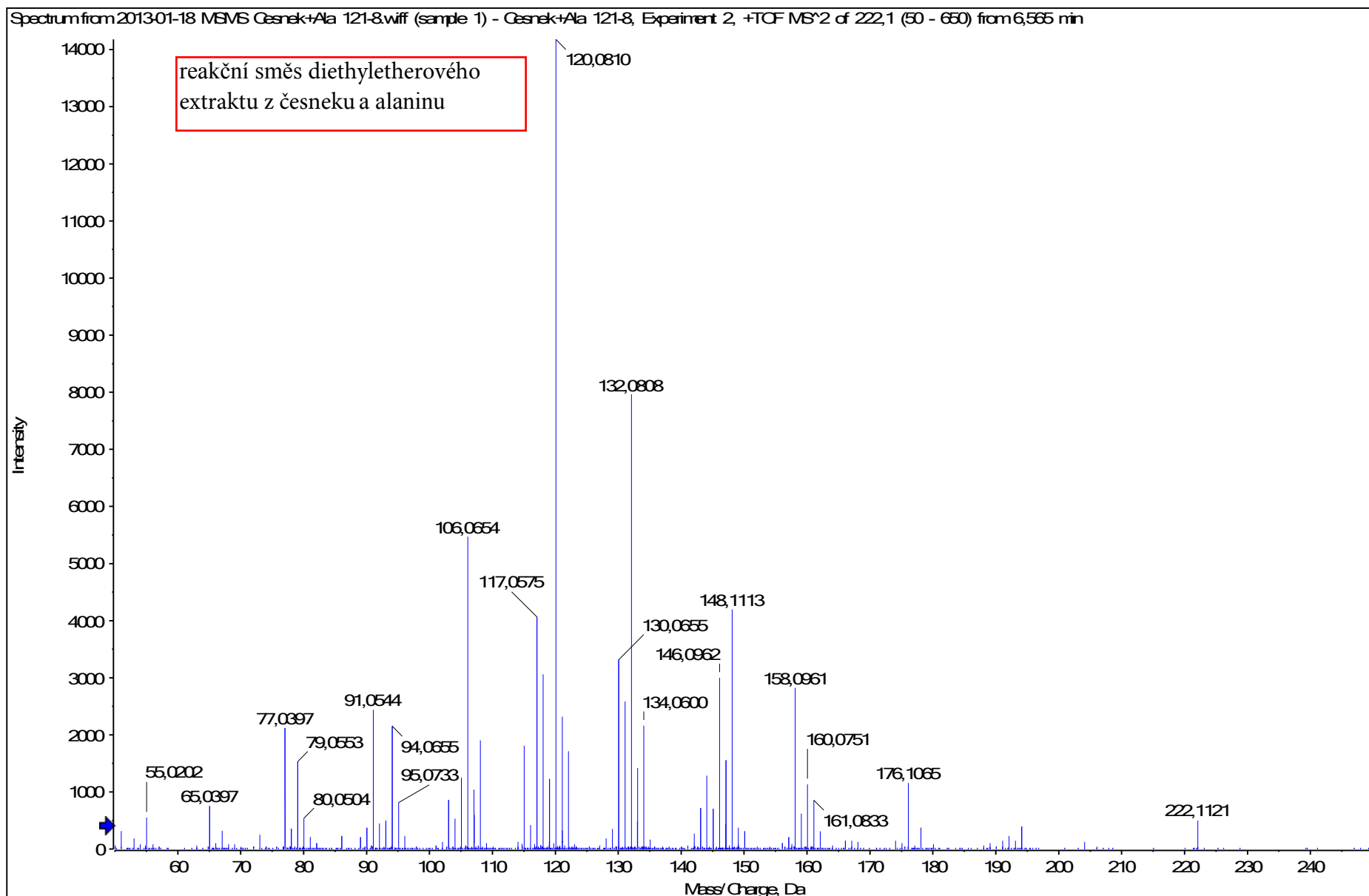


UV-Vis spektrum látky G-385

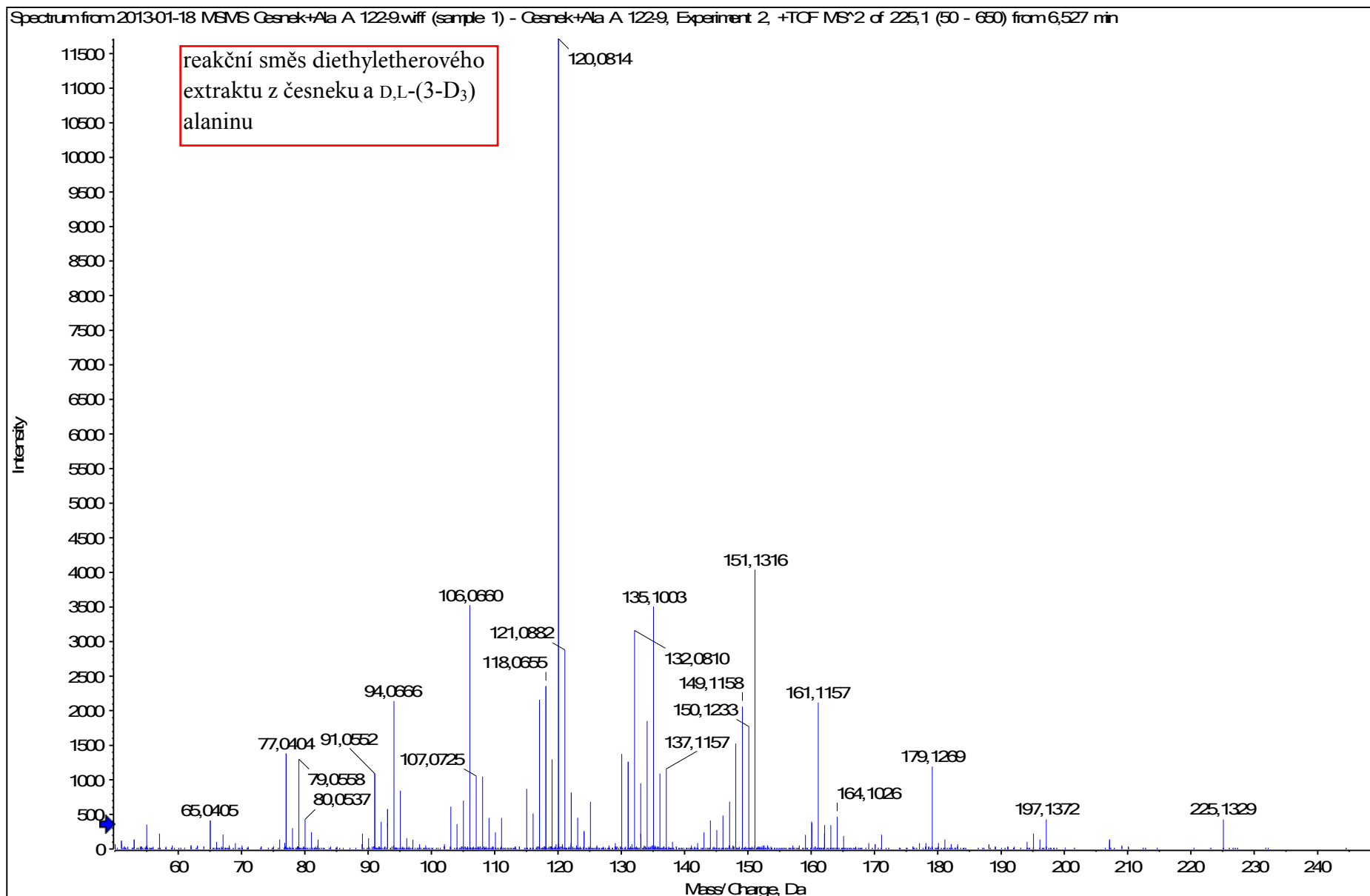


Příloha 18: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučenin vytvořených
v česneku

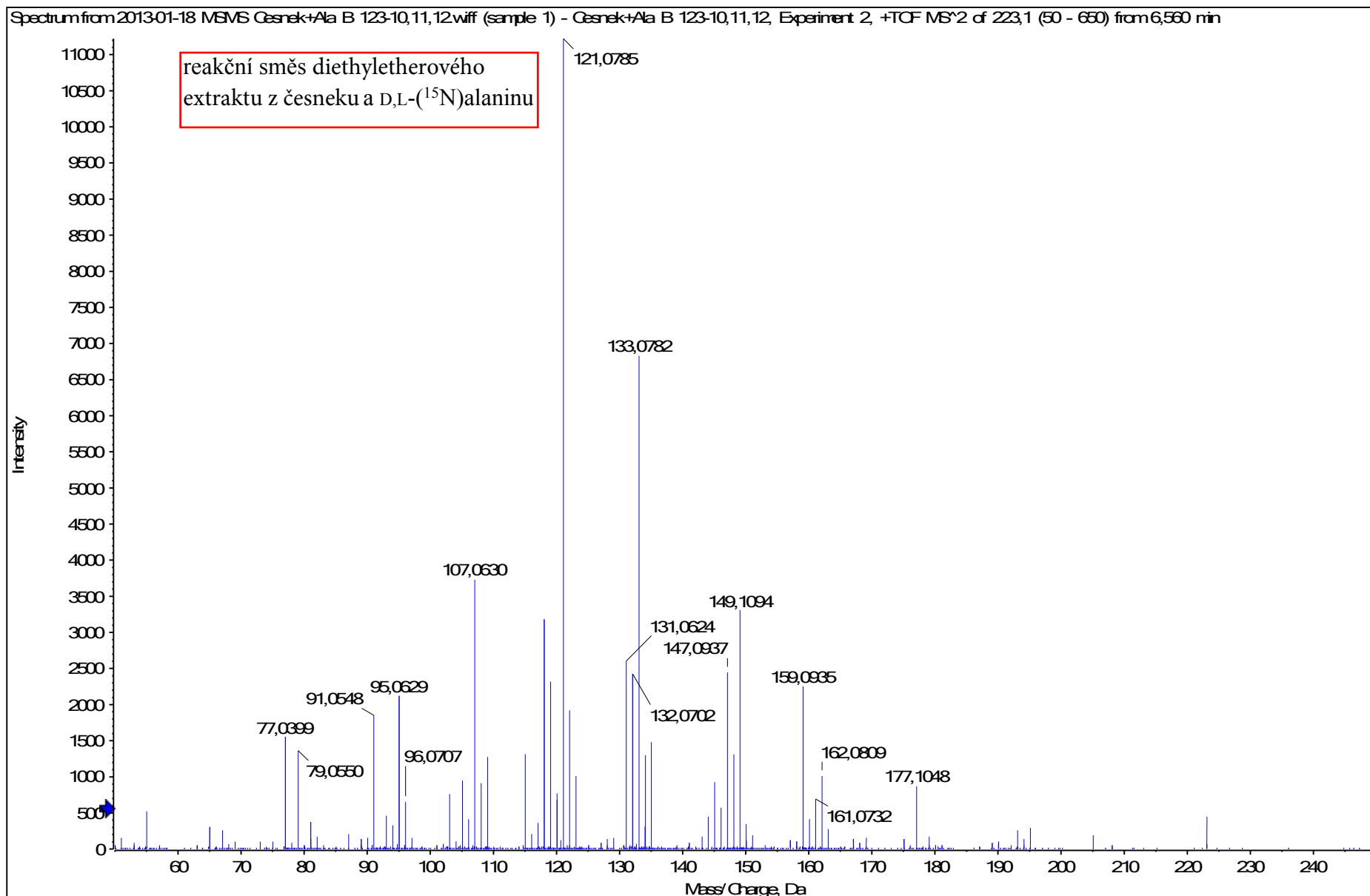
HRMS/MS spektrum látky G-222



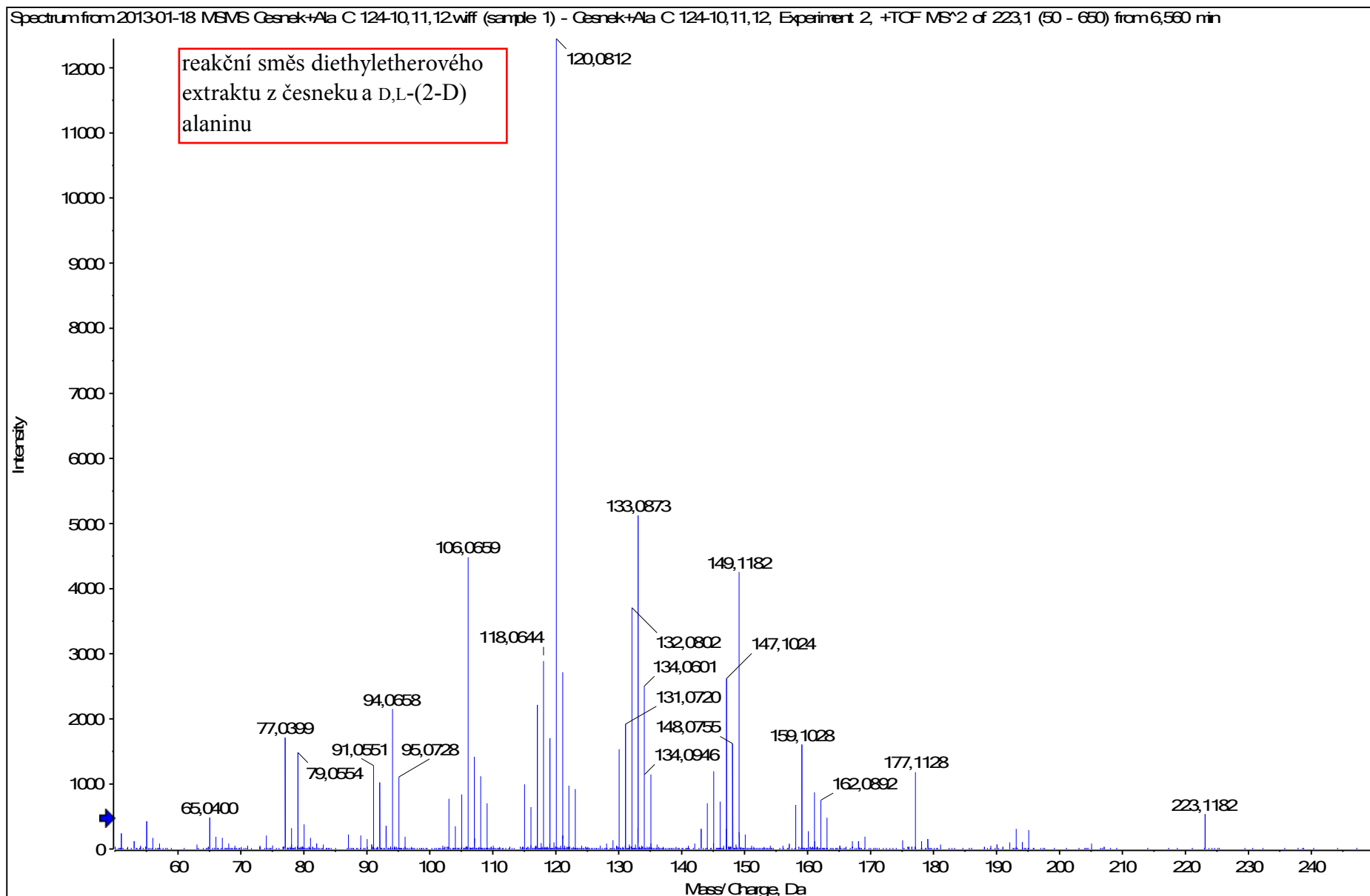
HRMS/MS spektrum látky G-222



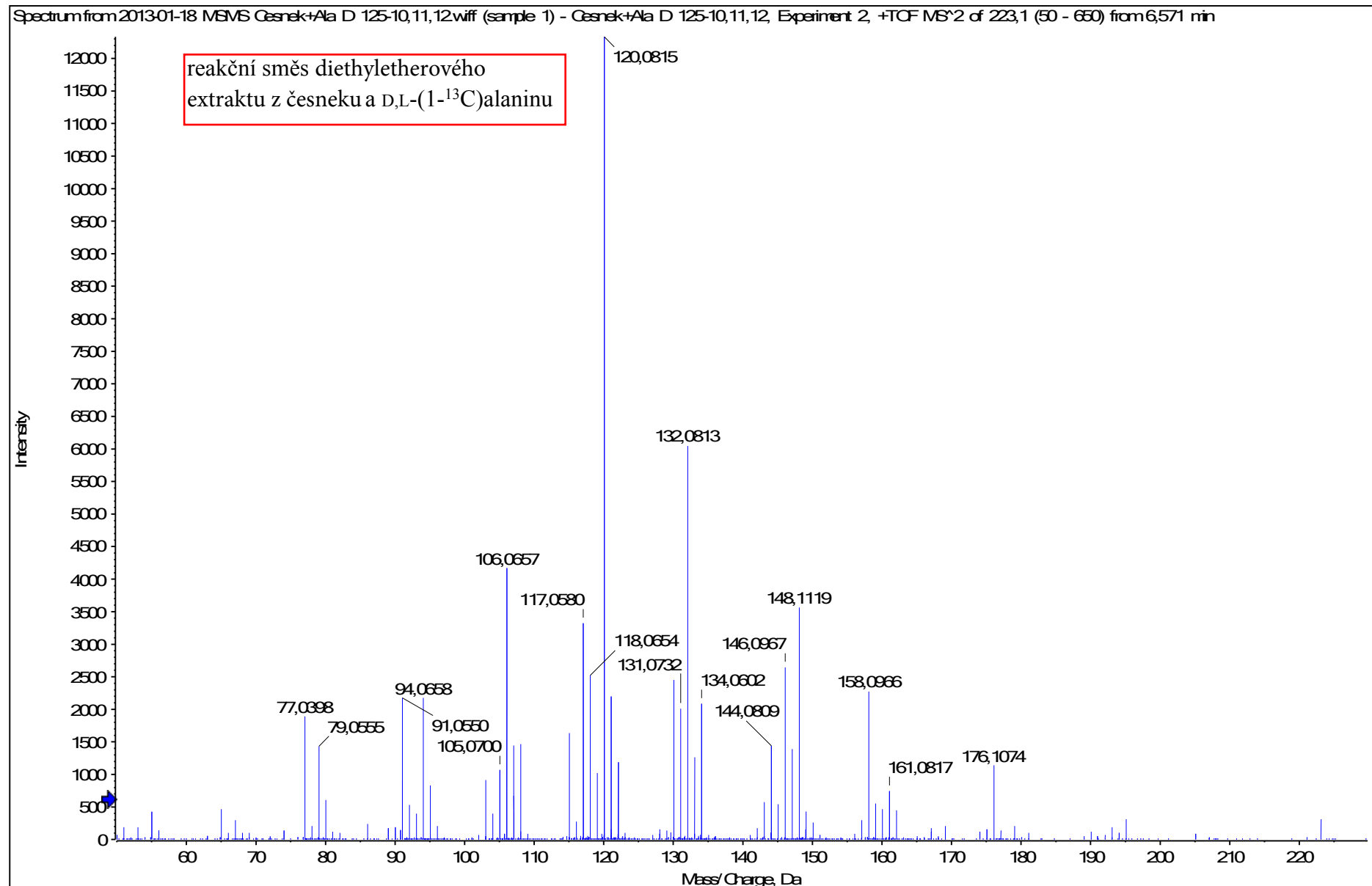
HRMS/MS spektrum látky G-222



HRMS/MS spektrum látky G-222

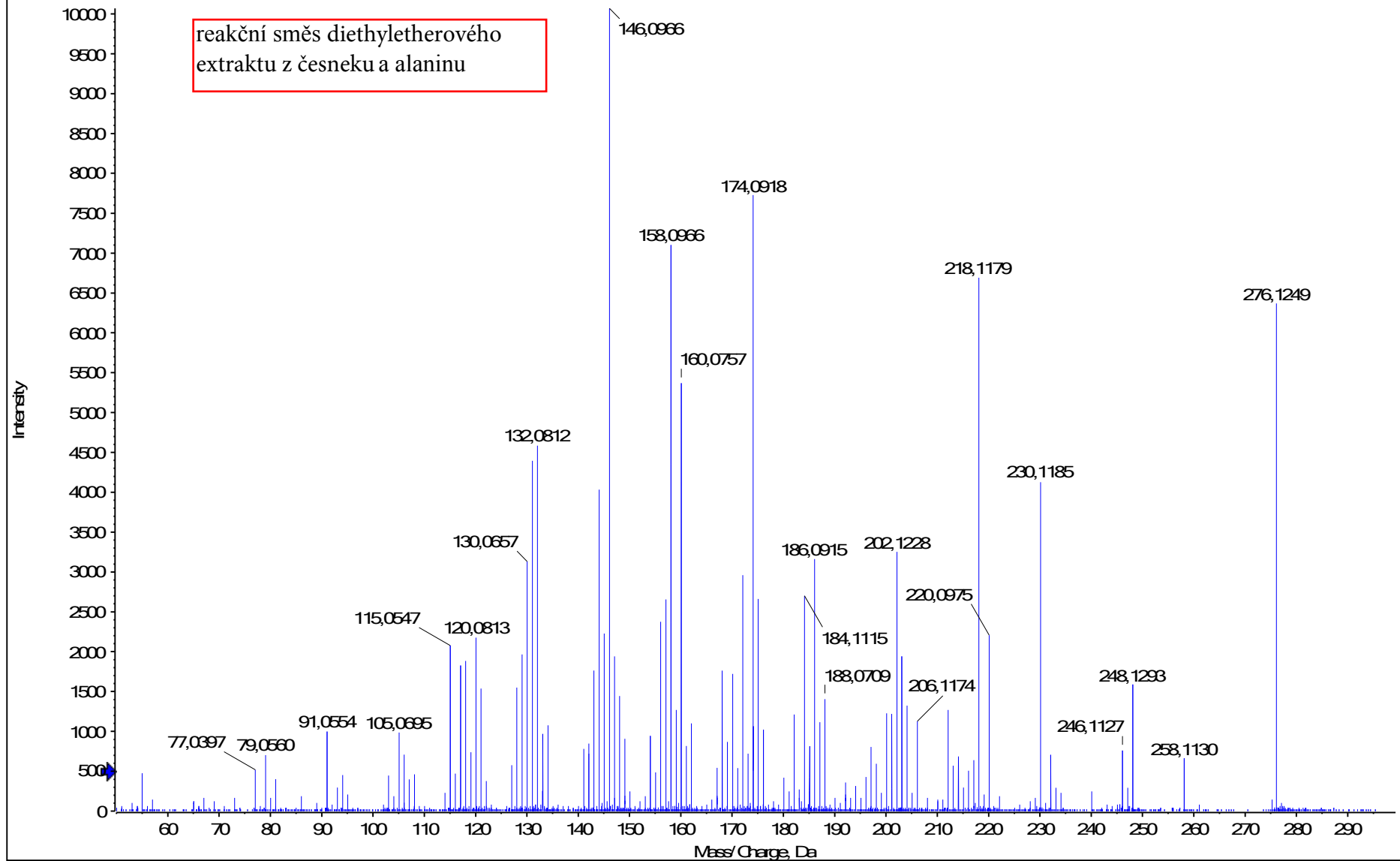


HRMS/MS spektrum látky G-222



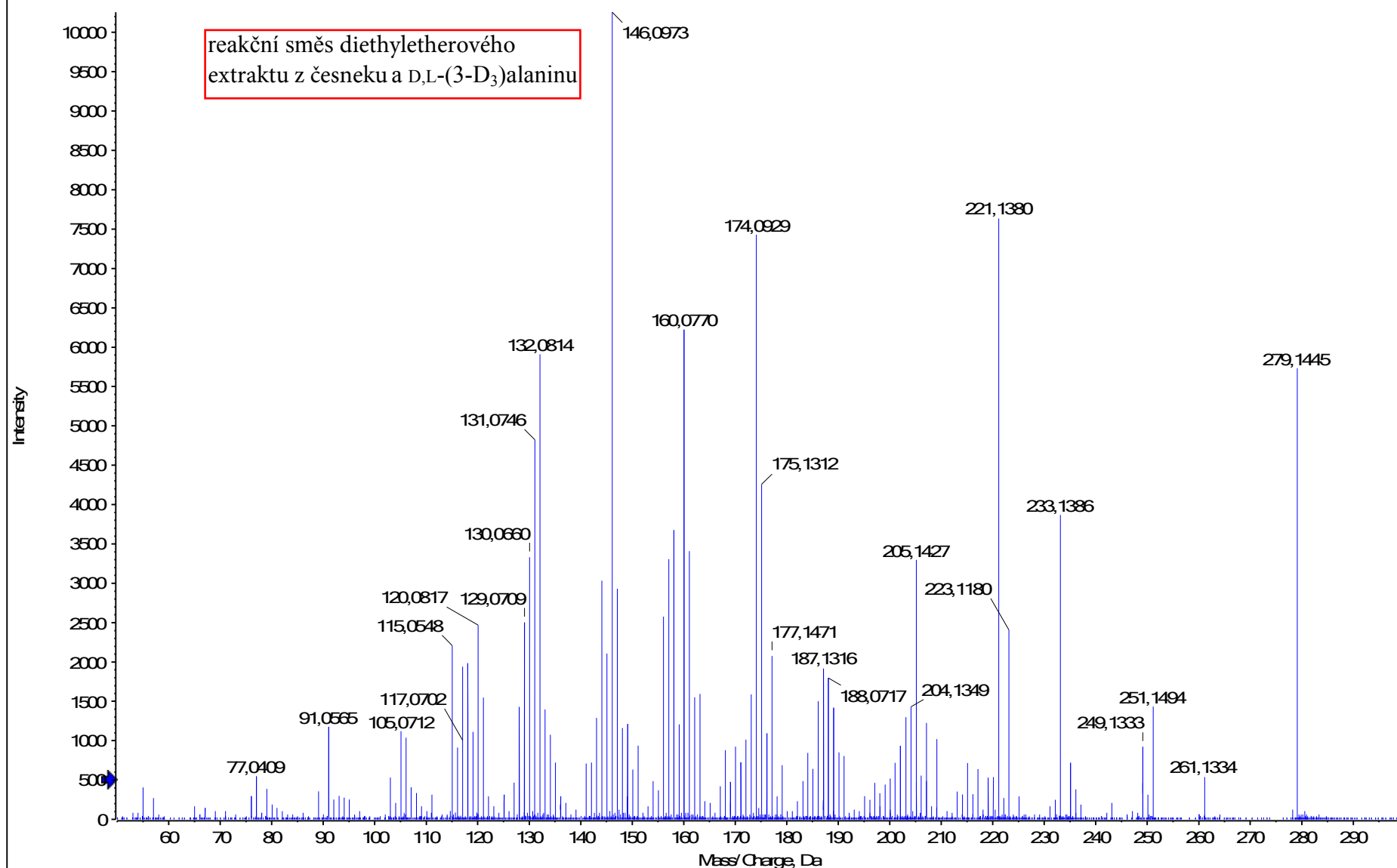
HRMS/MS spektrum látky G-276

Spectrum from 2012-11-29 07 Česnek + Ala.wiff (sample 1) - Česnek + Ala, Experiment 3, +TOF MS*2 (50 - 800) from 6,757 min
Precursor: 276,1 Da, CE 35,0

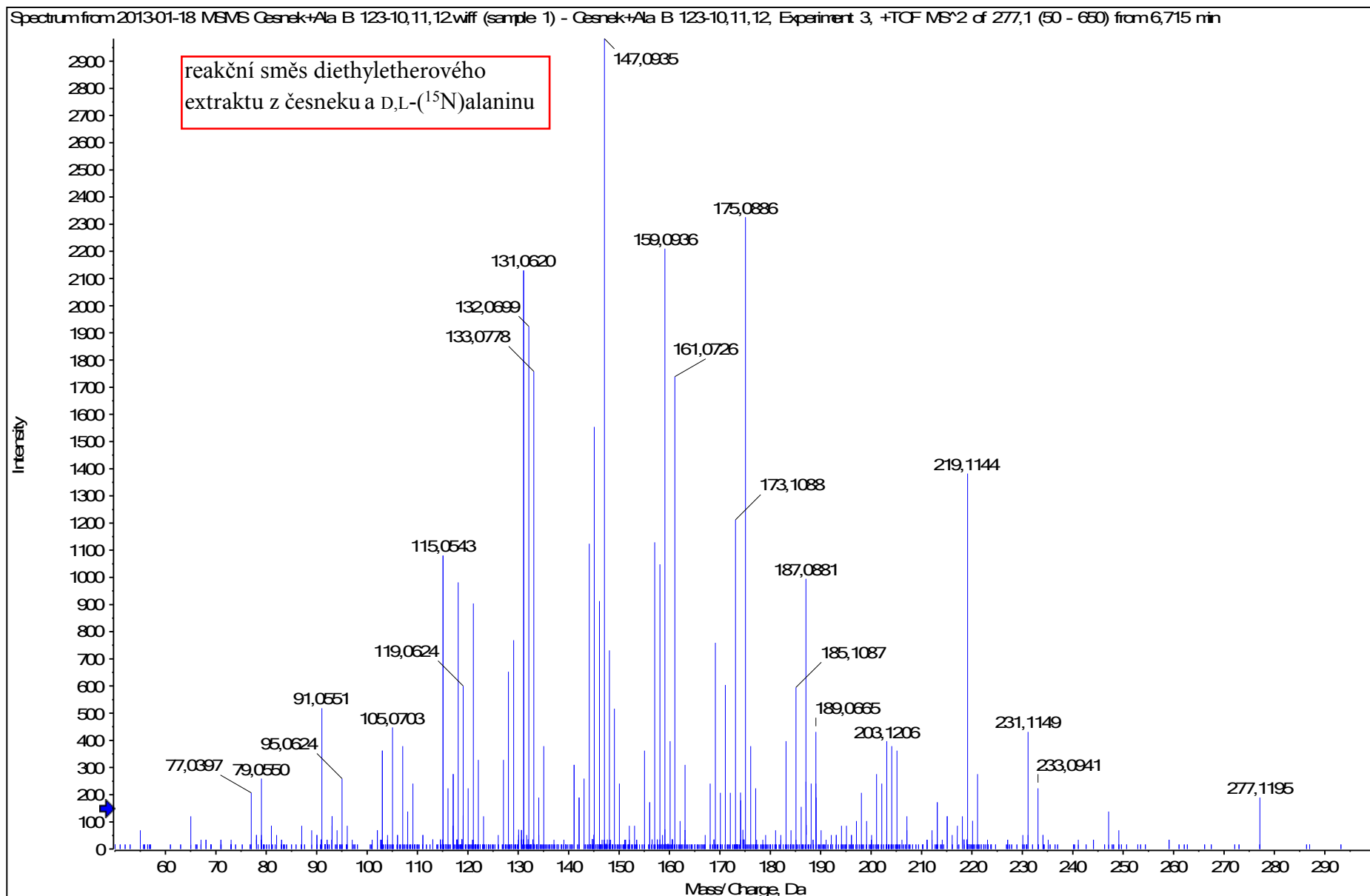


HRMS/MS spektrum látky G-276

Spectrum from 2012-11-29 08 Česnek + Ala Awiff (sample 1) - Česnek + Ala A, Experiment 2, +TOF MS² (50 - 800) from 6,736 min
Precursor: 279,1 Da, CE 35,0

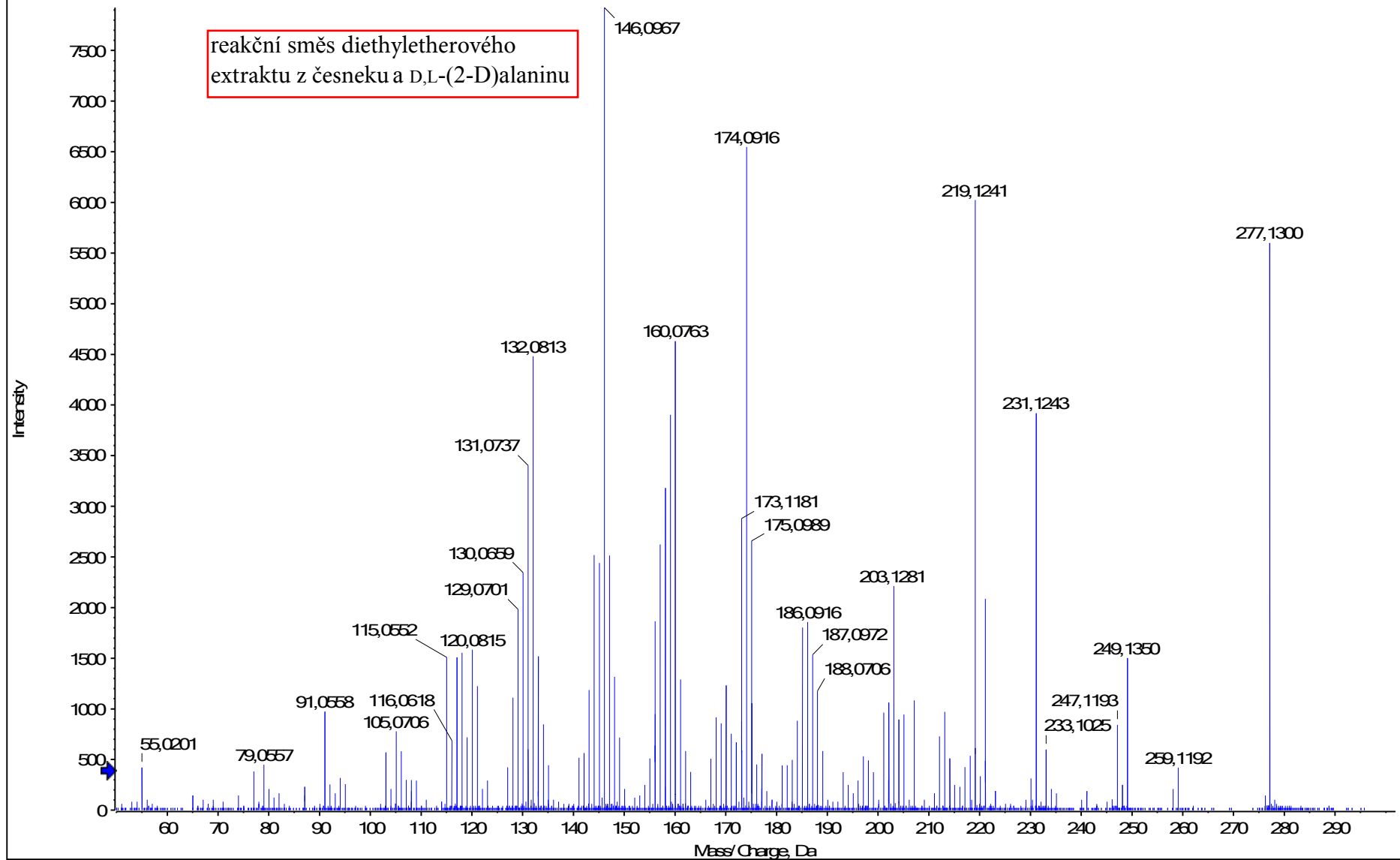


HRMS/MS spektrum látky G-276

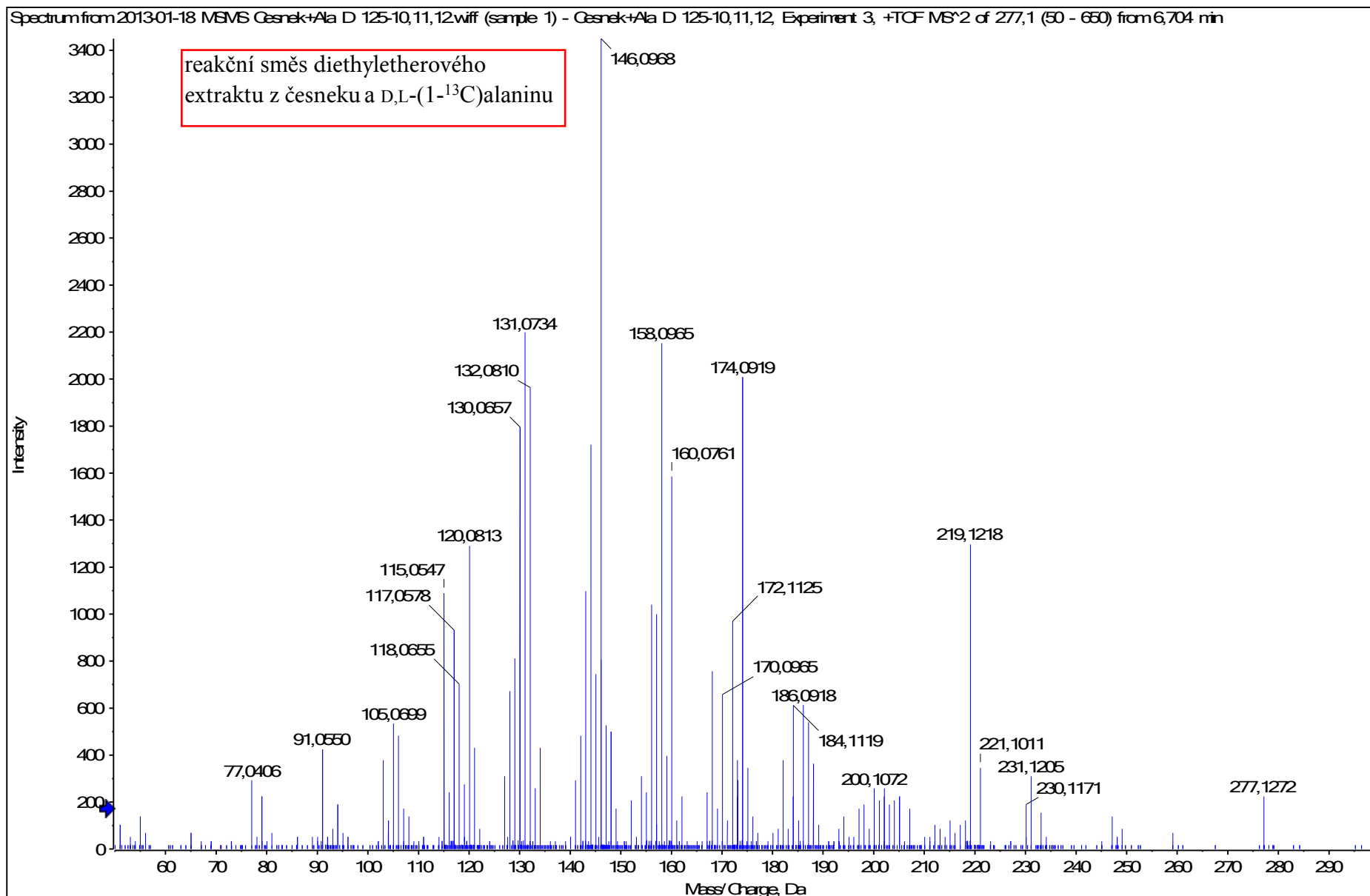


HRMS/MS spektrum látky G-276

Spectrum from 2012-11-29 10 Česnek + Ala Cwiff (sample 1) - Česnek + Ala C, Experiment 4, +TOF MS² (50 - 800) from 6,758 min
Precursor: 277,1 Da, CE 35,0

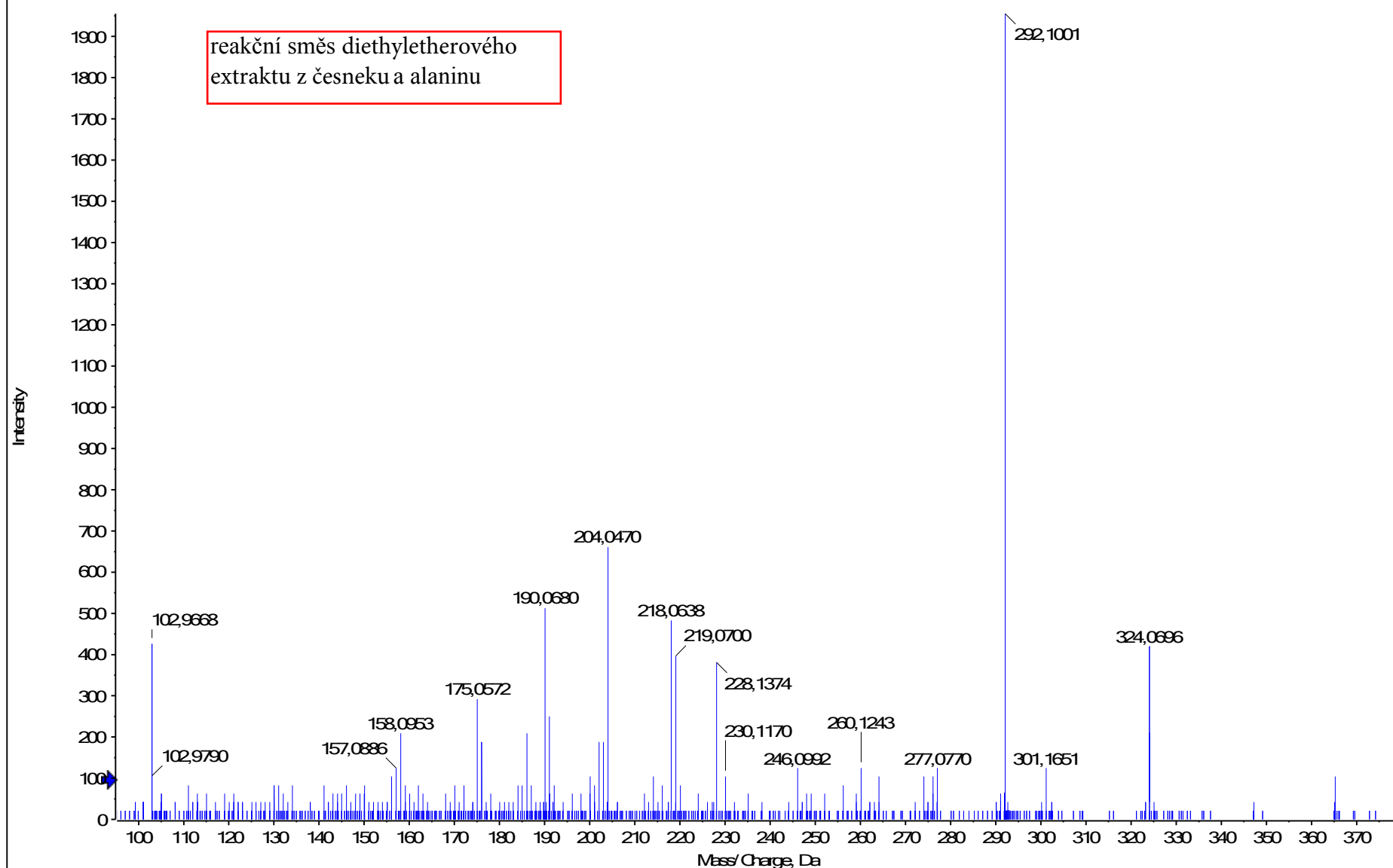


HRMS/MS spektrum látky G-276

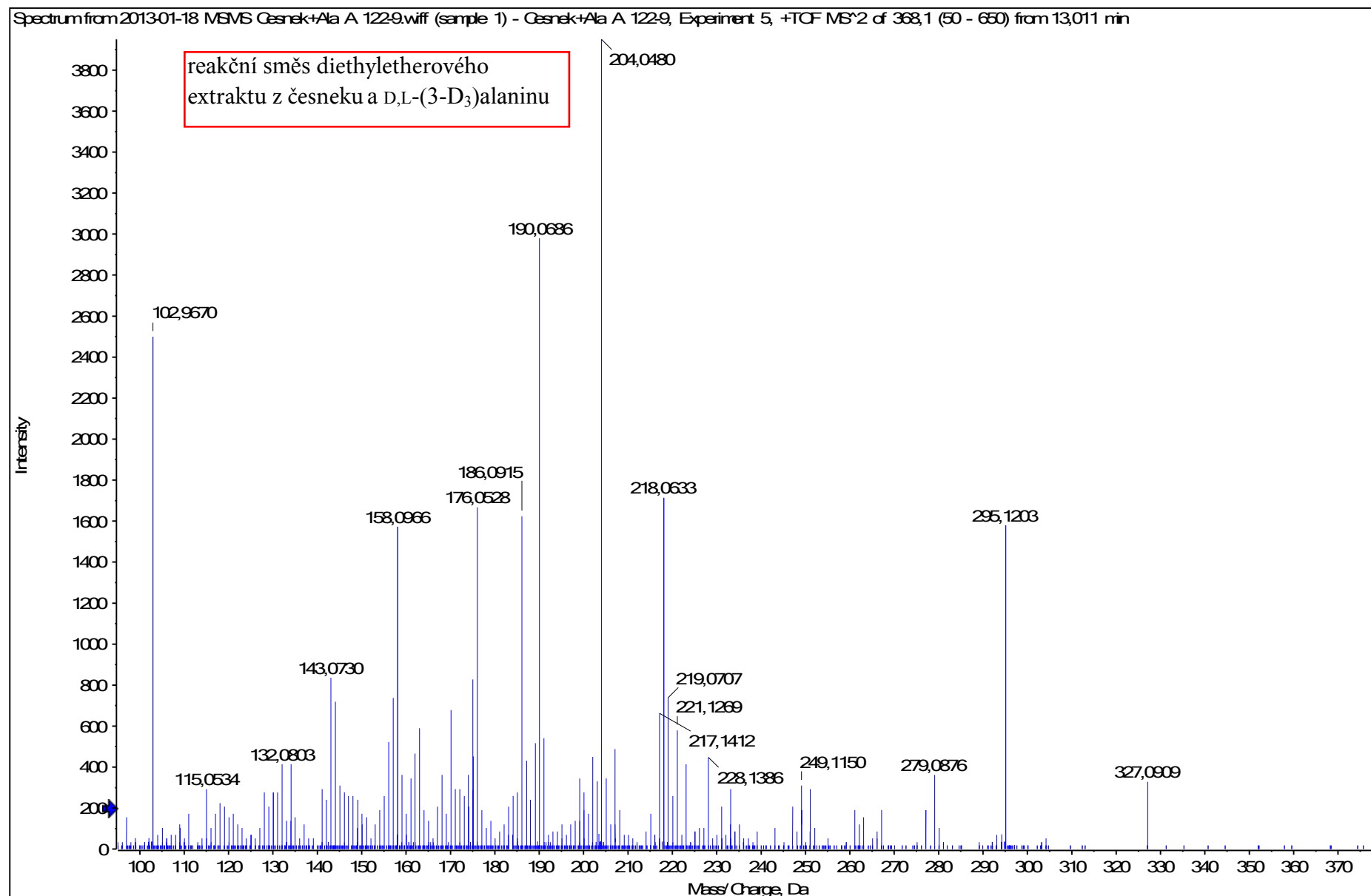


HRMS/MS spektrum látky G-365

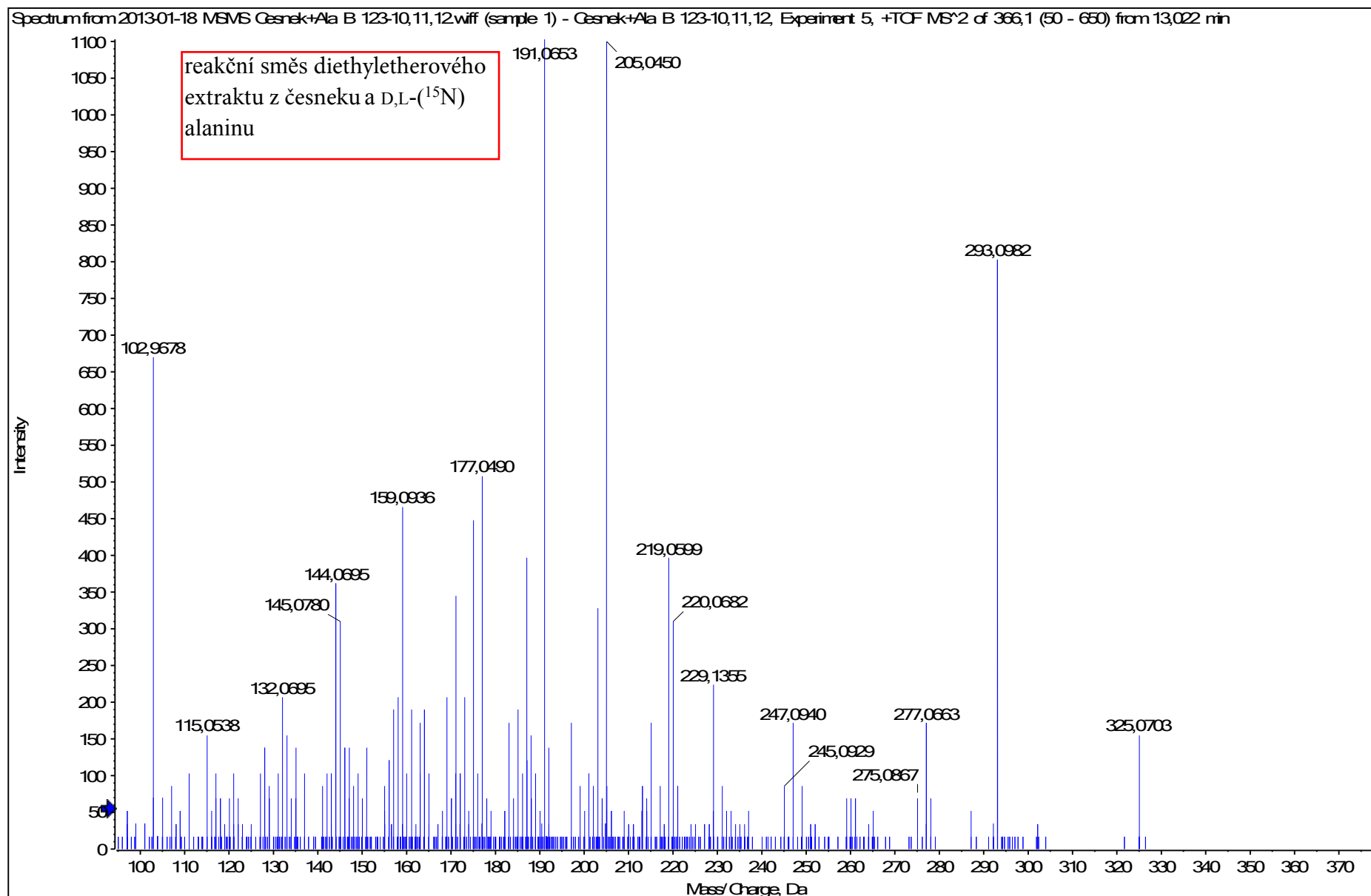
Spectrum from 2012-11-29 07 Česnek + Ala.wiff (sample 1) - Česnek + Ala, Experiment 3, +TOF MS*2 (50 - 800) from 13,235 min
Precursor: 365,1 Da, CE 35,0



