

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



# **Sirné sloučeniny v rostlinách rodu** ***Ferula***

Bakalářská práce

**Iveta Tichá**

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.  
(Katedra aplikované chemie, ZF JU)

České Budějovice 2012

Tichá, I. (2012). Sírné sloučeniny v rostlinách rodu *Ferula* [Sulfur-containing compounds in *Ferula* species. Bc. Thesis, in Czech] – 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

The theoretical part of the Bachelor thesis is focused on *Ferula* genus plants, their significance, occurrence and usage. The thesis also deals with their sulfur-containing compounds and the formation pathways of the sulfur compounds occurring in the *Allium* genus.

In the experimental part, the most important *Ferula* volatile sulfur compounds and their possible precursor are investigated. The precursor was suggested on the basis of the principle of similar sulfur compounds in *Ferula* genus plants and *Allium* genus plants.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

České Budějovice, 22. 4. 2012

.....

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (GAJU/067/2010/Z).

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za všestrannou pomoc a vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petře Krejčové za rady a pomoc s experimentální částí této práce a celému pracovnímu kolektivu doc. Kubce za příjemné prostředí, které mi bylo poskytnuto během jejího vypracování. Děkuji též Ing. Pavle Kružberské (Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR) za provedení HPLC/MS analýz.

Poděkování také patří mé rodině, která mi umožnila vysokoškolské studium.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>1</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>2</b>
3.1. <b>Rostliny rodu <i>Ferula</i></b> .....	<b>2</b>
3.1.1. Botanické zařazení a typické znaky .....	2
3.1.2. Geografický výskyt .....	4
3.1.3. Použití rostlin rodu <i>Ferula</i> .....	5
3.1.4. Předchozí výzkum .....	5
3.2. <b>Sírné sloučeniny rostlin rodu <i>Ferula</i></b> .....	<b>6</b>
3.3. <b>Tvorba sirných sloučenin v rostlinách rodu <i>Allium</i></b> .....	<b>10</b>
3.4. <b><i>S</i>-(<i>sek</i>-Butyl)cysteinsulfoxid - prekurzor těkavých sirných sloučenin v rostlinách rodu <i>Ferula</i>?</b> .....	<b>11</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
4.1. <b>Použité přístroje a chemikálie</b> .....	<b>12</b>
4.1.1. Chemikálie .....	12
4.1.2. Přístroje a laboratorní pomůcky .....	13
4.2. <b>Metody a postupy</b> .....	<b>14</b>
4.2.1. <b>Izolace a identifikace nejvýznamnějších těkavých sirných látek</b> .....	<b>14</b>
4.2.1.1. Použití Likens-Nickersonovy aparatury .....	14
4.2.1.2. Použití přímé extrakce .....	15
4.2.1.3. Určení identity izolovaných těkavých sirných látek .....	15
4.2.2. <b>Ověření přítomnosti potenciálního prekurzoru těkavých sirných látek</b> .....	<b>16</b>
4.2.2.1. Příprava <i>S</i> -( <i>sek</i> -butyl)-L-cysteinu .....	16
4.2.2.2. Oxidace <i>S</i> -( <i>sek</i> -butyl)-L-cysteinu .....	16
4.2.2.3. Izolace aminokyselin z <i>Ferula foetida</i> .....	17
4.2.2.4. Důkaz přítomnosti aminokyselin .....	18
4.2.2.5. Ověření identity prekurzoru těkavých sirných látek .....	18
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>20</b>

5.1. Přítomnost nejvýznamnějších těkavých sirných látek v rostlině <i>Ferula foetida</i> .....	20
5.2. Syntéza potenciálního prekursoru .....	23
5.3. Detekce potenciálního prekursoru .....	25
6. DISKUSE .....	27
7. ZÁVĚR.....	29
8. SHRnutí.....	29
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	30
10. DODATEK.....	32
11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	32

# 1. Úvod

Rostliny rodu *Ferula* L. nejsou v České republice příliš známé, jedná se o exotické byliny vyskytující se převážně v Asii, kde se používají jako koření a účinné prostředky v lidovém léčitelství již po staletí. Mají nezastupitelné místo v ájurvedské přírodní medicíně. Do povědomí obyvatel v ostatních částech světa se *Ferula* dostala především díky worcestrové omáčce, jejíž součástí jsou extrakty z těchto rostlin<sup>1</sup>.

Rostliny rodu *Ferula* byly již od minulého století podrobeny řadě výzkumů týkajících se nejen ověření jejich pozitivních účinků na lidský organismus, ale také chemického složení. Těkavé látky, které se v nich nacházejí, obsahují většinou ve své struktuře síru. Mezi ně patří zejména disulfidy a polysulfidy způsobující charakteristický zápach těchto rostlin, jejich přítomnost byla potvrzena mnohými vědeckými výzkumy. Není však dosud znám původ těchto sirných sloučenin, není prokázáno, zda tyto látky vznikají enzymově katalyzovanou přeměnou netěkavých prekurzorů podobně, jako je tomu u česnekovitých rostlin rodu *Allium*, nebo zcela odlišným způsobem.

Rostliny rodu *Ferula* sice nepatří do stejné botanické čeledi jako česnek (*Allium sativum* L.) nebo cibule (*A. cepa* L.), kteří náleží do čeledi Alliaceae (česnekovité), avšak struktura těkavých sirných sloučenin přítomných v rostlinách obou rodů je velmi podobná, a proto byla vyslovena hypotéza, že by se v rostlinách rodu *Ferula* mohl vyskytovat prekurzor, který by byl analogií k prekurzoru těkavých sirných sloučenin rostlin rodu *Allium*.

## 2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

- Izolovat a identifikovat nejvýznamnější těkavé sirné látky z rostliny *Ferula foetida*.
- Zjistit, zdali těkavé sirné sloučeniny v rostlinách rodu *Ferula* vznikají analogickým způsobem jako sirné sloučeniny v rostlinách rodu *Allium*.

## 3. Literární přehled

### 3.1. Rostliny rodu *Ferula*

#### 3.1.1. Botanické zařazení a typické znaky

Rostliny rodu *Ferula* L. patří do čeledi Apiaceae Lindl. (miříkovité), která je také pojmenována starším označením Umbelliferae Juss. Tato čeleď patří do řádu Apiales (miříkotvaré), do třídy Rosopsida (vyšší dvouděložné) a do oddělení Magnoliophyta (krytosemenné rostliny).