HRMS/MS spektrum látky G-365

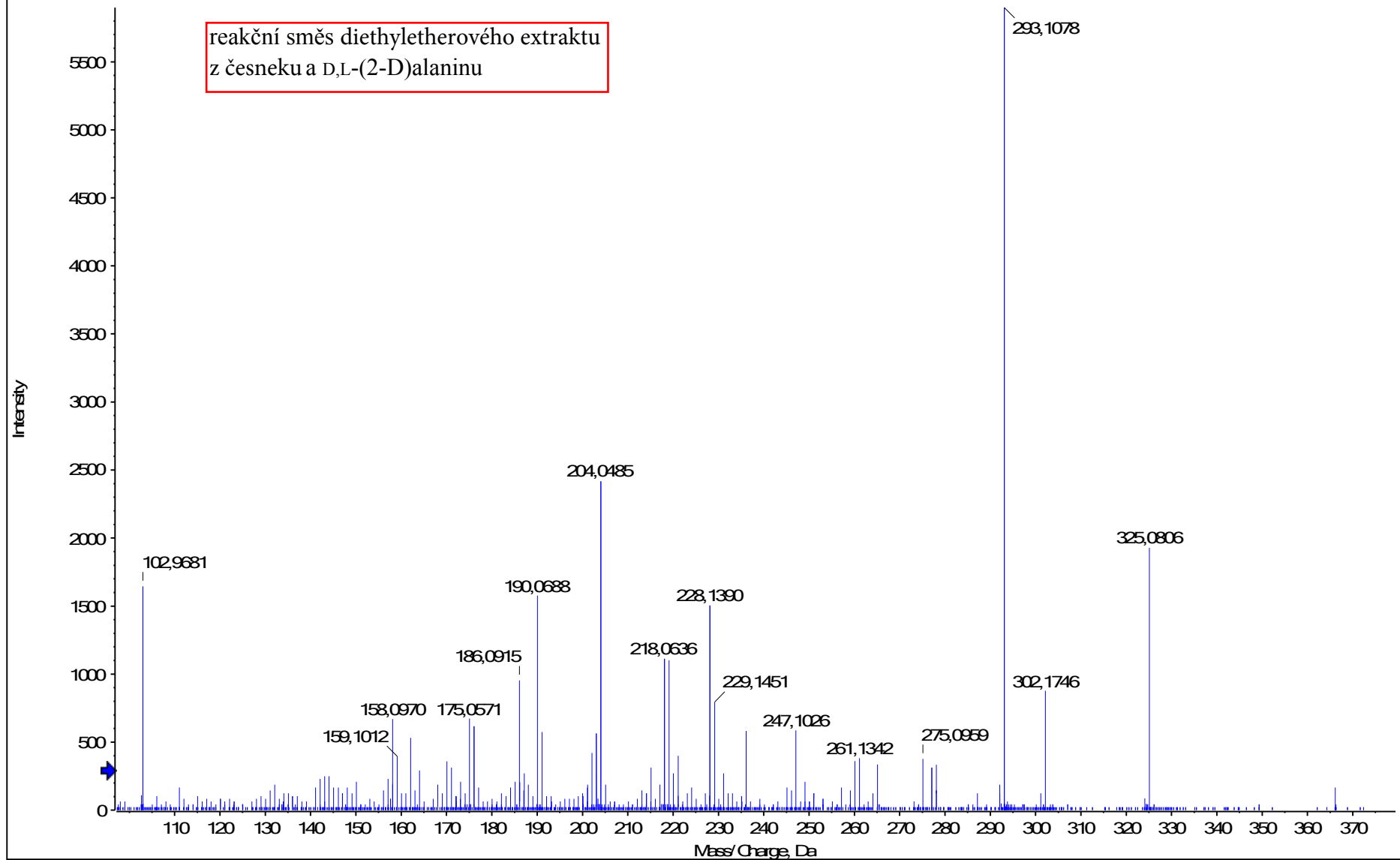


HRMS/MS spektrum látky G-365



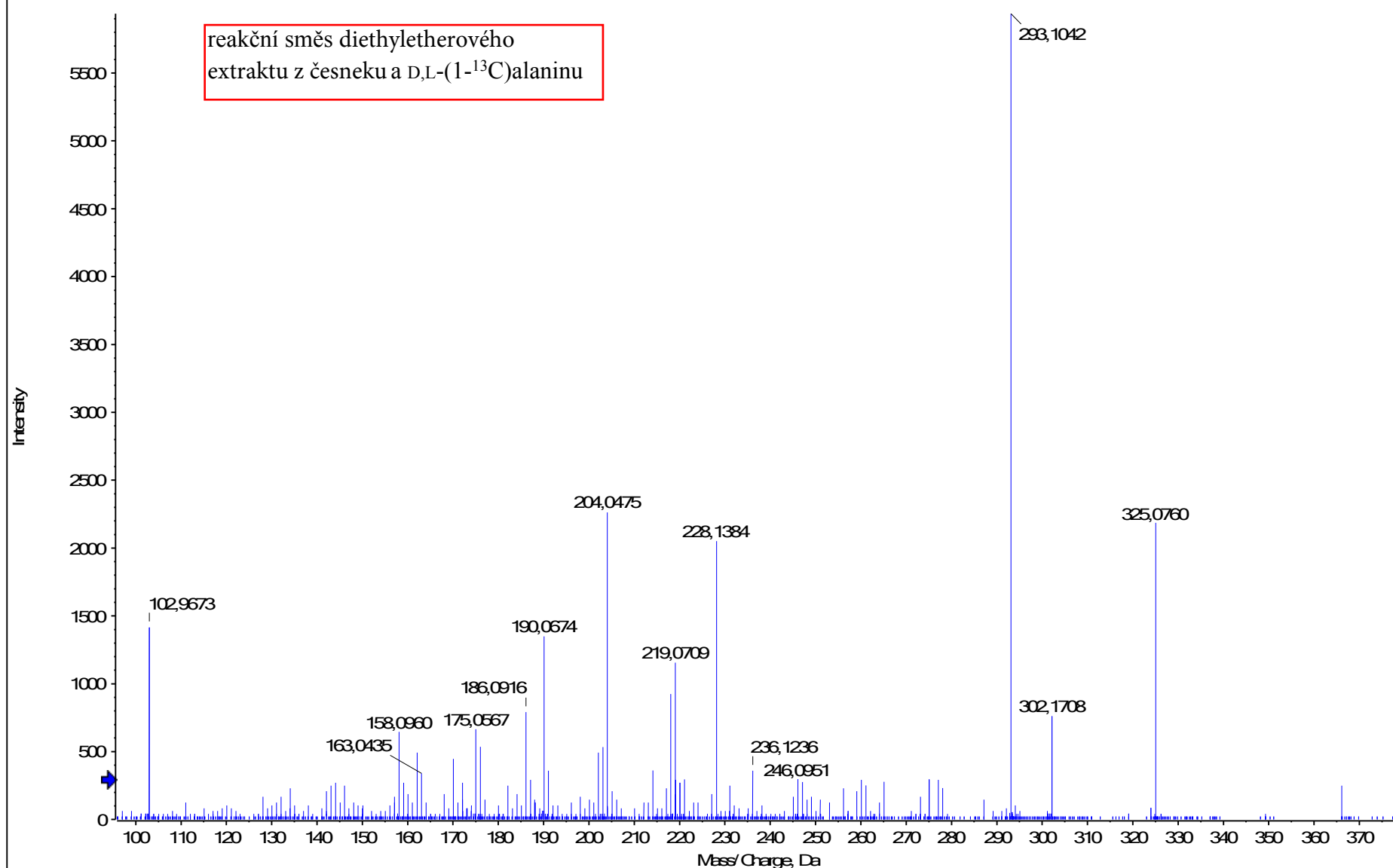
HRMS/MS spektrum látky G-365

Spectrum from 2012-11-29 10 Česnek + Ala Cwiff (sample 1) - Česnek + Ala C, Experiment 3, +TOF MS² (50 - 800) from 13,027 min
Precursor: 366,1 Da, CE 35,0

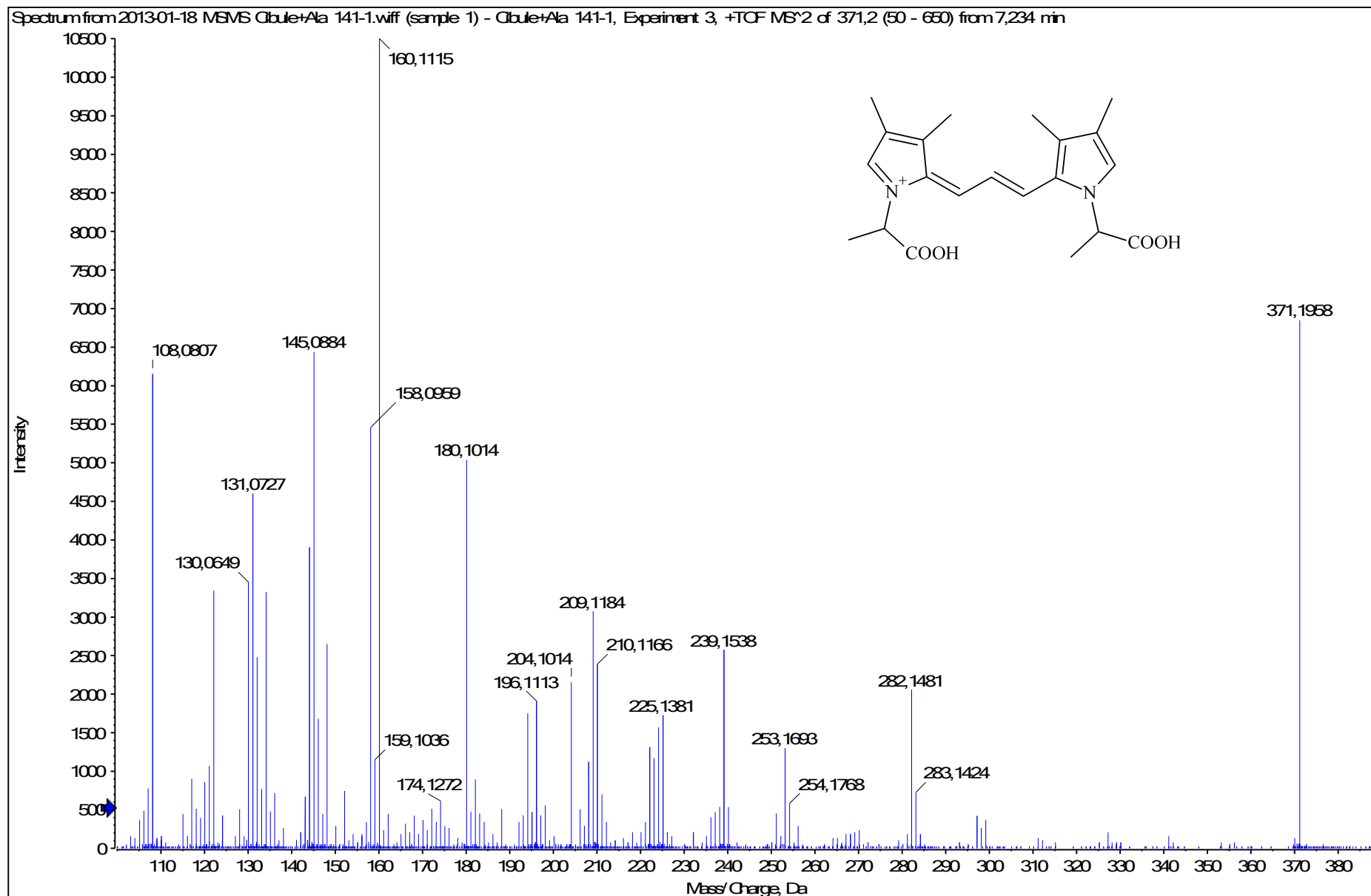


HRMS/MS spektrum látky G-365

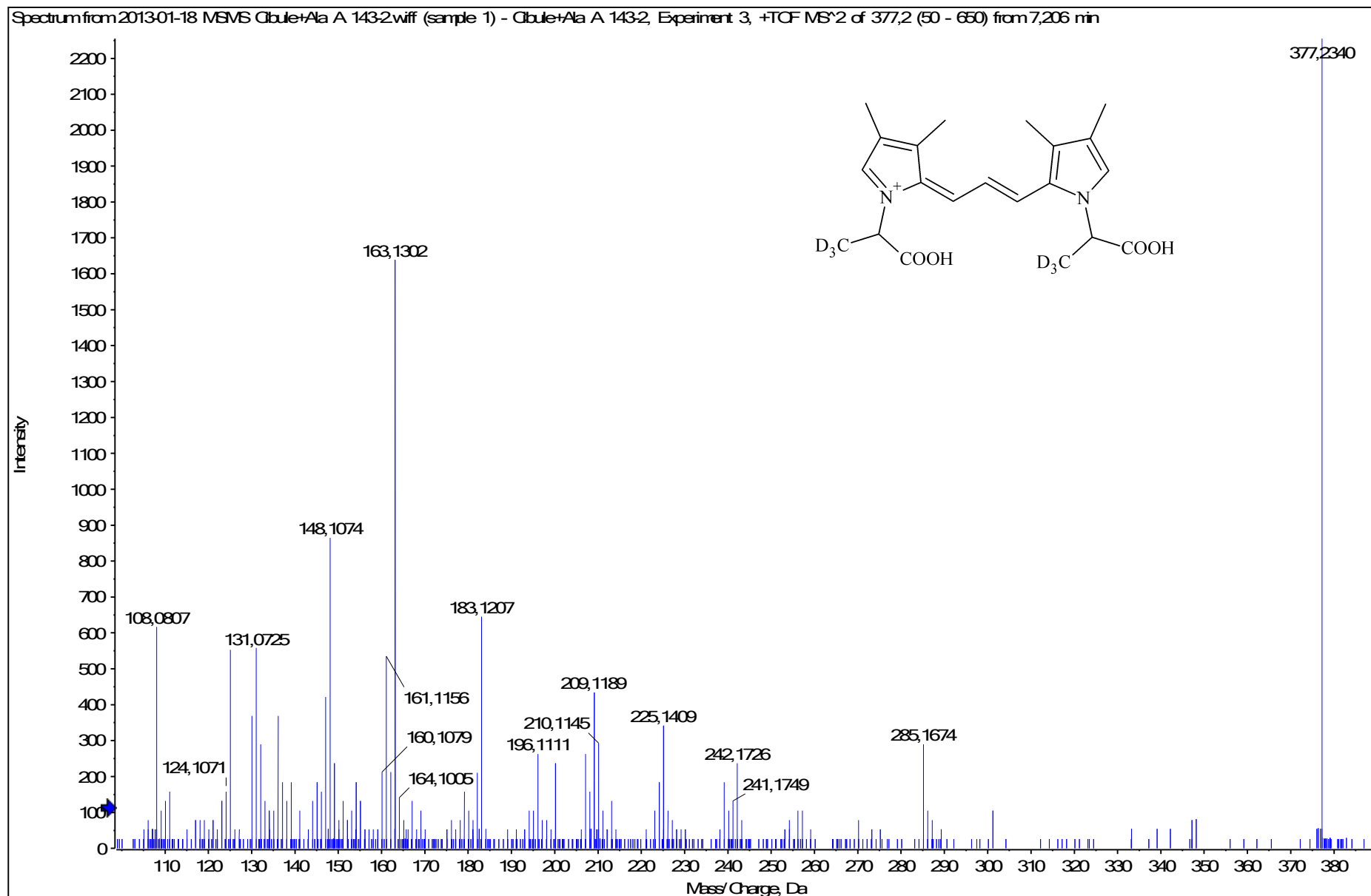
Spectrum from 2012-11-29 11 Česnek + Ala D.wiff (sample 1) - Česnek + Ala D, Experiment 4, +TOF MS² (50 - 800) from 13,033 min
Precursor: 366,1 Da, CE 35,0



HRMS/MS spektrum látky GLO-371

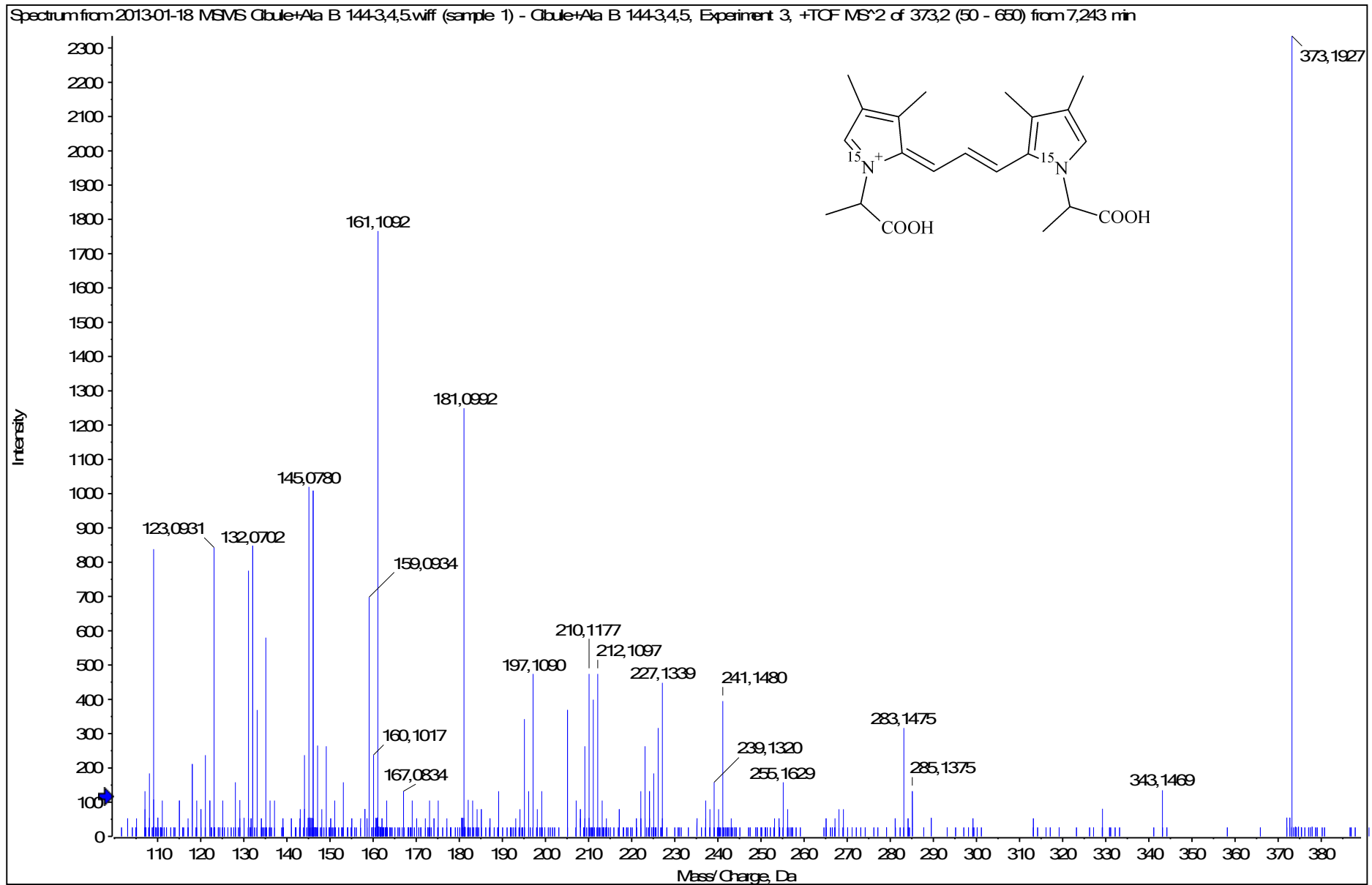


HRMS/MS spektrum látky GLO-371

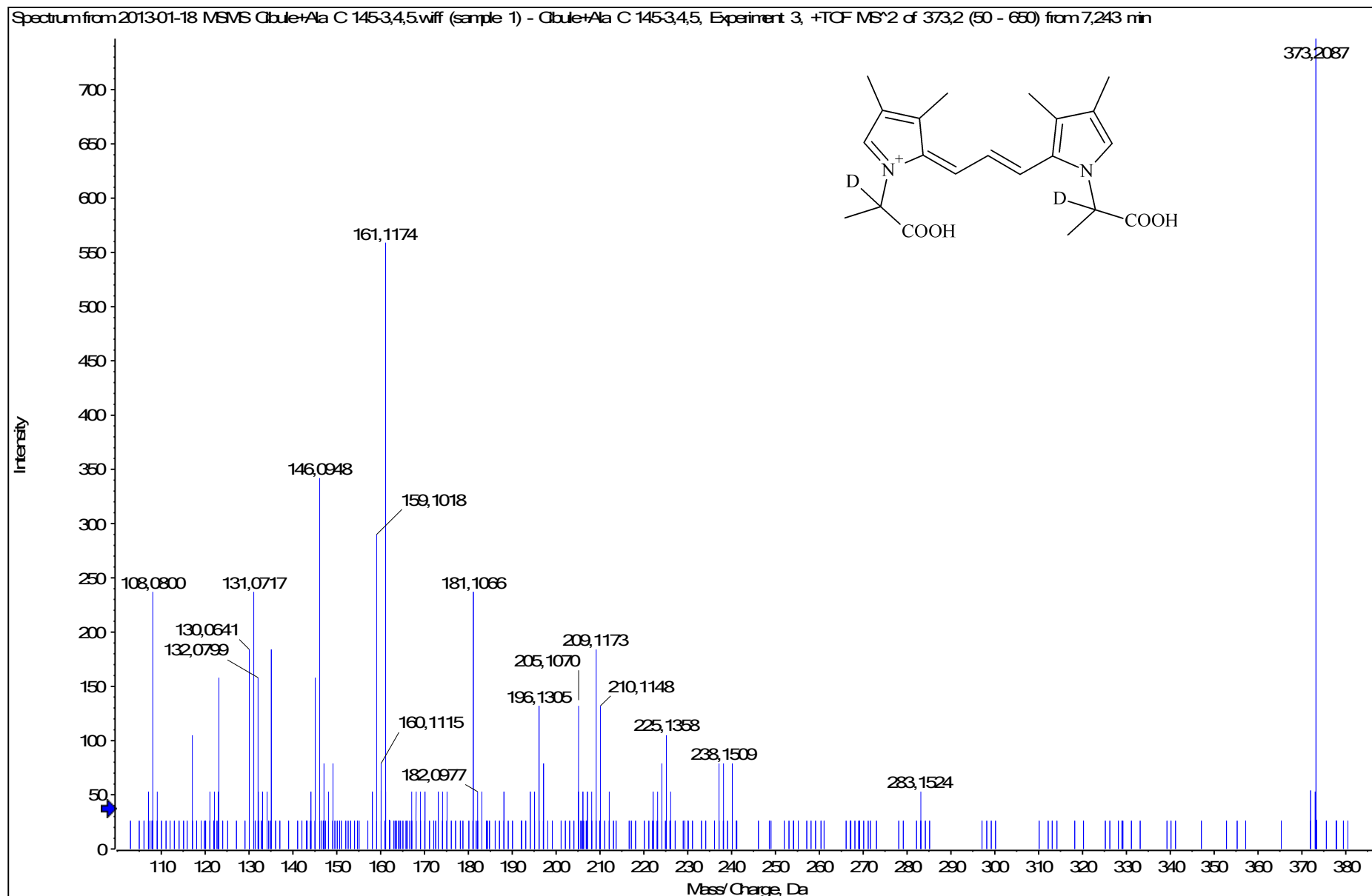


11.2.2013 18:25:08

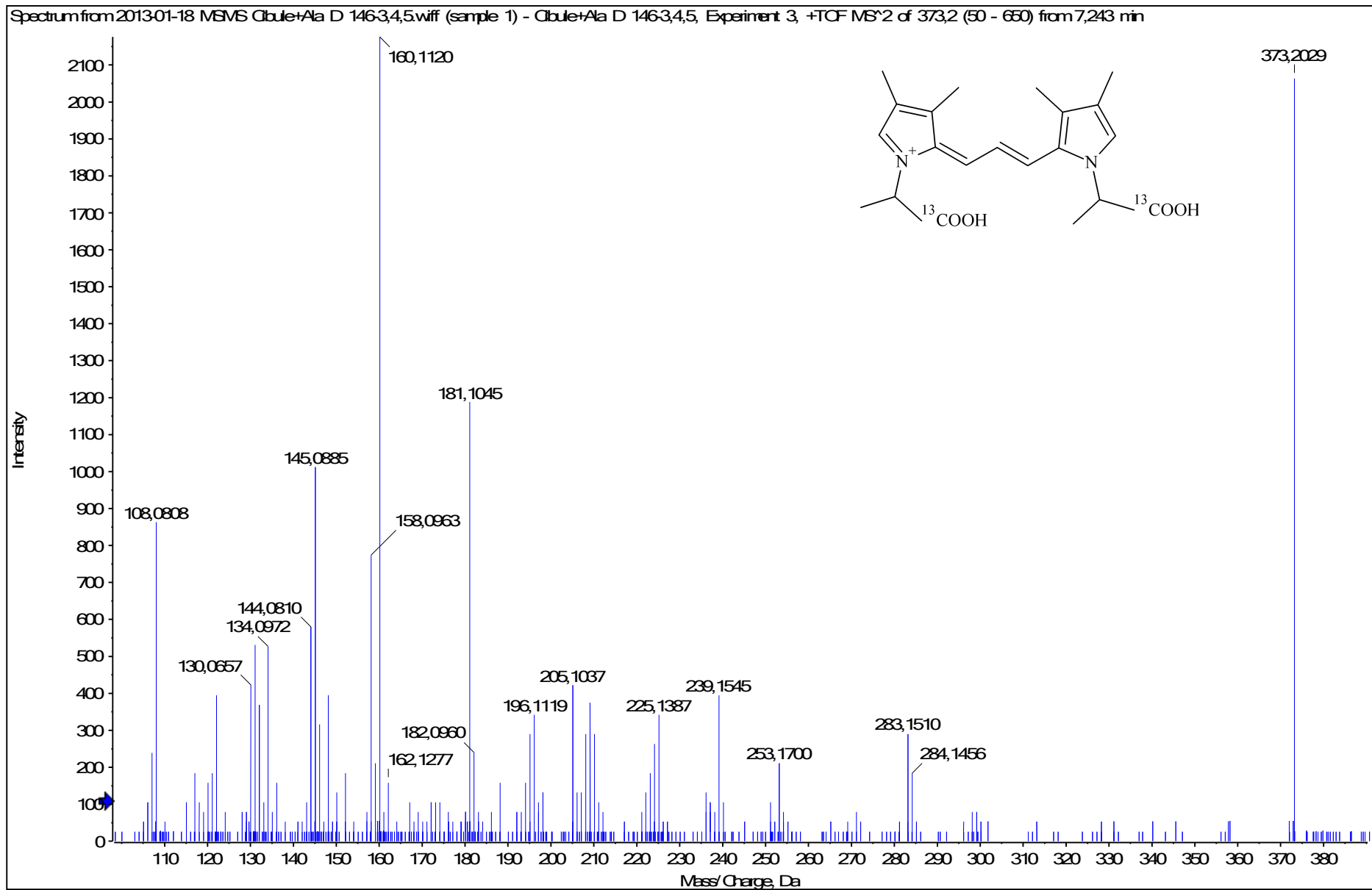
HRMS/MS spektrum látky GLO-371



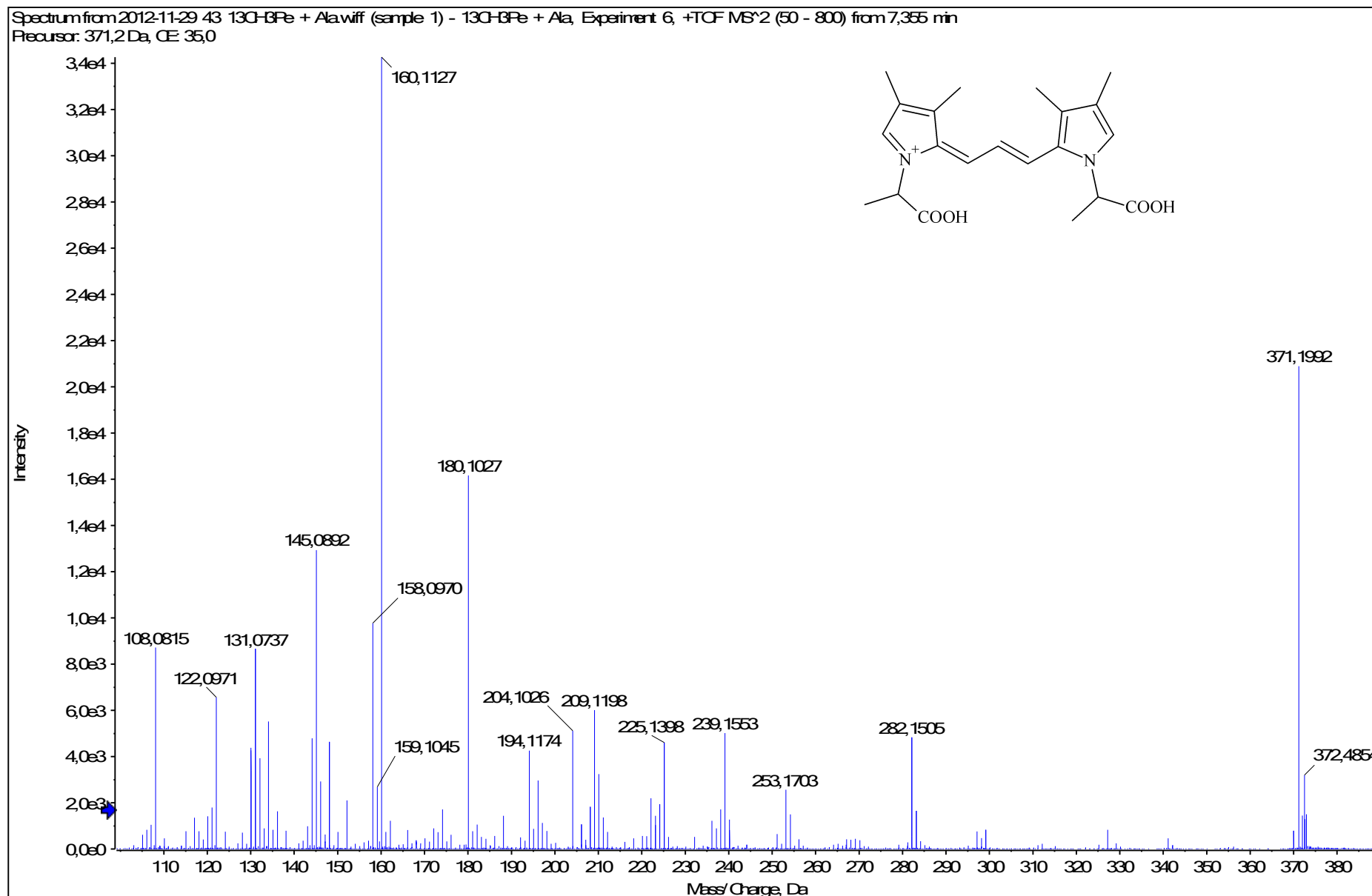
HRMS/MS spektrum látky GLO-371



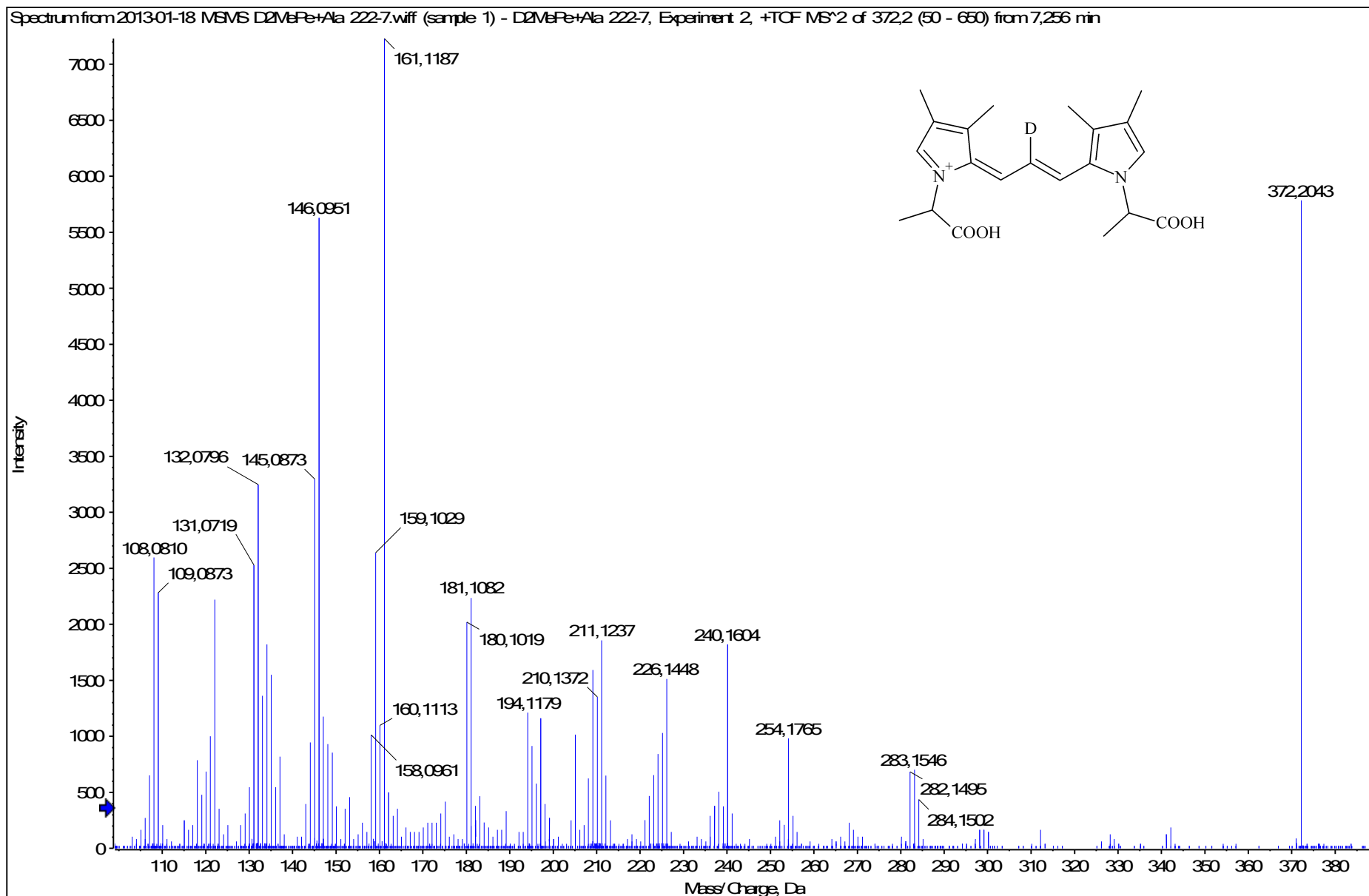
HRMS/MS spektrum látky GLO-371



HRMS/MS spektrum látky GLO-371



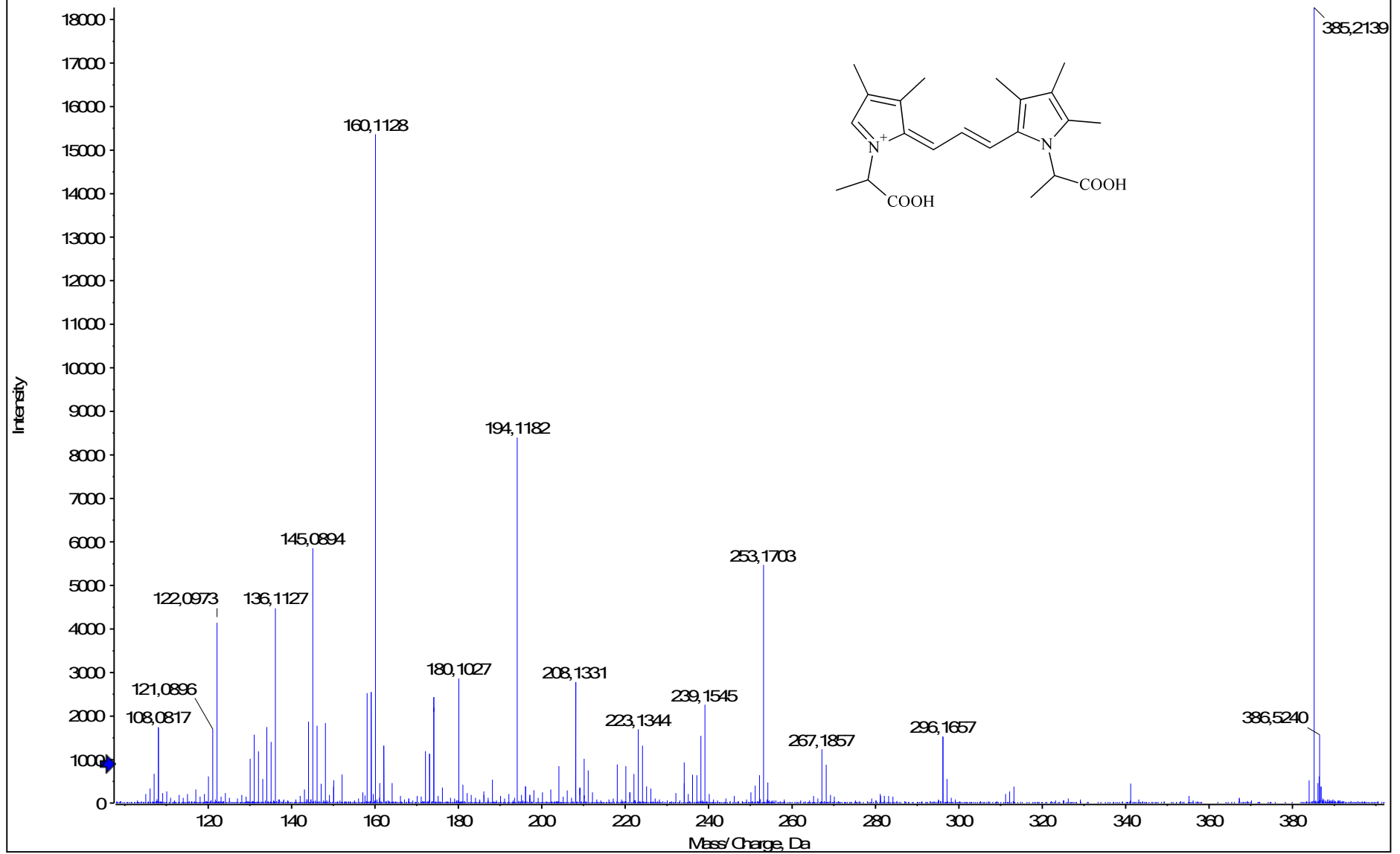
HRMS/MS spektrum látky GLO-371



11.2.2013 18:34:09

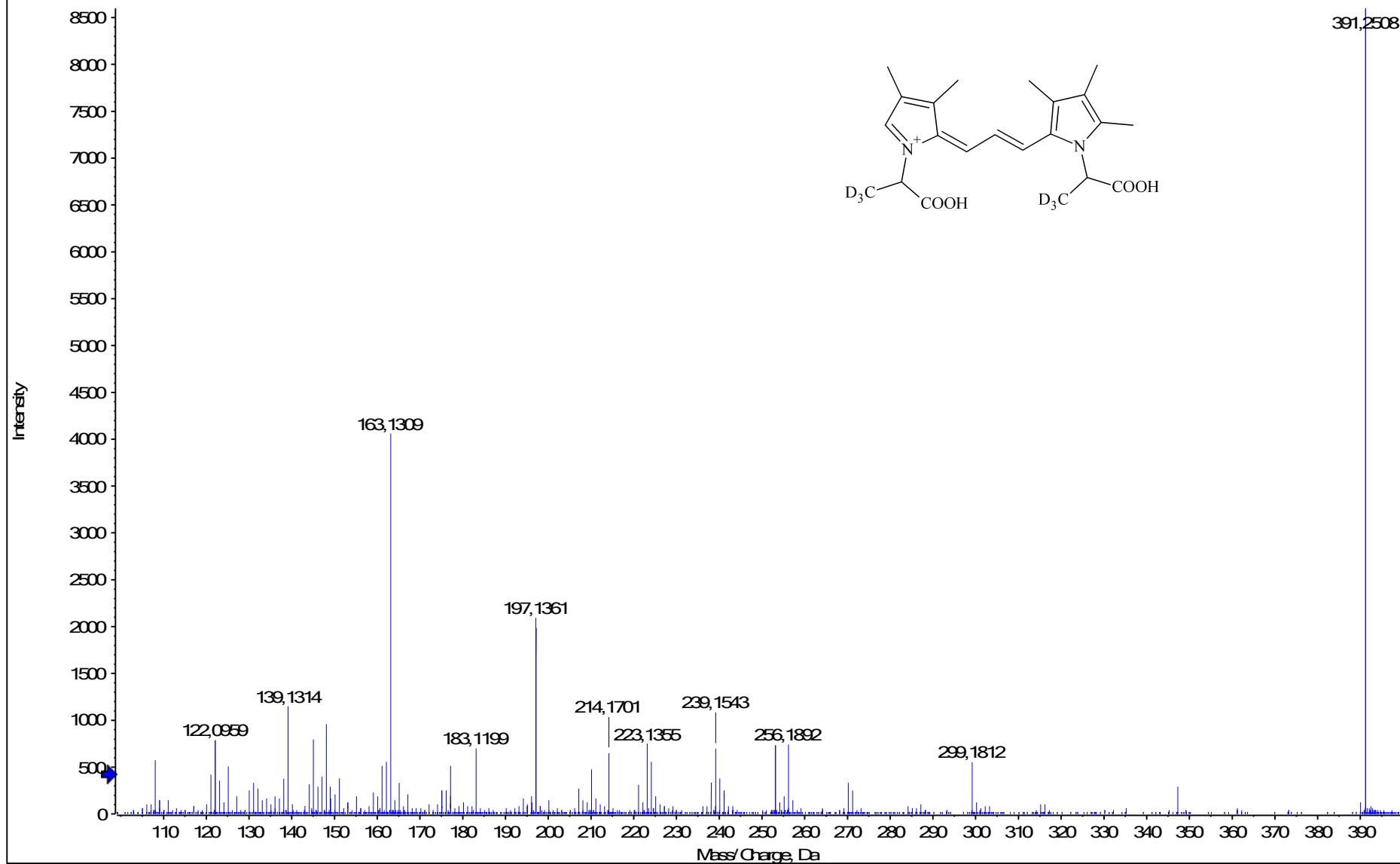
HRMS/MS spektrum látky G-385

Spectrum from 2012-11-29 07 Cesnek + Ala.wiff (sample 1) - Cesnek + Ala, Experiment 7, +TOF MS*2 (50 - 800) from 8,185 min
Precursor: 385,2 Da, CE 35,0