Na obr. 1–3 jsou zobrazeny tři rostliny z rodu *Ferula*.



**Obr. 1:** Rostlina *F. communis*<sup>a</sup>.



**Obr. 2:** Rostlina *F. foetida*<sup>b</sup>.



**Obr. 3:** Rostlina *F. assafoetida*<sup>c</sup>.

---

<sup>a</sup><http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Ferula+communis>; staženo dne 26. 9. 2011.

<sup>b</sup>[http://www.antoranz.net/CURIOSA/ZBIOR5/C0511/20051111-QZD07069\\_Asafoetida.HTM](http://www.antoranz.net/CURIOSA/ZBIOR5/C0511/20051111-QZD07069_Asafoetida.HTM); staženo dne 25. 2. 2012.

<sup>c</sup><http://www.henriettesherbal.com/pictures/p06/pages/ferula-assa-foetida-1.htm>; staženo dne 25. 2. 2012.

Rostliny rodu *Ferula* jsou trvalé byliny dosahující výšky až dvou metrů<sup>2</sup>. Tyto jednodomé rostliny mají dužnaté oddenky, stonk je obnažený, silný až 10 cm. Listy jsou dvojzpeřené, radikální. Květy mají žlutou barvu, jsou drobné, vyrůstají ve velkých okolících a vyskytují se každých pět let. Plody jsou červenohnědé, vejčité se šupinkami<sup>3</sup>.

Asafoetidou se pak označuje gumová pryskyřice se silicemi, která se získává odříznutím z kořenů nebo stonků. V Íránu se asafoetidě přezdívá „anghouzeh“, „khorakoma“ a „anguzakoma“<sup>2</sup>. Rozlišují se dva druhy asafoetidy: asafoetida *hing* (zkráceně *hing*) a asafoetida *hingra* (zkráceně *hingra*). Dále existují dva typy *hing*: Irani-*hing* a Pathani-*hing*. Získávají se z *F. alliacea* a částečně z *F. assafoetida* a používají se v kulinářství. Na trhu se ovšem samotná *hing* neprodává, neboť sama o sobě má velmi silné aroma nevhodné k použití bez ředění. Nejčastějšími látkami k ředění jsou arabská guma a kukuřičná nebo pšeničná mouka. Samozřejmě se vyskytují také padělky, které jsou rozředěné křídou nebo datlovým extraktem. Tato varianta dostupná na tržnicích se nazývá *Bandhani hing*. Naopak *hingra* získávaná z *F. foetida* má své uplatnění v medicíně<sup>4</sup>.

Na obr. 4 je vyobrazen typický profil listu a květu rostlin rodu *Ferula*.



**Obr. 4:** Typický profil listu a květu rostlin rodu *Ferula*<sup>a</sup>.

Nejznámějším druhem z tohoto rodu je *F. assafoetida*. V České republice se této bylině přezdívá „ločidlo“, „čertovo lejno“ nebo „asa smrdutá“.

<sup>a</sup> [http://nationalfoods.tradeindia.com/Exporters\\_Suppliers/Exporter5674.729733/Ferula-Assa-Foetida.html](http://nationalfoods.tradeindia.com/Exporters_Suppliers/Exporter5674.729733/Ferula-Assa-Foetida.html); staženo dne 3.8.2011; upraveno.



### 3.1.2. Geografický výskyt

Rostliny rodu *Ferula* se vyskytují především v centrální Asii, severní Africe a jižní Evropě<sup>5</sup>, můžeme je najít na území okolo Středozemního moře<sup>6</sup>, v Íránu, Afghánistánu, Pákistánu a Indii<sup>7</sup>. Oblasti jejich výskytu jsou naznačeny na obr. 5.



**Obr. 5:** Oblasti výskytu rostlin rodu *Ferula*<sup>a</sup>.

Rod *Ferula* čítá podle posledních poznatků okolo 170 druhů rostlin<sup>8</sup>, nejvýznamnější druhy spolu se svým přirozeným výskytem jsou uvedeny v tab. I.

**Tab. I:** Přehled nejvýznamnějších druhů rostlin rodu *Ferula* a jejich výskyt.

Rostlina	Výskyt
<i>F. alliacea</i> Boiss.	Írán <sup>4</sup>
<i>F. assafoetida</i> L.	Írán, Kašmír, západní Afghánistán <sup>4</sup>
<i>F. persica</i> Willd.	Írán <sup>4</sup>
<i>F. communis</i> L.	severní Afrika <sup>4</sup>
<i>F. foetida</i> (Bunge) Regel	Írán, jižní Turecko, Afghánistán <sup>4</sup>
<i>F. narthex</i> Boiss.	Kašmír, západní Tibet <sup>4</sup>
<i>F. behboudiana</i>	Írán <sup>9</sup>
<i>F. kashanica</i> Rech.f.	Írán <sup>10</sup>

<sup>a</sup> [http://www.mapshop.com/Raised\\_Relief/Continents&Countries/eurasiaRR-over-f.htm](http://www.mapshop.com/Raised_Relief/Continents&Countries/eurasiaRR-over-f.htm), staženo dne 20. 3. 2012, upraveno.

### 3.1.3. Použití rostlin rodu *Ferula*

Díky výraznému aroma, které je podobné vůni cibule a česneku, jsou rostliny rodu *Ferula* používány jako koření pro dochucení pikantních jídel, především v indické, iránské ale i evropské kuchyni<sup>7</sup>. Již ve starověkém Římě byl tento druh koření velice populární<sup>1</sup> a extrakty z těchto rostlin byly používány i při výrobě parfémů<sup>7</sup>. K přímé konzumaci jsou určeny jen zelené části rostlin<sup>1</sup>.

Rostliny rodu *Ferula* (a to především *F. assafoetida*) mají významné postavení v lidovém léčitelství<sup>11</sup> - například v ájurvedské medicíně, což je systém léčby starý 500 let a je založený na bylinné terapii, józe, meditaci, aromaterapii a zvláštním systému výživy.