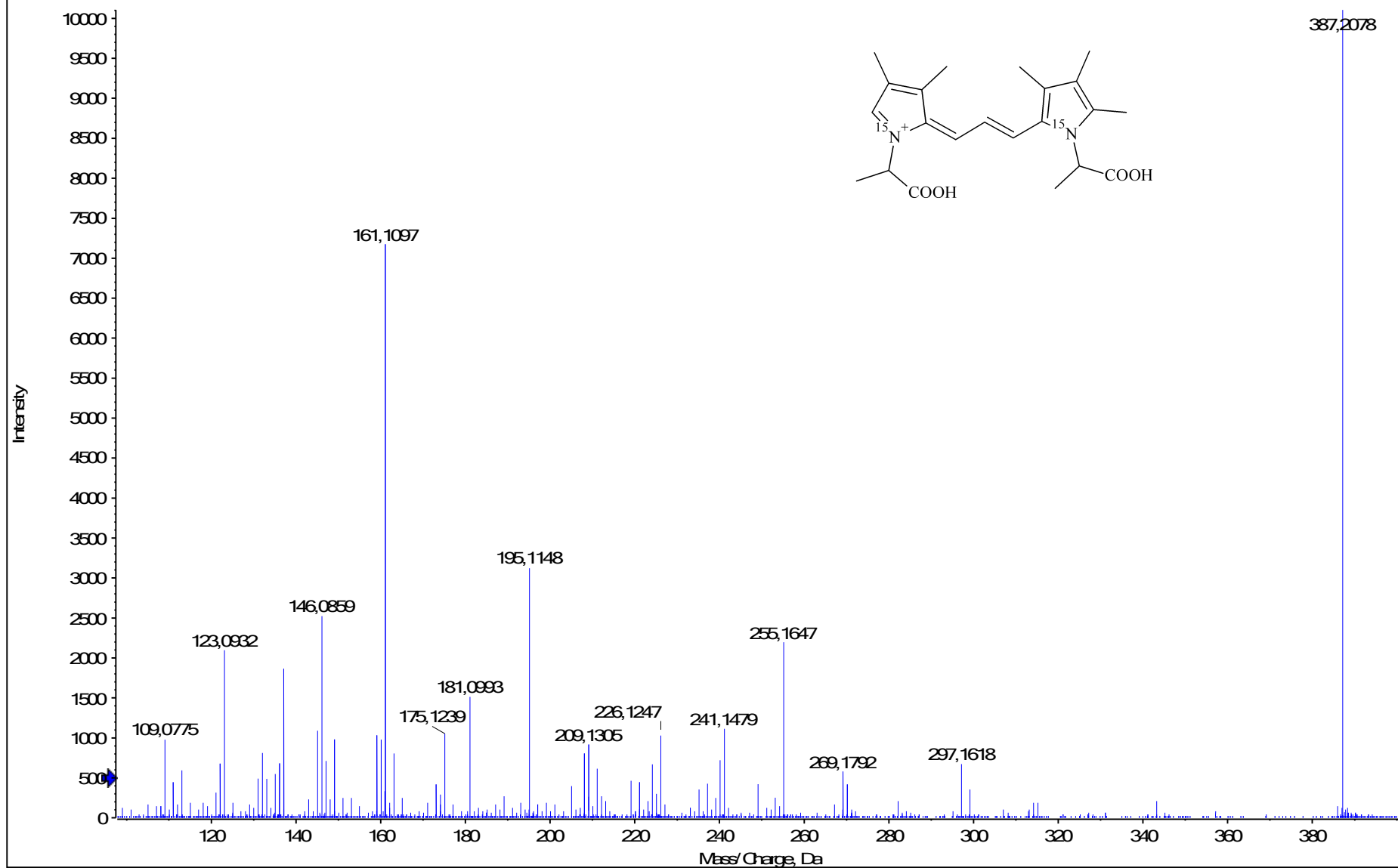
HRMS/MS spektrum látky G-385

Spectrum from 2012-11-29 08 Česnek + Ala Awiff (sample 1) - Česnek + Ala A, Experiment 5, +TOF MS² (50 - 800) from 8,089 min
Precursor: 391,3 Da, CE 35,0



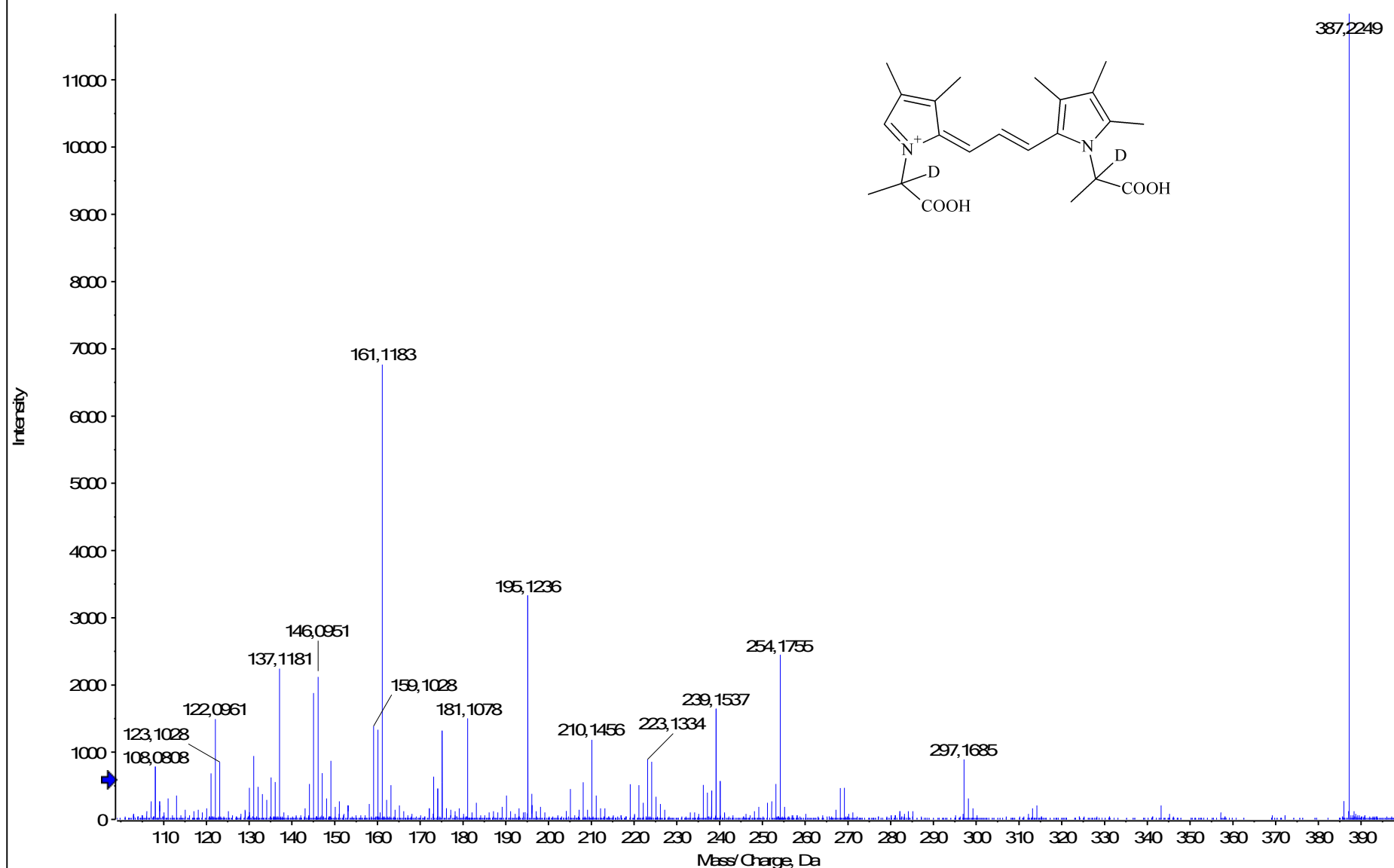
HRMS/MS spektrum látky G-385

Spectrum from 2012-11-29 09 Česnek + Ala Bwiff (sample 1) - Česnek + Ala B, Experiment 7, +TOF MS² (50 - 800) from 8,112 min
Precursor: 387,2 Da, CE 35,0

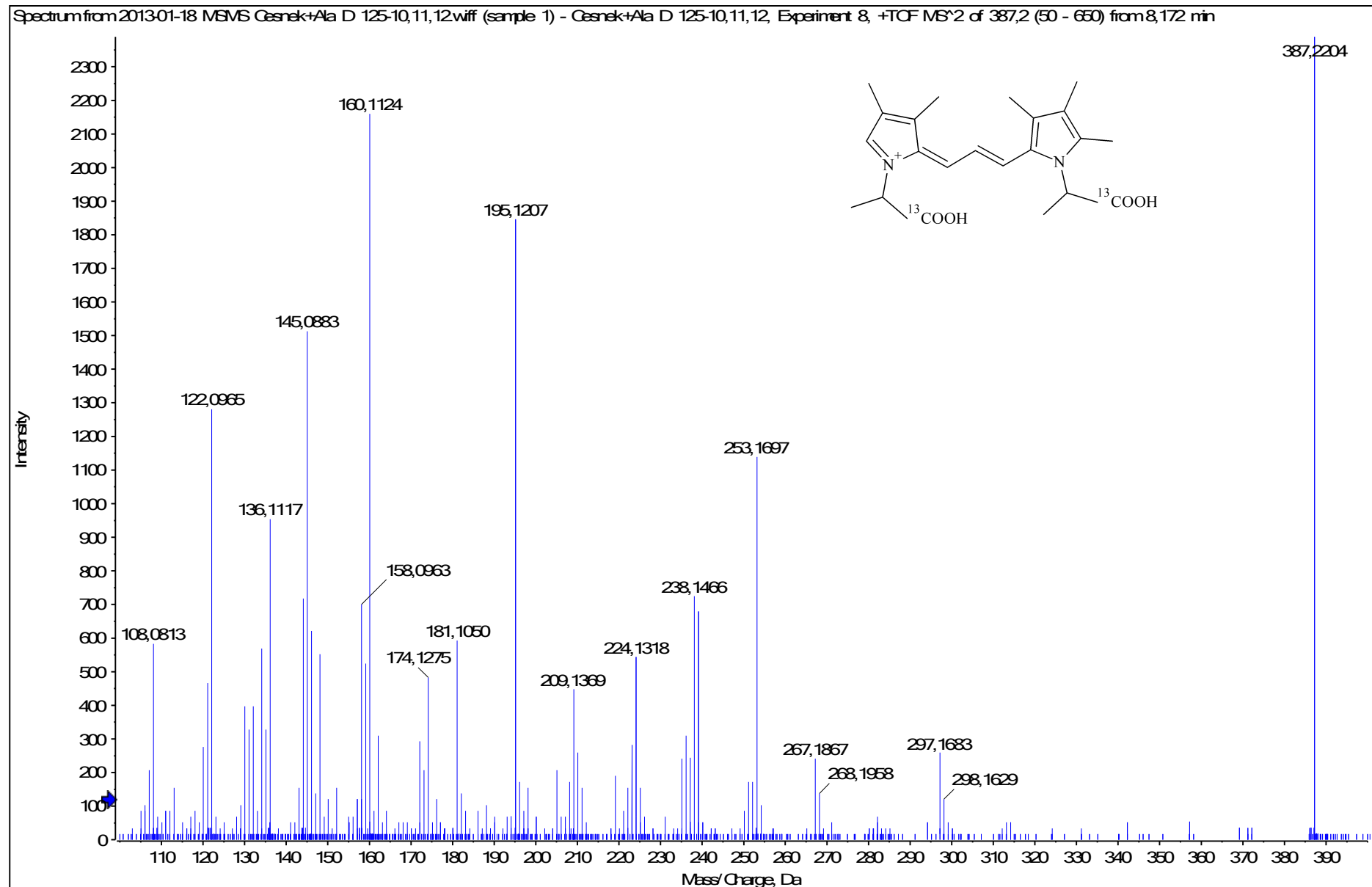


HRMS/MS spektrum látky G-385

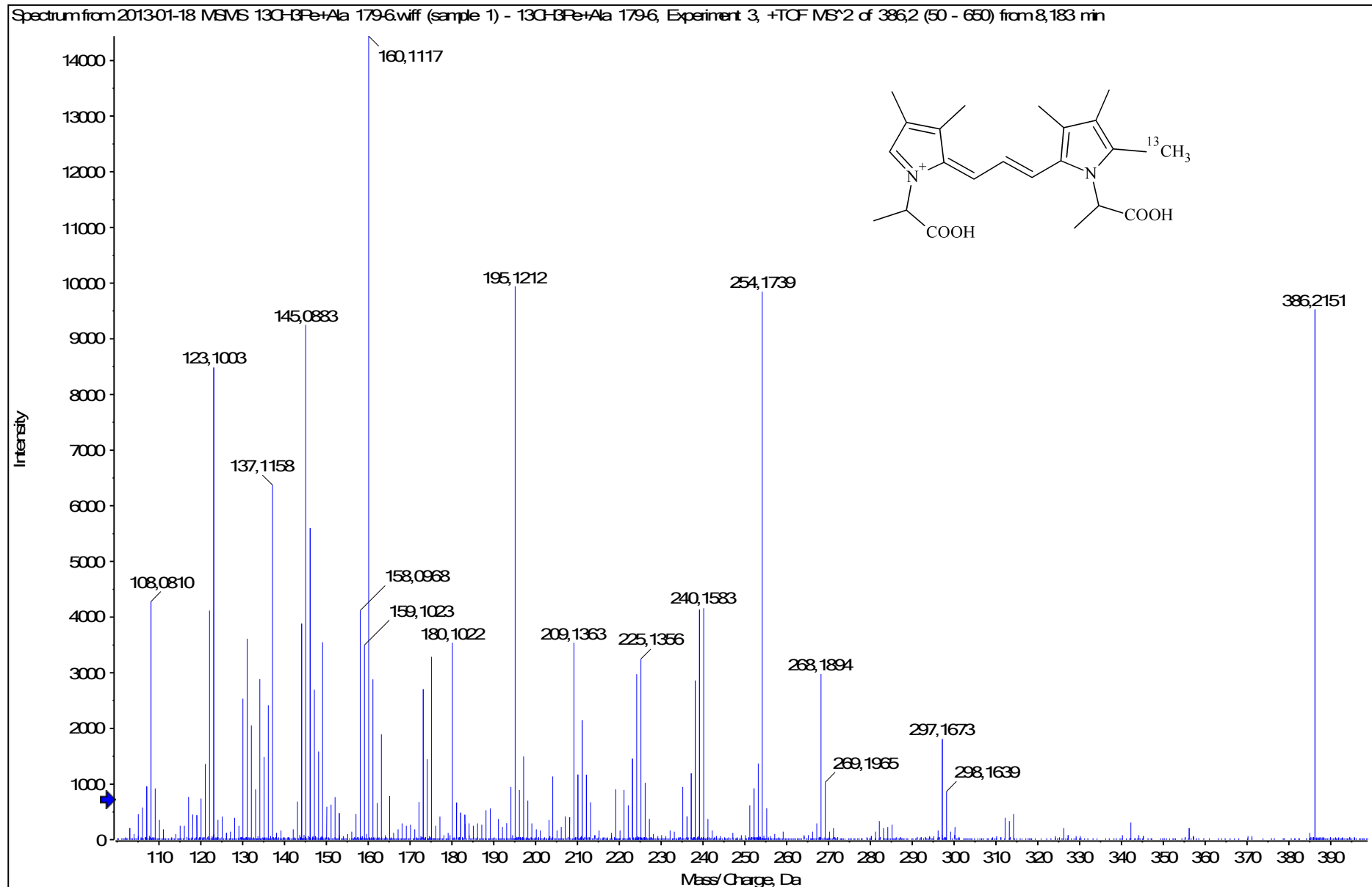
Spectrum from 2012-11-29 10 Česnek + Ala Cwiff (sample 1) - Česnek + Ala C, Experiment 8, +TOF MS² (50 - 800) from 8,232 min
Precursor: 387,2 Da, CE 35,0



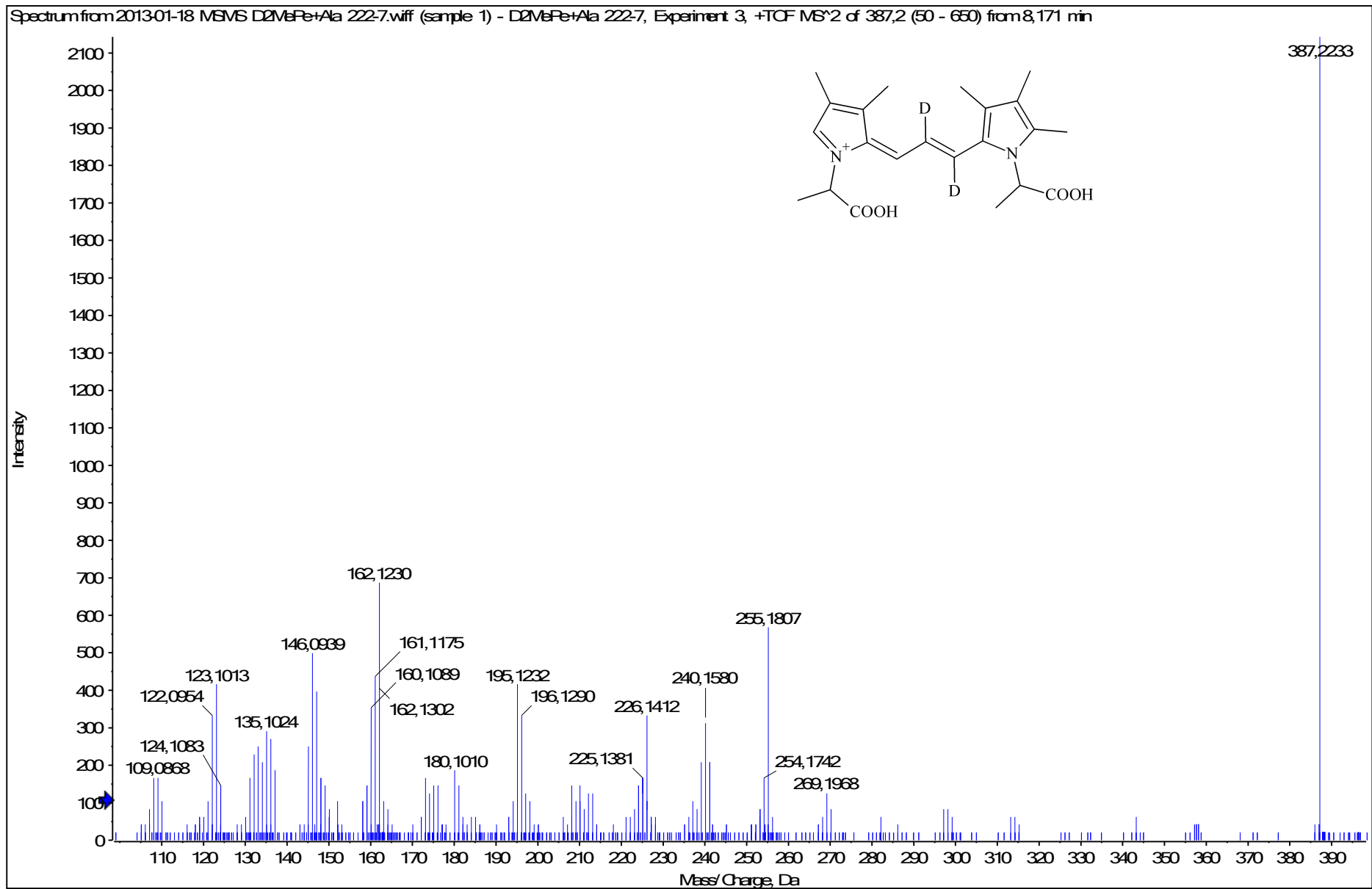
HRMS/MS spektrum látky G-385



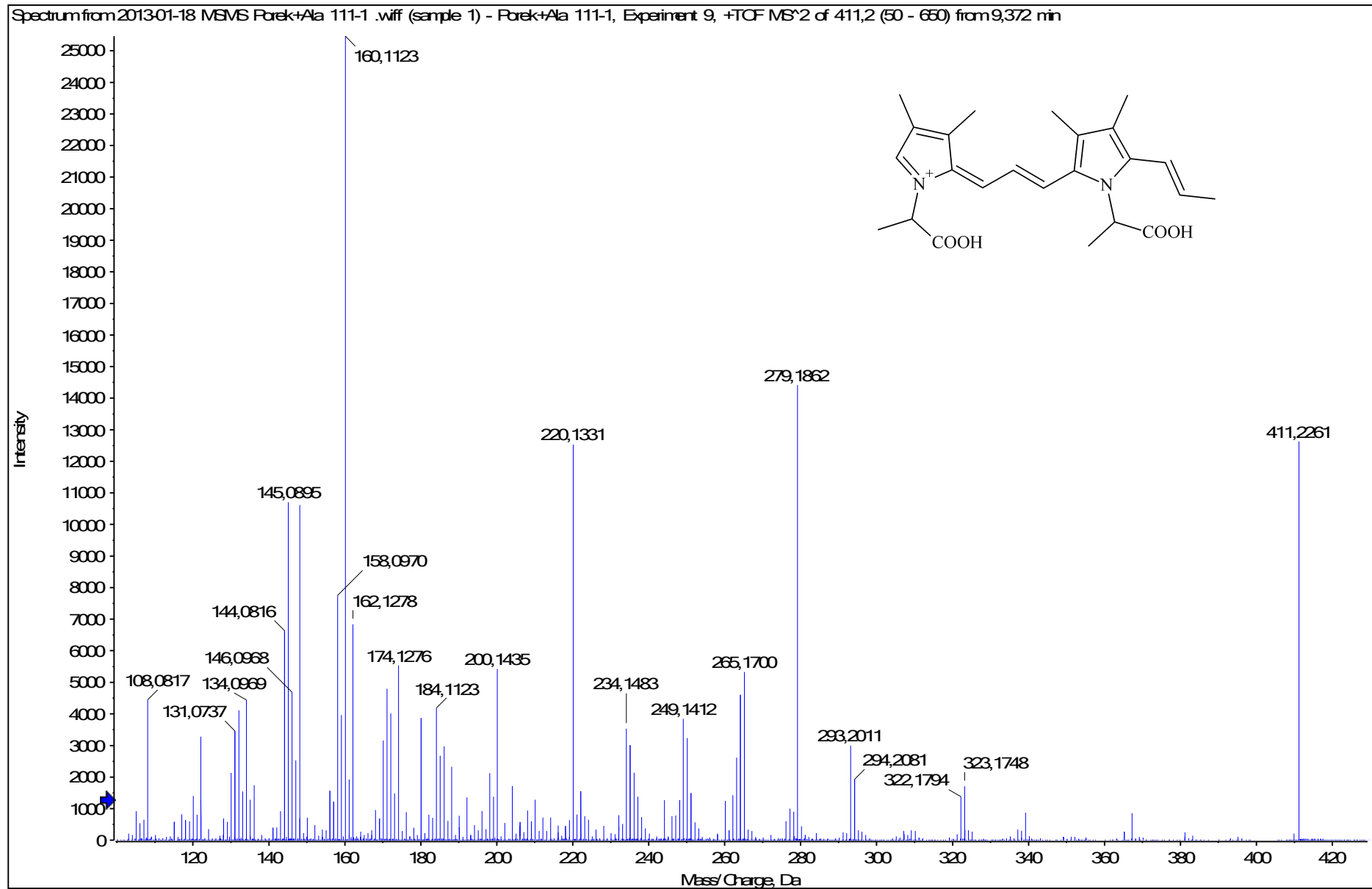
HRMS/MS spektrum látky G-385



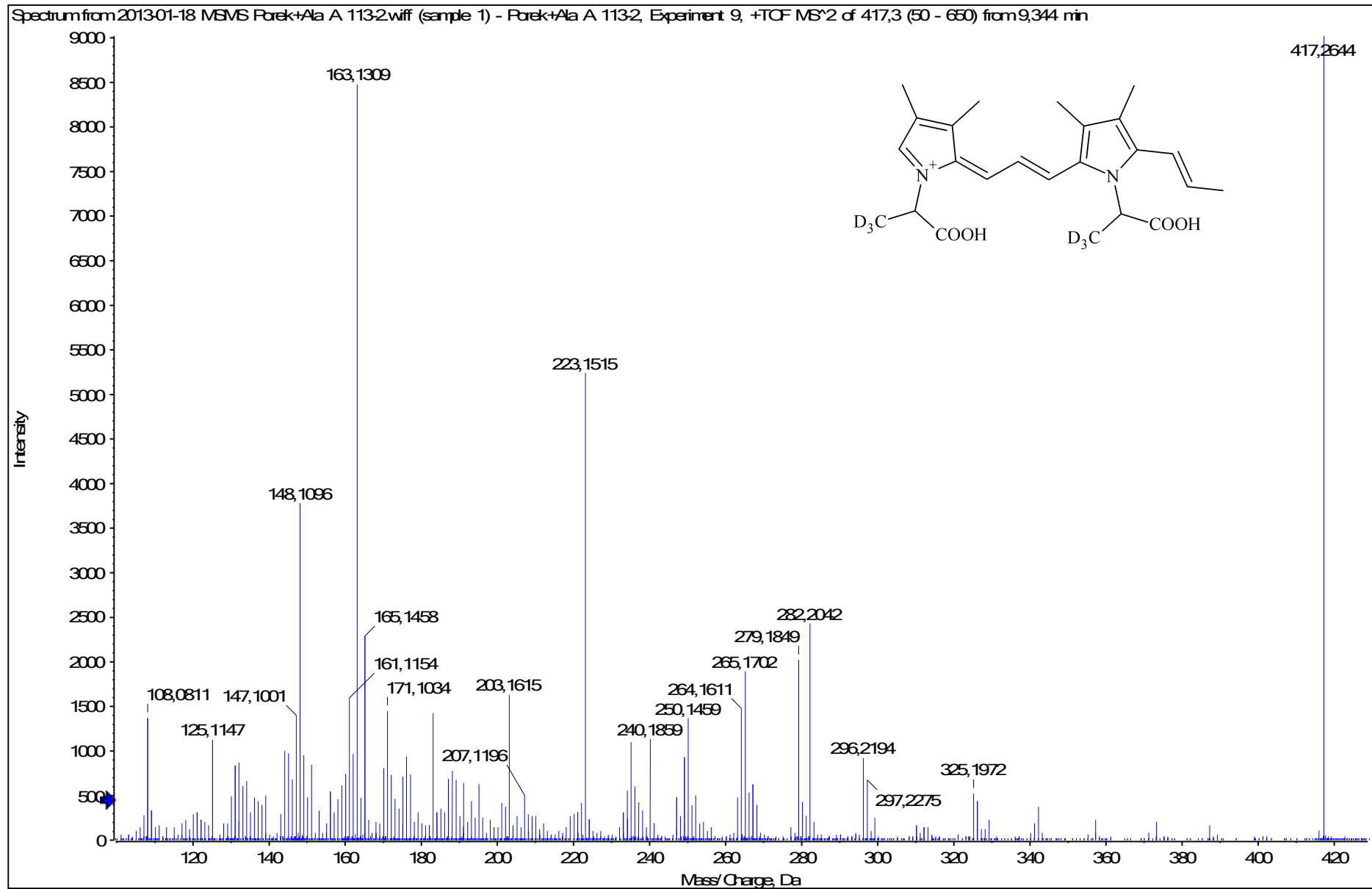
HRMS/MS spektrum látky G-385



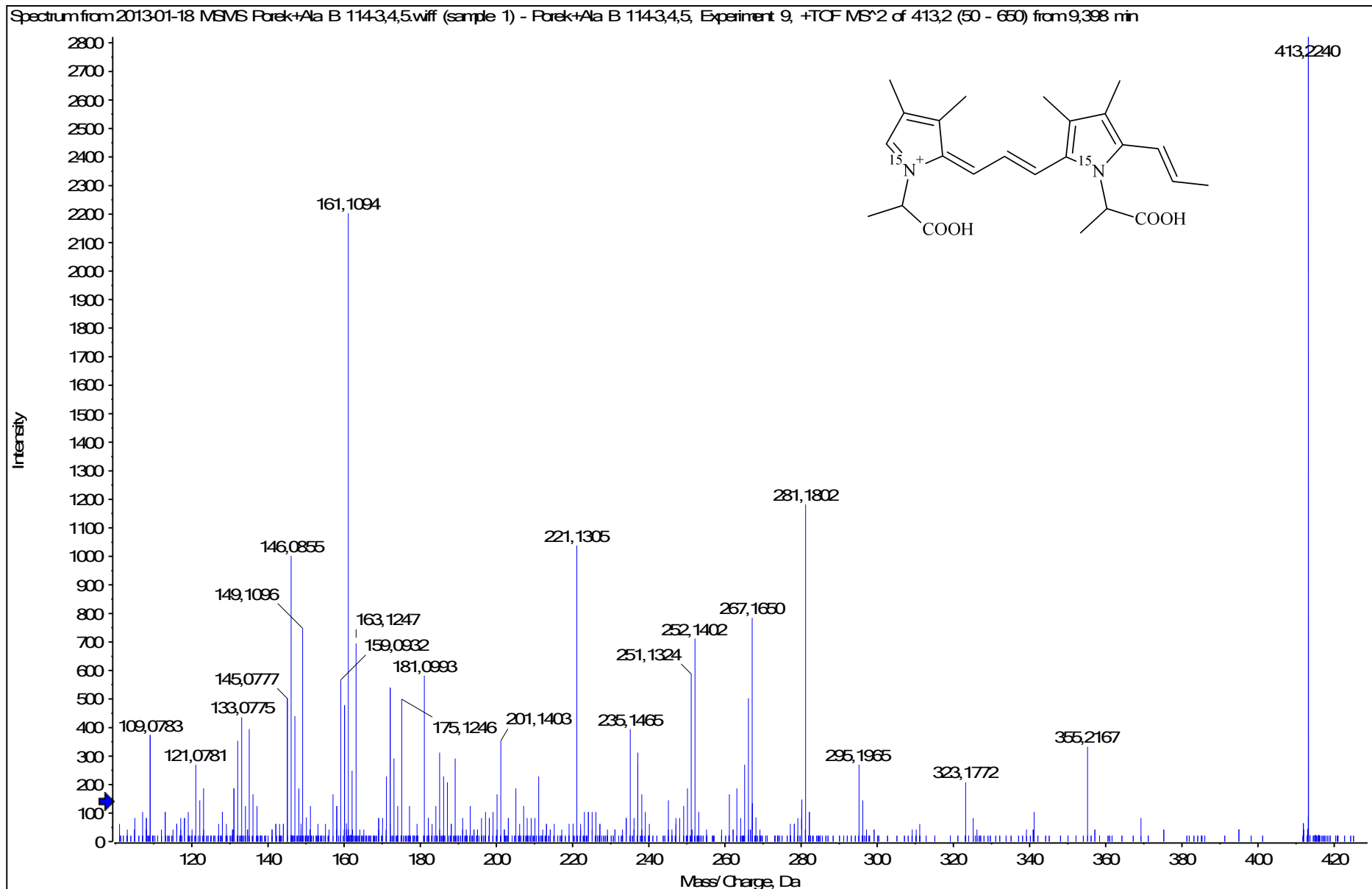
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



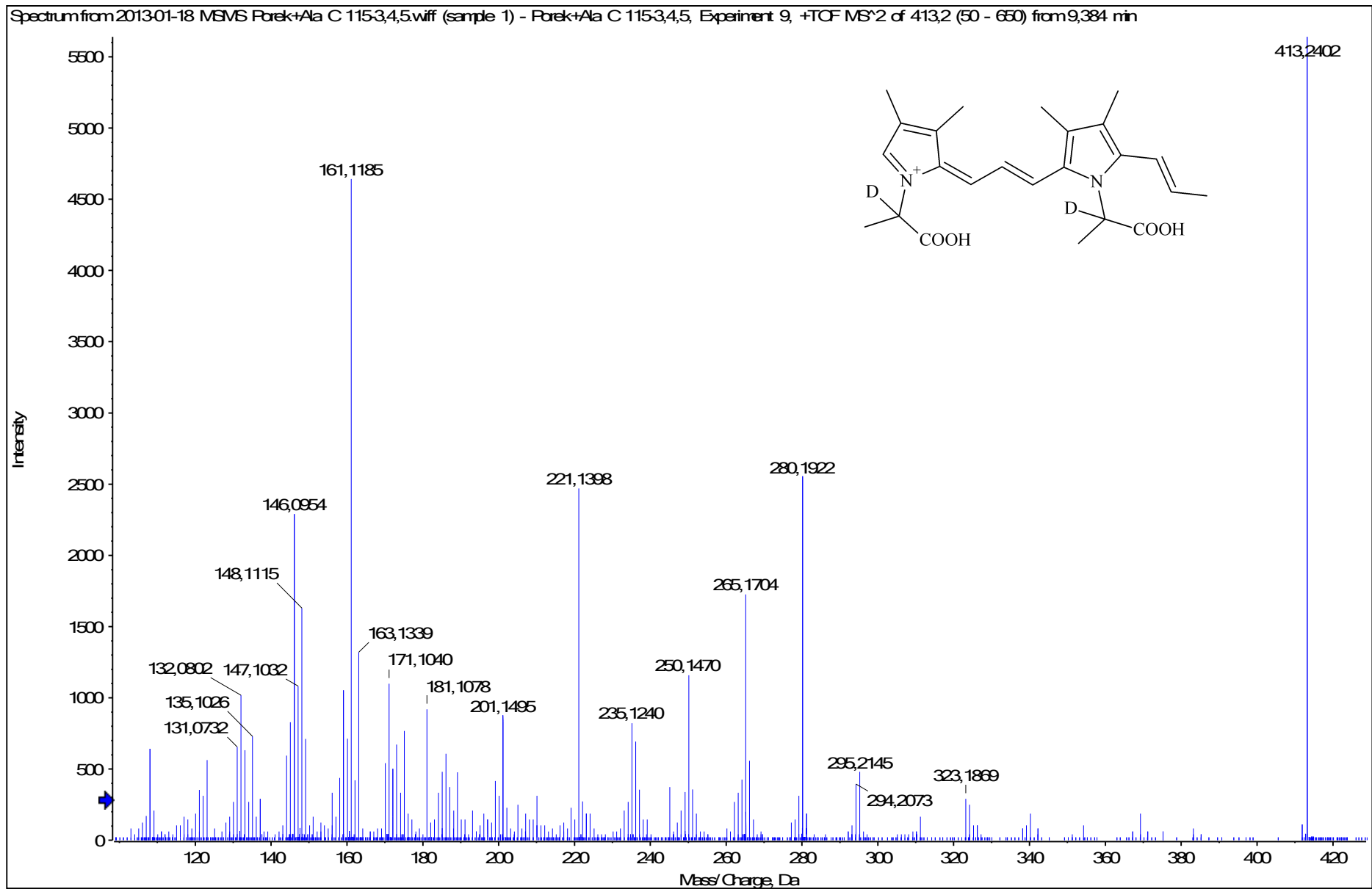
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



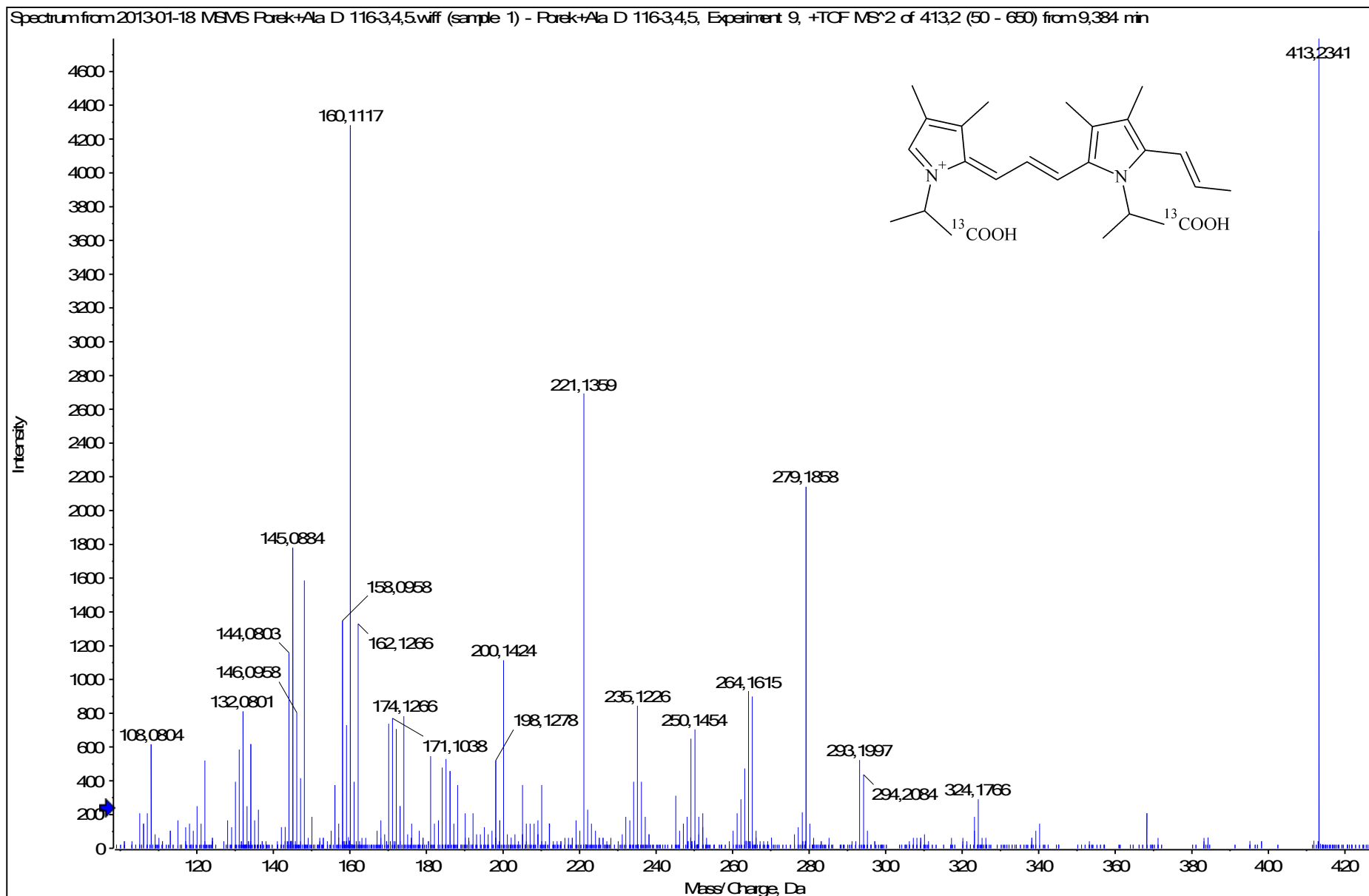
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



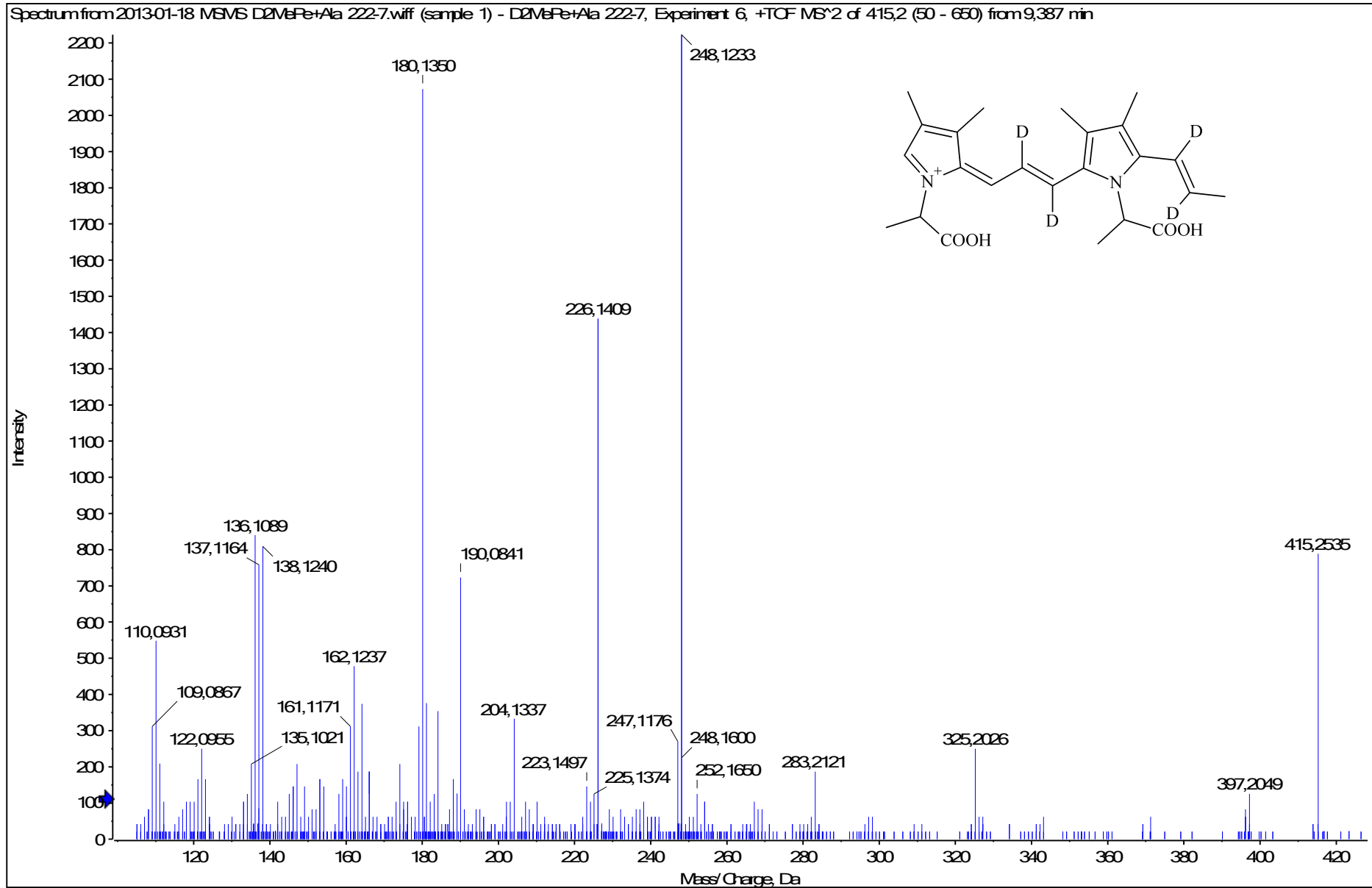
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