Tyto rostliny vykazují sedativní vlastnosti, působí proti nadýmání a křečím, dále tiší bolesti a usnadňují vykašlávání, v neposlední řadě byly používány jako afrodisiakum a léky upravující menstruační cyklus<sup>11</sup>. Pomáhají v léčbě astmatu, zánětu průdušek, podporují trávení, dokonce snižují krevní tlak<sup>1</sup>. Podle Kananiho a kol.<sup>8</sup> byly používány při léčení černého kašle a jako látky snižující hladinu cholesterolu a cukru v krvi.

Extrakty rostlin rodu *Ferula* jsou podávány dokonce i při epileptických záchvatech doprovázených křečemi<sup>2</sup>. V tradiční čínské medicíně se užívají ke zklidnění nervového a dýchacího systému<sup>7</sup>. Kořeny *F. persica* var. *persica* jsou používány při léčbě cukrovky<sup>12</sup>.

Na druhé straně vysoké denní dávky asafoetidy (doporučená denní dávka je 0,2–0,5 g) mohou způsobit bolesti hlavy, průjemy, nadýmání a závrat<sup>11</sup>.

### 3.1.4. Předchozí výzkum

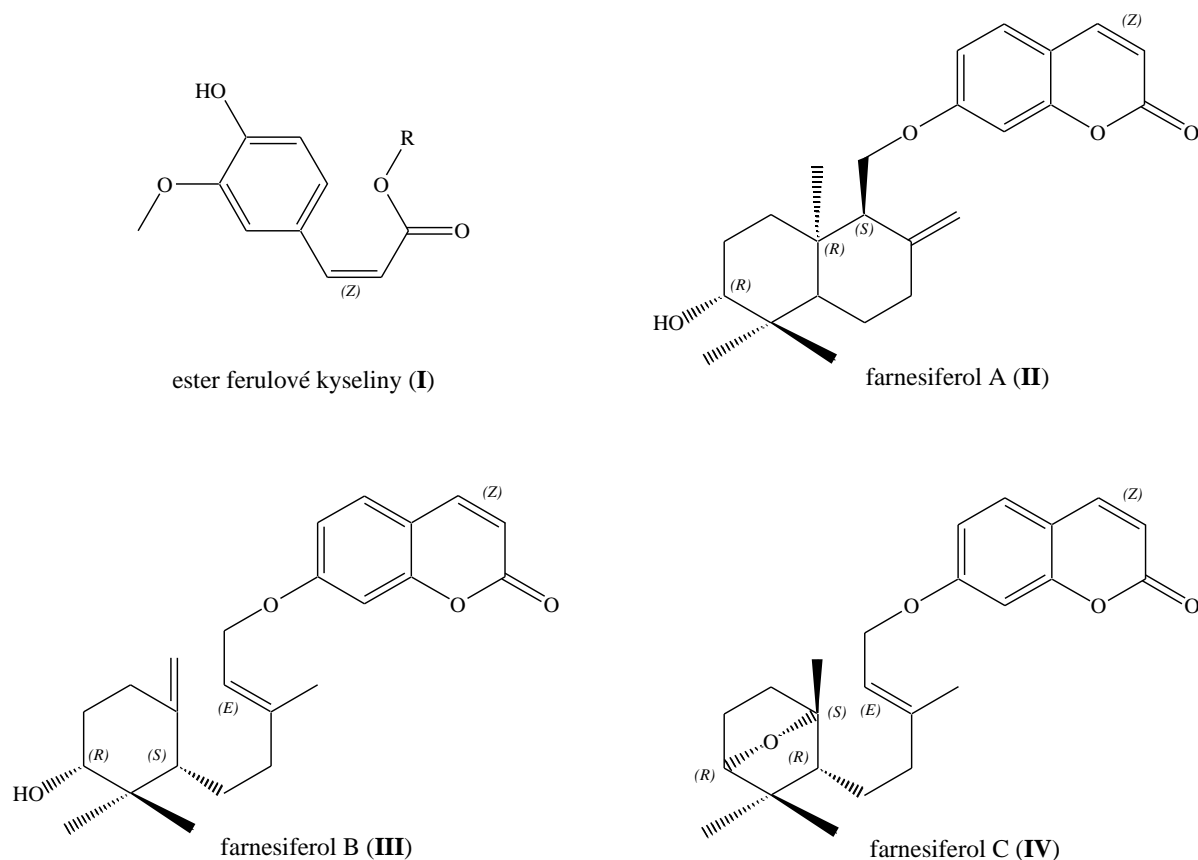
Rostliny rodu *Ferula* byly poprvé zkoumány vědeckým týmem vedeným Tsukervanikem – v roce 1935<sup>2</sup>. Od té doby byli zástupci rodu *Ferula* podrobeni výzkumu celé řady vědeckých týmů z různých částí světa např. Raghavanem a kol.<sup>4</sup>, Rajanikanthem a kol.<sup>13</sup>, Takeokou<sup>7</sup>, Khajehem a kol.<sup>14</sup>. Výzkum týkající se asafoetidy provedl také tým československých vědců<sup>15</sup>. Badatelé se zaměřili nejen na stanovení chemického složení, ale byl také prověřen pozitivní vliv na zdraví člověka a léčbu některých onemocnění, pozornost se obrátila i na antimikrobiální vlastnosti<sup>1</sup>. Bylo mimo jiné prokázáno, že látky obsažené v extraktech z rostlin rodu *Ferula* způsobují zpomalení růstu bakterií *Staphylococcus aureus* a *Shigella sonnei*<sup>11</sup>.

Asafoetida je účinná při odpuzování hmyzu<sup>1</sup>, některé její sirné sloučeniny vykazují pesticidní charakter<sup>11</sup>, jiné moluskocidní charakter (pomáhají při hubení měkkýšů v zemědělství)<sup>2</sup>.

### 3.2. Sirné sloučeniny rostlin rodu *Ferula*

Asafoetida se skládá ze tří složek: z pryskyřice (smoly), která tvoří 40–64 %, dále z gummy (25 %) a ze silic – etherických olejů (10–17 %). Sirné sloučeniny patří mezi nejdůležitější látky, které nalezneme v silicích, zatímco guma majoritně obsahuje látky, jako jsou např. estery ferulové kyseliny (**I**), farnesiferoly A (**II**), B (**III**) a C (**IV**)<sup>1,3</sup>.