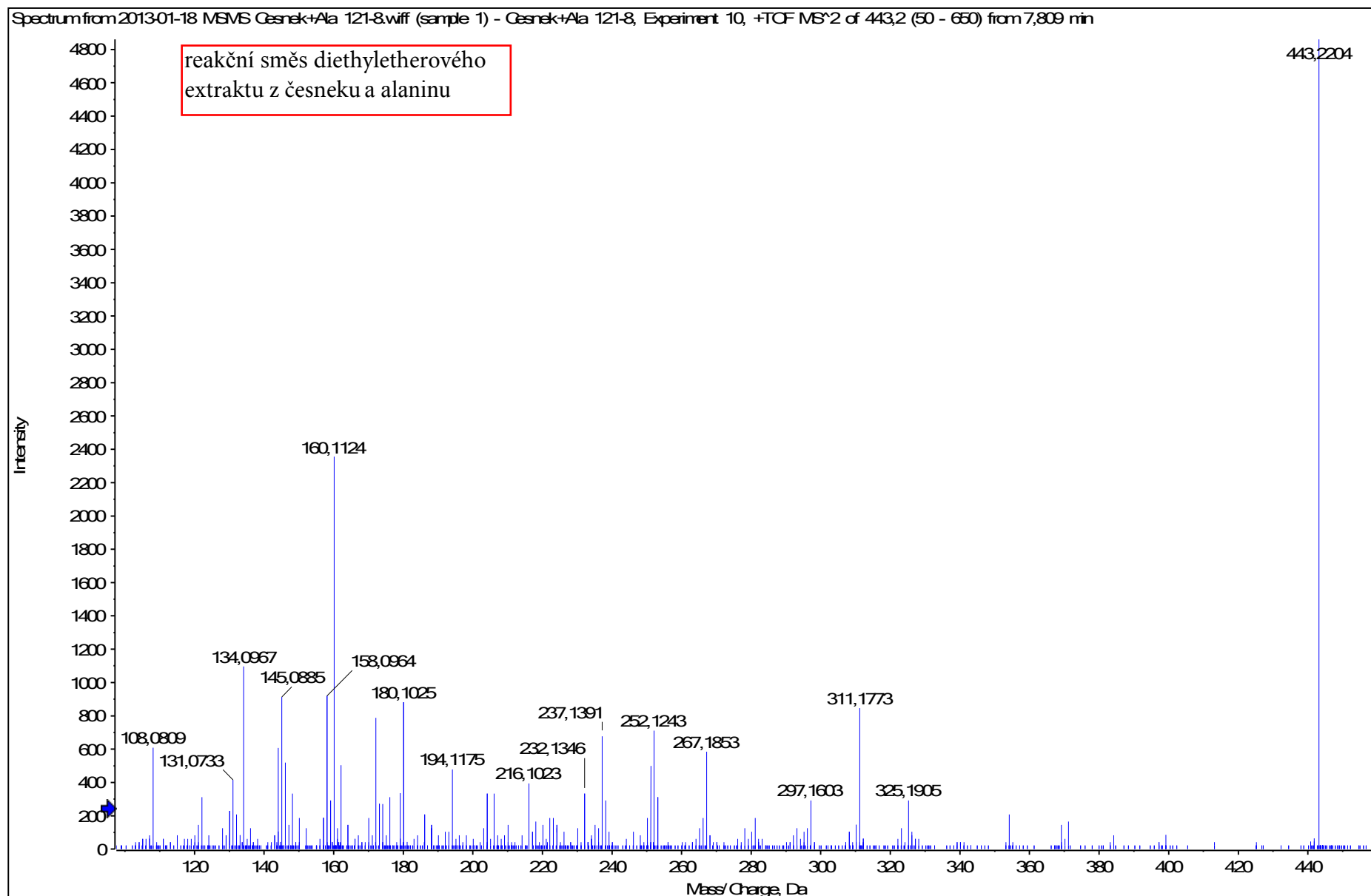
HRMS/MS spektrum látky GLO-411



HRMS/MS spektrum látky GLO-411

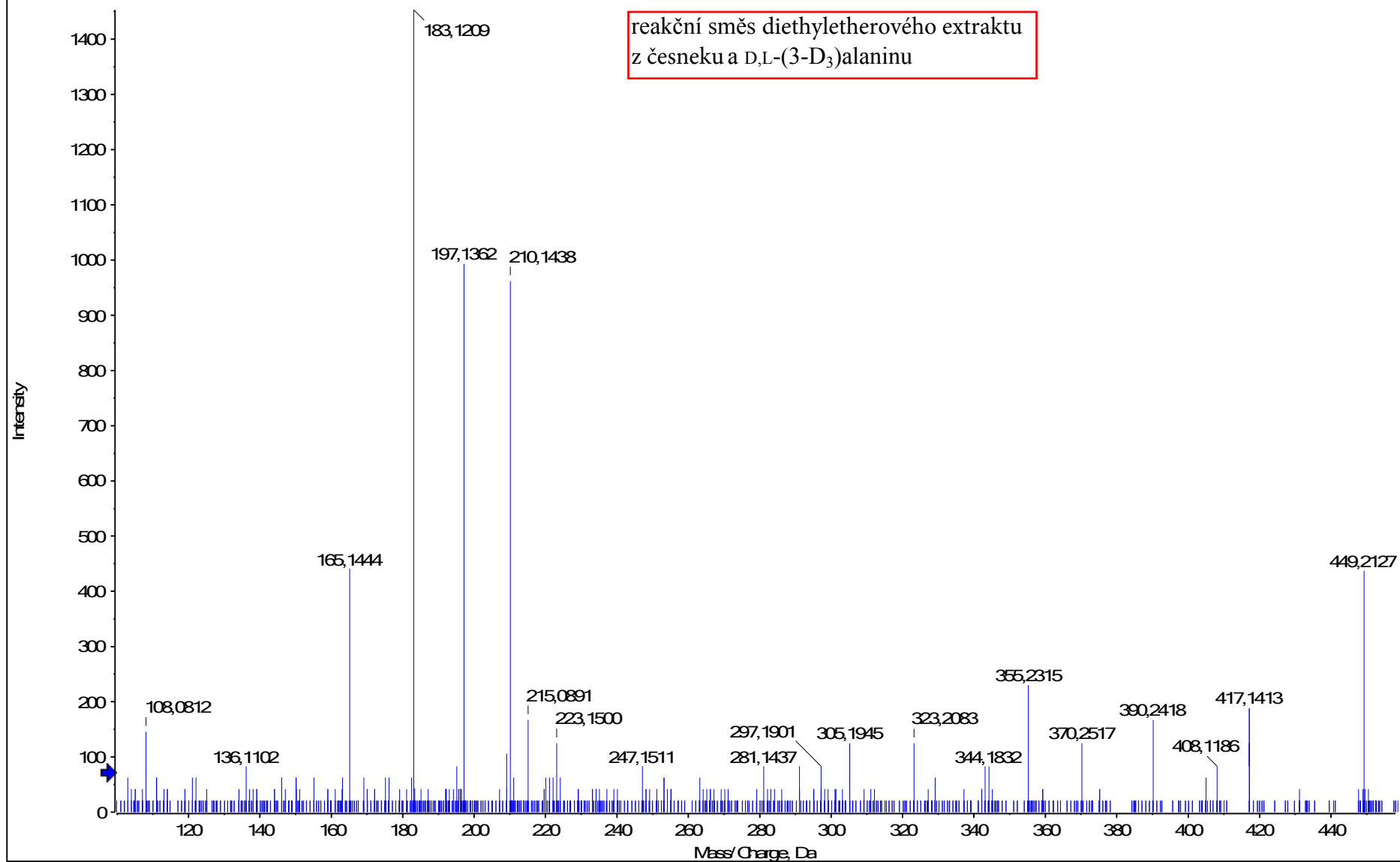


HRMS/MS spektrum látky G-443

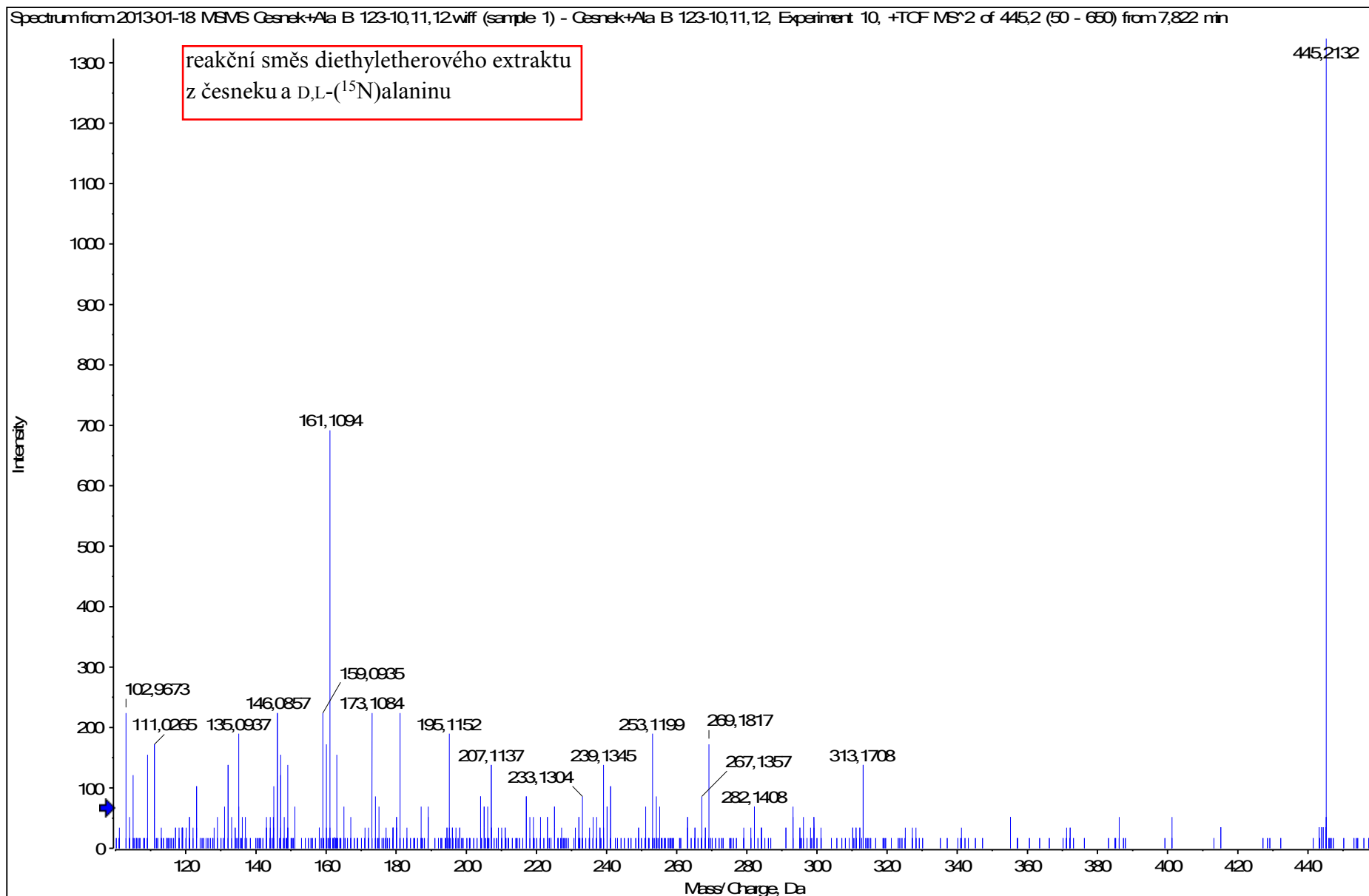


HRMS/MS spektrum látky G-443

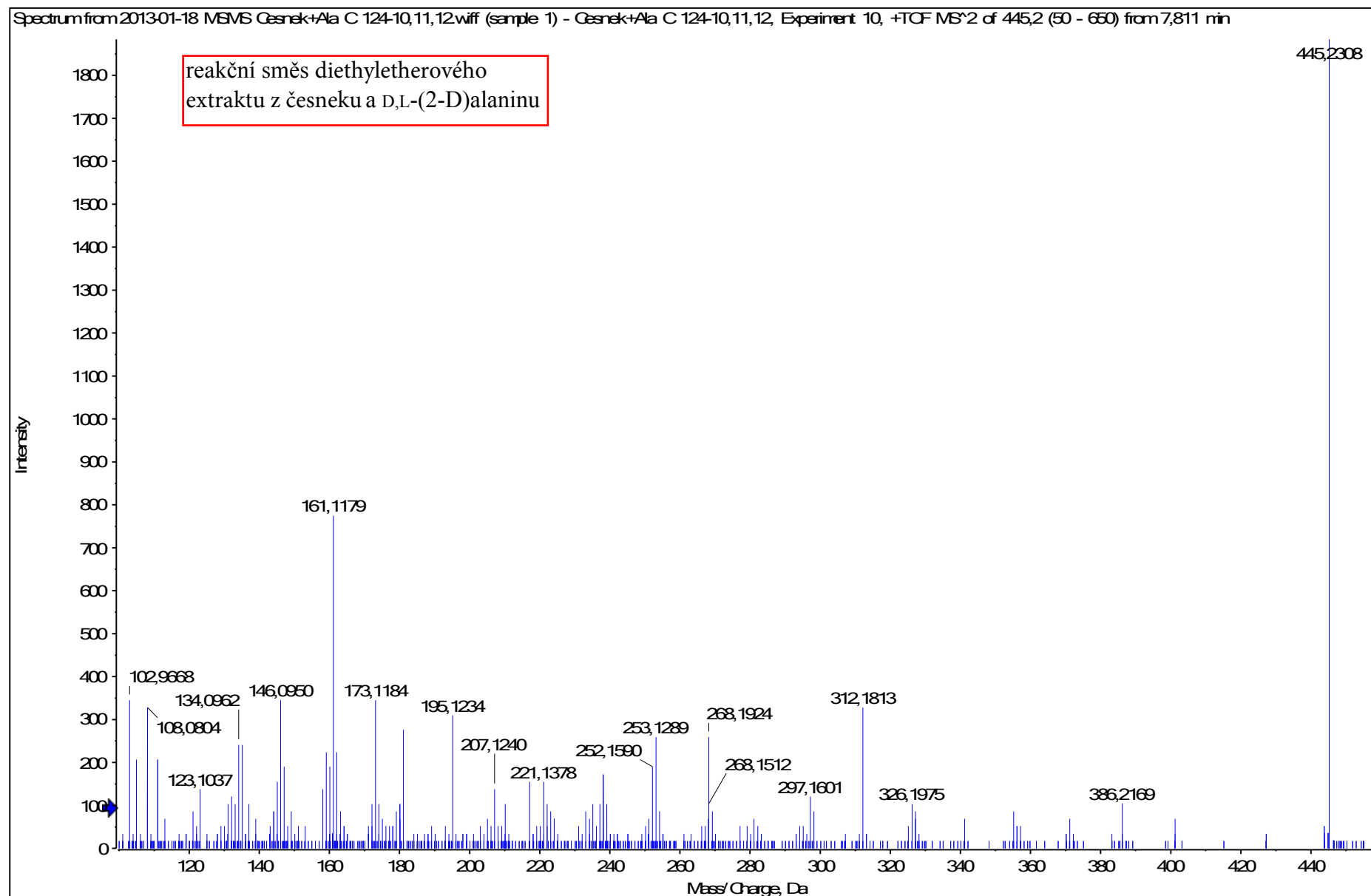
Spectrum from Česnek + Ala Awiff (sample 1) - Česnek + Ala A, Experiment 9, +TOF MS² (50 - 700) from 7,732 min
Precursor: 449,2 Da, CE 35,0



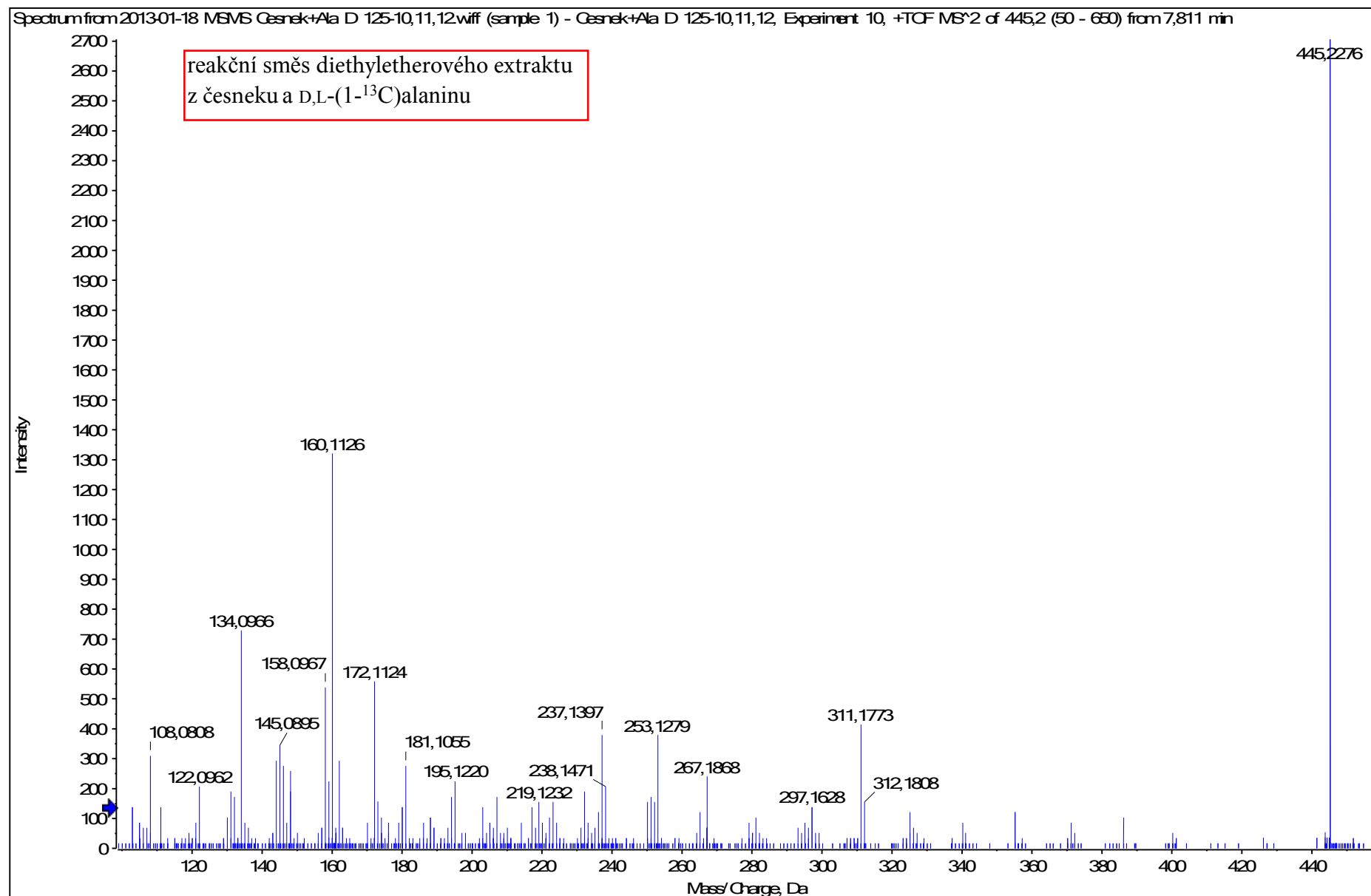
HRMS/MS spektrum látky G-443



HRMS/MS spektrum látky G-443



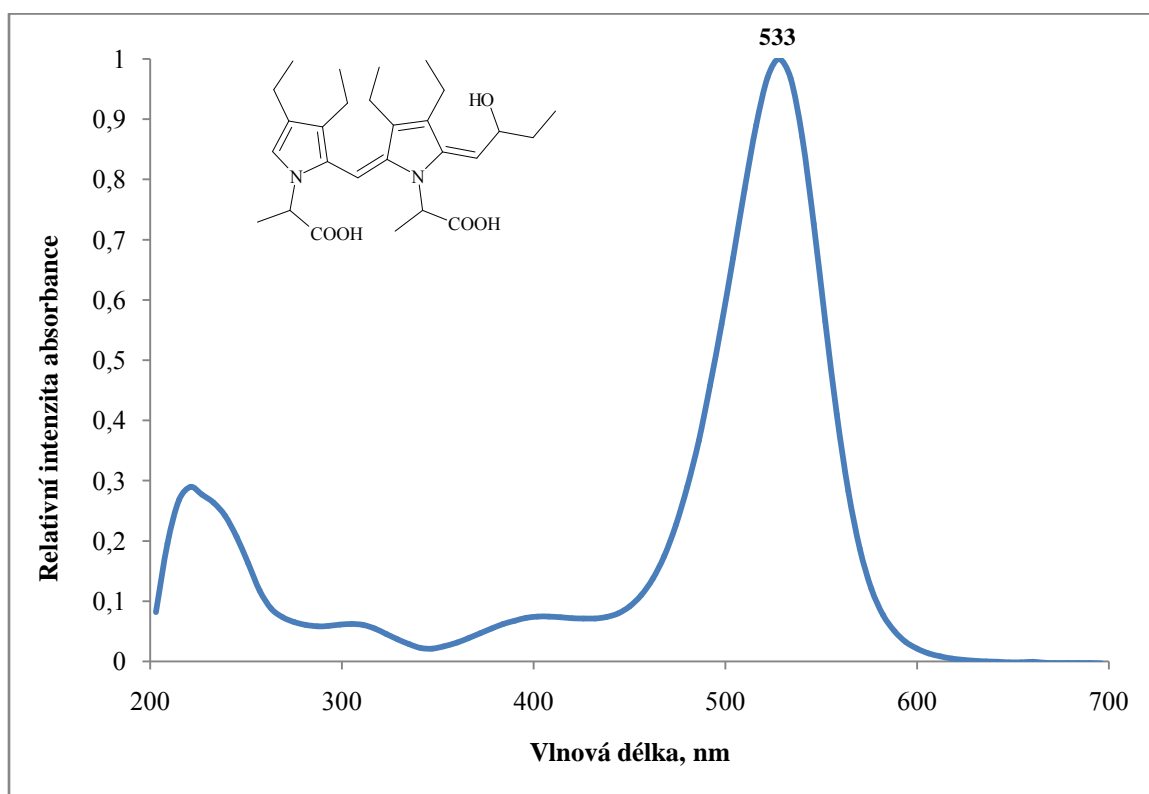
HRMS/MS spektrum látky G-443



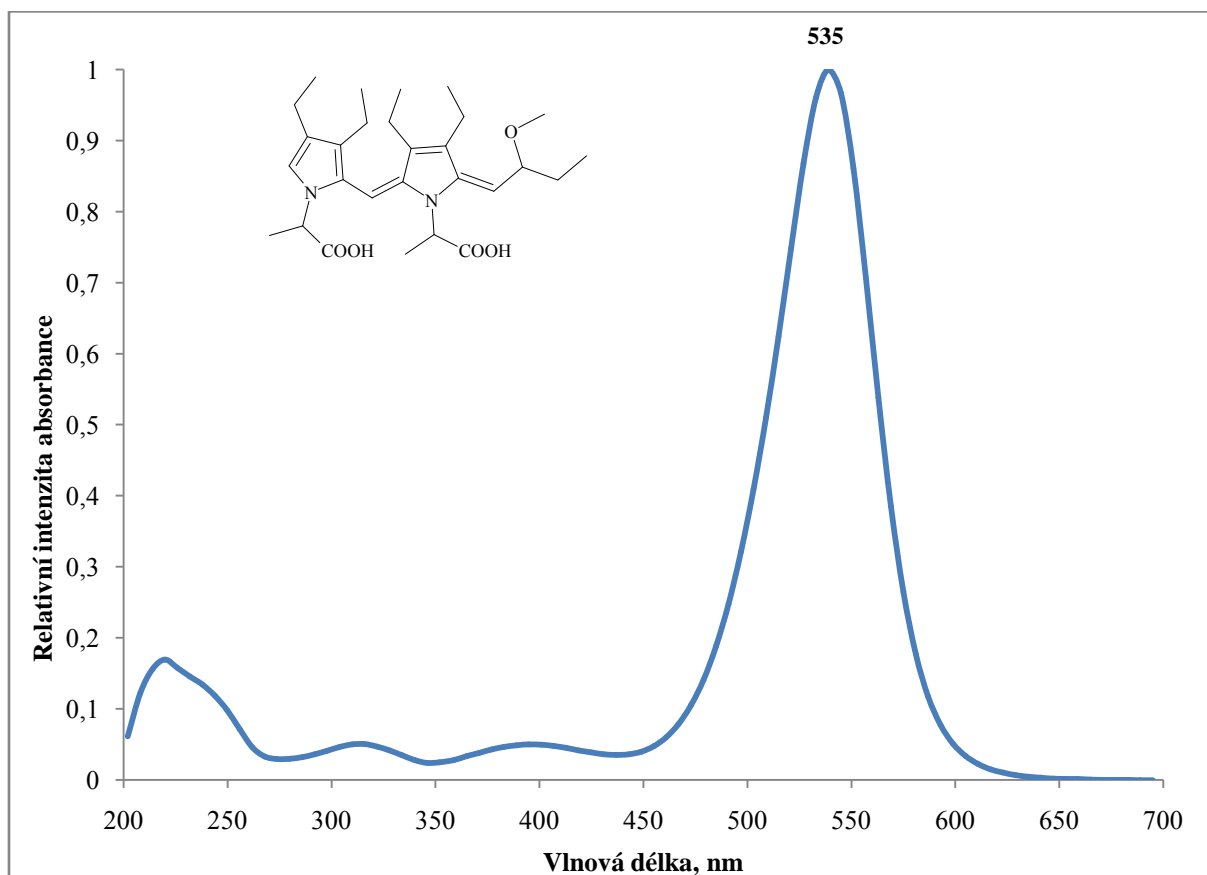
12.2.2013 18:08:03

Příloha 19: UV-Vis spektra některých barevných sloučenin vytvořených
v česneku sicilském

UV-Vis spektrum látky S-472

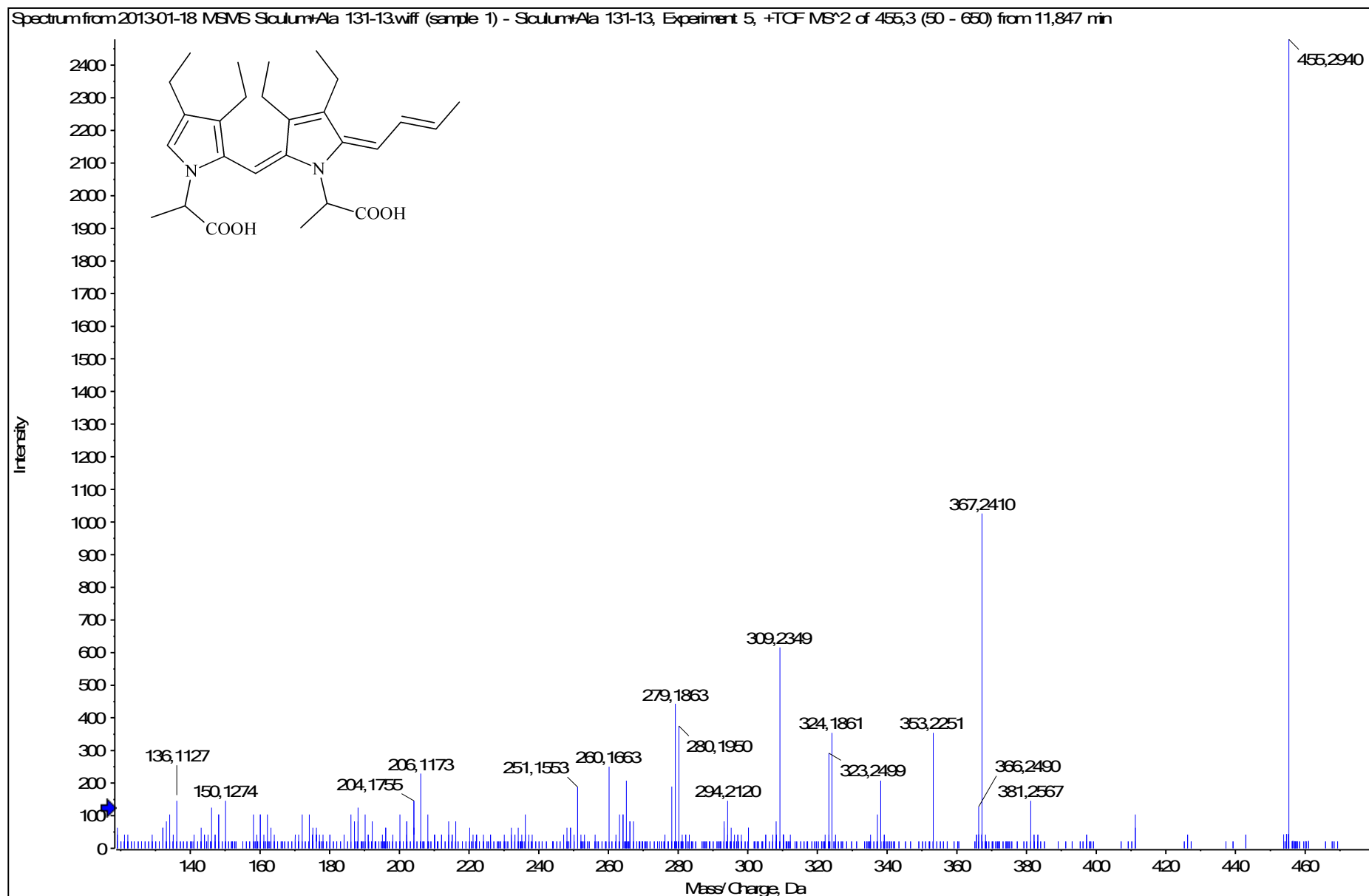


UV-Vis spektrum látky S-486

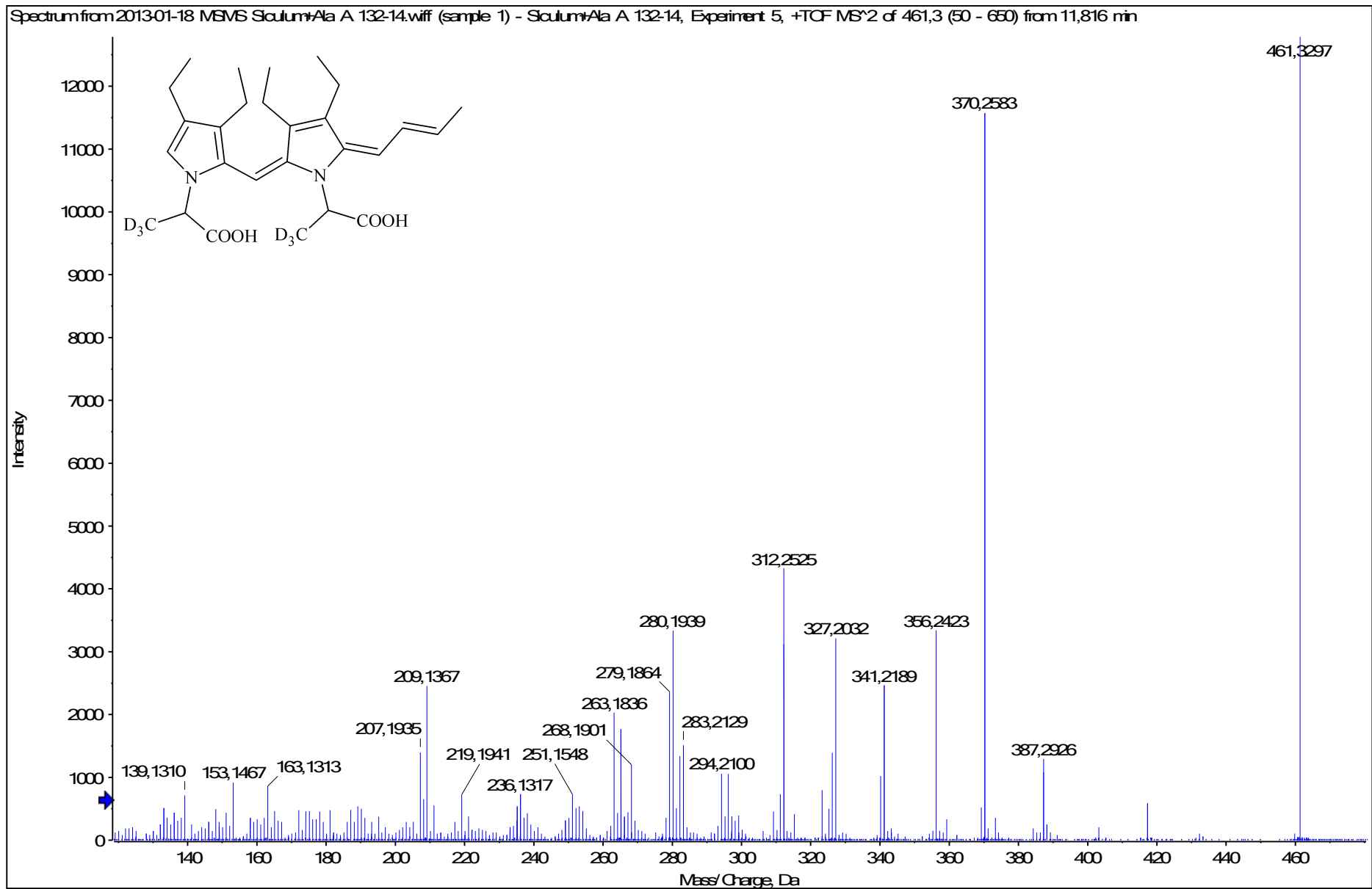


Příloha 20: ESI(+)-HRMS/MS spektra barevných sloučeniny vytvořených
v česneku sicilském