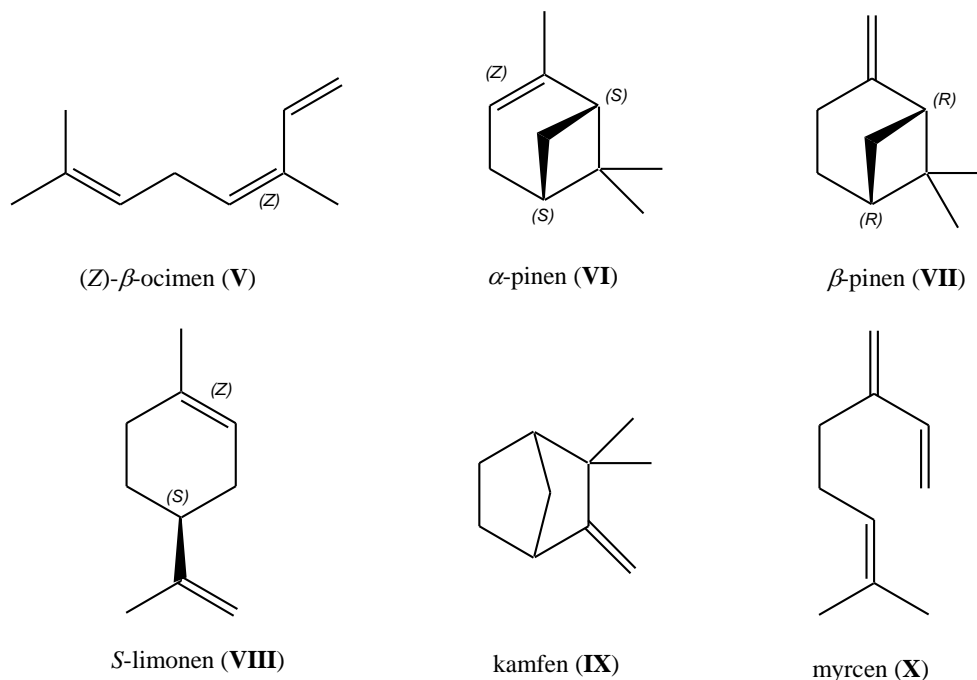
Na obr. 6 jsou zakresleny nejvýznamnější látky vyskytující se v gumě asafoetidy.



**Obr. 6:** Látky vyskytující se v gumě asafoetidy.

Sefidkon a kol.<sup>1</sup> mimo sirných sloučenin (viz dále) zjistili přítomnost terpenických uhlovodíků (*Z*)- $\beta$ -ocimenu (**V**), (*E*)- $\beta$ -ocimenu a  $\beta$ -pinenu. Výskyt terpenických uhlovodíků potvrdili také Akghar a kol.<sup>10</sup>, kteří identifikovali  $\alpha$ -pinen (**VI**),  $\beta$ -pinen (**VII**), limonen (**VIII**), kamfen (**IX**) a myrcen (**X**) v rostlinách *F. kashanica* a *F. diversivittata*.

Na obr. 7 jsou zakresleny nejvýznamnější terpenické uhlovodíky vyskytující se v rostlinách rodu *Ferula*.



**Obr. 7:** Nejvýznamnější terpenické uhlovodíky rostlin rodu *Ferula*.

Mezi nejvýznamnější sirné látky patří disulfidy a polysulfidy, které jsou nositeli typického zápachu.

Zhi-da a kol.<sup>16</sup> identifikovali jako hlavní sirné sloučeniny v druhu *F. sinkiangensis* (Z)-sek-butyl(1-propenyl)disulfid (XI) a v druhu *F. fukanensis* (E)-sek-butyl(1-propenyl)disulfid (XII). Tyto nejvýznamnější látky (jedná se o geometrické izomery), které se nachází i v ostatních druzích rostlin rodu *Ferula*, byly nalezeny též Sefidkonem a kol.<sup>1</sup> v rostlině *F. assafoetida*. Další dva vědecké týmy vedené Takeokou<sup>7</sup> a Noleauem<sup>5</sup> určily také předcházející geometrické izomery disulfidu v majoritním podílu u rostlin rodu *Ferula*. Dále identifikovaly (Z)-1-(methylthio)propyl[1-propenyl]disulfid (XIII), (E)-1-(methylthio)propyl[1-propenyl]disulfid a sek-butyl(3-methylthio-2-propenyl)disulfid (XIV).

Iransahi a kol.<sup>17</sup> popsali dvě nové látky v rostlině *F. persica* Willd. var. *latinsecta*: *terc*-butyl-[3-(1-methylpropyl)dithio-2-propenyl]malonát (persicasulfid A) a *terc*-butyl-[3-(1-methylthiopropyl)thio-2-propenyl]malonát, v jiné studii<sup>18</sup> tohoto autora byly zmíněny jako nejvýznamnější sloučeniny dimethyltrisulfid, myristicin, dimethyltetrasulfid, α-terpinyl-*n*-pentanoát, lavandulyl-2-methylbutanoát, α-terpinyl-isovalerát a α-barbaten. Mirjani a

kol.<sup>12</sup> také poukázali u druhu *F. persica* var. *persica* Willd. na persicasulfid A a persicasulfid B, nicméně struktura obou chybně identifikovaných sloučenin byla nakonec opravena Iranshahim a kol.<sup>6</sup> na 3-(*sek*-butylidisulfanyl)allylester kyseliny 3-acetoxy-3-methylbutanové (persicasulfid A – **XV**) a 3-(1-methylsulfanylpropylsulfanyl)allylester kyseliny 3-acetoxy-3-methylbutanové (persicasulfid B – **XVI**). Identifikovali mimo ně i novou sloučeninu vyskytující se v kořenech rostliny *F. persica* – persicasulfid C.

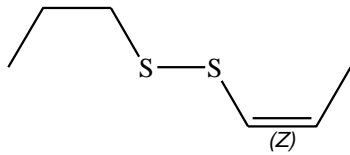
Yousefi a kol.<sup>9</sup> identifikovali u druhu *F. behboudiana* celou řadu nových polysulfidů: (*E*)-*sek*-butyl(3-methylthio-1-propenyl)disulfid (**XVII**), (*Z*)-*sek*-butyl(3-methylthio-1-propenyl)disulfid, (*E*)-3-methylthio-1-propenyl[1-(methylthio)propyl]disulfid (**XVIII**) a (*Z*)-3-methylthio-1-propenyl[1-(methylthio)propyl]disulfid.

Kajimoto a kol.<sup>19</sup> popsali asadisulfid (**XIX**), asakumarin A a asakumarin B. Kanani a kol.<sup>8</sup> zmínili následující sírné sloučeniny a terpenické uhlovodíky vyskytující se v několika druzích rodu *Ferula* (*F. foetida*, *F. behboudiana*, *F. diversivittata* atd.):  $\alpha$ -terpinyl-acetát, 2,3,4-trimethylthiofen (**XX**), sabinen, verbenon,  $\beta$ -pinen, (*Z*)- $\beta$ -ocimen, (*Z*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid a (*E*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid.

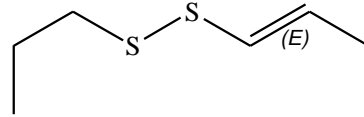
Rajanikanth a kol.<sup>13</sup> identifikovali jako nejvýznamnější látky také (*E*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid, (*Z*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid, 1-(methylthio)propyl[1-propenyl]disulfid a *sek*-butyl[3-(methylthio)allyl]disulfid. Banerji a kol.<sup>20</sup> zmínili assafoetidín a ferokolicín v rostlině *F. assafoetida*, zatímco Duan a kol.<sup>21</sup> poprvé popsali foetisulfidy A–D a foetithiofeny A a B v *F. foetida*.

Mimo pouhé identifikace sírných sloučenin byla také zkoumána absolutní konfigurace v alkylových zbytcích výše uvedených disulfidů. Na chirálním uhlíkovém atomu v *sek*-butylové skupině ve sloučenině (*E,Z*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid je absolutní konfigurace *R*, která byla potvrzena výzkumem Kjaera a kol.<sup>22</sup>

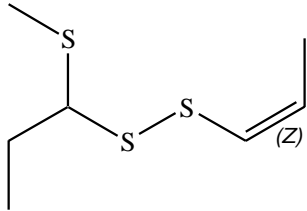
Na obr. 8 jsou zobrazeny nejvýznamnější těžké sírné sloučeniny rostlin rodu *Ferula*.



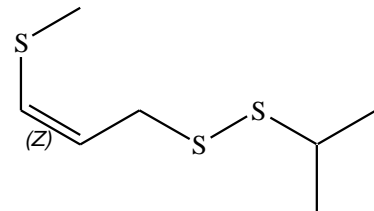
(*Z*)-sek-butyl(1-propenyl)disulfid (**XI**)



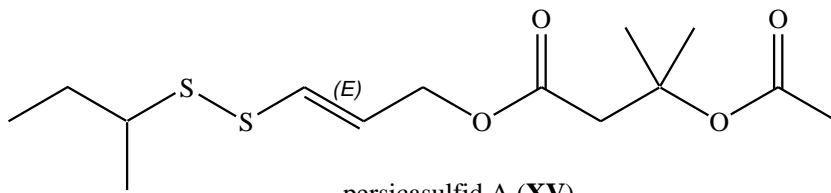
(*E*)-sek-butyl(1-propenyl)disulfid (**XII**)



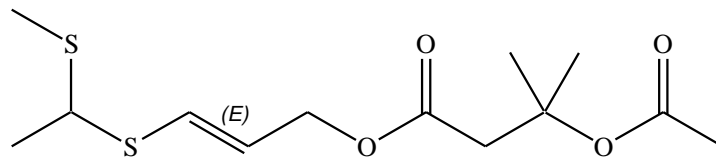
(*Z*)-1-(methylthio)propyl[1-propenyl]disulfid (**XIII**)



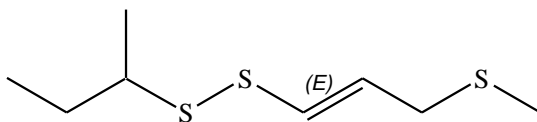
(*Z*)-sek-butyl(3-methylthio-2-propenyl)disulfid (**XIV**)



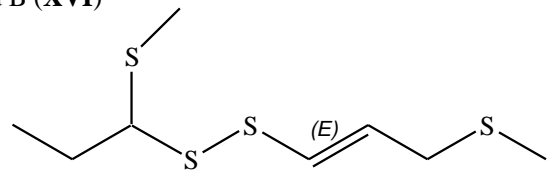
persicasulfid A (**XV**)



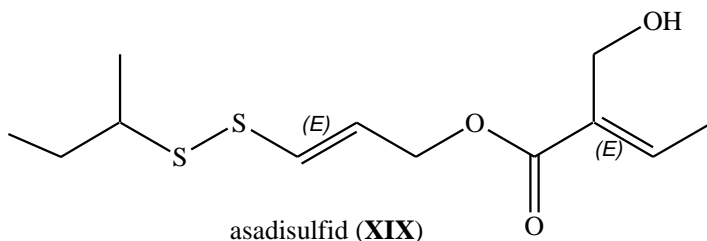
persicasulfid B (**XVI**)



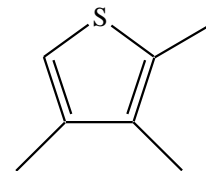
(*E*)-sek-butyl(3-methylthio-1-propenyl)disulfid (**XVII**)



(*E*)-3-methylthio-1-propenyl  
[1-(methylthio)propyl]disulfid (**XVIII**)



asadisulfid (**XIX**)



2,3,4-trimethylthiofen (**XX**)

**Obr. 8:** Nejvýznamnější těkavé sirné sloučeniny rostlin rodu *Ferula*.

### 3.3. Tvorba sirných sloučenin v rostlinách rodu *Allium*

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.), cibule kuchyňská (*A. cepa* L.), pór (*A. porrum* L.) nebo pažitka (*A. schoenoprasum* L.) patří mezi nejznámější představitele rostlinného rodu *Allium* L. (česnekovité). Tyto česnekovité rostliny byly používány již staletí před naším letopočtem, neboť byly známy jejich příznivé účinky na lidské zdraví a dodnes mají nezastupitelné postavení v přírodní medicíně po celém světě. Rostliny se vyznačují charakteristickým aroma, které je tvořeno sirnými sloučeninami vznikajícími během narušení pletiva<sup>23</sup>.