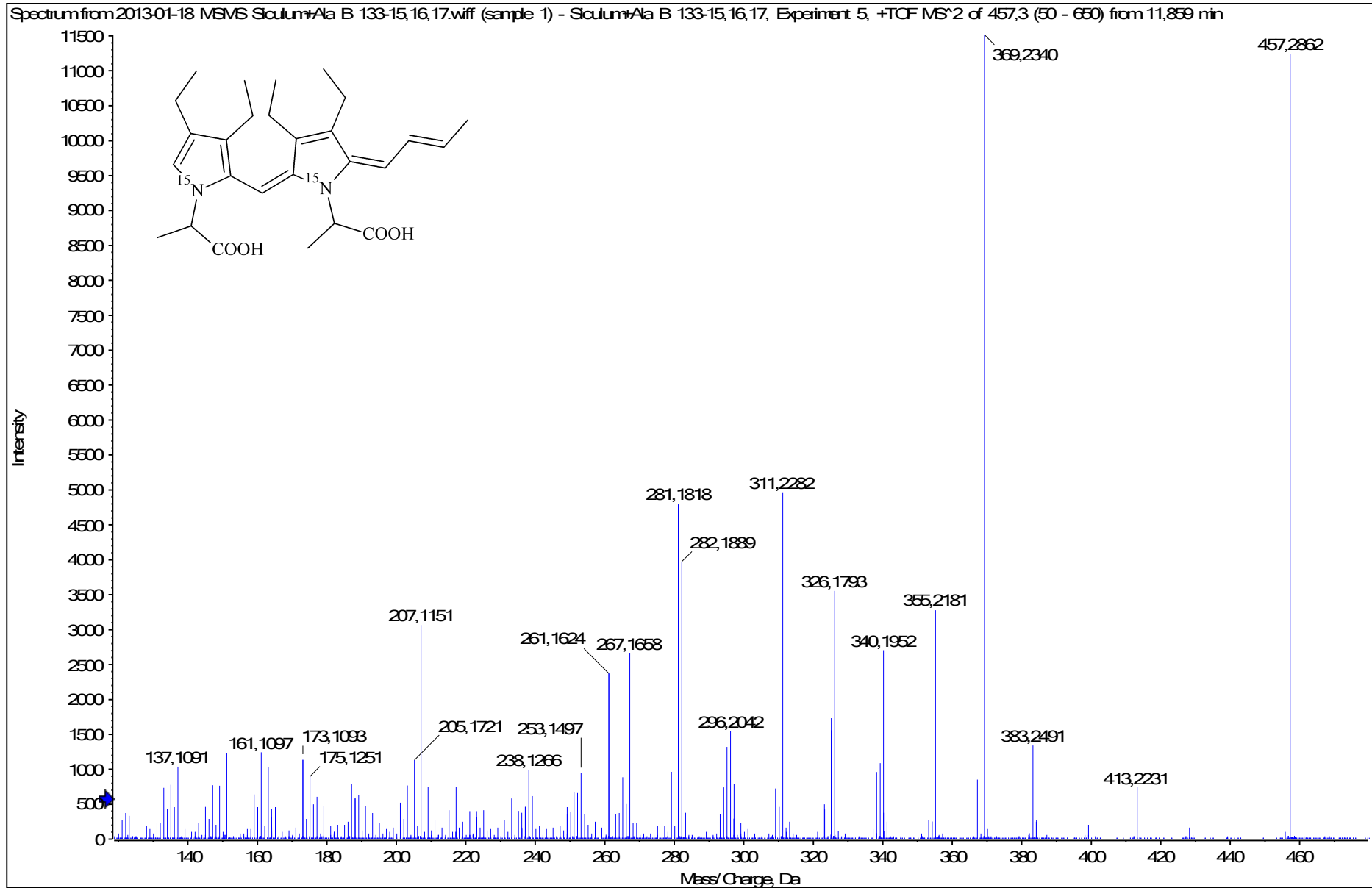
HRMS/MS spektrum látky S-454



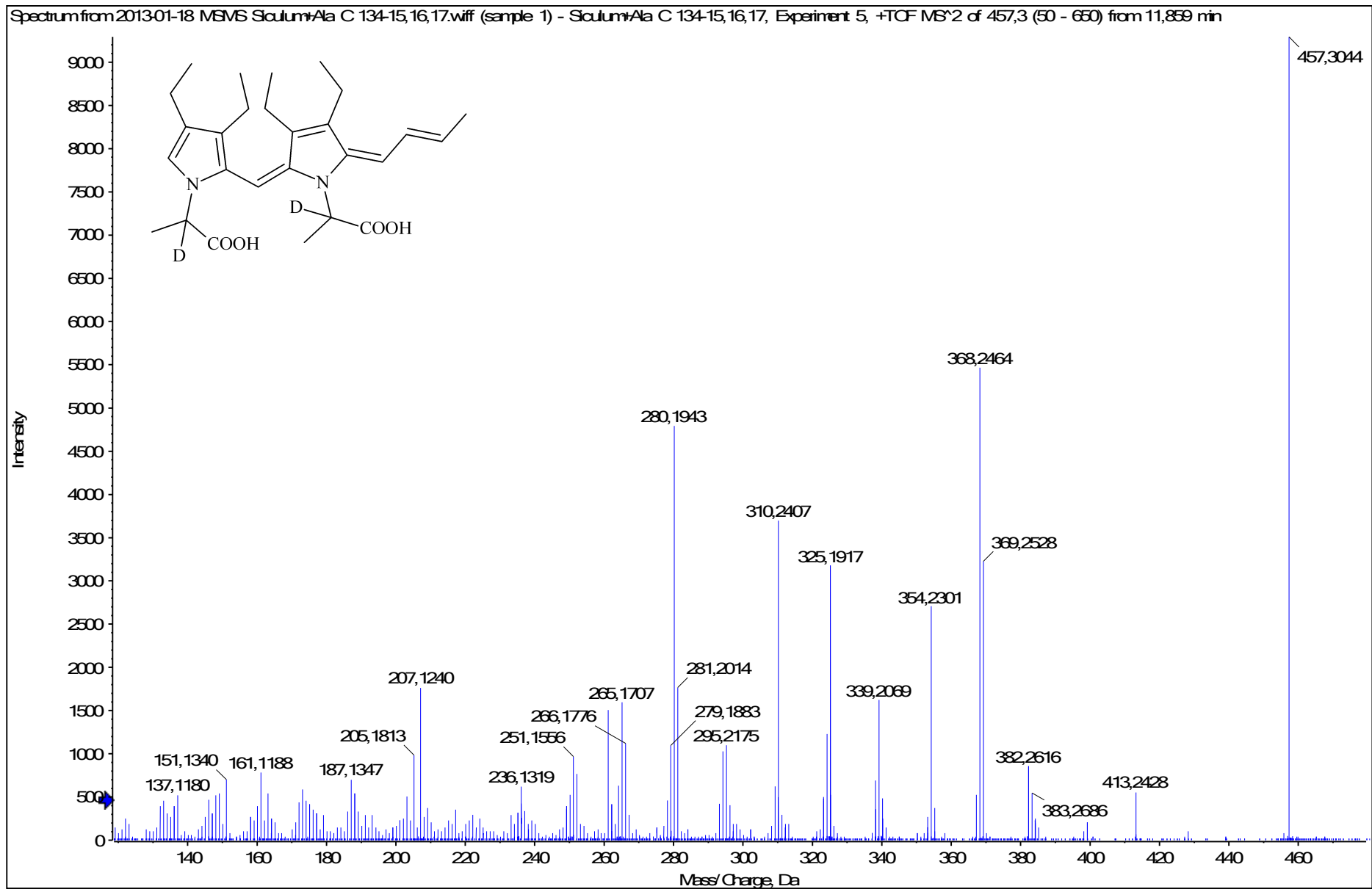
HRMS/MS spektrum látky S-454



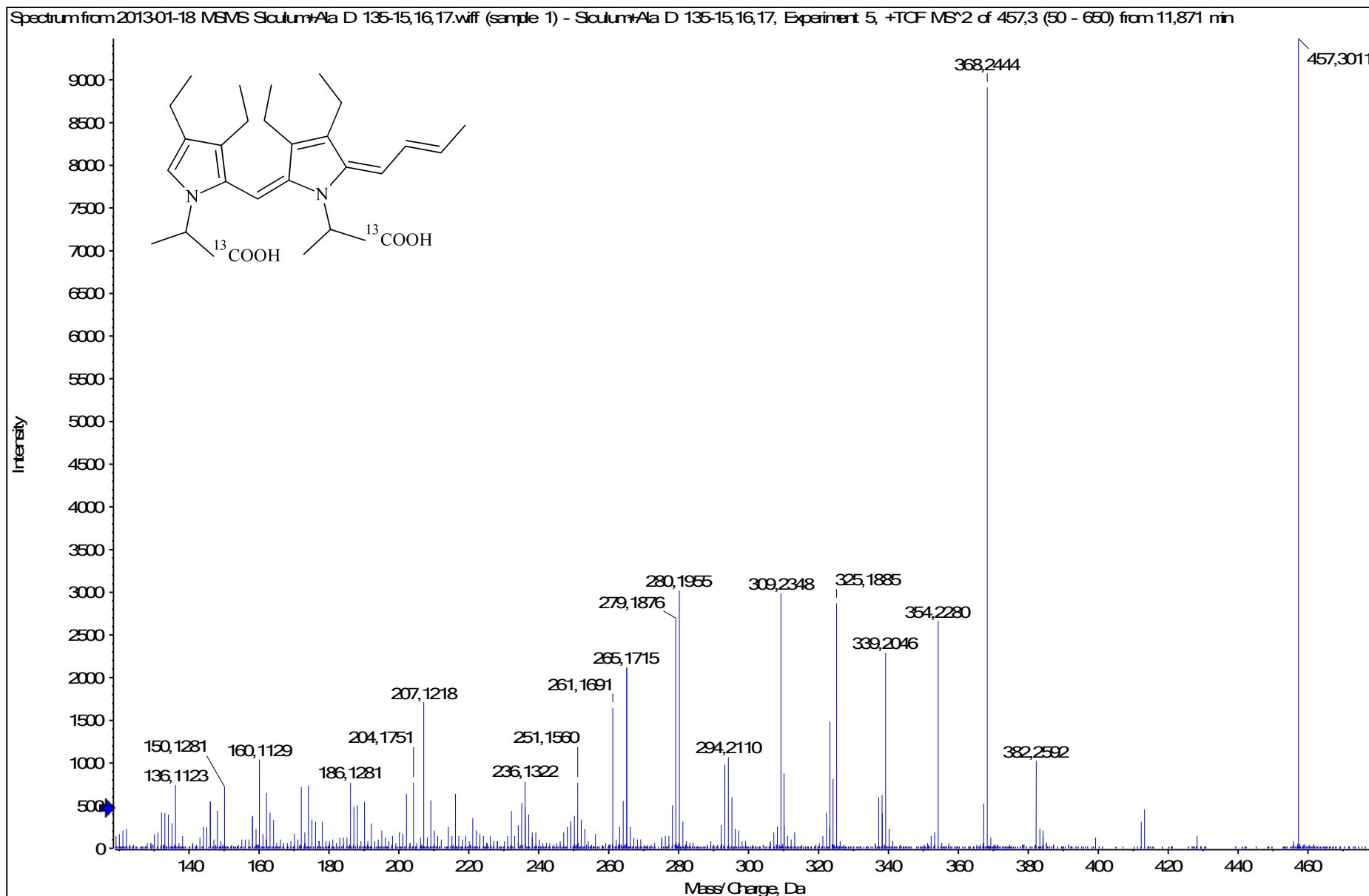
HRMS/MS spektrum látky S-454



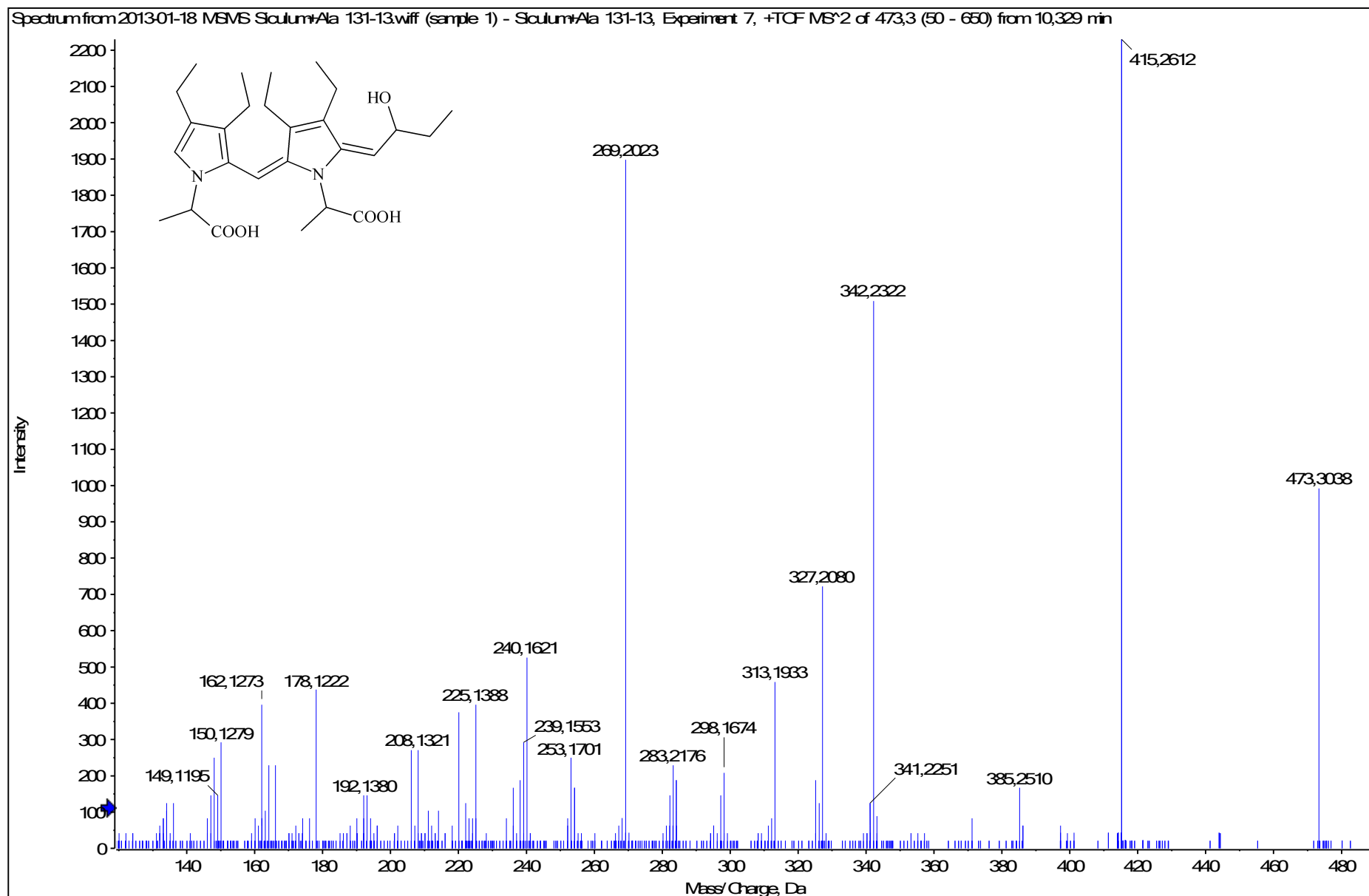
HRMS/MS spektrum látky S-454



HRMS/MS spektrum látky S-454

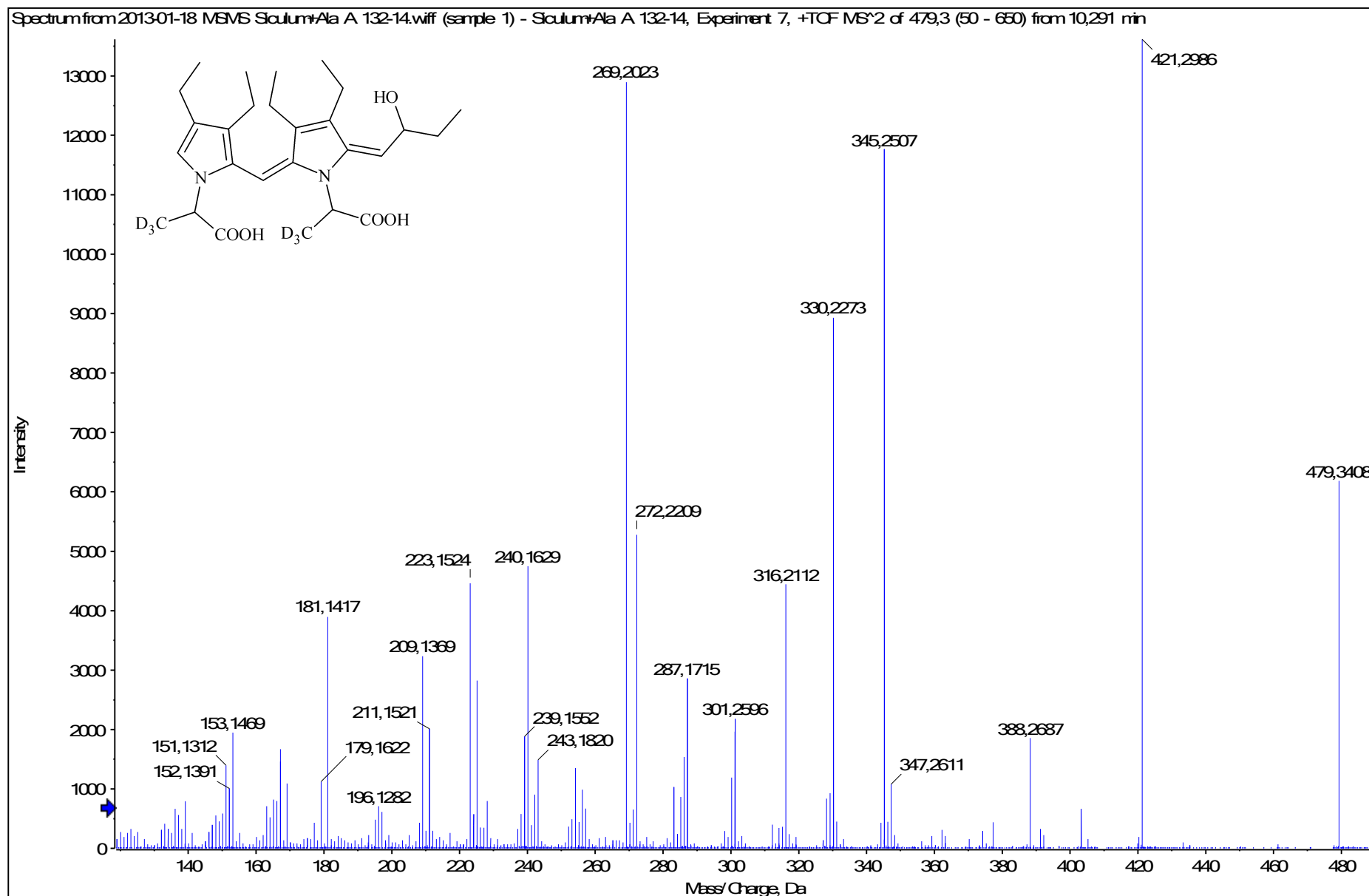


HRMS/MS spektrum látky S-472

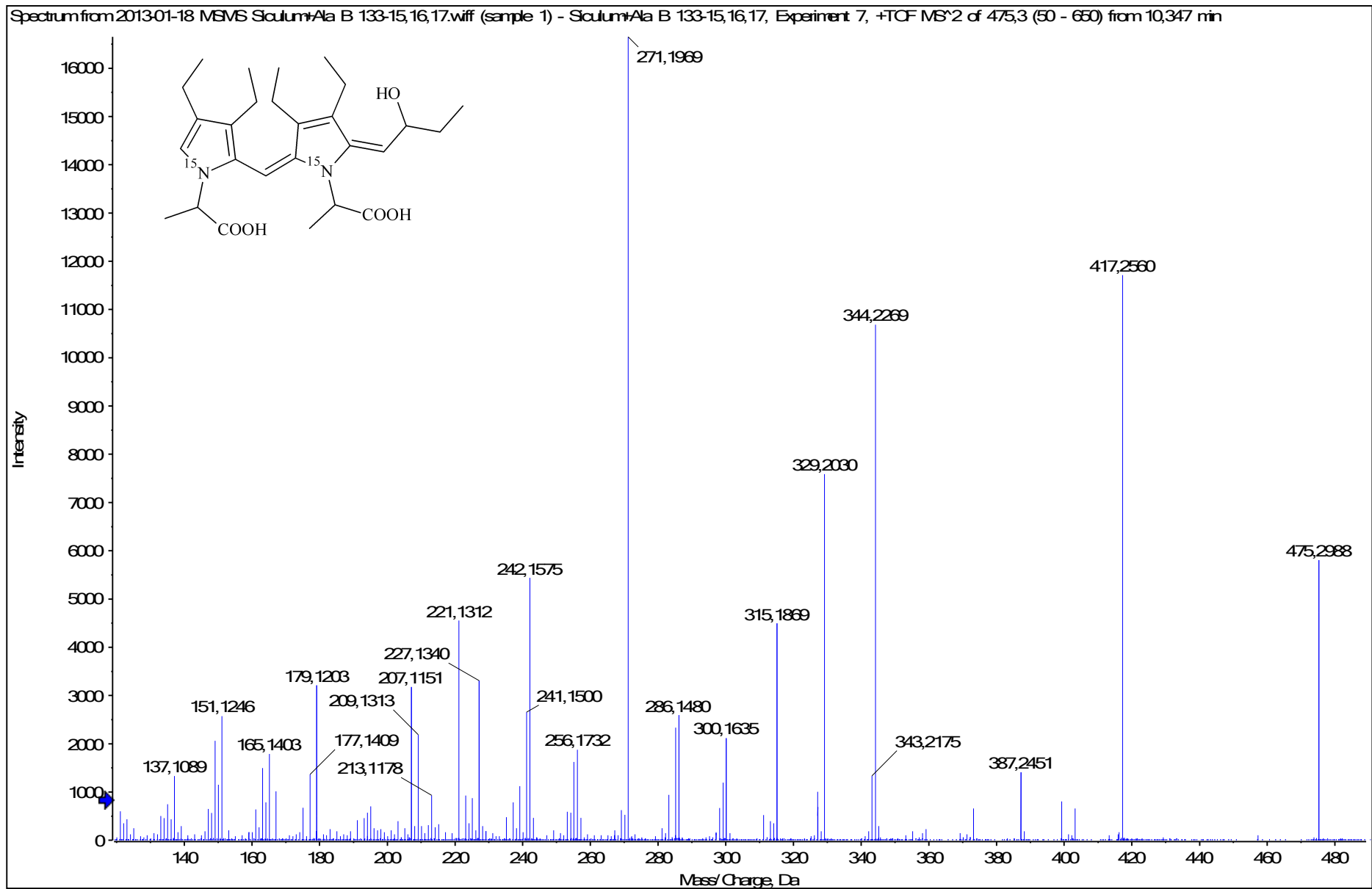


23.1.2013 17:55:38

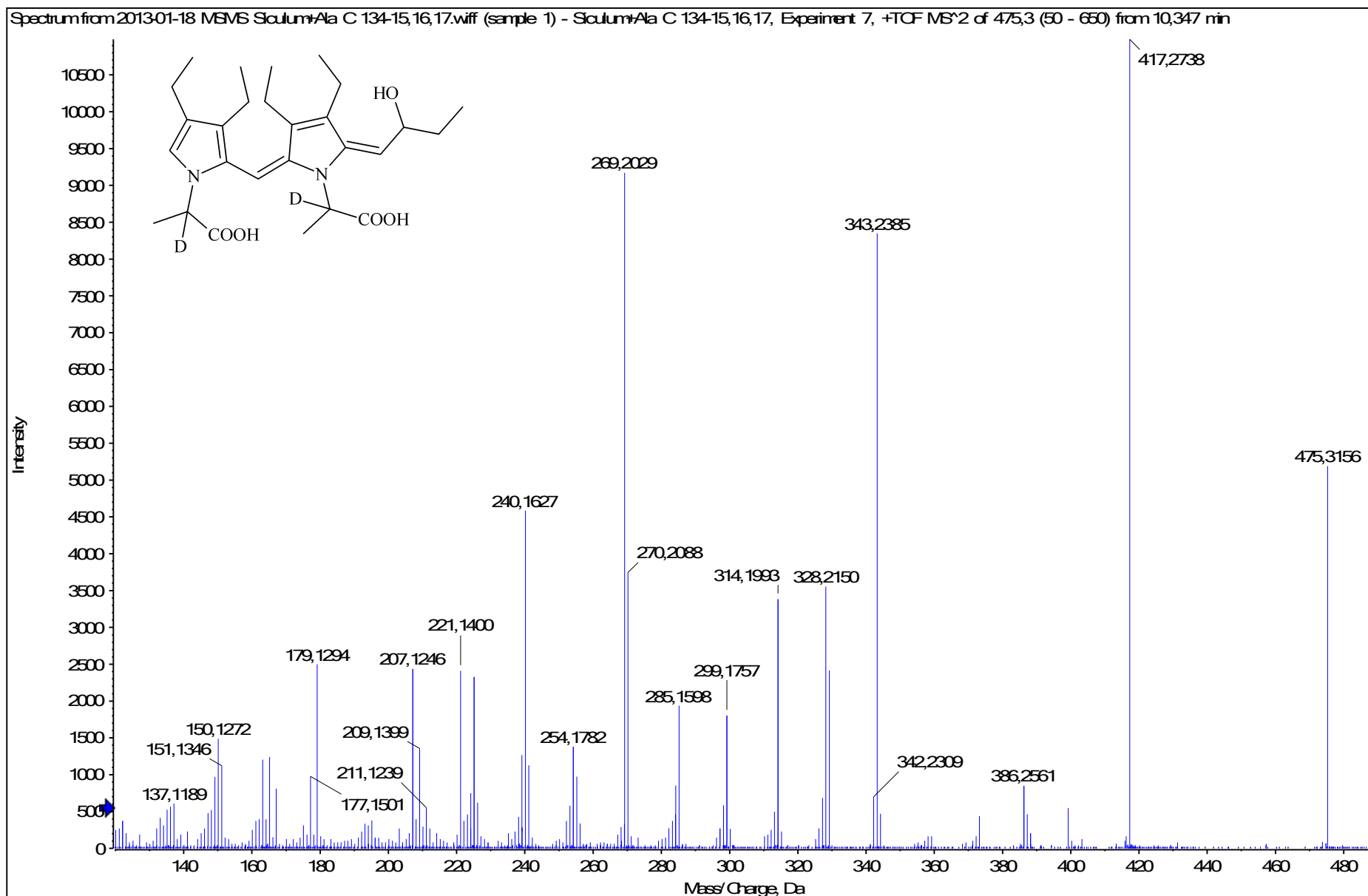
HRMS/MS spektrum látky S-472



HRMS/MS spektrum látky S-472

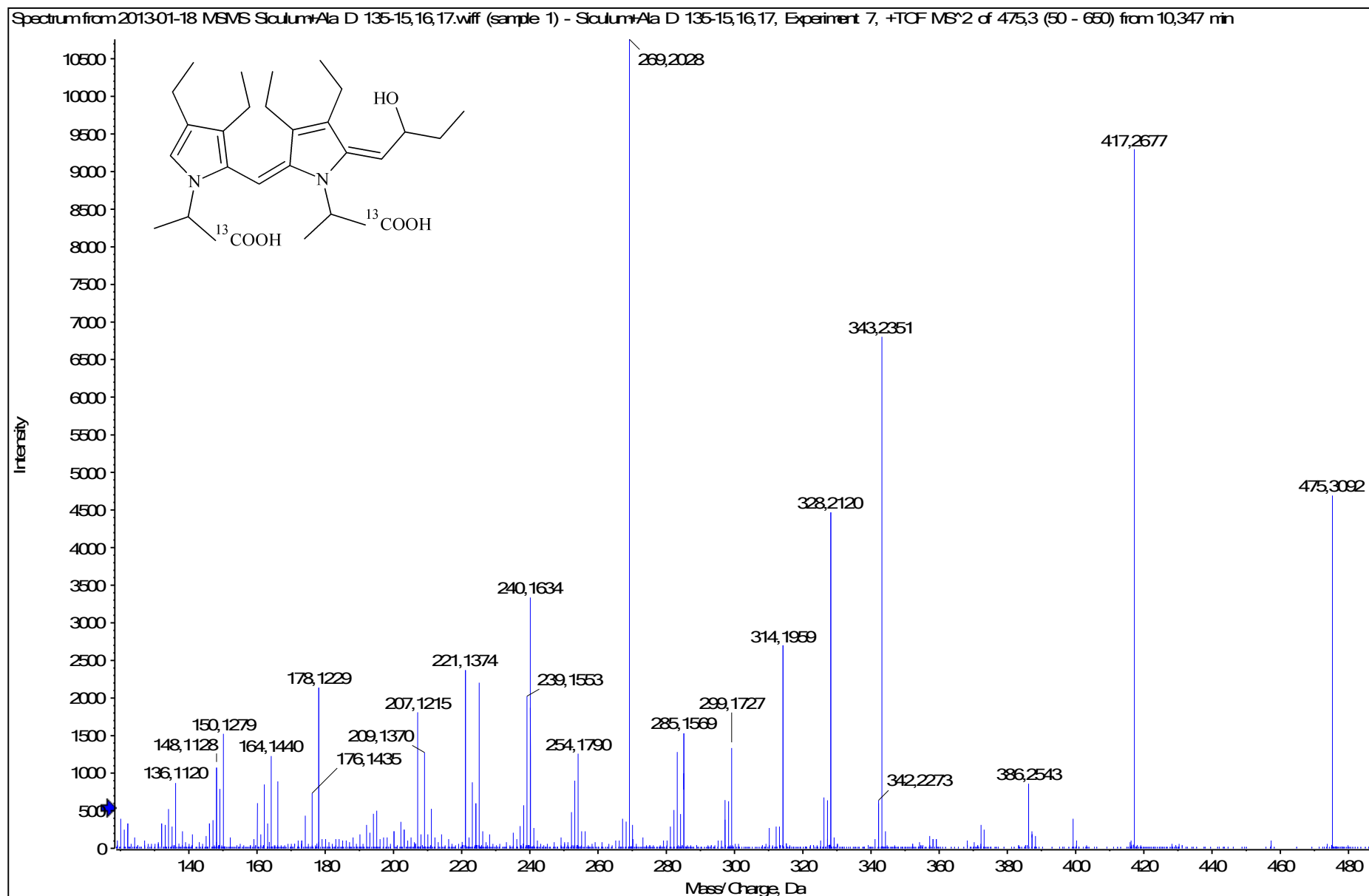


HRMS/MS spektrum látky S-472



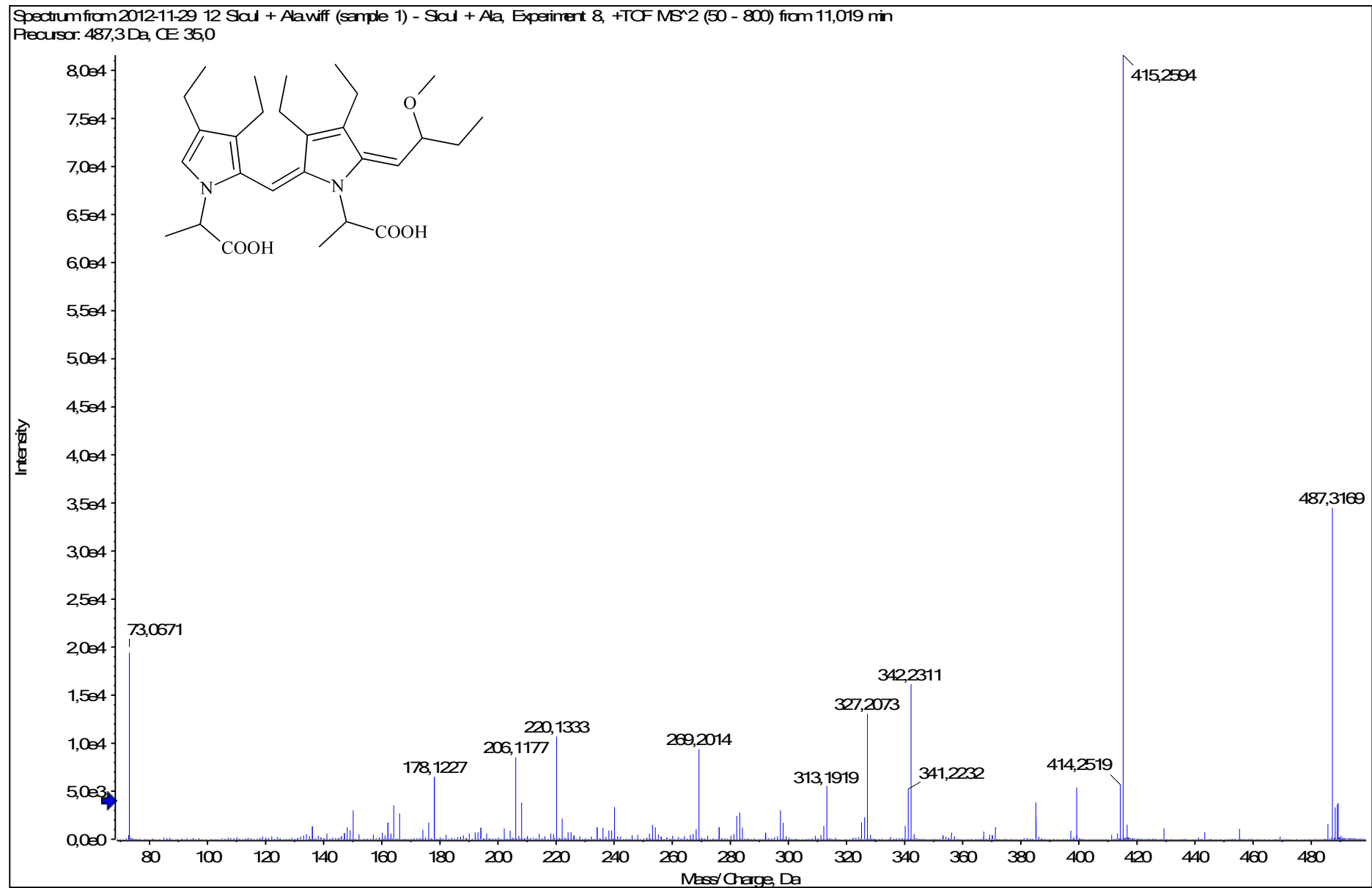
12.2.2013 18:30:03

HRMS/MS spektrum látky S-472



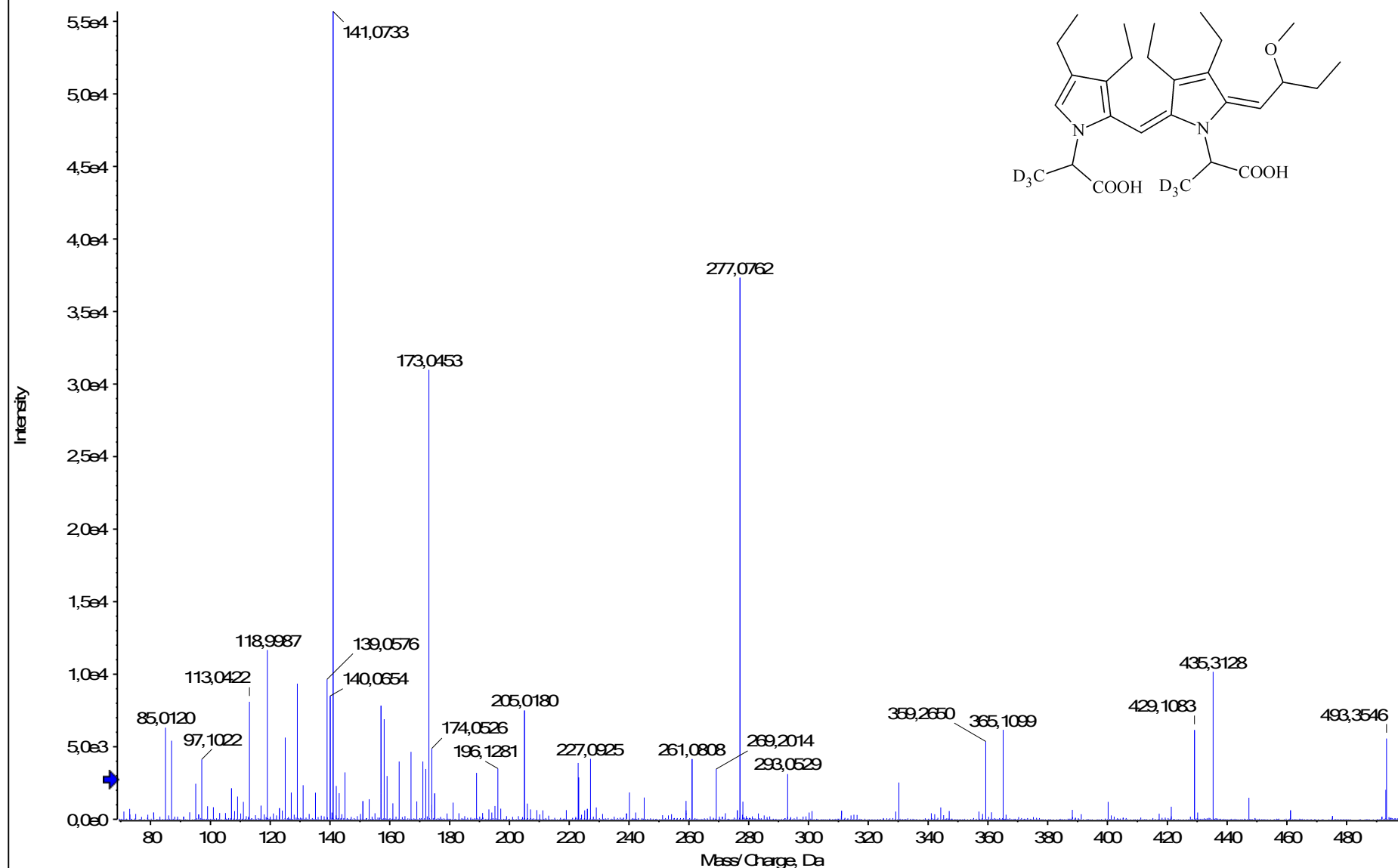
12.2.2013 18:31:33

HRMS/MS spektrum látky S-486

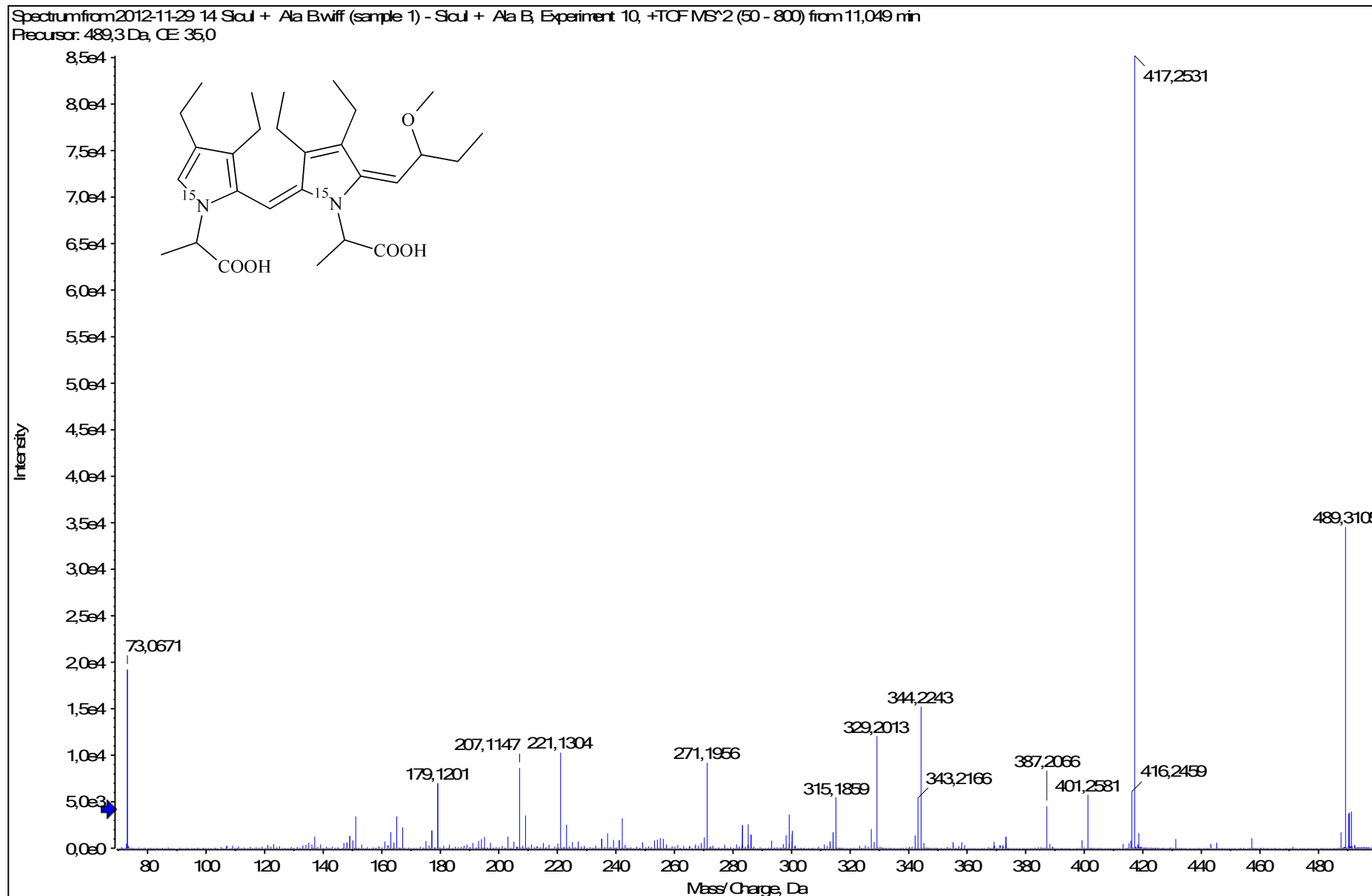


HRMS/MS spektrum látky S-486

Spectrum from 2012-11-29 13 Scul + Ala A wiff (sample 1) - Scul + Ala A, Experiment 8, +TOF MS² (50 - 800) from 11,182 min
Precursor: 493,4 Da, CE 35,0

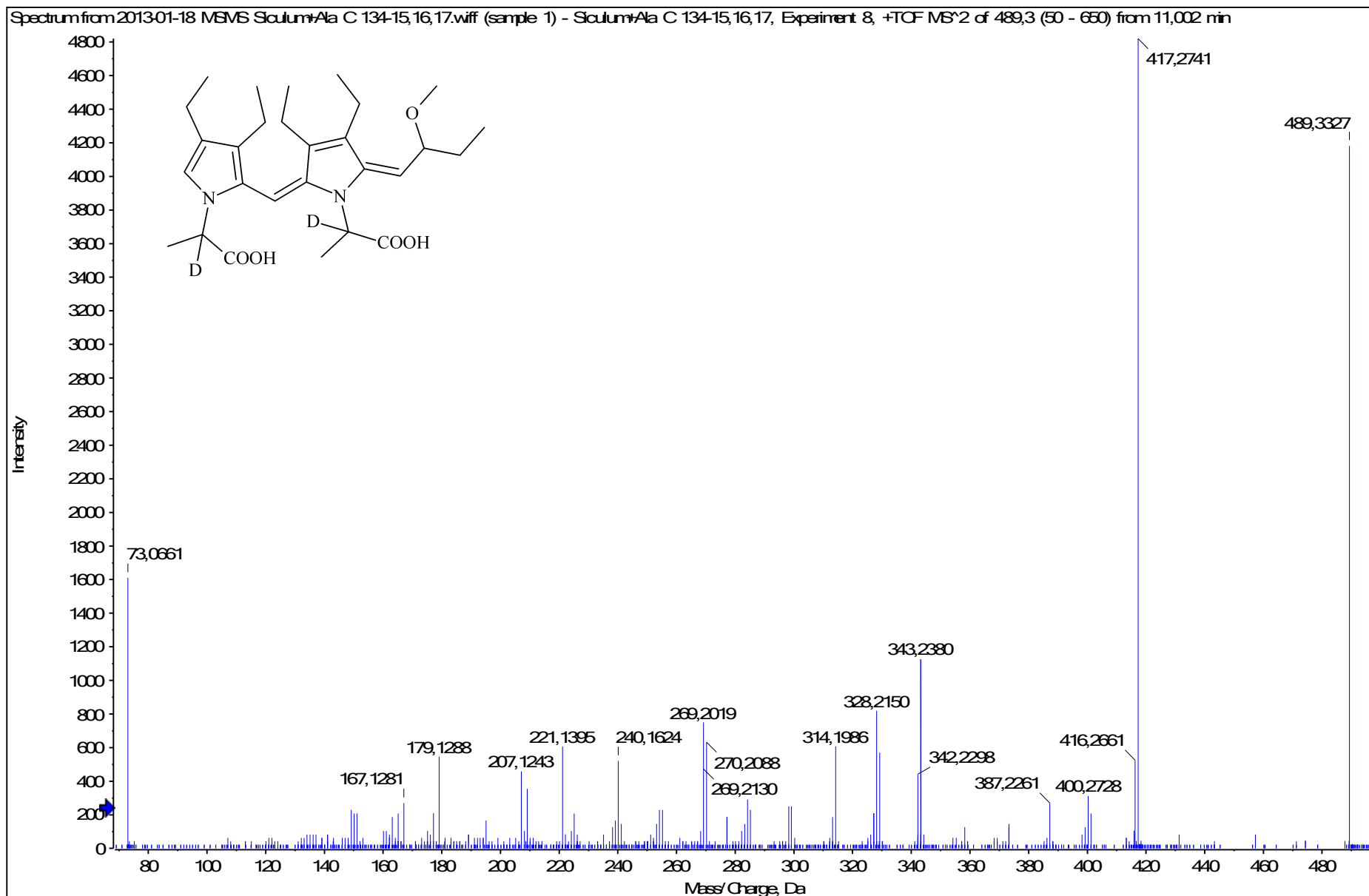


HRMS/MS spektrum látky S-486

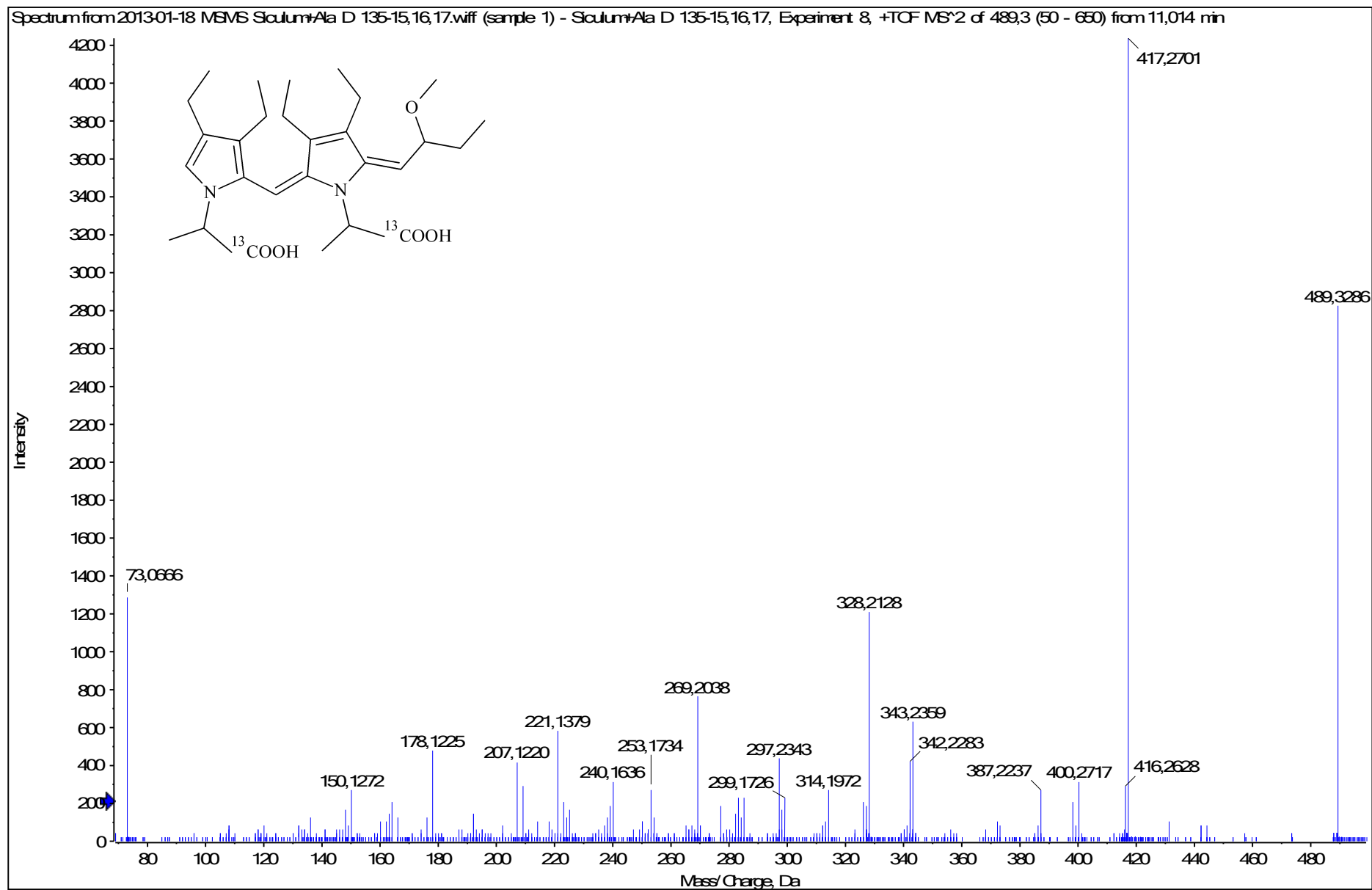


17.1.2013 11:41:27

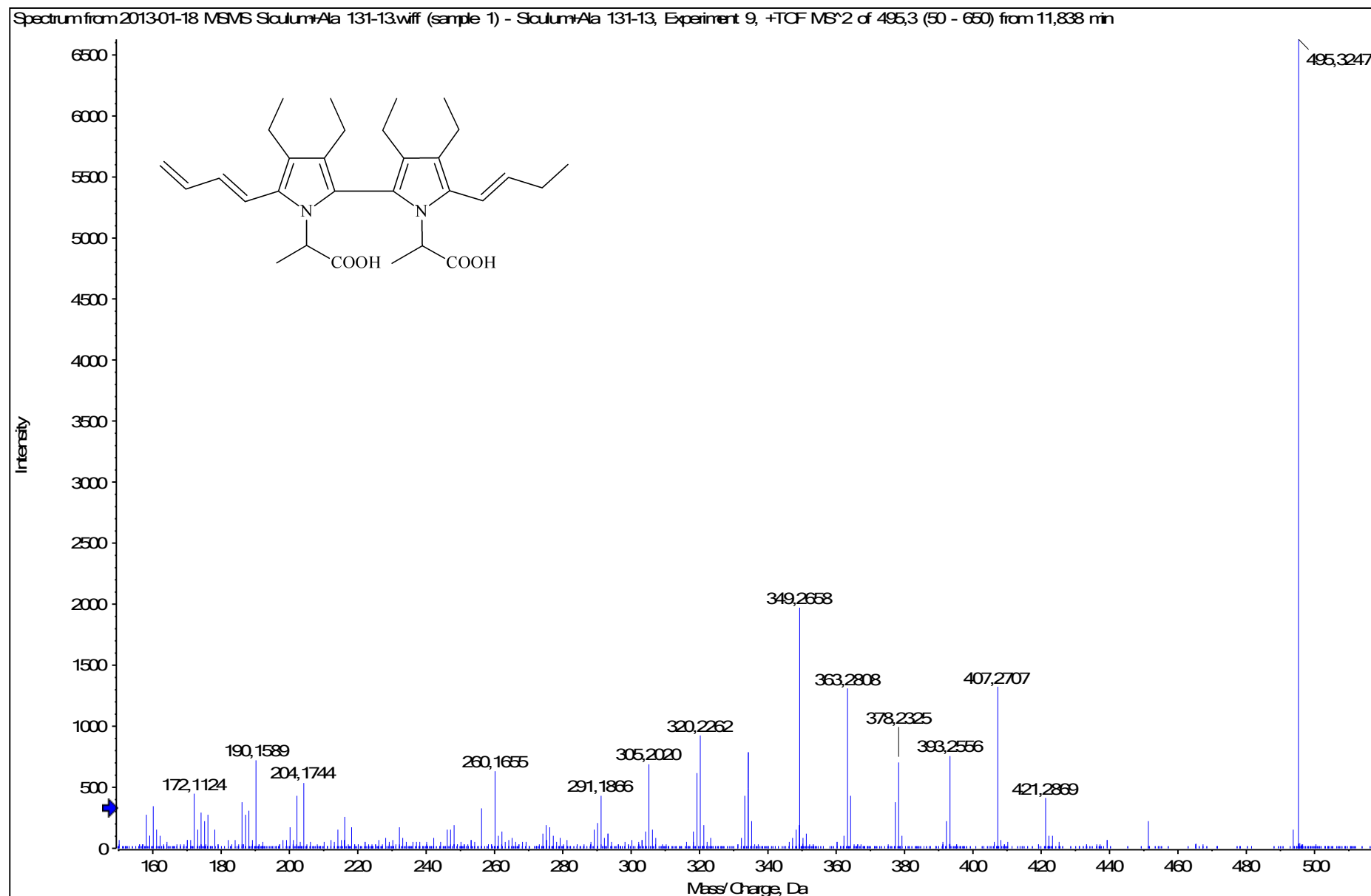
HRMS/MS spektrum látky S-486



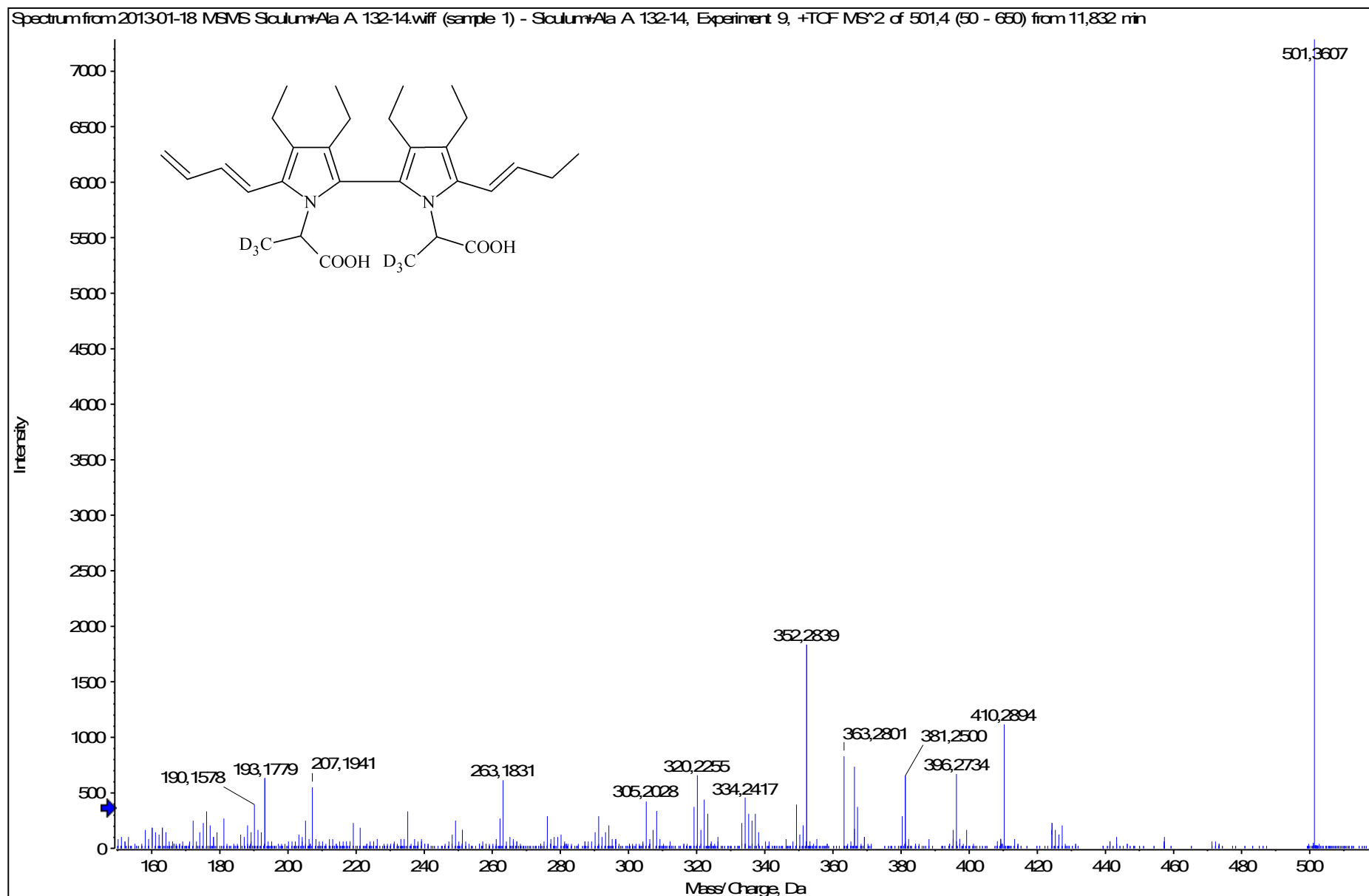
HRMS/MS spektrum látky S-486



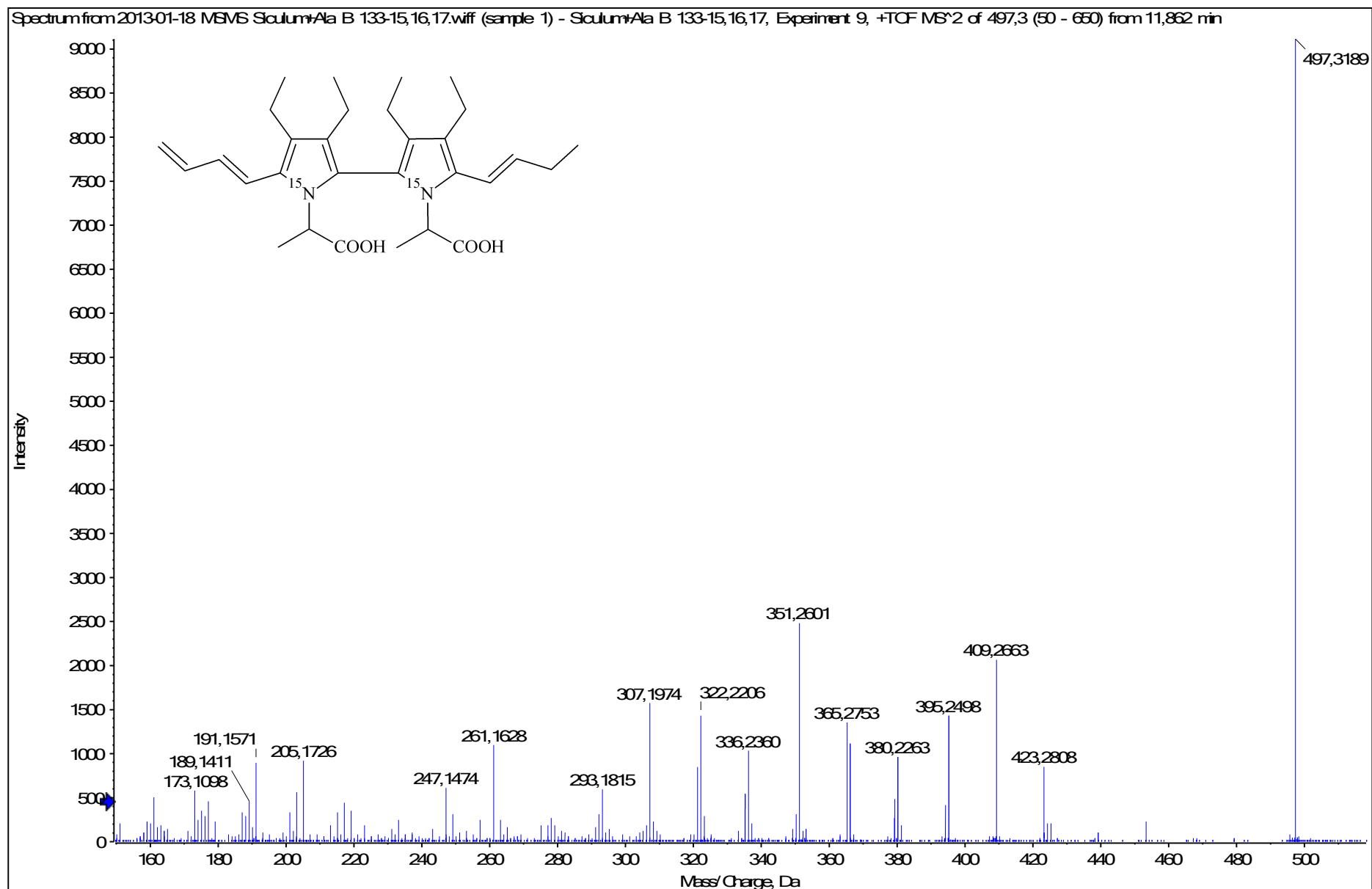
HRMS/MS spektrum látky S-494



HRMS/MS spektrum látky S-494

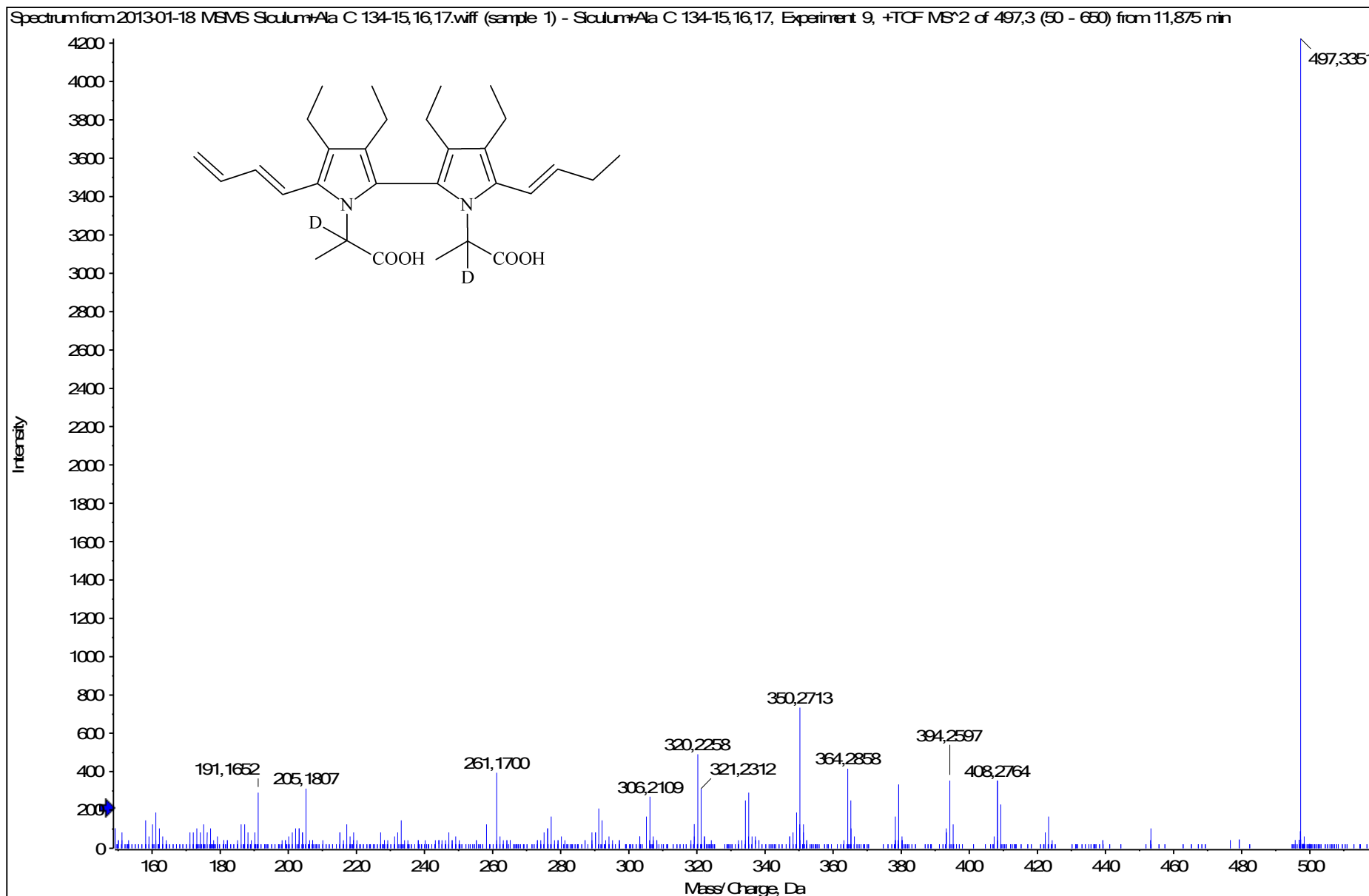


HRMS/MS spektrum látky S-494

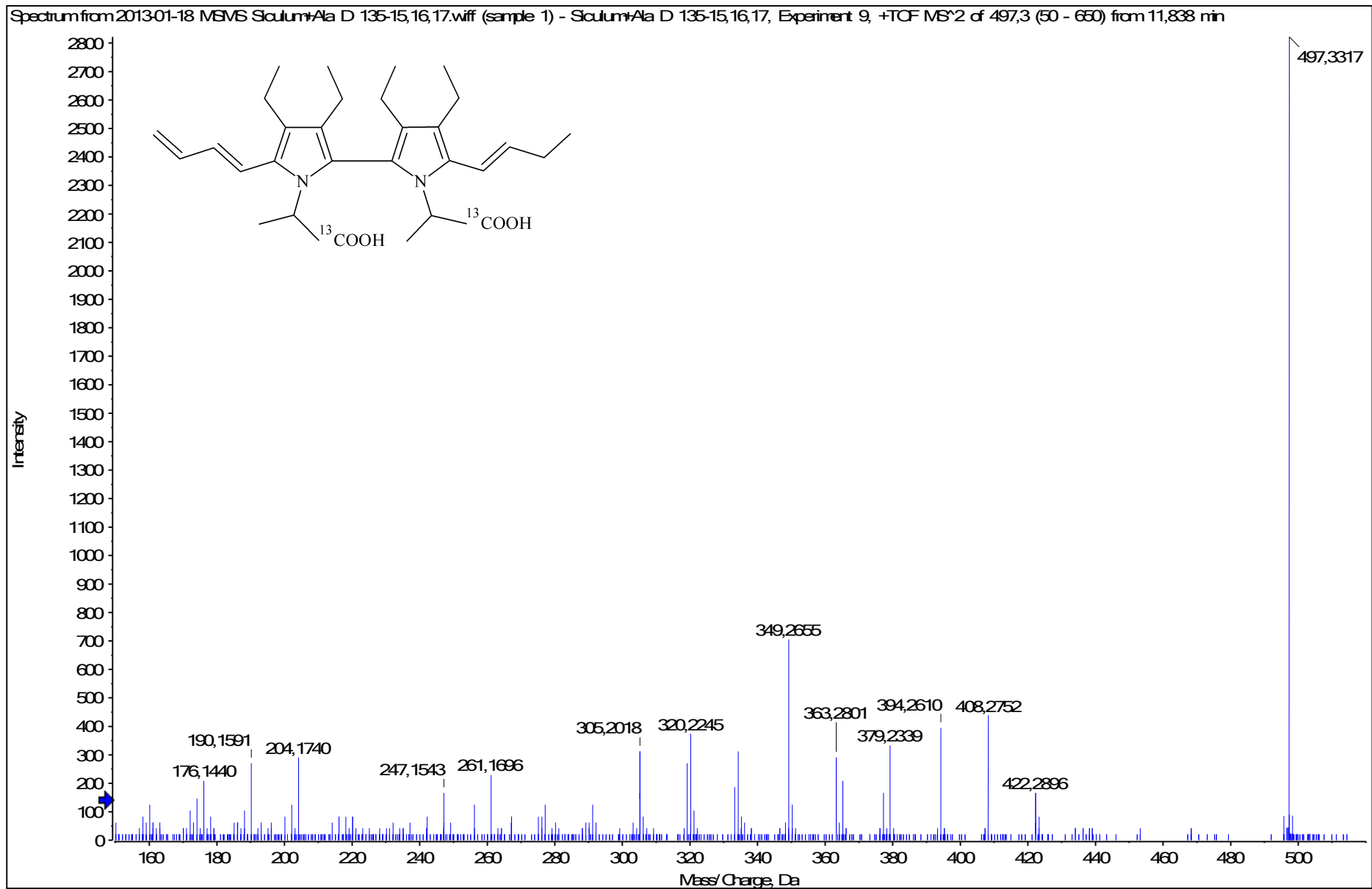


12.2.2013 18:41:00

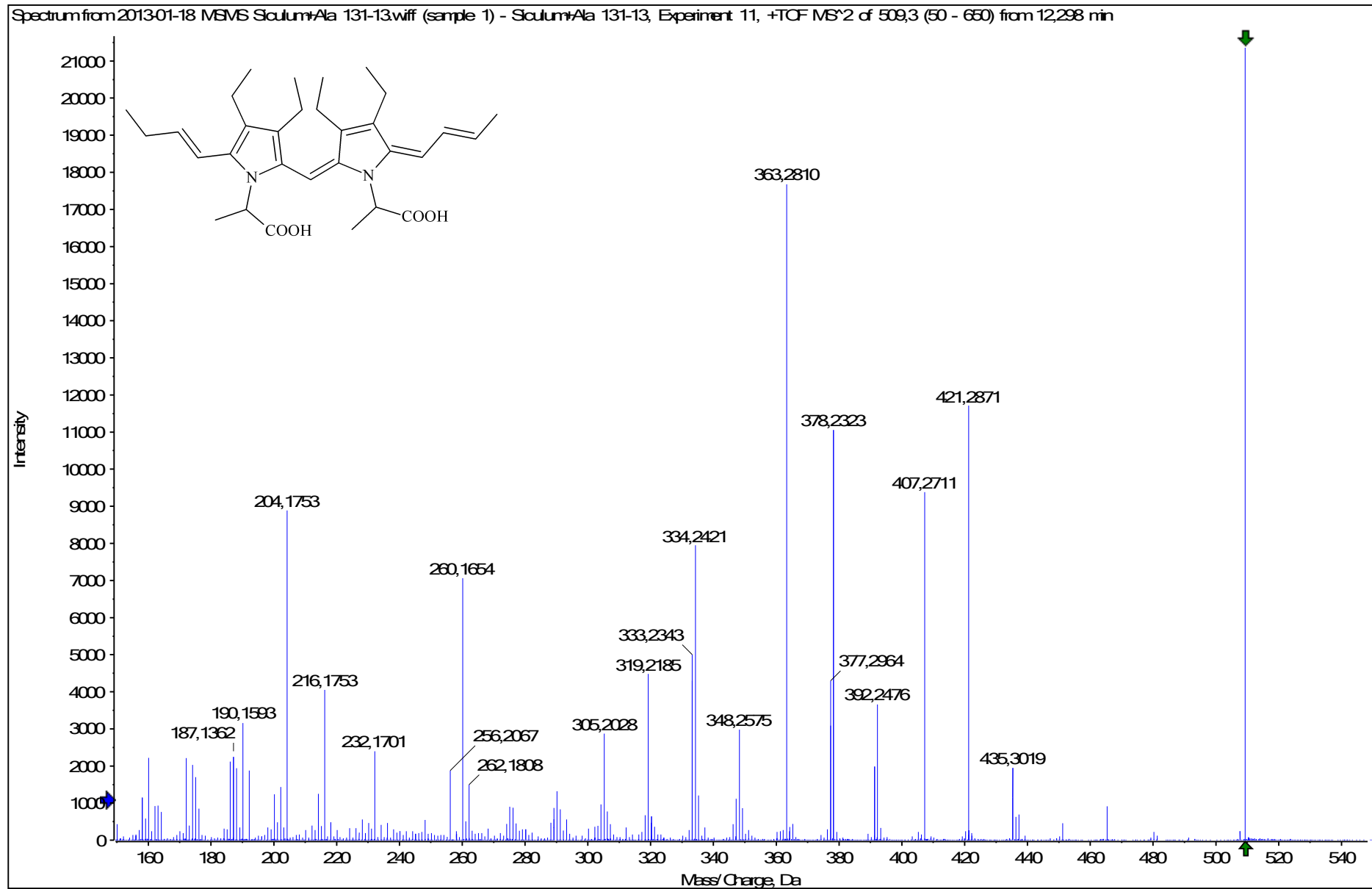
HRMS/MS spektrum látky S-494



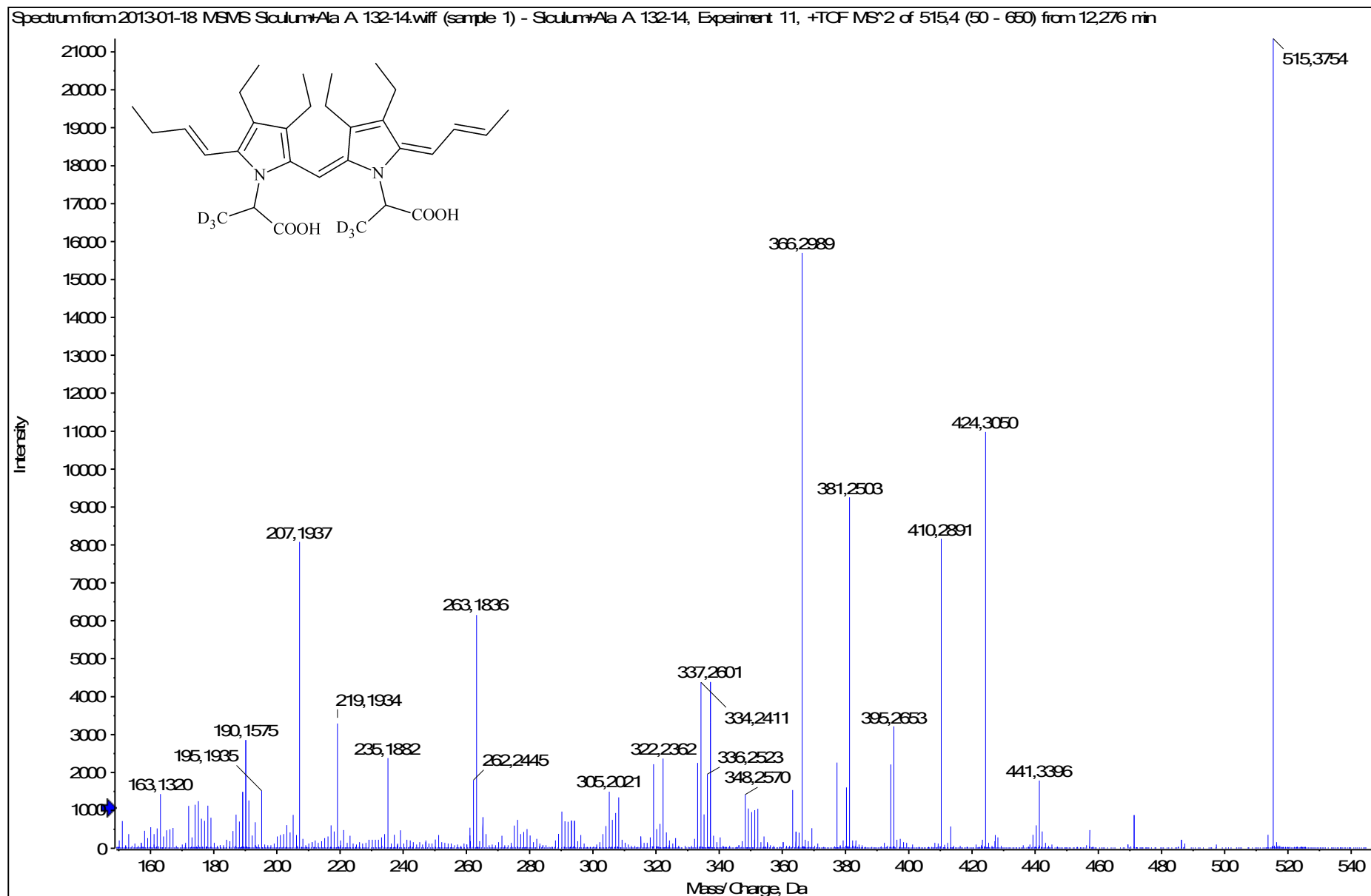
HRMS/MS spektrum látky S-494



HRMS/MS spektrum látky S-508

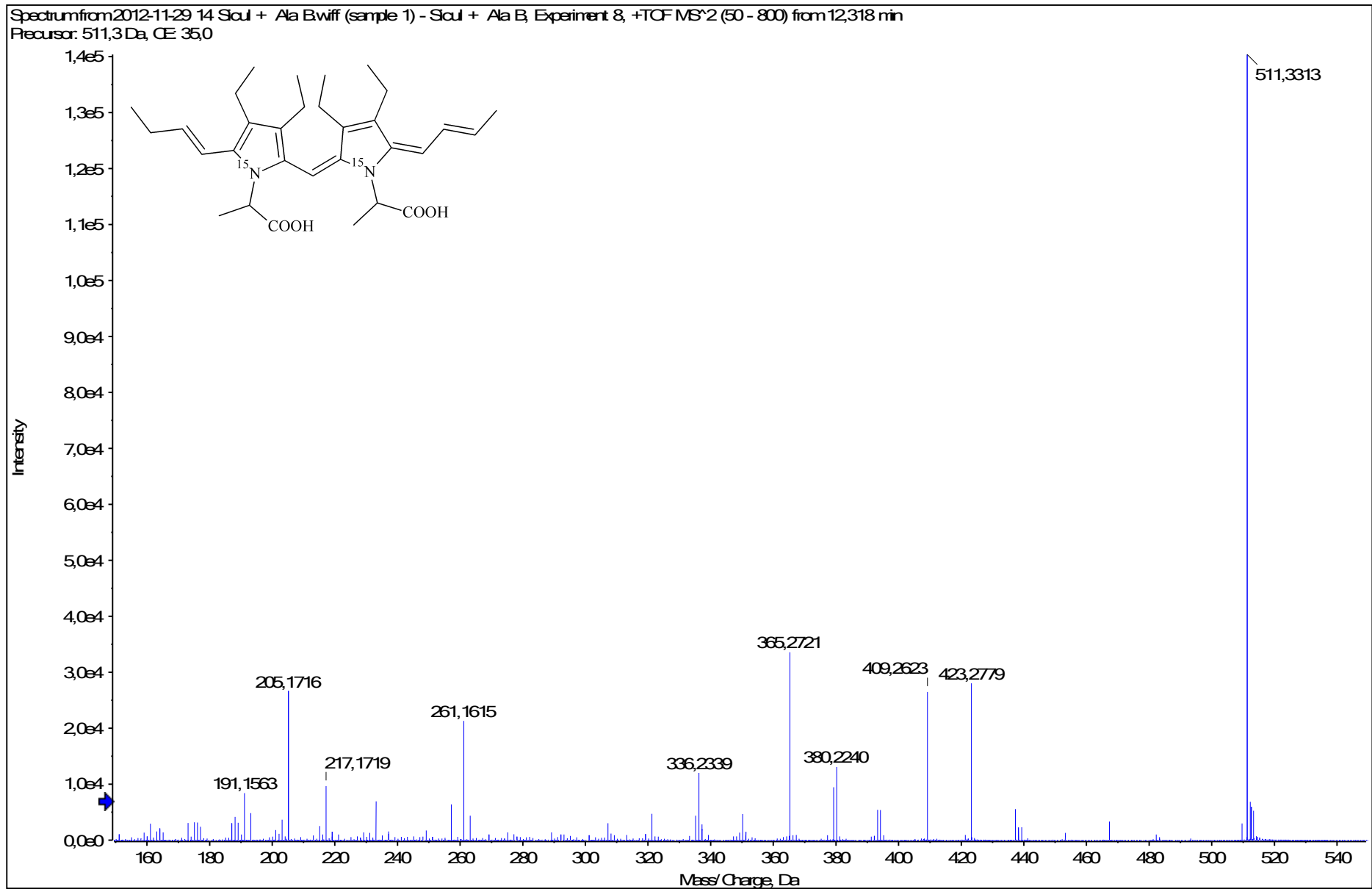


HRMS/MS spektrum látky S-508



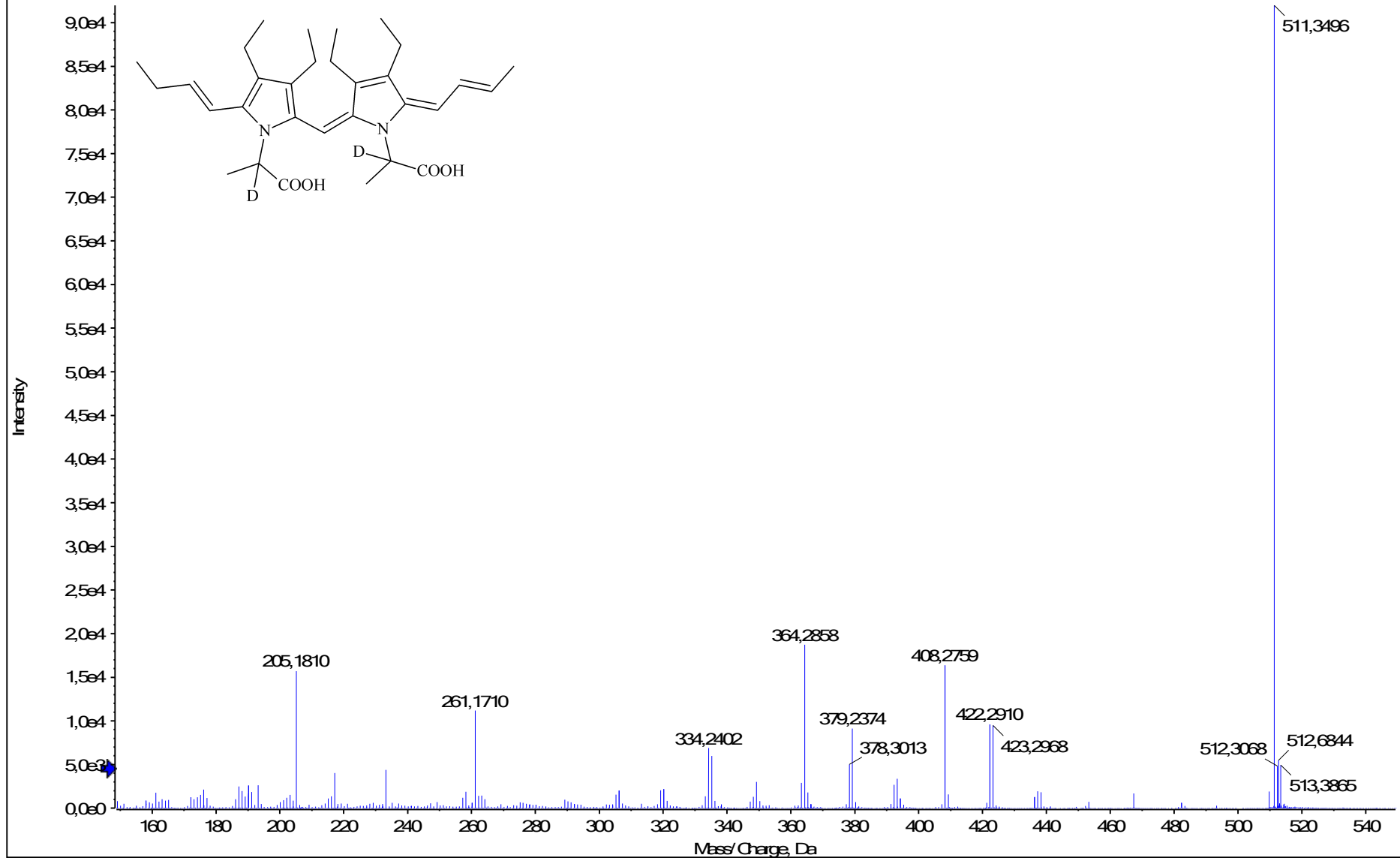
12.2.2013 18:44:33

HRMS/MS spektrum látky S-508



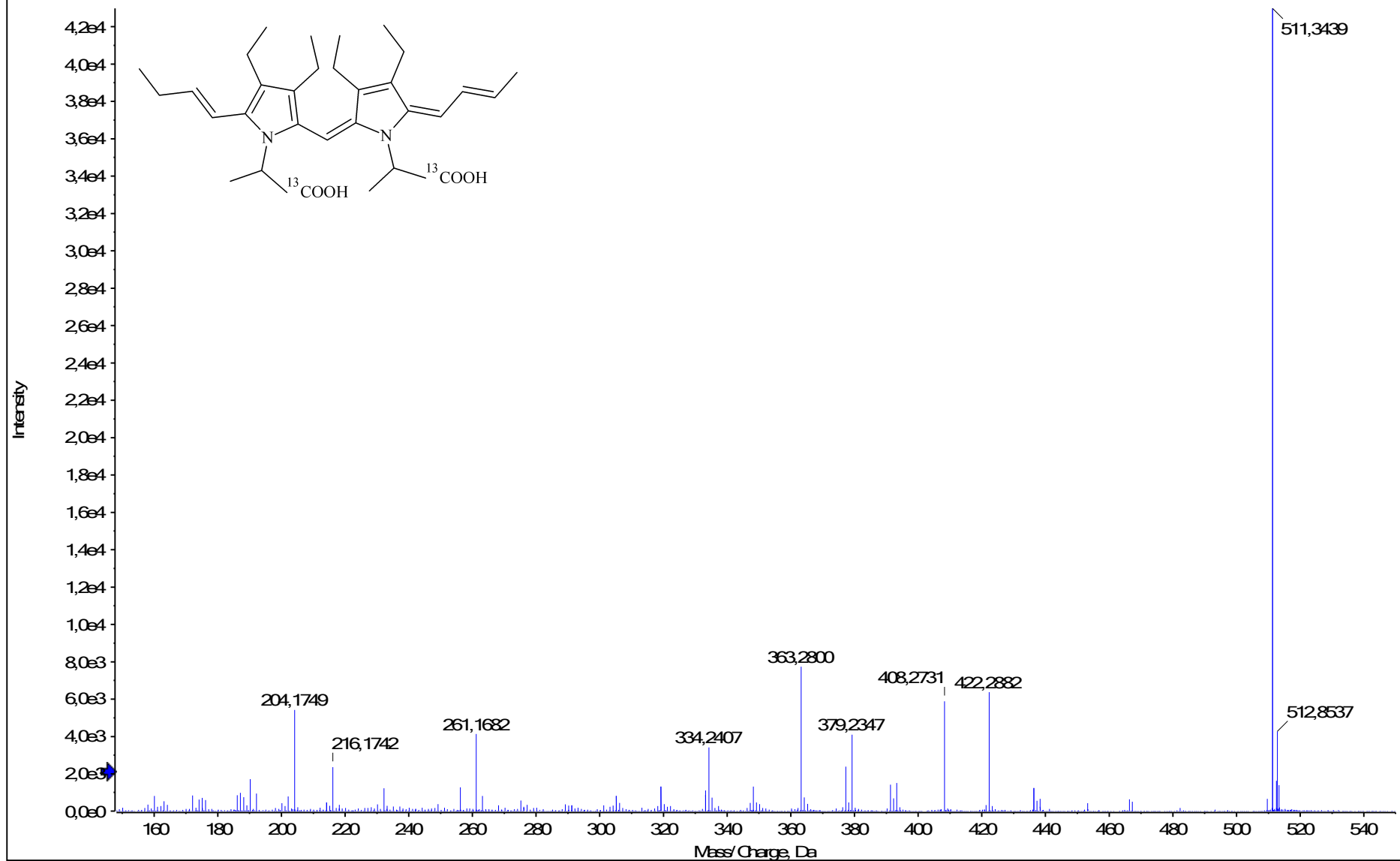
HRMS/MS spektrum látky S-508

Spectrum from 2012-11-29 15 Scul + Ala Cwiff (sample 1) - Scul + Ala C, Experiment 9, +TOF MS² (50 - 800) from 12,297 min
Precursor: 511,3Da, CE 35,0

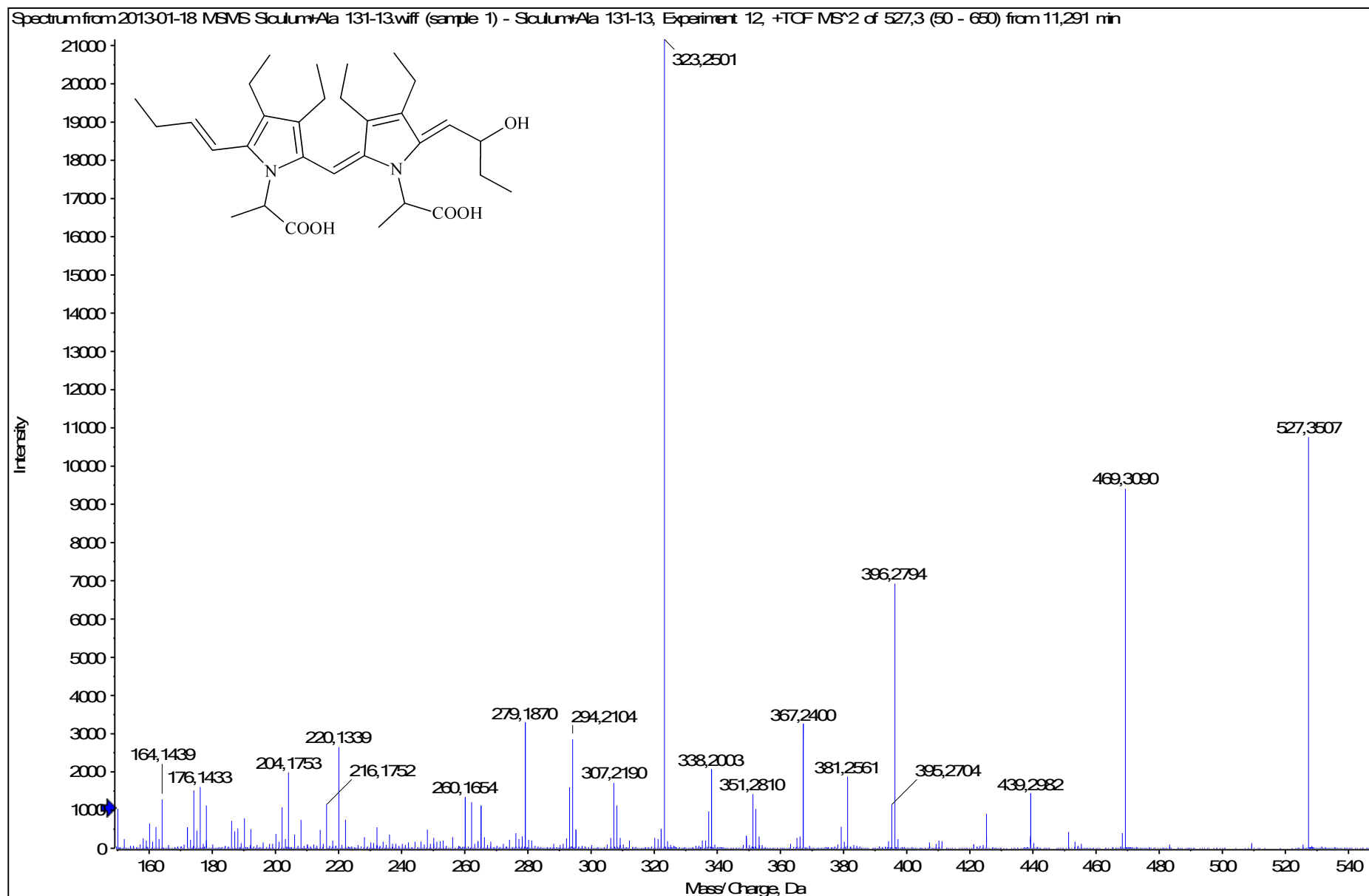


HRMS/MS spektrum látky S-508

Spectrum from 2012-11-29 16 Scul + Ala D.wiff (sample 1) - Scul + Ala D, Experiment 7, +TOF MS² (50 - 800) from 12,297 min
Precursor: 511,3 Da, CE 35,0



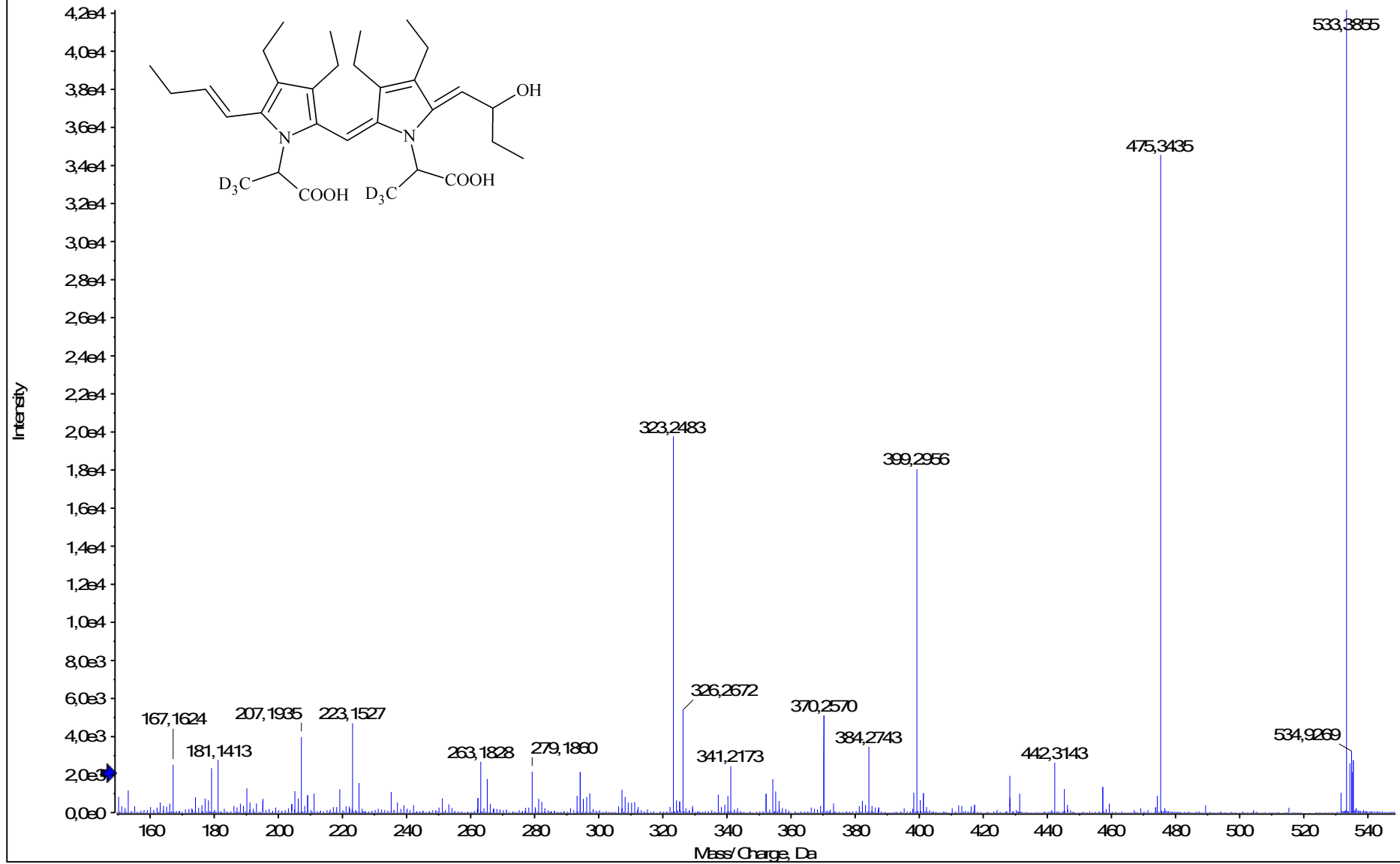
HRMS/MS spektrum látky S-526



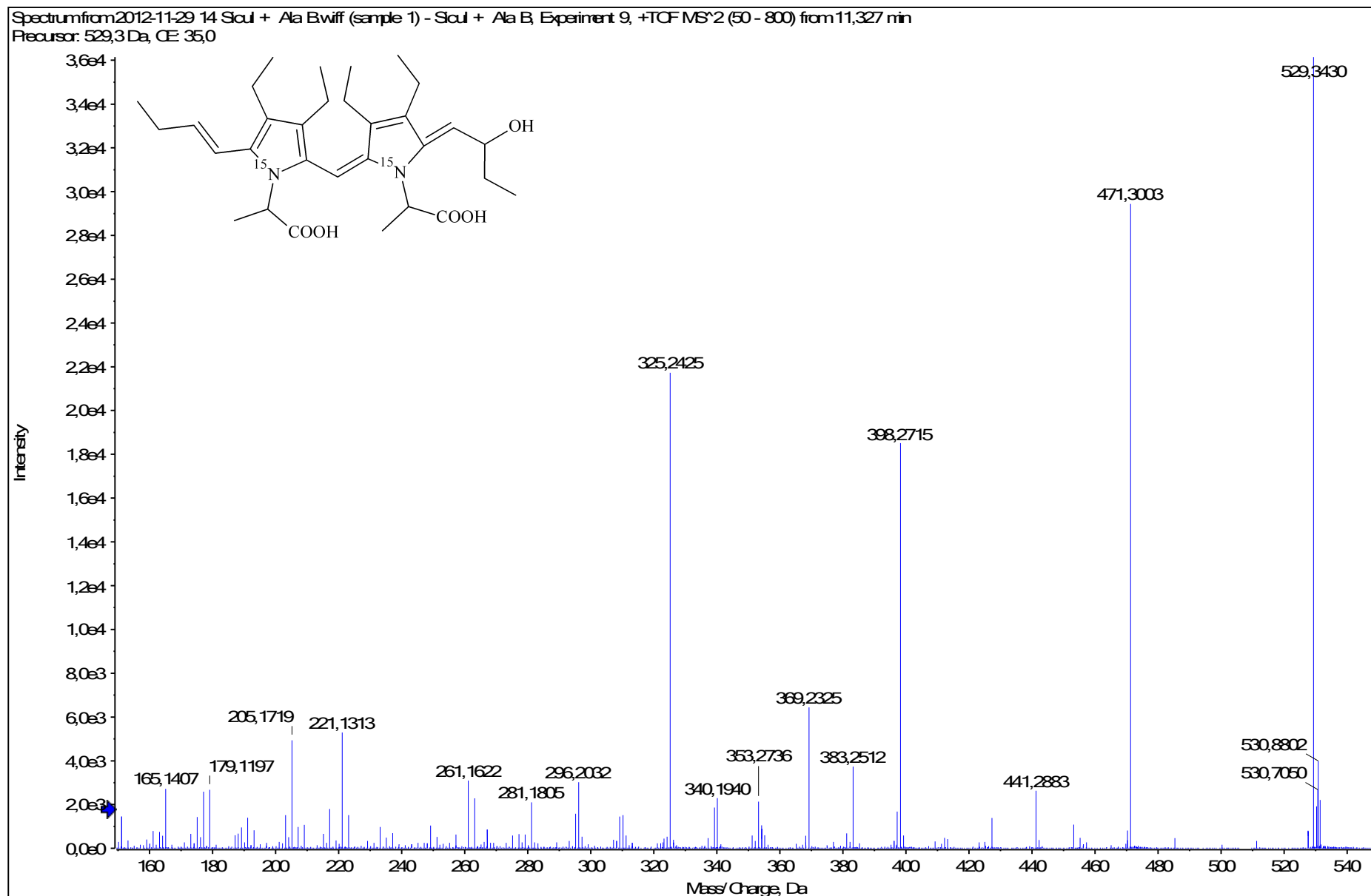
12.2.2013 18:38:25

HRMS/MS spektrum látky S-526

Spectrum from 2012-11-29 13 Scul + Ala A wiff (sample 1) - Scul + Ala A, Experiment 10, +TOF MS² (50 - 800) from 11,316 min
Precursor: 533,4 Da, CE 35,0

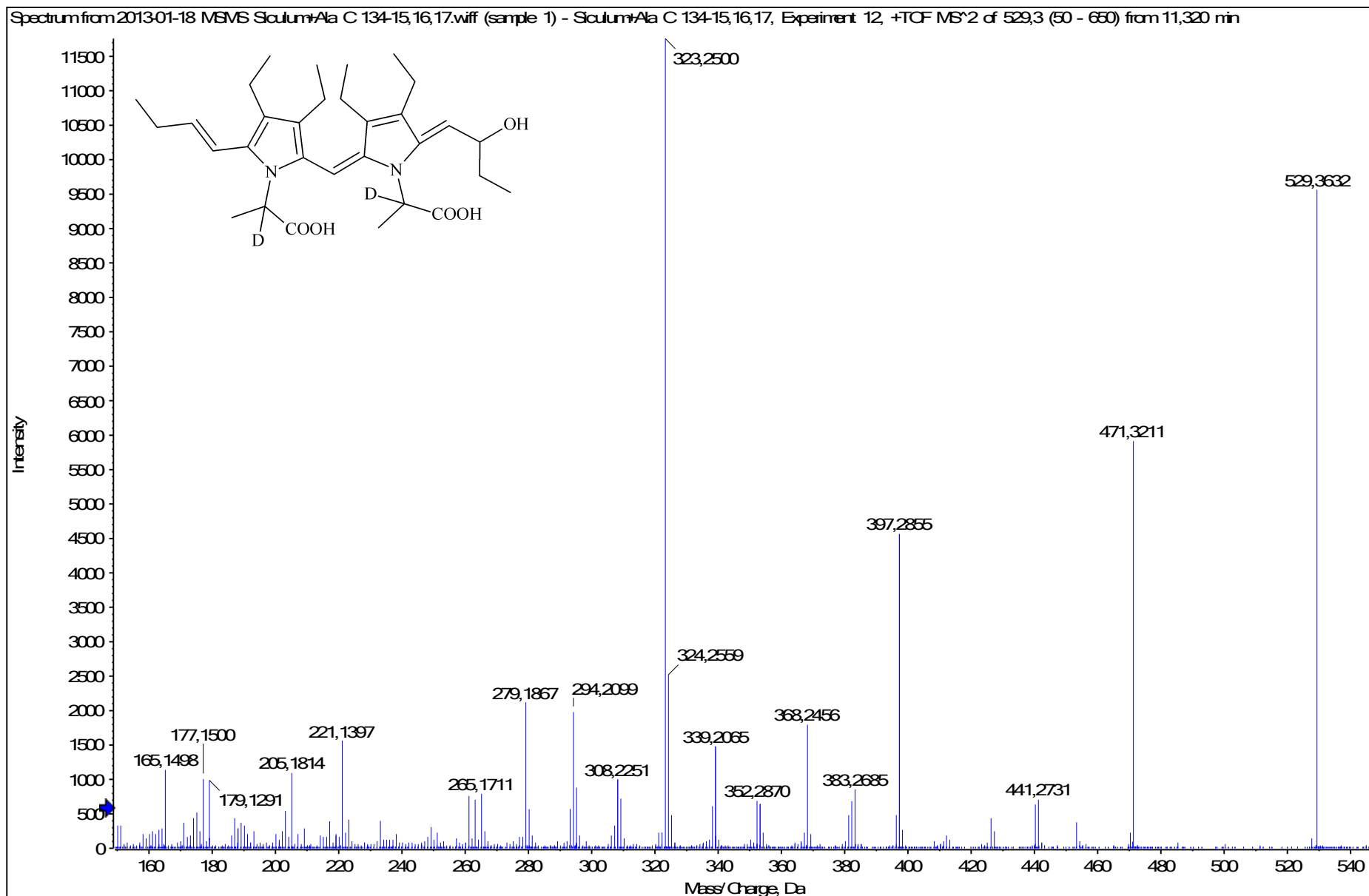


HRMS/MS spektrum látky S-526



17.1.2013 11:42:45

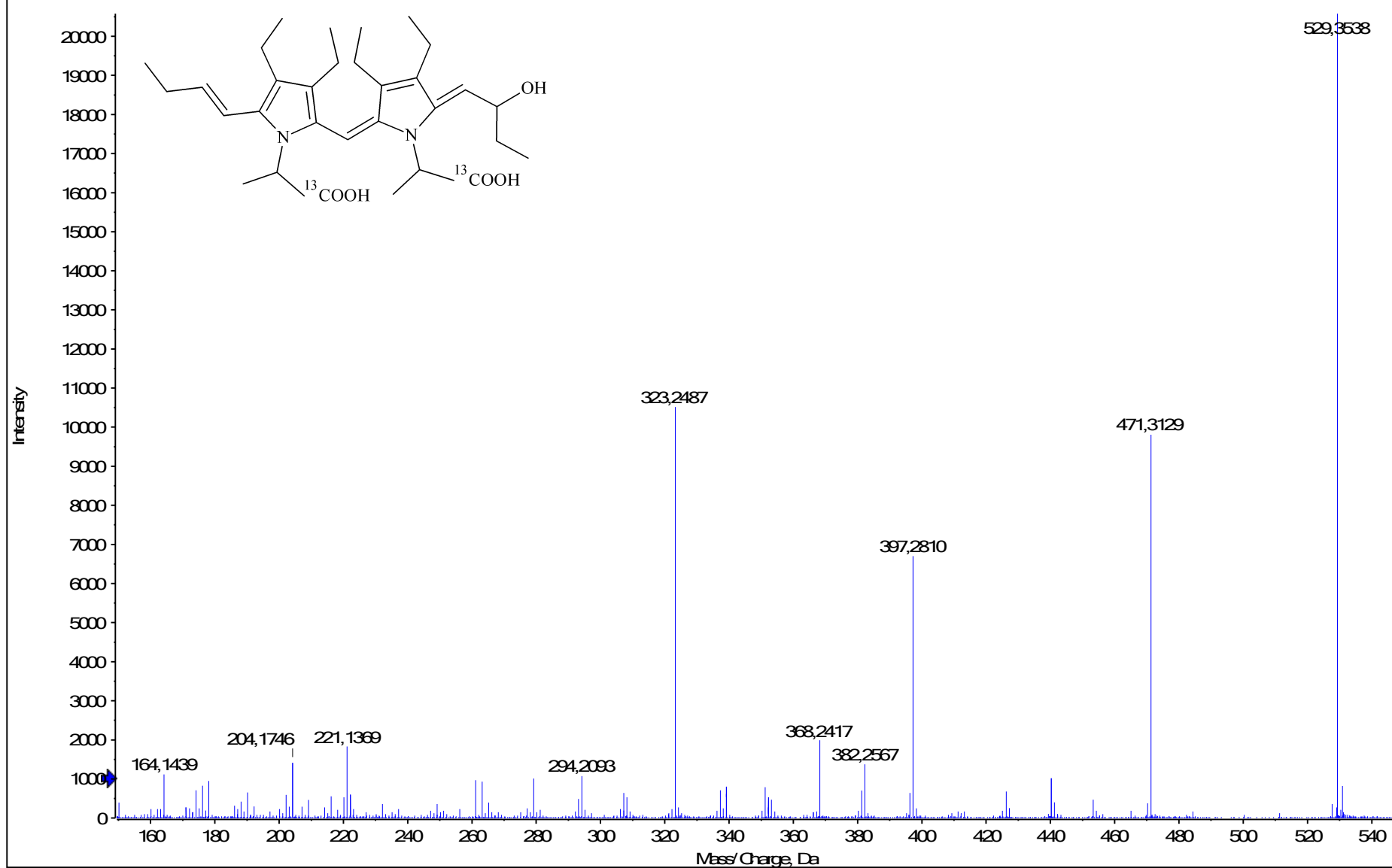
HRMS/MS spektrum látky S-526



12.2.2013 18:37:27

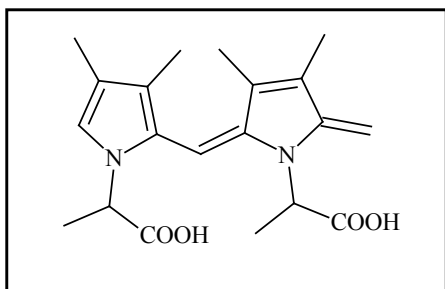
HRMS/MS spektrum látky S-526

Spectrum from 2012-11-29 16 Scul + Ala D.wiff (sample 1) - Scul + Ala D, Experiment 9, +TOF MS² (50 - 800) from 11,324 min
Precursor: 529,4 Da, CE 35,0



17.1.2013 12:05:00

Příloha 21: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v cibuli a póru



ESI+

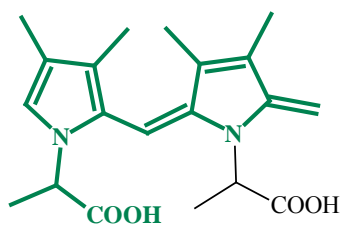
Sloučenina: LO-358

Sumární vzorec: C₂₀H₂₆N₂O₄

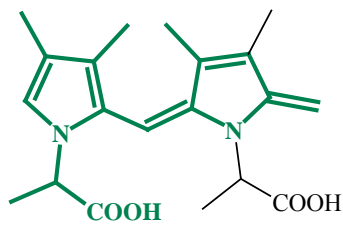
$t_R = 5,8$ min

$\lambda_{max} = 518$ nm

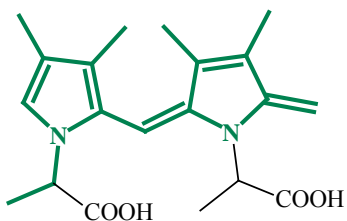
Přesná molární hmotnost: 358,1887 Da



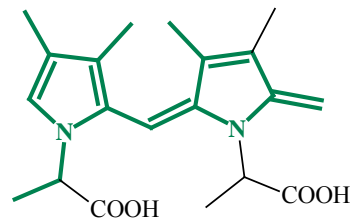
285,2 (MH⁺-74,1)



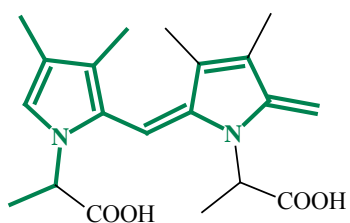
271,1 (MH⁺-88,1)



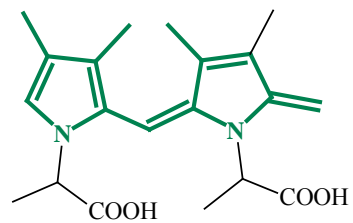
241,2 (MH⁺-118,0)



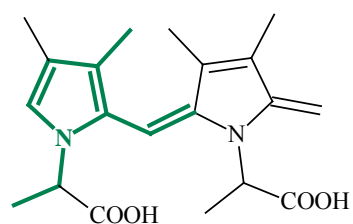
227,2 (MH⁺-132,0)



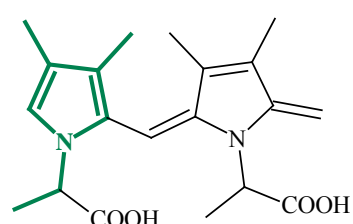
212,1 (MH⁺-147,1)



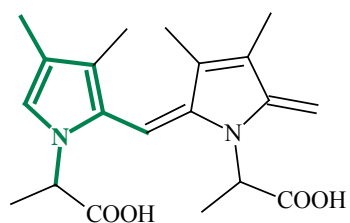
198,1 (MH⁺-161,1)



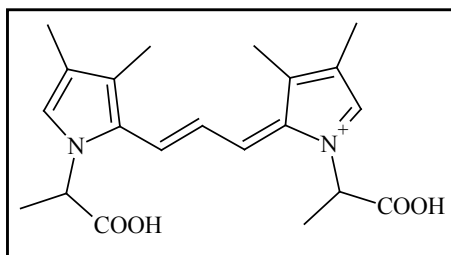
136,1 (MH⁺-223,1)



122,1 (MH⁺-237,1)



108,1 (MH⁺-251,1)