Na obr. 9 jsou zobrazeni dva nejznámější představitelé botanického rodu *Allium* – česnek kuchyňský a cibule kuchyňská.

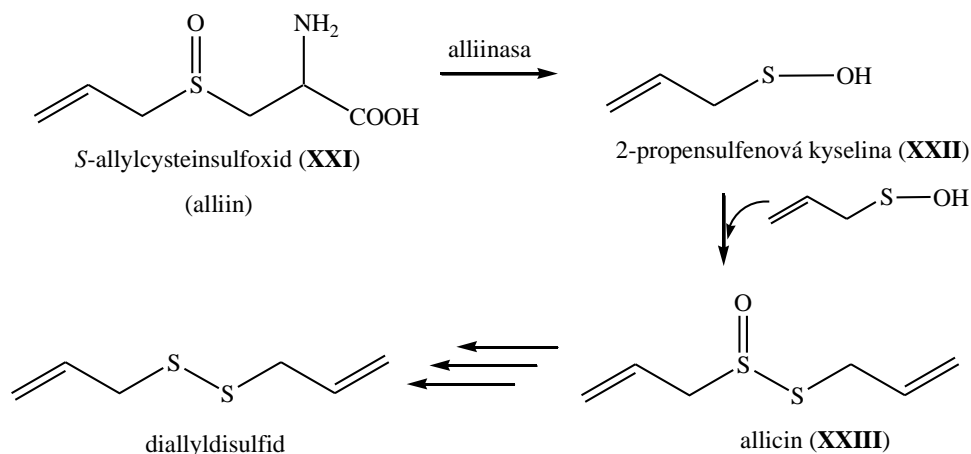


**Obr. 9:** Česnek kuchyňský a cibule kuchyňská<sup>a</sup>.

Prekurzorem těkavých sirných látek v česneku je aminokyselina alliin – *S*-allylcysteinsulfoxid (**XXI**). Působením enzymu alliinasy (C-S lyasy) dochází k přeměně alliiinu přes vysoce nestabilní 2-propensulfenovou kyselinu (**XXII**) na allicin (**XXIII**)<sup>24</sup>. Alliinasa se začne uvolňovat teprve po mechanickém porušení buněk, neboť alliin i alliinasa se nacházejí v odlišných buněčných organelách, alliin v cytoplazmě, alliinasa ve vakuole<sup>25</sup>. Allicin představuje majoritní látku, která vzniká při této enzymatické reakci v česneku, byly u něj prokázány antimikrobiální, antitrombotické a protirakovinné vlastnosti, jež se připisují jeho schopnosti modifikovat –SH skupiny<sup>26</sup>. Degradací allicinu vznikají polysulfidy, především diallyldisulfidy, diallylsulfidy, diallyltetrasulfidy, dále pak i vinyldithiiny a ajoeny<sup>24</sup>. Základní schéma přeměny sirných sloučenin v rostlinách rodu *Allium* je zakresleno na obr. 10.

---

<sup>a</sup> Fotografie autorky.

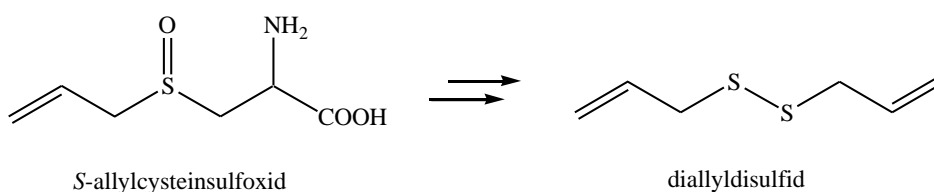


**Obr. 10:** Schéma přeměny sírných látek v česneku.

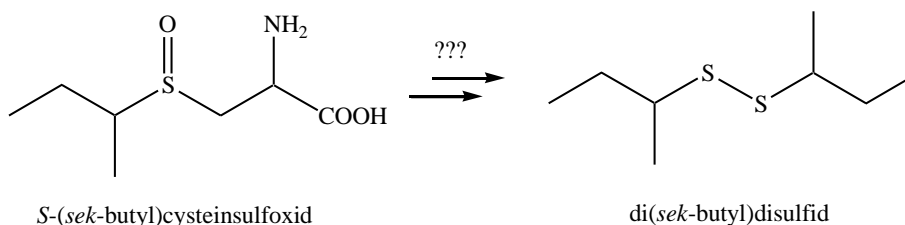
### 3.4. *S*-(*sek*-Butyl)cysteinsulfoxid - prekurzor těkavých sírných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula*?

Vzhledem k přítomnosti podobných těkavých sírných sloučenin v rostlinách rodu *Allium* a rostlinách rodu *Ferula* byla vyslovena hypotéza, že může docházet k analogickým přeměnám těchto látek u obou botanických rodů. Na základě toho byl navržen možný prekurzor těkavých sírných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula* jako *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxid. Schéma navržené analogie přeměn je znázorněno na obr. 11.

*Allium:*



*Ferula:*



**Obr. 11:** Navržená analogie přeměny sírných látek v rostlinách rodu *Allium* a *Ferula*.



## 4. Experimentální část

V experimentální části této práce byla použita rostlina *Ferula foetida* (Bunge) Regel, jejíž kořeny byly získány od Prof. Dr. Olimjona K. Kodzhimatova (Institute of Botany, Taškent, Uzbekistán) v roce 2005 a pocházejí z oblasti Farish v Uzbekistánu. Kořeny (obr. 12) byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě -28°C.



Obr. 12: Kořeny analyzované rostliny *F. foetida* (Bunge) Regel<sup>a</sup>.

### 4.1. Použité přístroje a chemikálie

#### 4.1.1. Chemikálie

Pro izolaci a identifikaci nejvýznamnějších sirných látek byly použity diethylether a acetylchlorid od firmy PENTA (Chrudim, ČR), síran hořečnatý a dichlormethan firmy LACHNER (Neratovice, ČR), pyridin a ethylester kyseliny chlormravenčí od firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko), jodid sodný a chlorid cínatý firmy LACHEMA (Brno, ČR), ethanol denat. firmy LIHO (Blanice, ČR), destilovaná voda.