ESI+

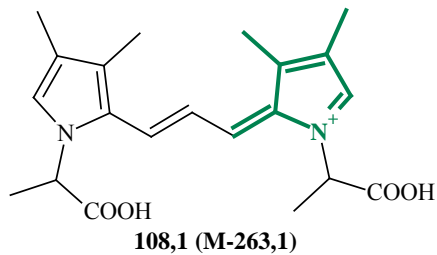
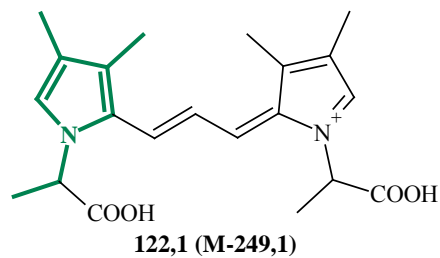
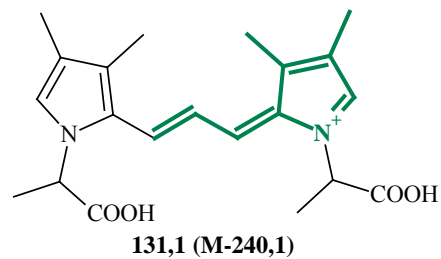
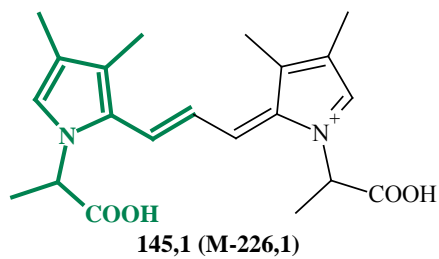
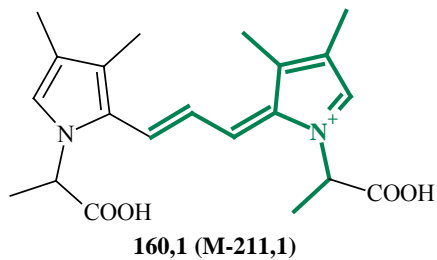
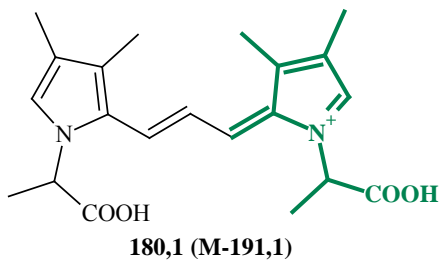
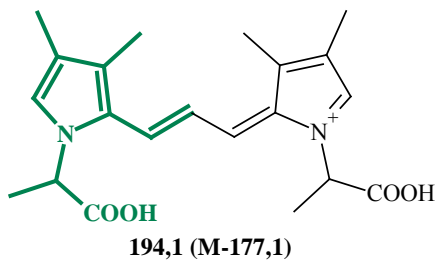
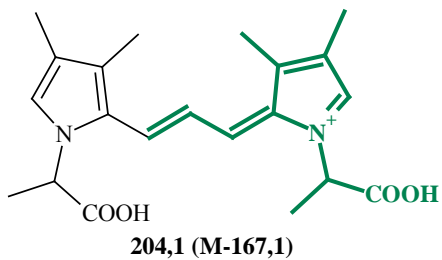
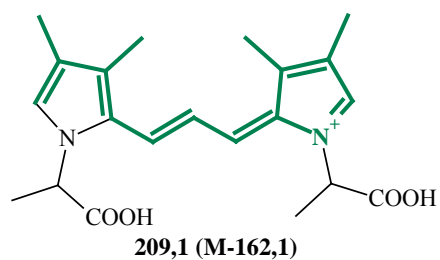
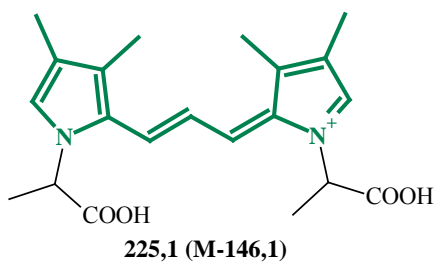
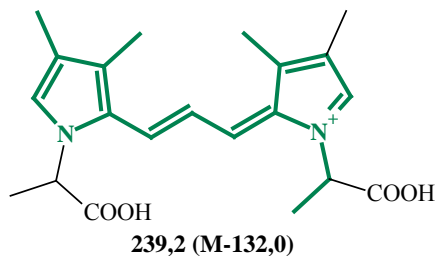
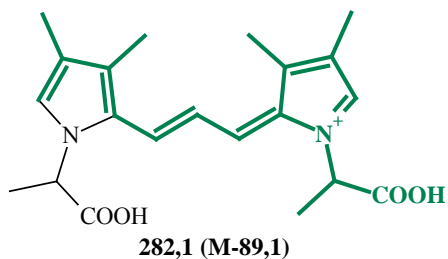
Sloučenina: GLO-371

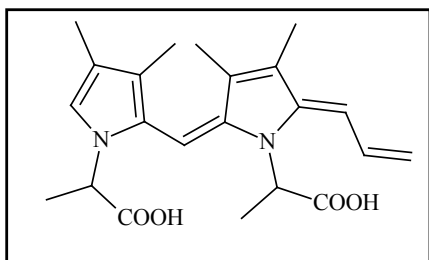
Sumární vzorec: $C_{21}H_{27}N_2O_4^+$

$t_R = 7,26$ min

$\lambda_{max} = 568$ nm

Přesná molární hmotnost: 371,1965 Da





ESI+

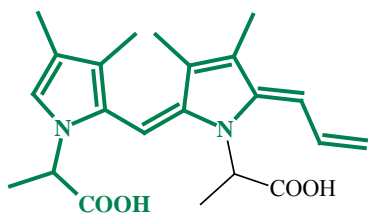
Sloučenina: LO-384

Sumární vzorec: $C_{22}H_{28}N_2O_4$

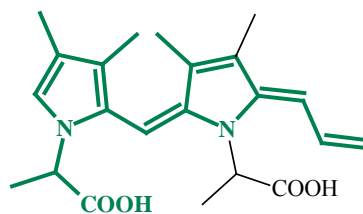
$t_R = 7,45$ min

$\lambda_{max} = 535$ nm

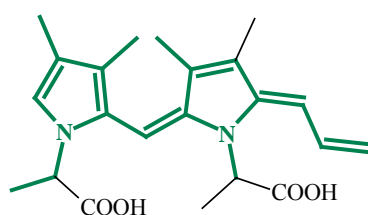
Přesná molární hmotnost: 384,2044 Da



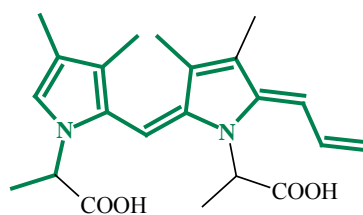
311,2 (MH⁺-74,0)



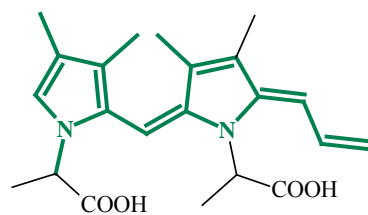
297,2 (MH⁺-88,1)



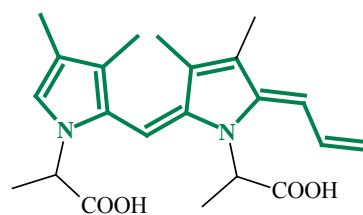
267,2 (MH⁺-118,0)



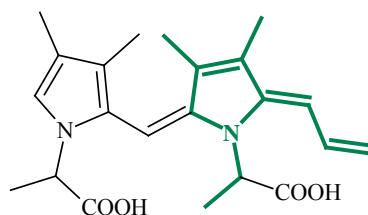
253,2 (MH⁺-132,0)



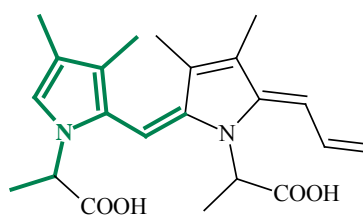
238,1 (MH⁺-147,1)



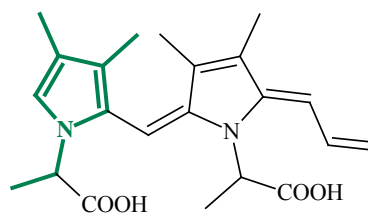
224,1 (MH⁺-161,1)



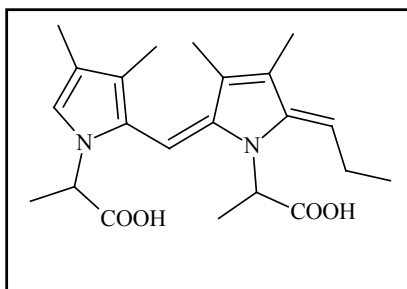
162,1 (MH⁺-223,1)



146,1 (MH⁺-239,1)



122,1 (MH⁺-263,1)



ESI+

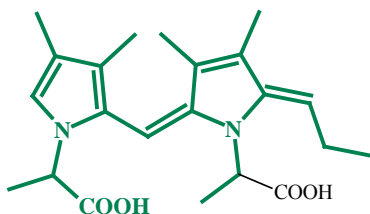
Sloučenina: LO-386

Sumární vzorec: C₂₂H₃₀N₂O₄

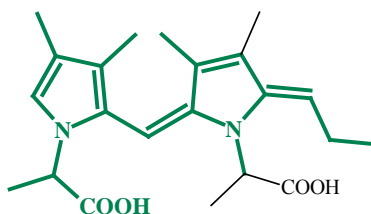
$t_R = 7,51$ min

$\lambda_{max} = 517$ nm

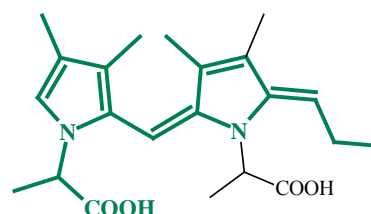
Přesná molární hmotnost: 386,2200 Da



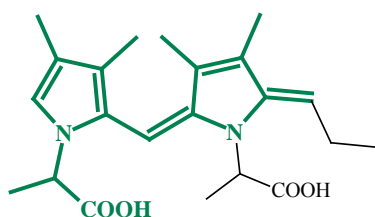
343,2 (MH⁺-44,1)



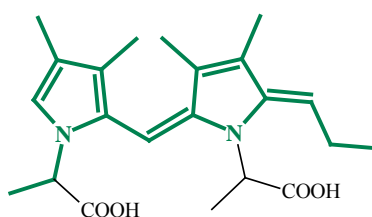
313,2 (MH⁺-74,0)



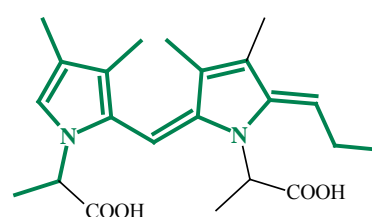
299,2 (MH⁺-88,1)



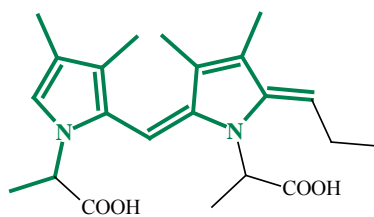
285,2 (MH⁺-102,1)



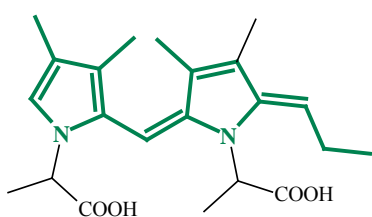
269,2 (MH⁺-118,0)



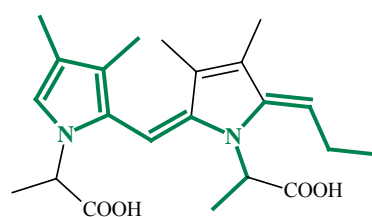
255,2 (MH⁺-132,0)



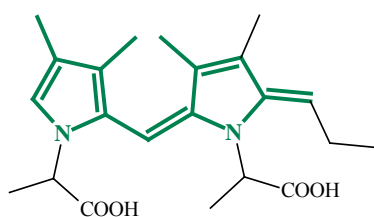
241,2 (MH⁺-146,1)



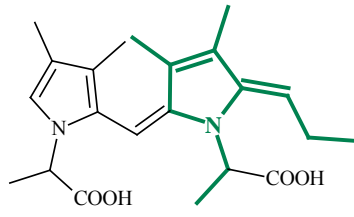
226,1 (MH⁺-161,1)



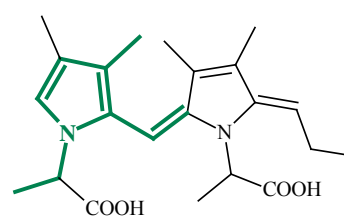
211,1 (MH⁺-176,1)



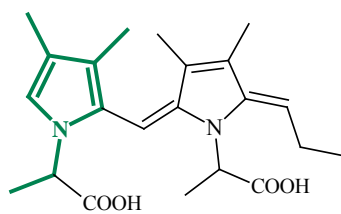
197,1 (MH⁺-190,1)



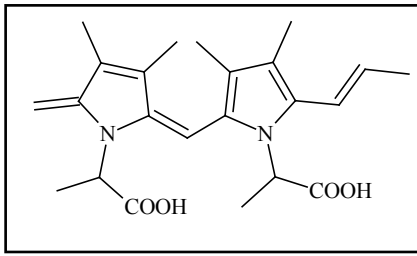
164,1 (MH⁺-223,1)



134,1 (MH⁺-253,1)



122,1 (MH⁺-265,1)



ESI+

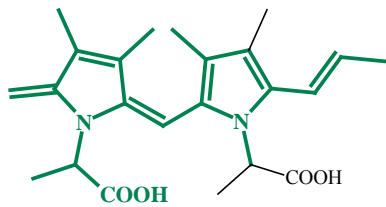
Sloučenina: LO-398

Sumární vzorec: C₂₃H₃₀N₂O₄

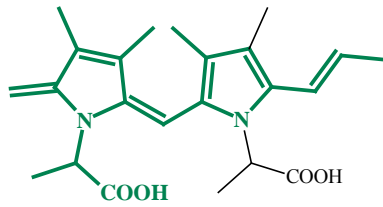
$t_R = 7,93$ min

$\lambda_{max} = 546$ nm

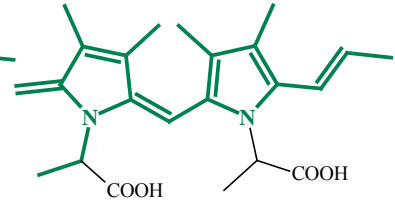
Přesná molární hmotnost: 398,2200 Da



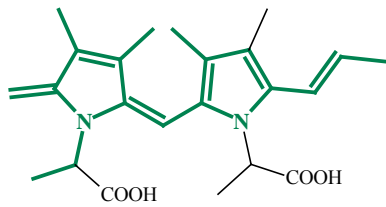
325,2 (MH⁺-74,0)



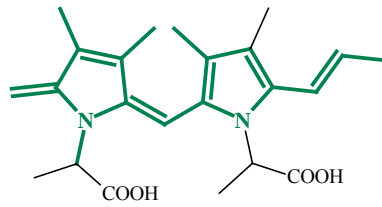
311,2 (MH⁺-88,1)



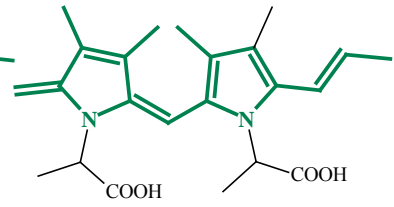
281,2 (MH⁺-118,0)



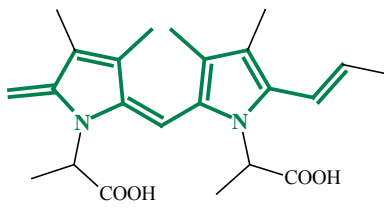
267,2 (MH⁺-132,0)



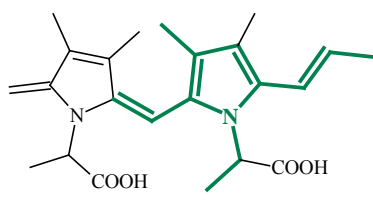
252,2 (MH⁺-147,1)



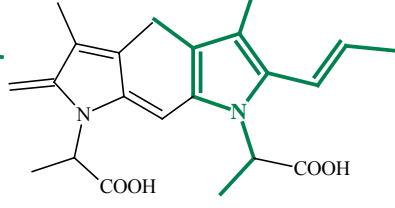
238,1 (MH⁺-161,1)



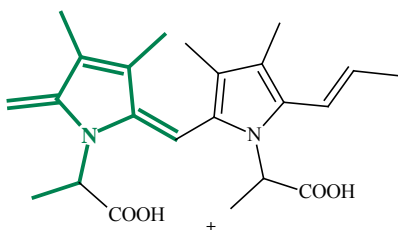
223,1 (MH⁺-176,1)



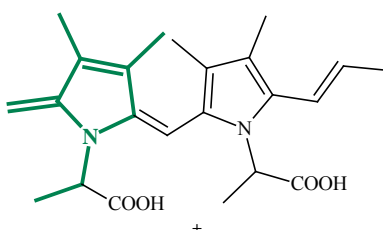
174,1 (MH⁺-225,1)



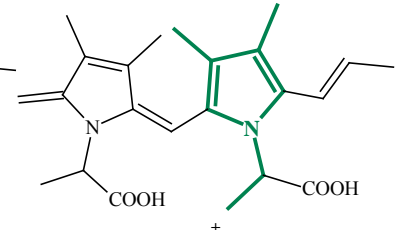
162,1 (MH⁺-237,1)



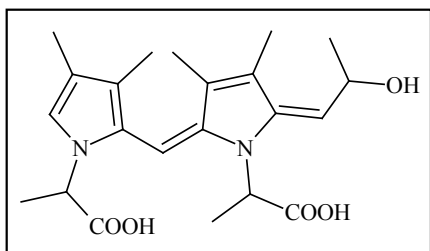
148,1 (MH⁺-251,1)



136,1 (MH⁺-263,1)



122,1 (MH⁺-277,1)



ESI+

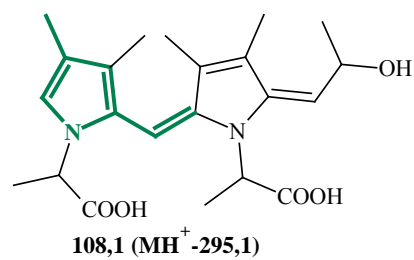
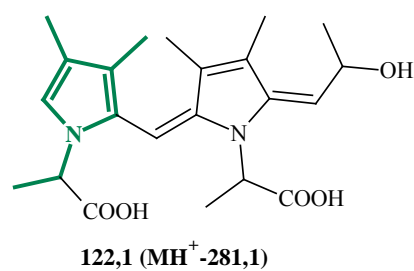
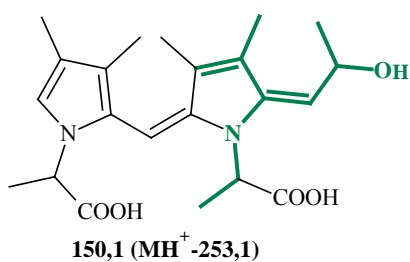
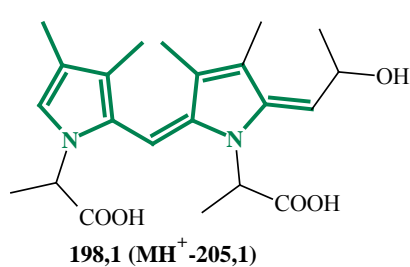
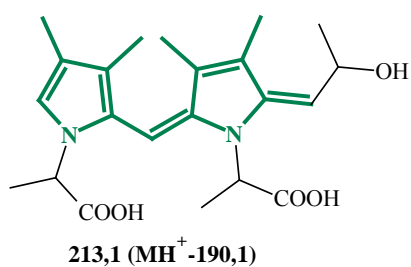
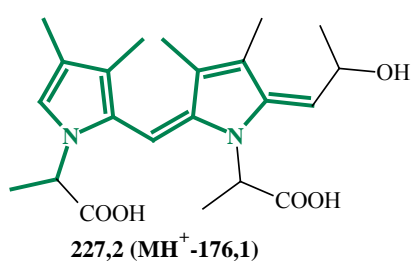
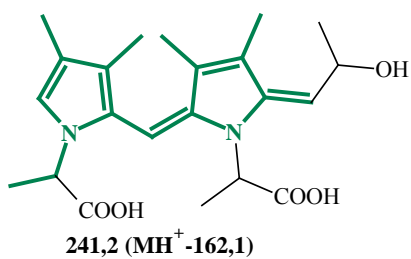
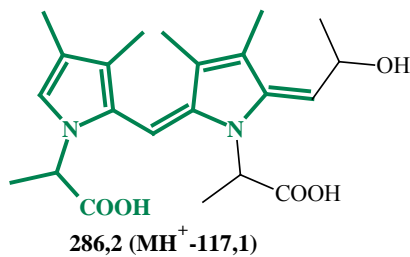
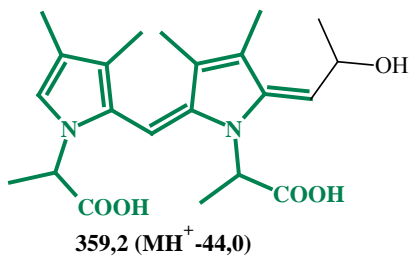
Sloučenina: LO-402

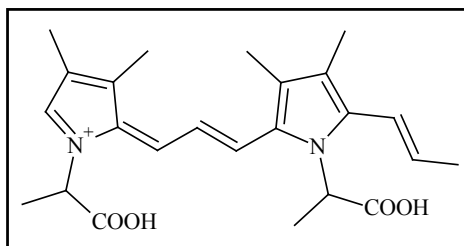
Sumární vzorec: C₂₂H₃₀N₂O₅

$t_R = 5,80$ min

$\lambda_{max} = 518$ nm

Přesná molární hmotnost: 402,2149 Da





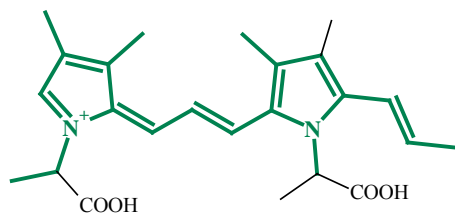
ESI+ Sloučenina: GLO-411

Sumární vzorec: $C_{24}H_{31}N_2O_4^+$

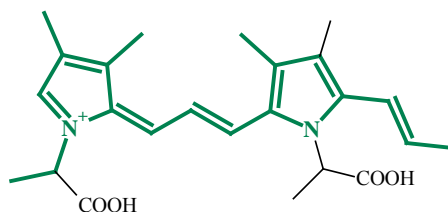
$t_R = 9,39$ min

$\lambda_{max} = 600$ nm

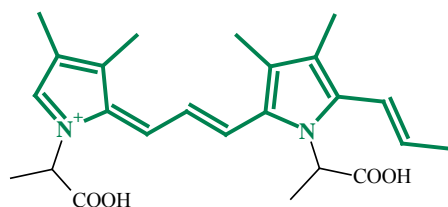
Přesná molární hmotnost: 411,2278 Da



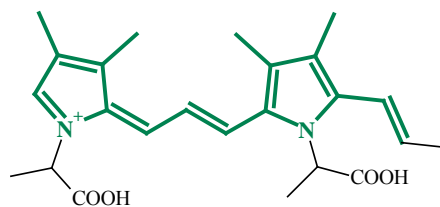
293,2 (M-118)



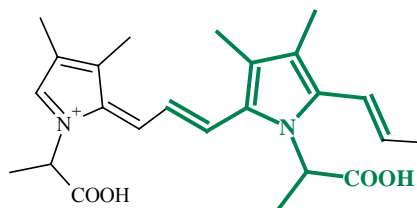
279,2 (M-132)



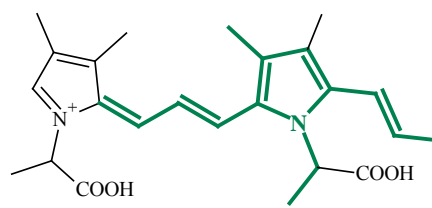
265,2 (M-146,1)



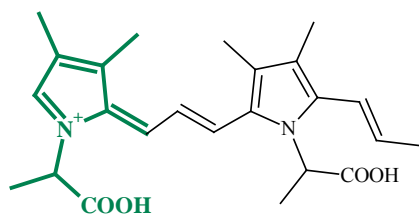
249,1 (M-162,1)



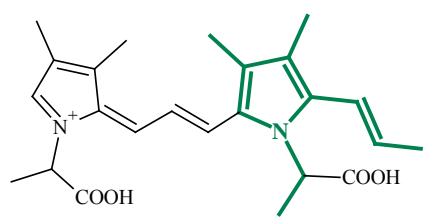
220,1 (M-191,1)



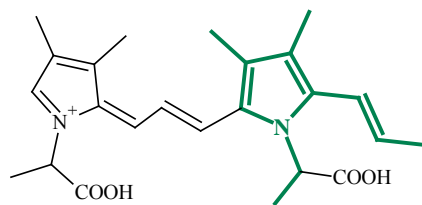
200,1 (M-211,1)



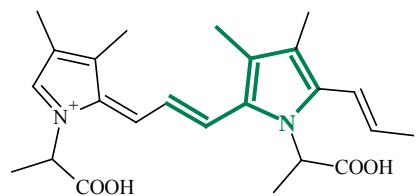
180,1 (M-231,1)



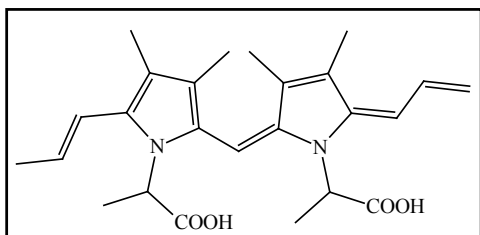
160,1 (M-251,1)



145,1 (M-266,1)



108,1 (M-303,1)



ESI+

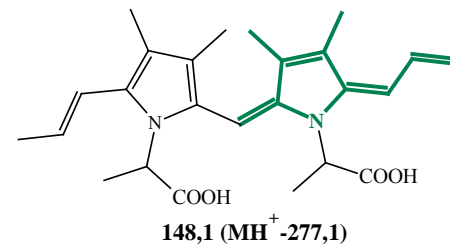
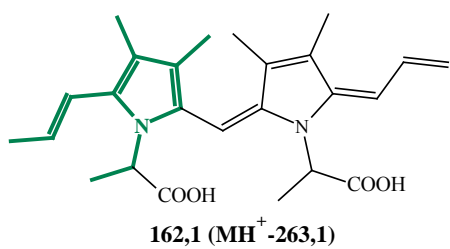
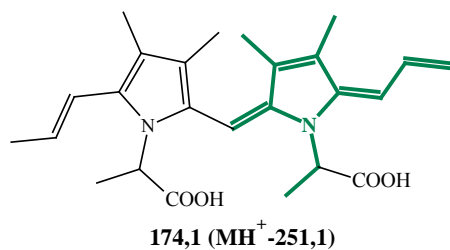
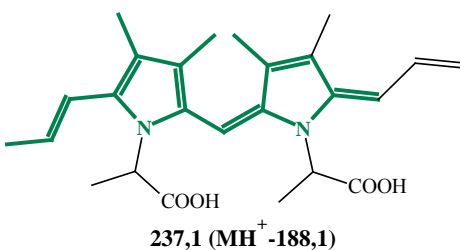
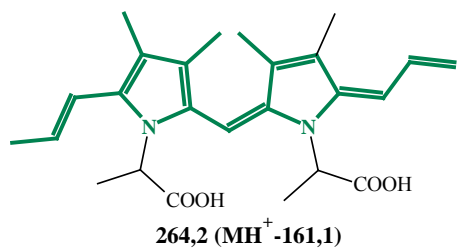
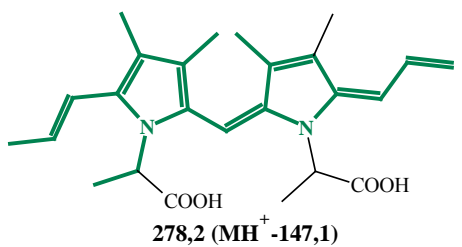
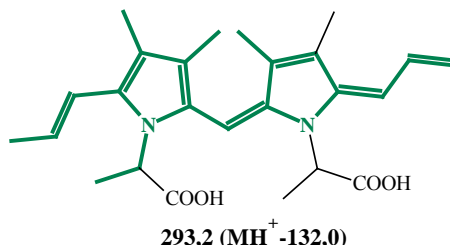
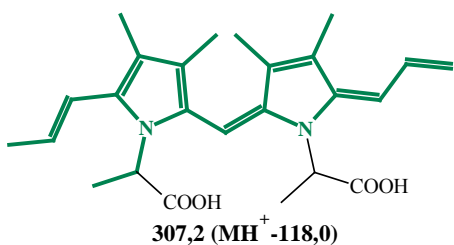
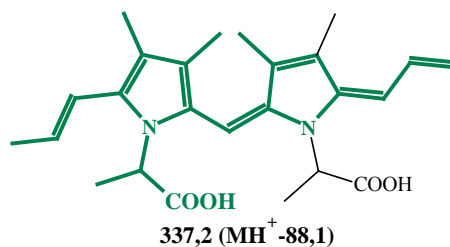
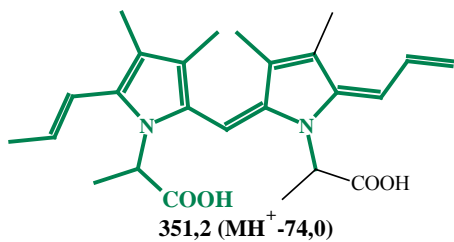
Sloučenina: LO-416

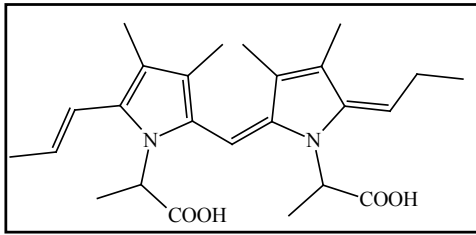
Sumární vzorec: $C_{23}H_{32}N_2O_5$

$t_R = 7,19$ min

$\lambda_{max} = 520$ nm

Přesná molární hmotnost: 416,2306 Da





ESI+

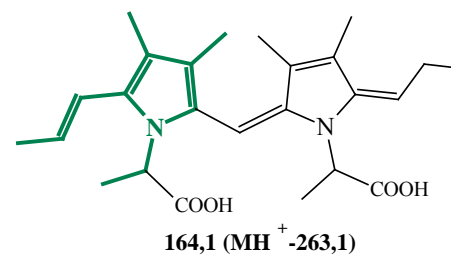
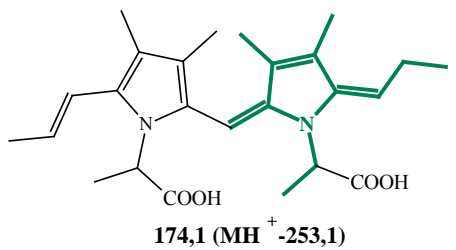
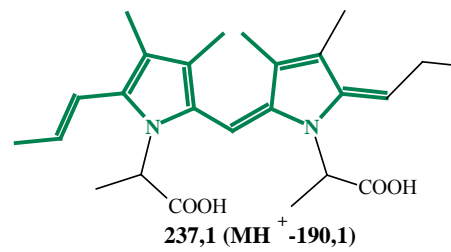
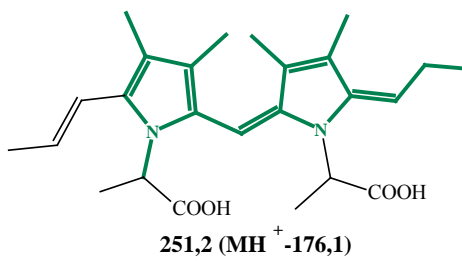
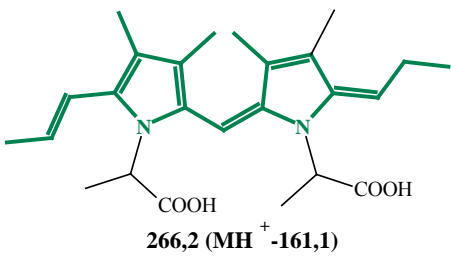
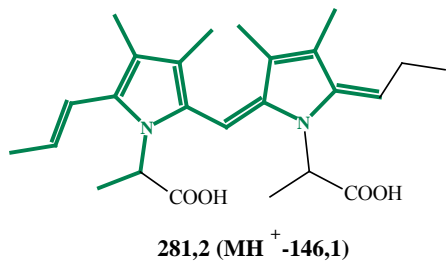
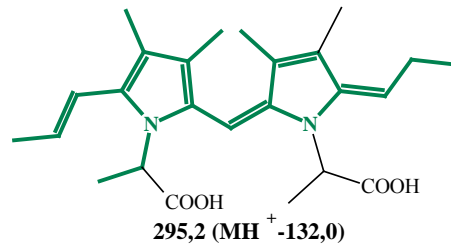
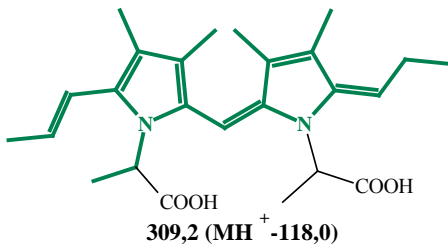
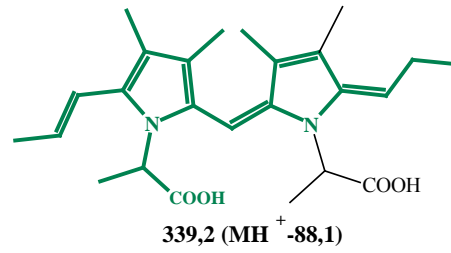
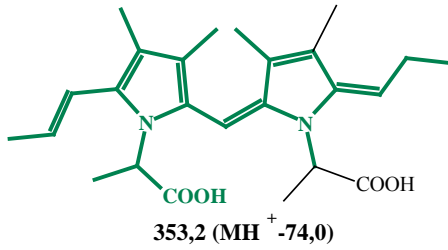
Sloučenina: LO-426

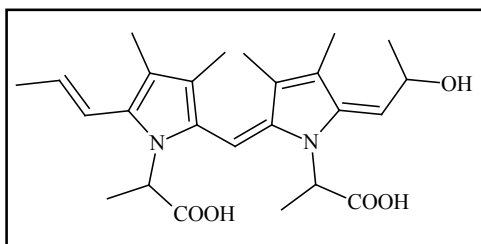
Sumární vzorec: C₂₅H₃₄N₂O₄

$t_R = 9,16$ min

$\lambda_{max} = 548$ nm

Přesná molární hmotnost: 426,2513 Da





ESI+

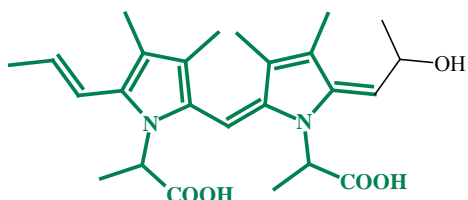
Sloučenina: LO-442

Sumární vzorec: $C_{25}H_{34}N_2O_5$

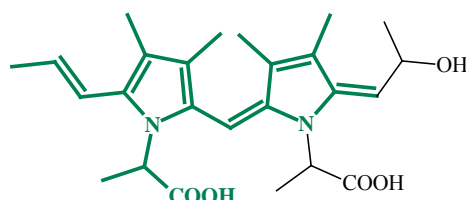
$t_R = 7,77$ min

$\lambda_{max} = 548$ nm

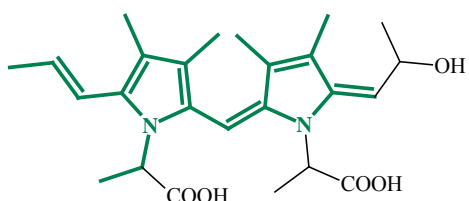
Přesná molární hmotnost: 442,2462 Da



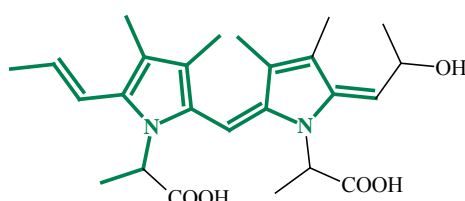
399,2 (MH⁺-44,0)



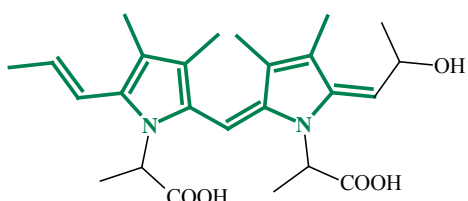
326,2 (MH⁺-117,1)



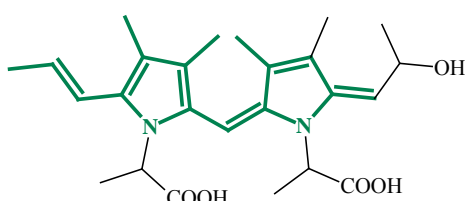
281,2 (MH⁺-162,1)



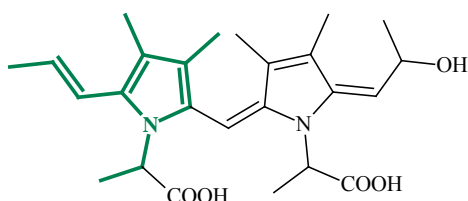
267,2 (MH⁺-176,1)



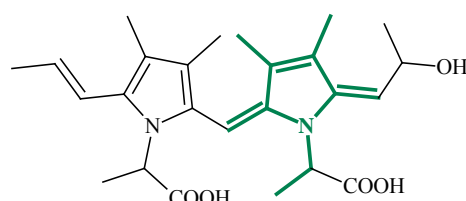
253,2 (MH⁺-190,1)



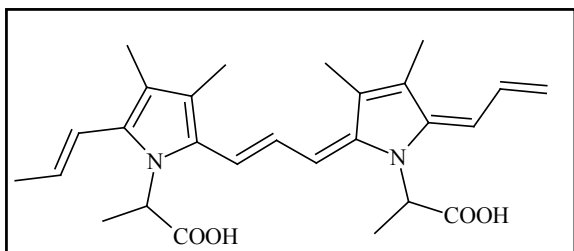
238,1 (MH⁺-205,1)



162,1 (MH⁺-281,1)



148,1 (MH⁺-295,1)



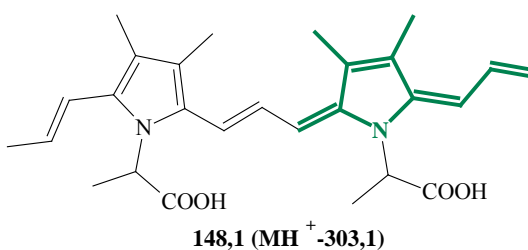
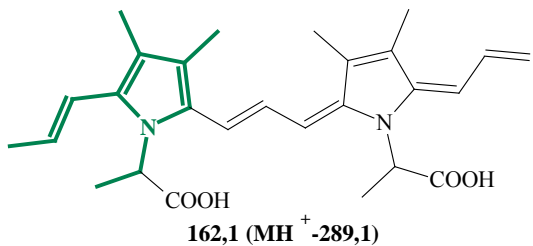
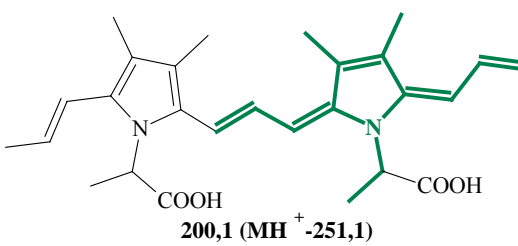
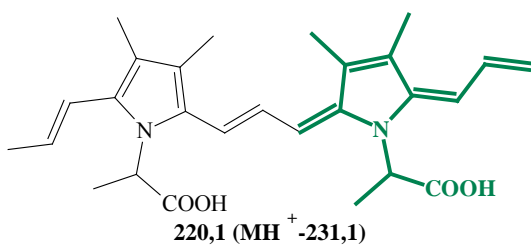
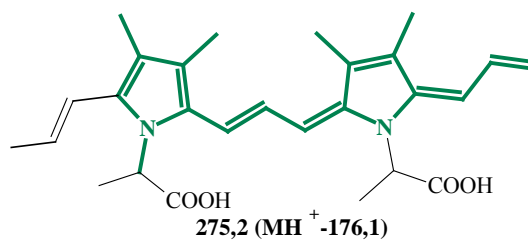
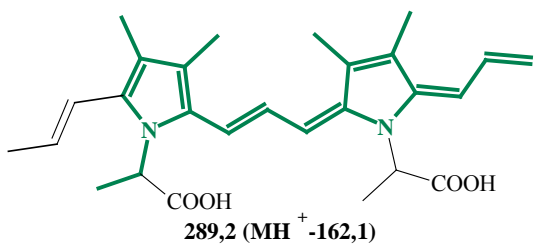
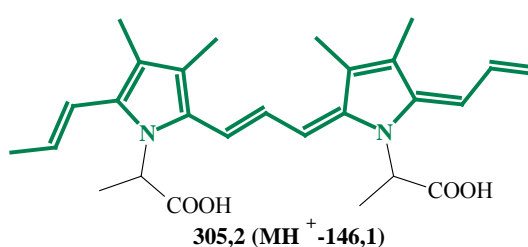
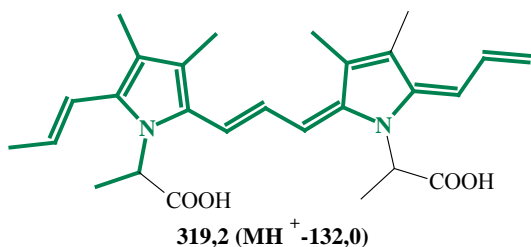
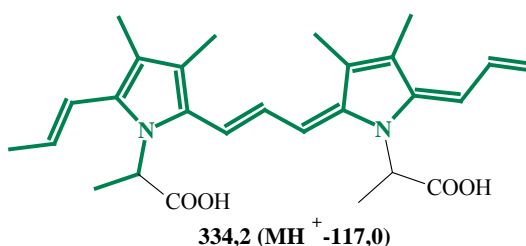
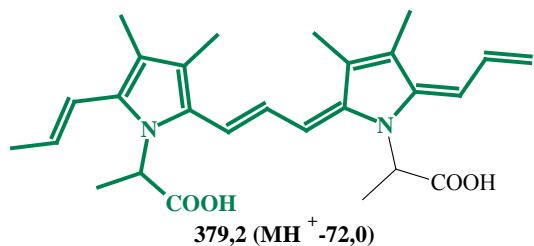
ESI+ Sloučenina: LO-450

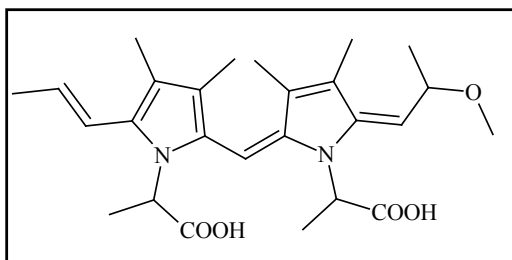
Sumární vzorec: $C_{26}H_{34}N_2O_4$

$t_R = 10,96$ min

$\lambda_{max} = 634$ nm

Přesná molární hmotnost: 450,2513 Da





ESI+

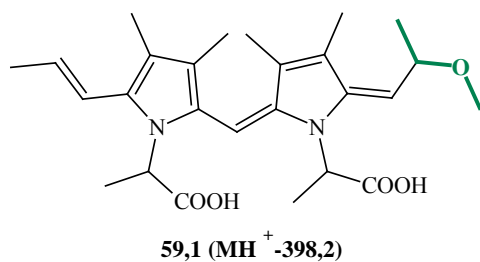
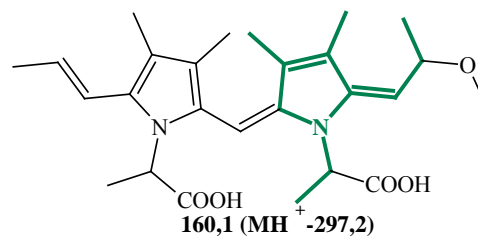
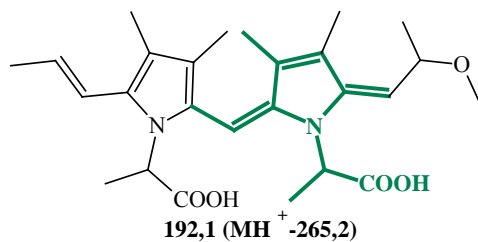
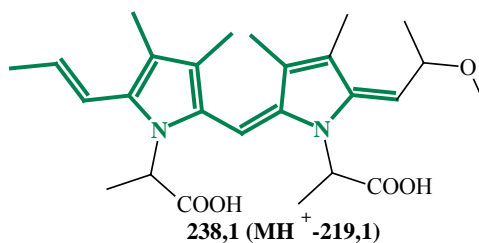
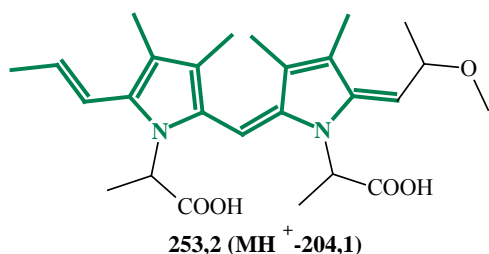
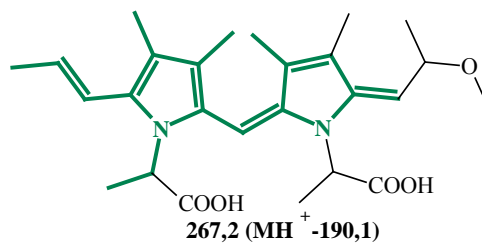
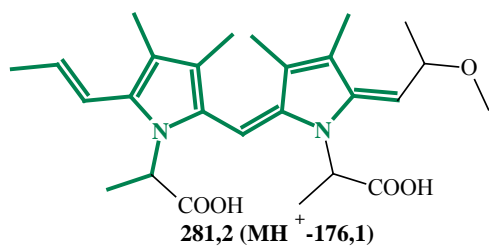
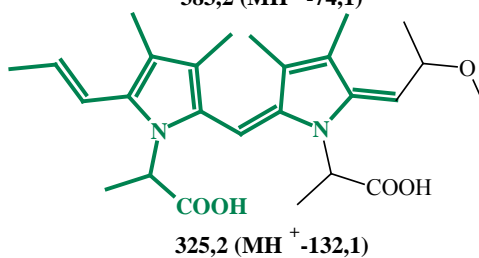
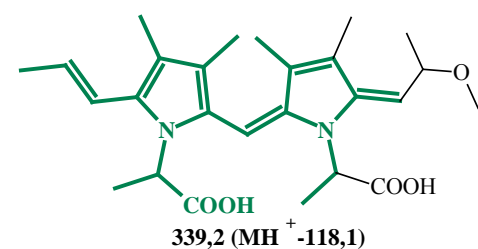
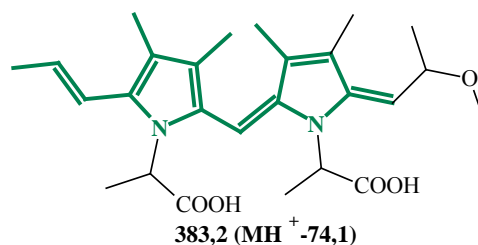
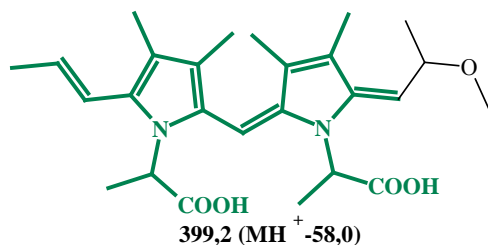
Sloučenina: LO-456