Pro syntézu *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu a jeho oxidaci byly použity hydroxid sodný, kyselina mravenčí (98%) a aktivní uhlí Silcarbon od firmy LACHNER (Neratovice, ČR), ethanol denat. firmy LIHO (Blanice, ČR), L-cystein od firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko), 2-brombutan firmy ALDRICH (Steinheim, Německo), peroxid vodíku (30%) od firmy LACHEMA (Neratovice, ČR), oxid manganičitý a kyselina chlorovodíková (35%) firmy PENTA (Chrudim, ČR), destilovaná voda.

---

<sup>a</sup> Fotografie autorky.

Pro izolaci a identifikaci aminokyseliny jako potenciálního prekursoru byly použity methanol (100%) od firmy J. T. Baker (Deventer, Nizozemí), kyselina chlorovodíková (35%), amoniak (25%), aceton (min. 99,5%) a *n*-butanol firmy PENTA (Chrudim, ČR), hydroxid draselný a ninhydrin od firmy LACHEMA (Neratovice, ČR), katex Amberlite IR-120 firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko) se zrněním 16–50 mesh aktivovaný HCl (10%), destilovaná voda.

Při HPLC analýzách byl použit acetonitril firmy J. T. Baker (Deventer, Nizozemí) a pro přípravu pufru dihydrogenfosforečnan draselný od firmy LACHEMA (Neratovice, ČR).

#### **4.1.2. Přístroje a laboratorní pomůcky**

V experimentální části bakalářské práce byly kromě běžných laboratorních zařízení a pomůcek použity následující přístroje:

- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem (GC/MS)

Při GC/MS analýzách byl používán plynový chromatograf Varian 3800 (Varian, Palo Alto, USA), hmotnostní detektor Varian 4000 MS (Varian, Palo Alto, USA) a kapilární kolona HP-5MS (30 m × 0,25 mm) s tloušťkou filmu 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Byla použita jak ionizace elektronovým nárazem (EI, 70 eV), tak i chemická ionizace (CI).

Pro identifikaci těkavých sirných látek byl použit následující teplotní program: nástřiková teplota byla 220°C, teplota detektoru 250°C, nosným plynem bylo helium o průtoku 1,3 ml/min. Počáteční teplota byla 40°C, která po třech minutách začala stoupat až na 240°C tak, že se každou minutu zvýšila o 4°C.

Pro ověření přítomnosti potenciálního prekursoru byl použit tento teplotní program: nástřiková teplota byla 180°C, teplota detektoru 250°C, nosným plynem bylo helium o průtoku 1,3 ml/min. Počáteční teplota byla 130°C, která po třech minutách začala stoupat až na 220°C tak, že se každou minutu zvýšila o 2°C.

- Kapalinový chromatograf s detektorem diodového pole (HPLC/DAD)

Při kapalinové chromatografii byl použit binární systém vysokotlakých pump Dynamax SD-210 (Varian, Palo Alto, USA), PDA detektor Varian ProStar 210 (Varian, Palo Alto, USA), analytická kolona Varian Microsorb – MV 100-5 C-18 (250 mm × 4,6 mm,

5 µm). Nastříkovaný objem vzorku byl 20 µl. Průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Měření probíhalo při vlnové délce 220 nm. V tab. II je uveden poměr složek mobilní fáze HPLC v jednotlivých časových intervalech.

**Tab. II:** Mobilní fáze HPLC.

Složení mobilní fáze: **A** – dihydrogenfosforečnan draselný (50 mM; pH = 3,0)

**B** – acetonitril

Mobilní fáze	Čas (min)				
	0	5	10	15	25
Zastoupení <b>A</b> (%)	97	97	40	40	97
Zastoupení <b>B</b> (%)	3	3	60	60	3

- Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem (HPLC/MS)

Tyto analýzy byly prováděny ve spolupráci s pracovníky Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR (Ing. Pavla Kružberská).

Byl použit kapalinový chromatograf Accela 600, automatický dávkovač vzorku Thermo Accela, hmotnostní spektrometr Thermo LTQ XL a UV detektor UV 1000 Spectra System (Thermo Finnigan).