Sumární vzorec: C₂₆H₃₆N₂O₅

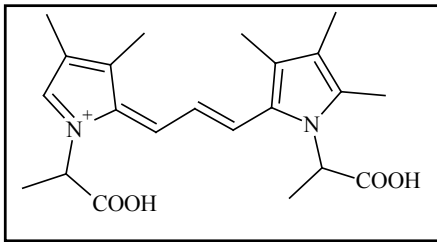
$t_R = 8,76$ min

$\lambda_{max} = 548$ nm

Přesná molární hmotnost: 456,2619 Da



Příloha 22: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v česneku



ESI+

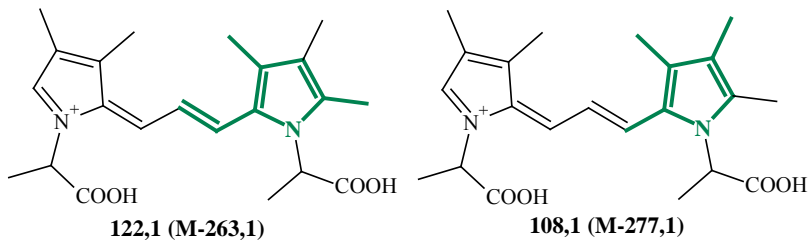
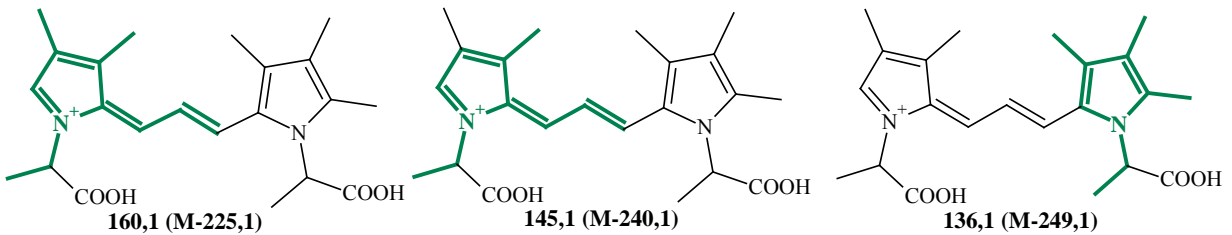
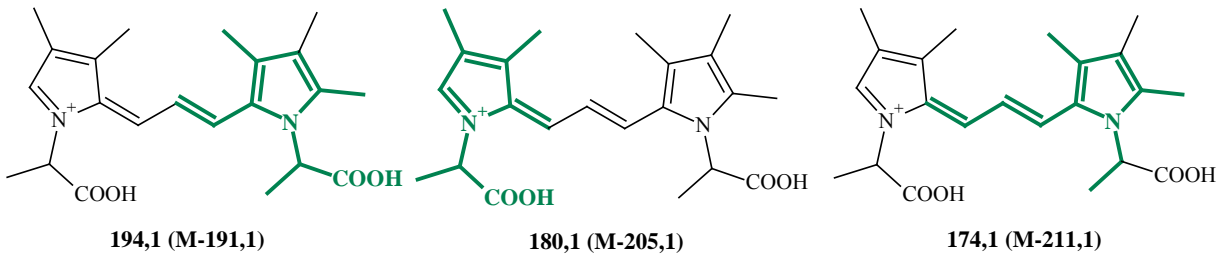
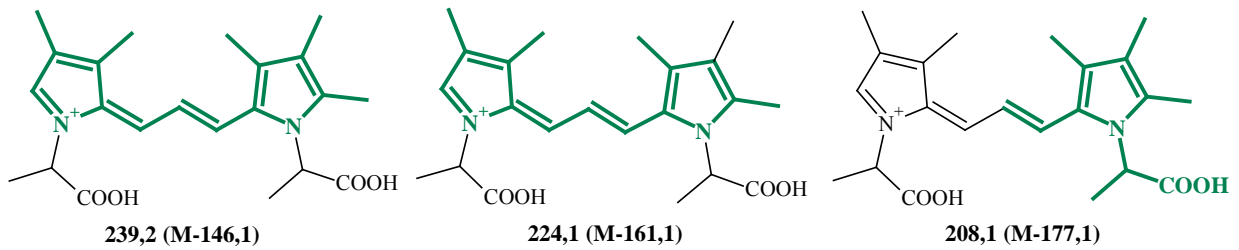
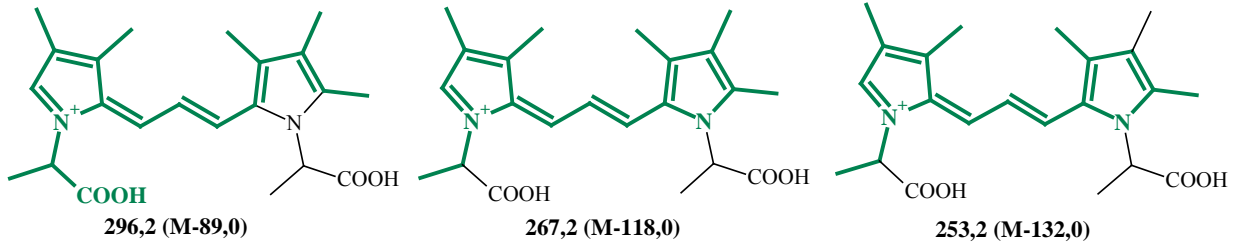
Sloučenina: **G-385**

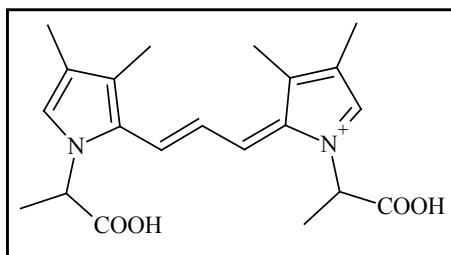
Sumární vzorec: $C_{22}H_{29}N_2O_4$

$t_R = 8,18$ min

$\lambda_{max} = 576$ nm

Přesná molární hmotnost: 385,2122 Da





ESI+

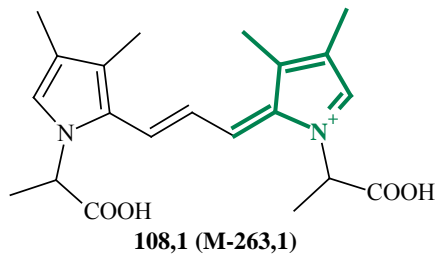
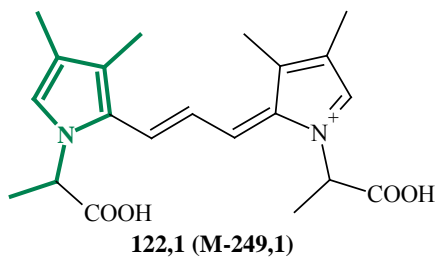
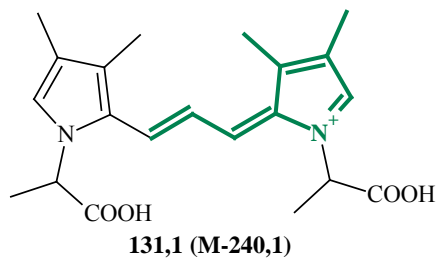
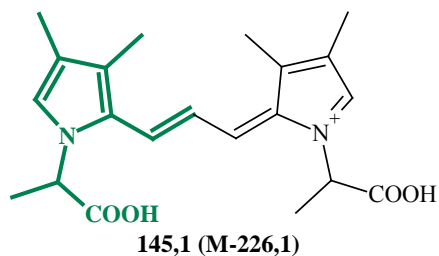
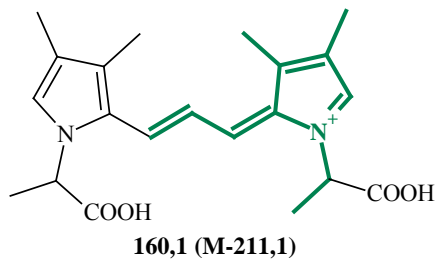
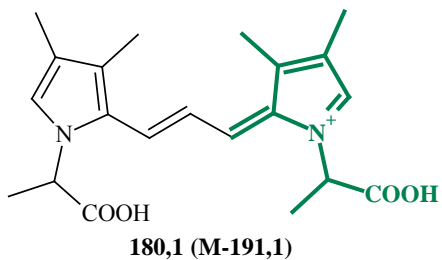
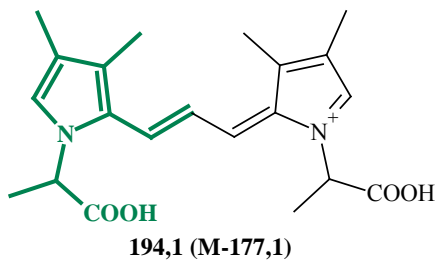
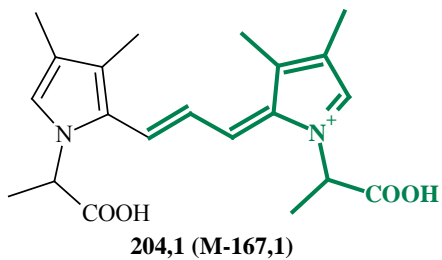
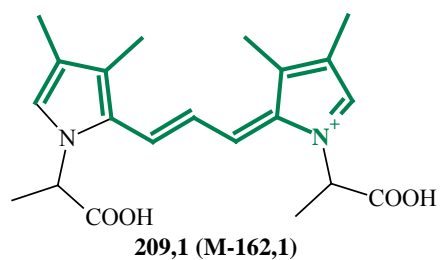
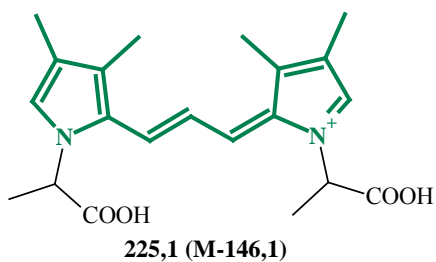
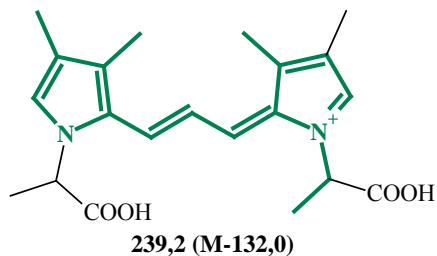
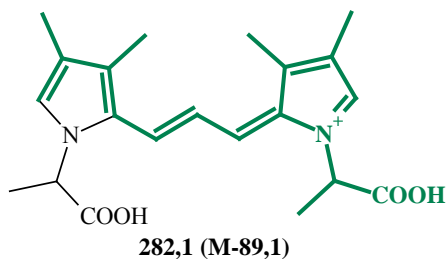
Sloučenina: GLO-371

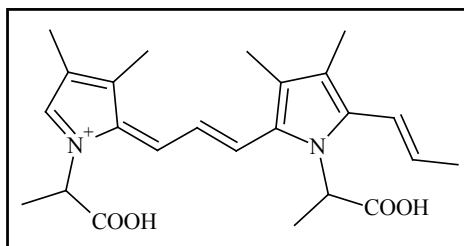
Sumární vzorec: $C_{21}H_{27}N_2O_4^+$

$t_R = 7,26$ min

$\lambda_{max} = 568$ nm

Přesná molární hmotnost: 371,1965 Da





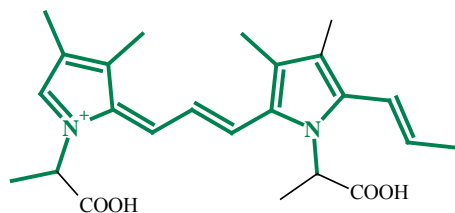
ESI+ Sloučenina: GLO-411

Sumární vzorec: $C_{24}H_{31}N_2O_4^+$

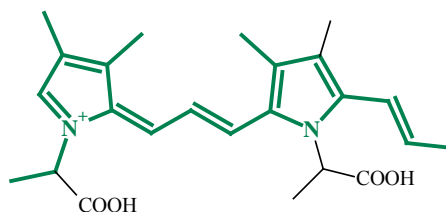
$t_R = 9,39$ min

$\lambda_{max} = 600$ nm

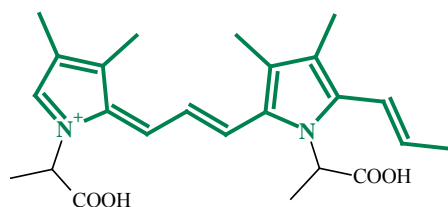
Přesná molární hmotnost: 411,2278 Da



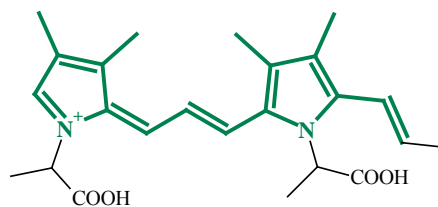
293,2 (M-118)



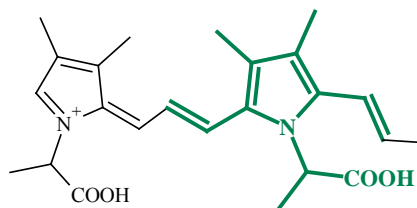
279,2 (M-132)



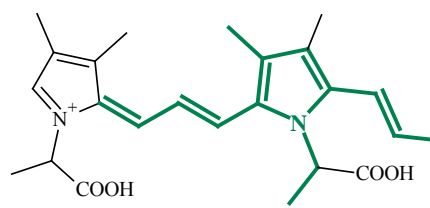
265,2 (M-146,1)



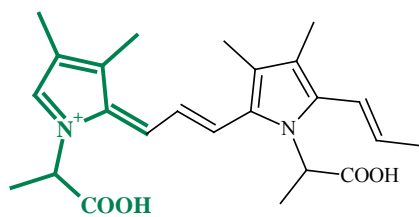
249,1 (M-162,1)



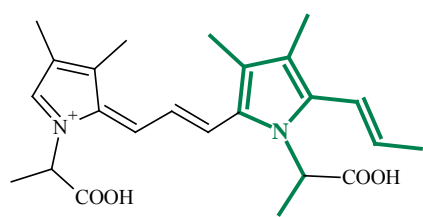
220,1 (M-191,1)



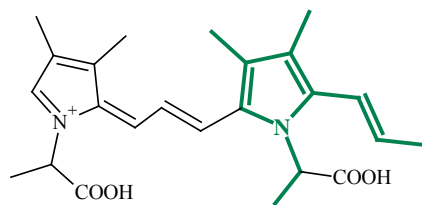
200,1 (M-211,1)



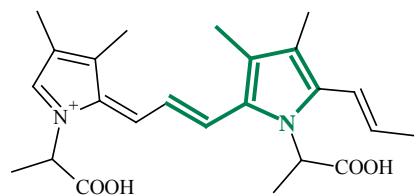
180,1 (M-231,1)



160,1 (M-251,1)

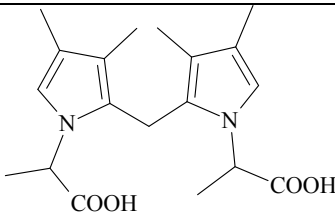
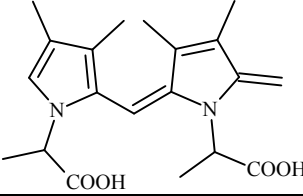
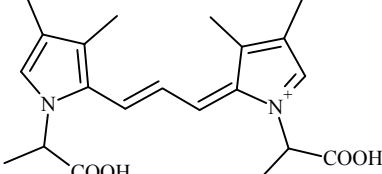
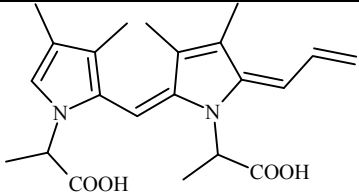
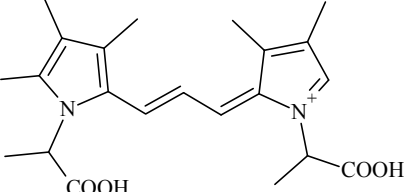
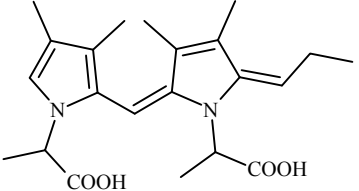
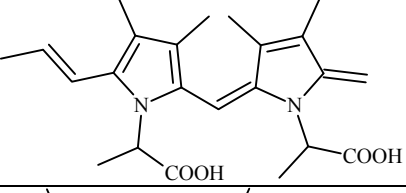
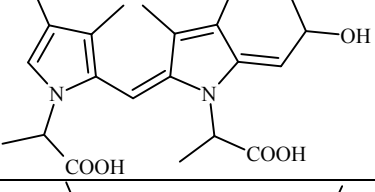
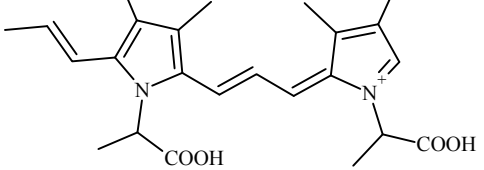


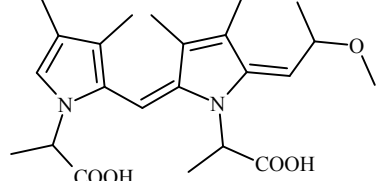
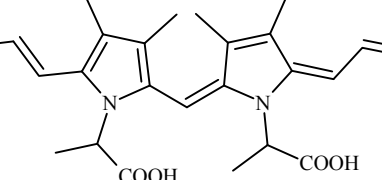
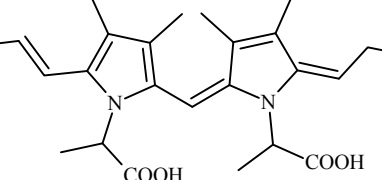
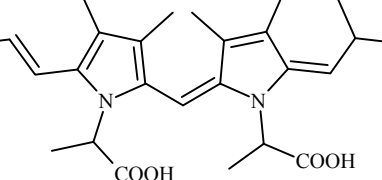
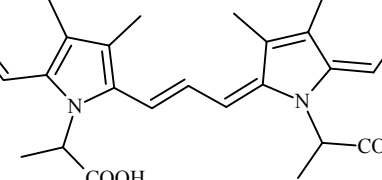
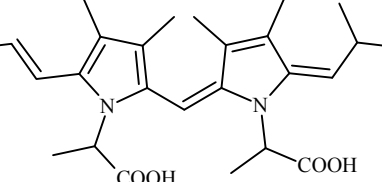
145,1 (M-266,1)



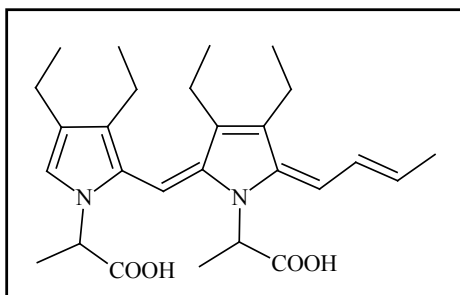
108,1 (M-303,1)

Příloha 23: Přehled sloučenin obsahujících dvě pyrrolová jádra vznikajících v cibuli, póru nebo v česneku

sloučenina	vzorec	IUPAC název
36		2,2'-[methandiylbis(3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2,1-diyl)]dipropanová kyselina
LO-358		2-(2-{(E)-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-methyliden-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]methyl))-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)propanová kyselina
GLO-371		(2 <i>E</i>)-1-(karboxyethyl)-2-{(2 <i>E</i>)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden}-3,4-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrolium
LO-384		2-(2-{(E)-[(5 <i>E</i>)-1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-(prop-2-en-1-yliden)-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]methyl))-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)propanová kyselina
G-385		(2 <i>E</i>)-1-(1-karboxyethyl)-2-{(2 <i>E</i>)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4,5-trimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden}-3,4-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrolium
LO-386		2-(2-{(E)-[(5 <i>E</i>)-1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-propyliden-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]methyl))-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)propanová kyselina
LO-398		2-(2-{(Z)-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-methyliden-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]methyl))-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)propanová kyselina
LO-402		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-[[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl]methyliden]-5-(2-hydroxypropyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
GLO-411		(2 <i>Z</i>)-1-(1-karboxyethyl)-2-[(2 <i>E</i>)-3-[[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden]-3,4-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrolium

sloučenina	vzorec	IUPAC název
LO-416		2-[(2 <i>Z</i> ,5 <i>E</i>)-2-({1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyliden}-5-(2-methoxy-propyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
LO-424		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-({1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyliden)-3,4-dimethyl-5-(prop-2-en-1-yliden)-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
LO-426		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-({1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyliden)-3,4-dimethyl-5-propyliden-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
LO-442		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-({1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyliden)-5-(2-hydroxypropyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
LO-450		2-(2-({1 <i>E</i> ,3 <i>Z</i>)-3-[(5 <i>E</i>)-1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-(prop-2-en-1-yliden)-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]prop-1-en-1-yl}-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)propanová kyselina
LO-456		2-[(2 <i>Z</i> ,5 <i>E</i>)-2-({1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-5-[(1 <i>E</i>)-prop-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)methyliden)-5-(2-methoxypropyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina

Příloha 24: Fragmentace barevných sloučenin vznikajících v česneku sicilském



ESI+

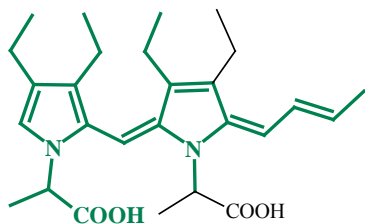
Sloučenina: S-454

Sumární vzorec: C₂₇H₃₈N₂O₄

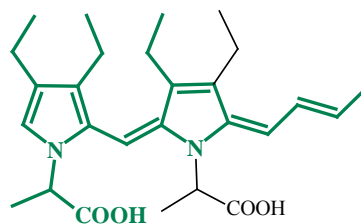
$t_R = 11,86$ min

$\lambda_{max} = 557$ nm

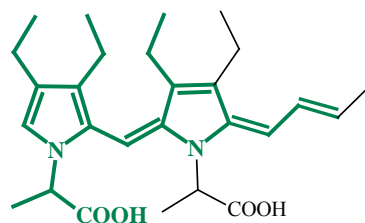
Přesná molární hmotnost: 454,2904 Da



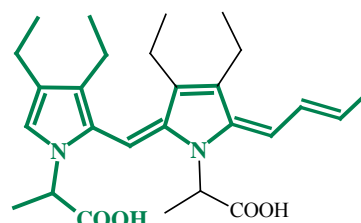
367,2 (MH⁺-88,1)



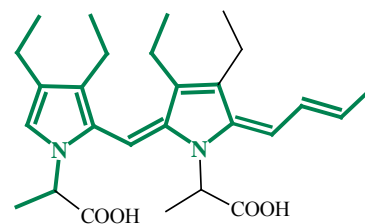
353,2 (MH⁺-102,1)



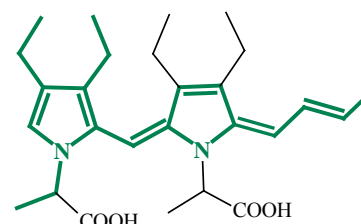
338,2 (MH⁺-117,1)



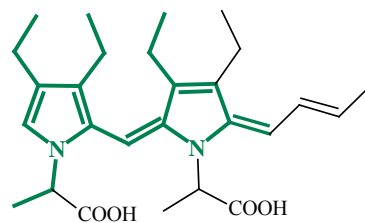
324,2 (MH⁺-131,1)



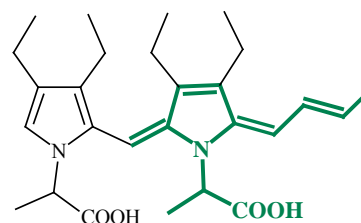
309,2 (MH⁺-146,1)



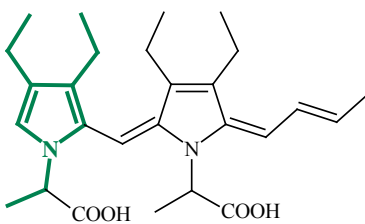
280,2 (MH⁺-175,1)



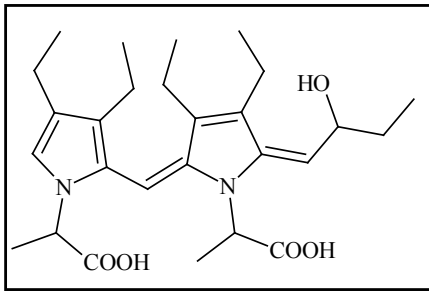
265,2 (MH⁺-190,1)



206,1 (MH⁺-249,2)



150,1 (MH⁺-305,2)



ESI+

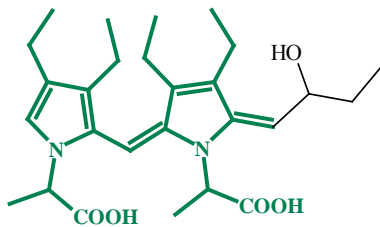
Sloučenina: S-472

Sumární vzorec: $C_{27}H_{40}N_2O_5$

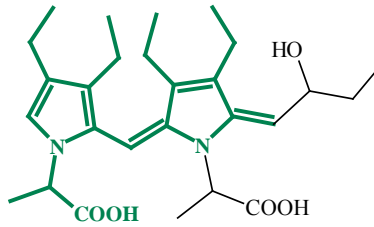
$t_R = 9,8 + 10,34$ min

$\lambda_{max} = 533$ nm

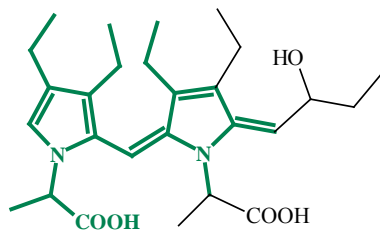
Přesná molární hmotnost: 472,2932 Da



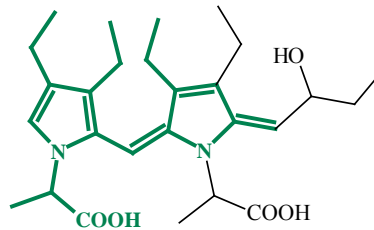
415,3 (MH⁺ -58,0)



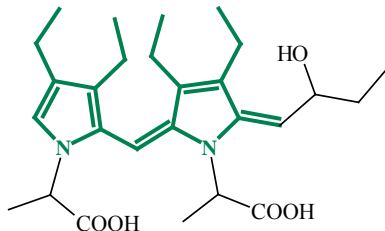
342,2 (MH⁺ -131,1)



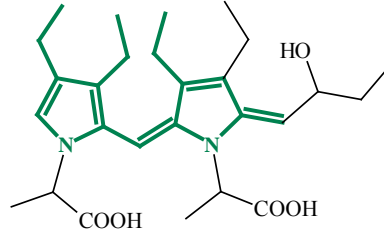
327,2 (MH⁺ -146,1)



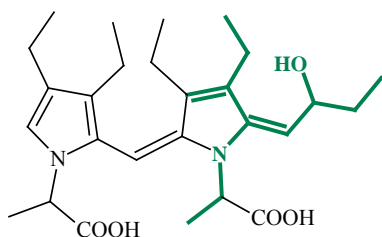
313,2 (MH⁺ -160,1)



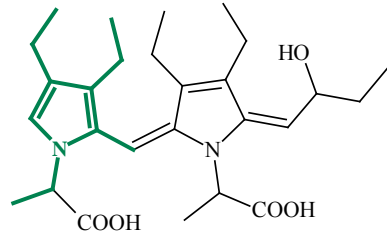
269,2 (MH⁺ -204,1)



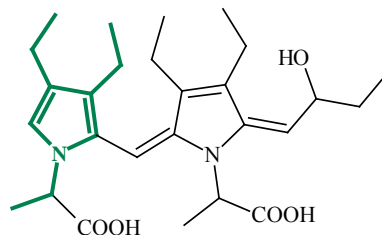
240,2 (MH⁺ -233,1)



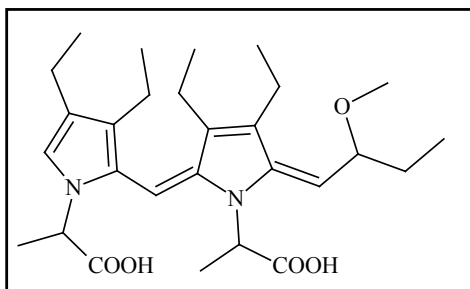
178,1 (MH⁺ -295,2)



162,1 (MH⁺ -311,2)



150,1 (MH⁺ -323,2)



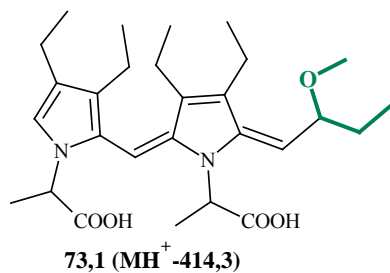
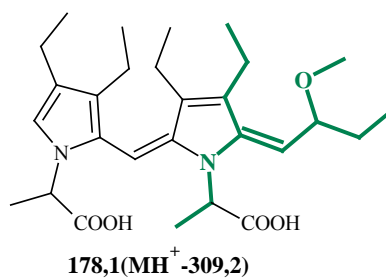
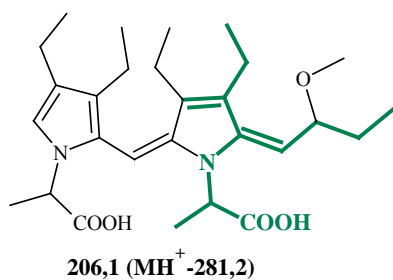
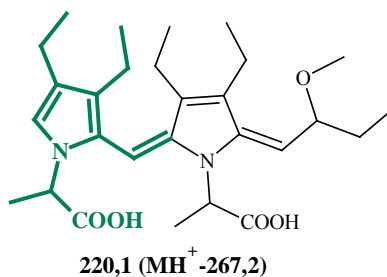
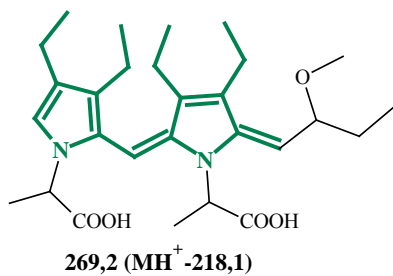
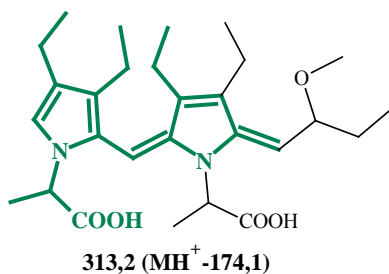
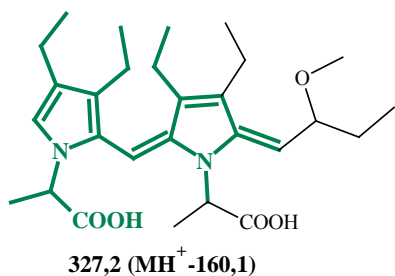
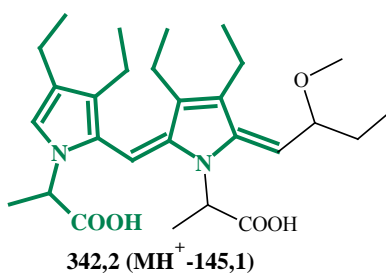
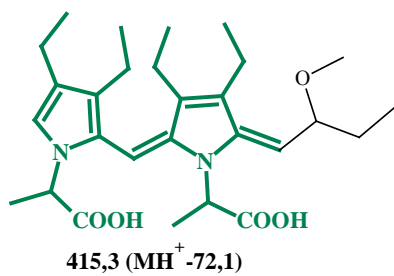
ESI+ **Sloučenina: S-486**

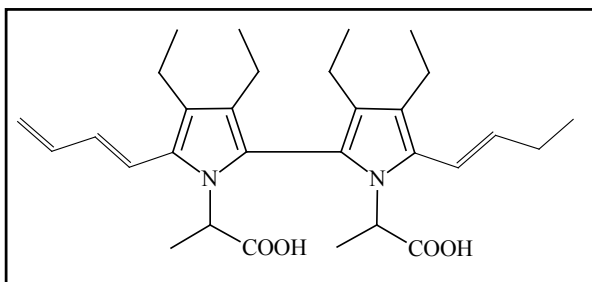
Sumární vzorec: C₂₈H₄₂N₂O₅

$t_R = 11,01$ min

$\lambda_{max} = 535$ nm

Přesná molární hmotnost: 486,3088 Da





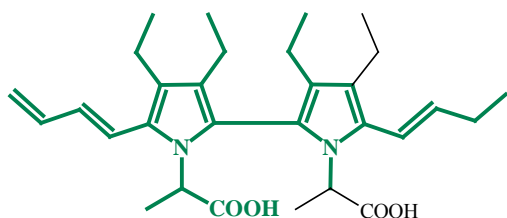
ESI+ Sloučenina: S-494

Sumární vzorec: $C_{30}H_{42}N_2O_4$

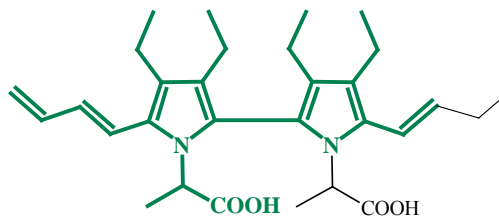
$t_R = 11,84$ min

$\lambda_{max} = 551$ nm

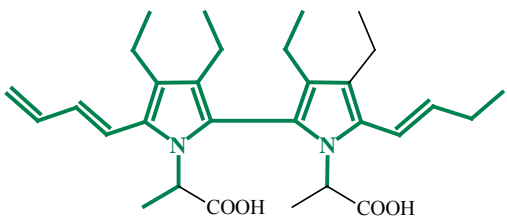
Přesná molární hmotnost: 484,3139 Da



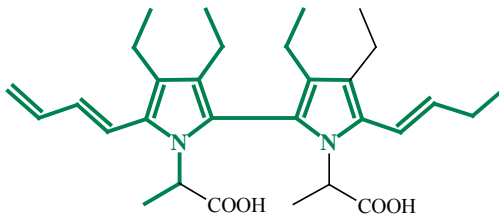
407,3 ($MH^+ -88,1$)



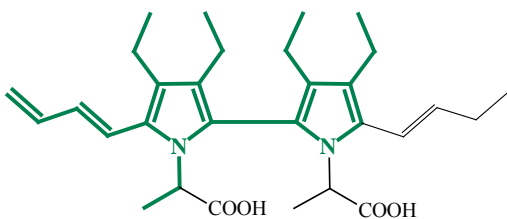
393,3 ($MH^+ -102,1$)



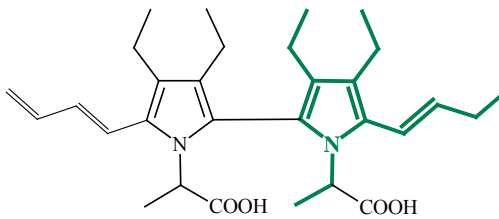
363,3 ($MH^+ -132,0$)



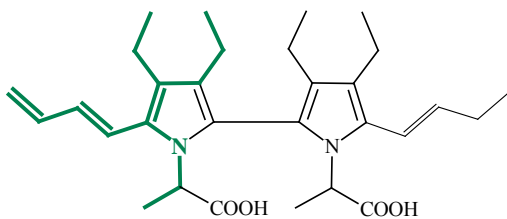
349,3 ($MH^+ -146,1$)



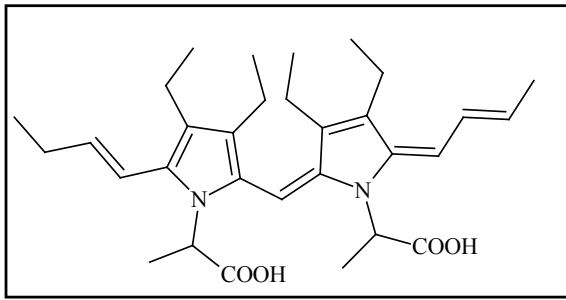
320,2 ($MH^+ -175,1$)



204,2 ($MH^+ -291,1$)



190,2 ($MH^+ -305,2$)



ESI+

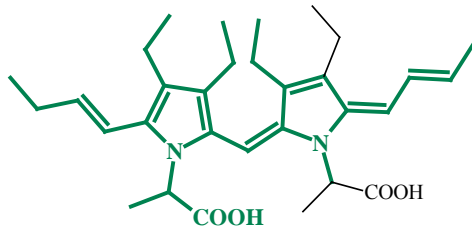
Sloučenina: S-508

Sumární vzorec: C₃₁H₄₄N₂O₄

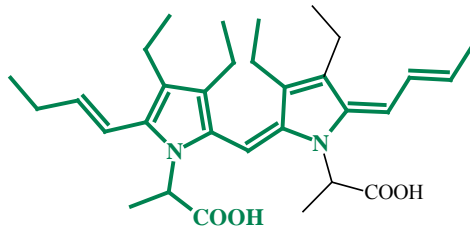
$t_R = 12,28$ min

$\lambda_{max} = 580$ nm

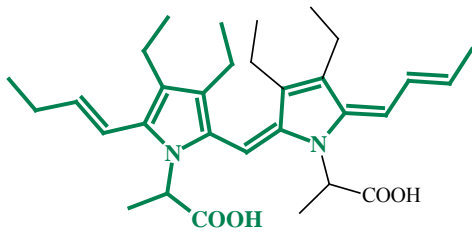
Přesná molární hmotnost: 508,3296 Da



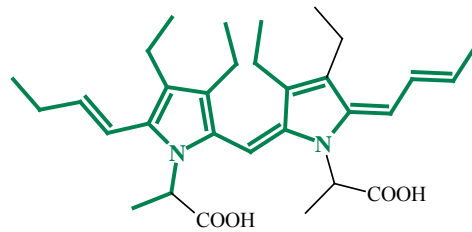
421,3 (MH⁺ -88,1)



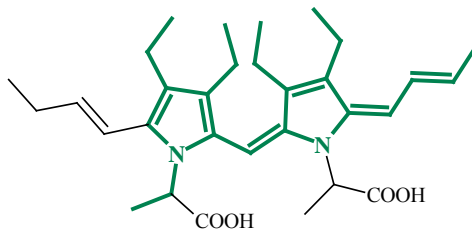
407,3 (MH⁺ -102,1)



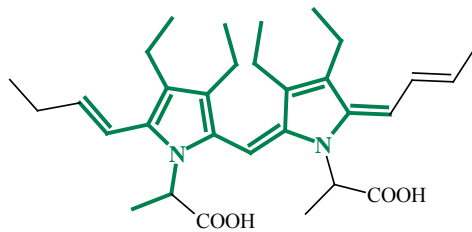
378,2 (MH⁺ +131,1)



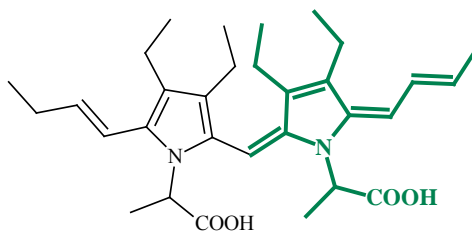
363,3 (MH⁺ -146,1)



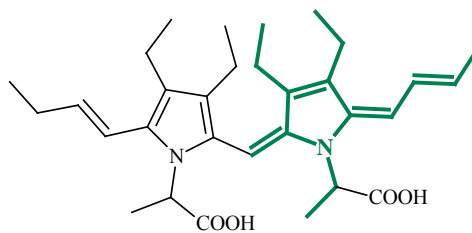
334,2 (MH⁺ -175,1)



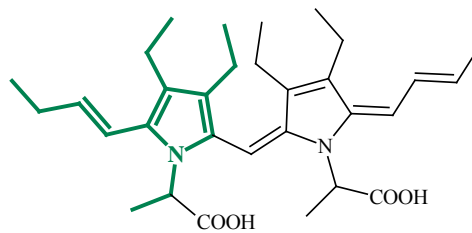
319,2 (MH⁺ -190,1)



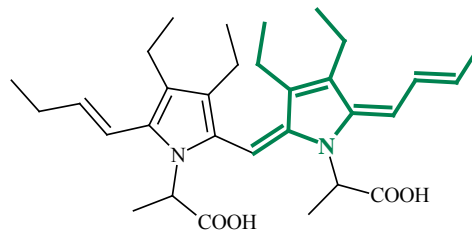
260,2 (MH⁺ -246,2)



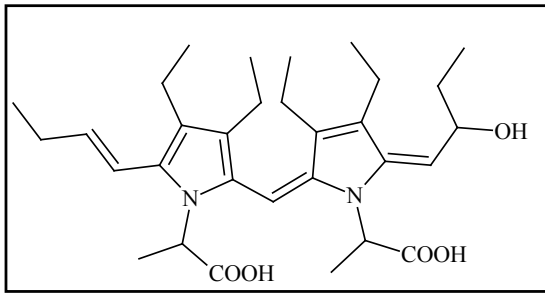
216,2 (MH⁺ -293,2)



204,2 (MH⁺ -305,2)



190,2 (MH⁺ -319,2)



ESI+

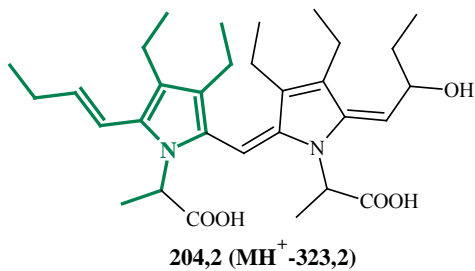
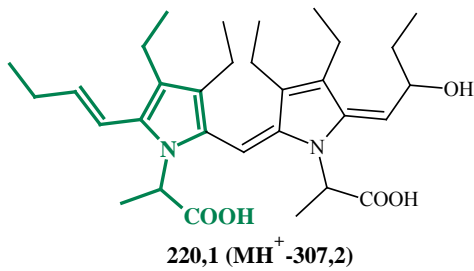
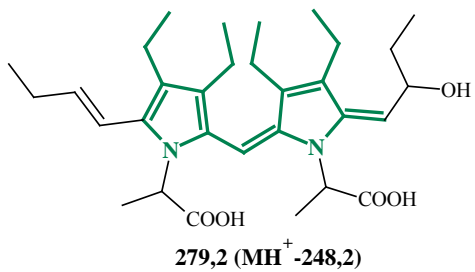
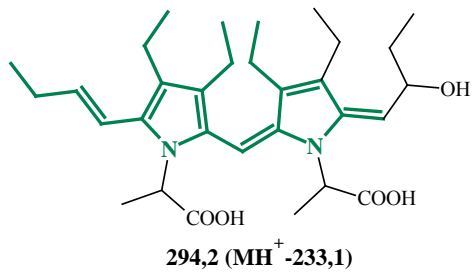
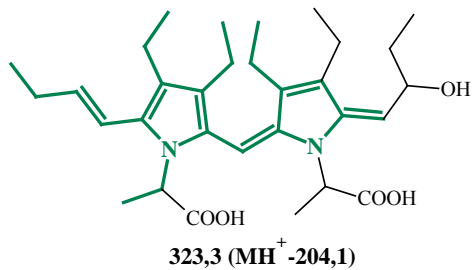
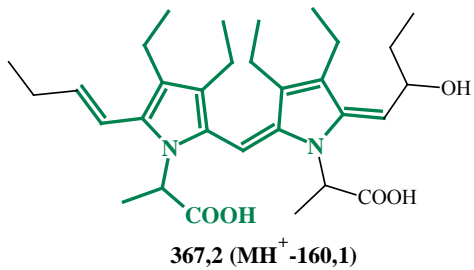
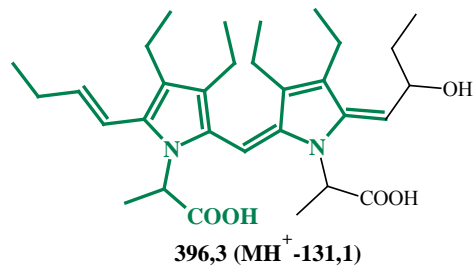
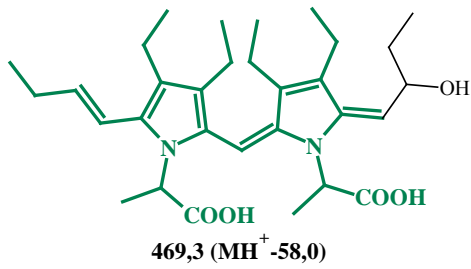
Sloučenina: S-526

Sumární vzorec: $C_{31}H_{46}N_2O_5$

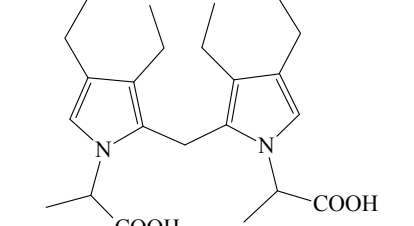
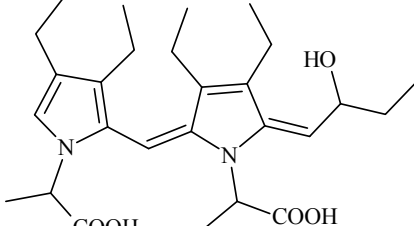
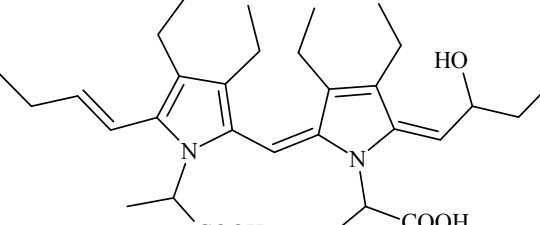
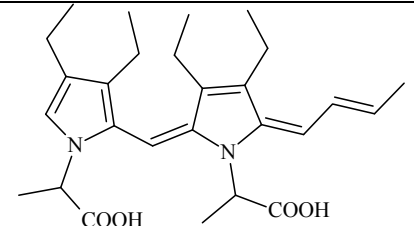
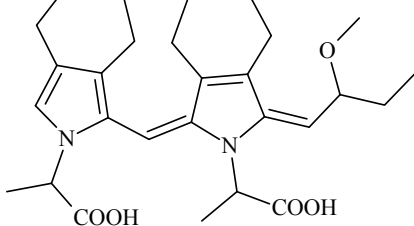
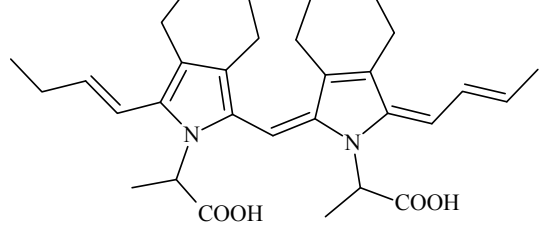
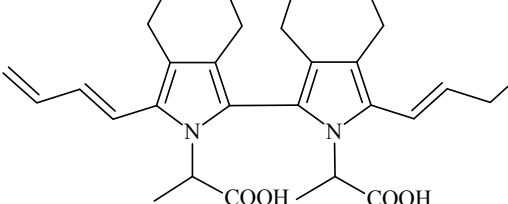
$t_R = 11,28$ min

$\lambda_{max} = 566$ nm

Přesná molární hmotnost: 526,3401 Da



Příloha 25: Přehled sloučenin obsahující dvě pyrrolová jádra vznikajících
v česneku sicilském

sloučenina	vzorec	IUPAC název
44		2,2'-[methandiylbis(3,4-diethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2,1-diyl)]dipropanová kyselina
S-472		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-{{1-(1-karboxyethyl)-3,4-diethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl}methyliden}-5-(2-hydroxybutyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
S-526		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-{{1-(1-karboxyethyl)-3,4-diethyl-5-[(1 <i>E</i>)-but-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl}methyliden)-5-(2-hydroxybutyliden)-3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
S-454		2-(2-{{(<i>E</i>)-[(5 <i>E</i>)-1-(1-karboxyethyl)-3,4-diethyl-5-(but-2-en-1-yliden)-1,5-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden]methyl}-3,4-diethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl}propanová kyselina
S-486		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-{{1-(1-karboxyethyl)-3,4-diethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl}methyliden}-5-(2-methoxybutyliden)-3,4-diethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
S-508		2-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2-{{1-(1-karboxyethyl)-3,4-diethyl-5-[(1 <i>E</i>)-but-1-en-1-yl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl}methyliden)-3,4-diethyl-5-(but-2-en-1-yliden)-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]propanová kyselina
S-494		2,2'-{5-[(1 <i>E</i>)-buta-1,3-dien-1-yl]-5'-[(1 <i>E</i>)-but-1-en-1-yl]-3,3',4,4'-tetraethyl-1 <i>H</i> ,1' <i>H</i> -2,2'-bipyrrol-1,1'-diyl}dipropanová kyselina