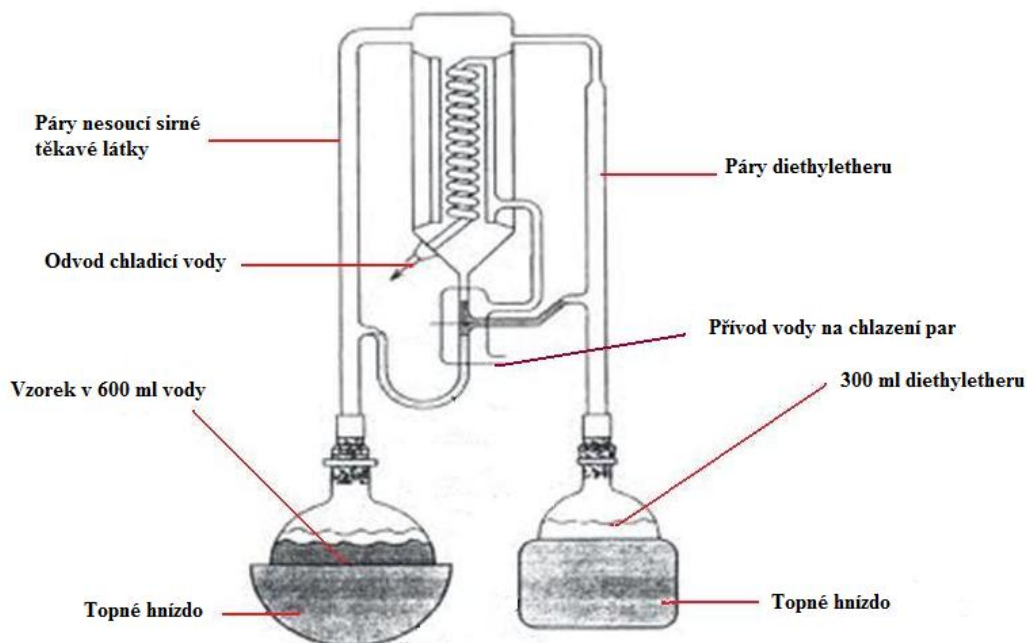
## 4.2. Metody a postupy

### 4.2.1. Izolace a identifikace nejvýznamnějších těkavých sirných látek

#### 4.2.1.1. Použití Likens-Nickersonovy aparatury

Na laboratorních vahách bylo naváženo 53,6 g kořenů rostliny *F. foetida*, přidala se destilovaná voda (400 ml) a kořeny se rozmixovaly. Poté se sestavila Likens-Nickersonova aparatura (schéma je zobrazeno na obr. 13). Levá baňka (1000 ml) v této aparatuře byla naplněna destilovanou vodou a homogenizovanými kořeny o celkovém objemu 600 ml. Do pravé baňky (500 ml) bylo dáno 300 ml diethyletheru a obě varné baňky se zahřívaly v topných hnízdech dvě hodiny. Těkavé látky z rostliny za tuto dobu přešly do etherové fáze. Objem pravé baňky byl nalit do dělicí nálevky, pomocí níž byla oddělena etherová a vodná

fáze. Zbytky vody v požadované etherové fázi byly ještě vysušeny bezvodým  $\text{MgSO}_4$ . Poté byla etherová fáze odpařena na rotační vakuové odparce při teplotě  $25^\circ\text{C}$ . Během této operace pravděpodobně došlo také k odpaření některých vysoce těkavých sirných látek.



Obr. 13: Použitá Likens-Nickersonova aparatura<sup>a</sup>.

#### 4.2.1.2. Použití přímé extrakce

Na laboratorních vahách bylo naváženo 53,2 g kořenů rostliny *F. foetida* a poté byly kořeny rozmixovány v 500 ml diethyletheru. Směs byla nalita do varné baňky, na níž se nasadil zpětný chladič, a zahřívala se po dobu jedné hodiny. Extrakt byl přesušen pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$  a zakoncentrován na rotační vakuové odparce při teplotě  $25^\circ\text{C}$ . I při této operaci zřejmě došlo k odpaření některých vysoce těkavých sirných sloučenin.

#### 4.2.1.3. Určení identity izolovaných těkavých sirných látek

Sirné těkavé látky byly identifikovány pomocí GC/MS v obou extraktech rostliny získaných jak použitím Likens-Nickersonovy aparatury, tak použitím přímé extrakce.

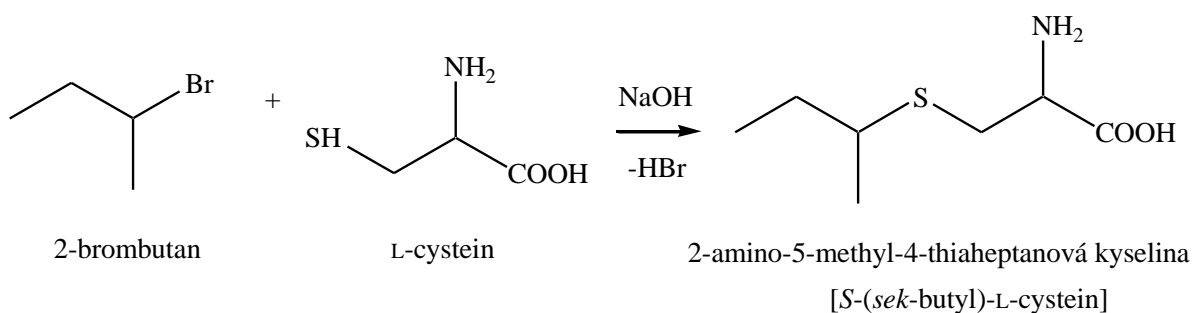
<sup>a</sup> [http://www.neubert-glas.de/laborglas/onlineshop/katalog\\_php/1\\_995727484085\\_1030342896125\\_997508385770/1249034082339/Likens-Nickerson-Apparatur.html](http://www.neubert-glas.de/laborglas/onlineshop/katalog_php/1_995727484085_1030342896125_997508385770/1249034082339/Likens-Nickerson-Apparatur.html); staženo dne 20. 10. 2011; upraveno.

## 4.2.2. Ověření přítomnosti potenciálního prekursoru těkavých sírných látek

### 4.2.2.1. Příprava *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu

24,2 g L-cysteinu (0,24 mol) bylo rozpuštěno v 300 ml 1,5 M vodného roztoku NaOH. Po rozpuštění vzniklých krystalků bylo přimícháno 400 ml ethanolu a za stálého míchání se postupně přidalo 34 ml 2-brombutanu. Směs byla v baňce míchána při laboratorní teplotě do druhého dne, pak byla okyselena koncentrovanou kyselinou mravenčí na pH= 6,0. Poté se směs nechala odpařit na rotační vakuové odparce (při 40°C) do sucha. Vzniklý produkt byl rekrystalizován ze směsi aceton/H<sub>2</sub>O (50/50; v/v) za vzniku bílých krystalů (výtěžek 56%).

Na obr. 14 je uvedena rovnice syntézy *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu (2-amino-5-methyl-4-thiaheptanové kyseliny).

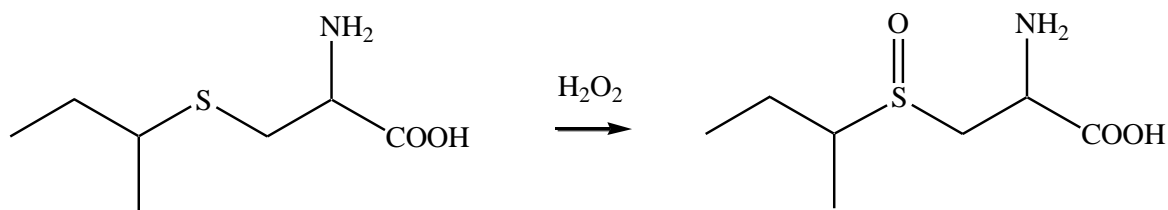


Obr. 14: Syntéza *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu.

### 4.2.2.2. Oxidace *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu

Ve 20 ml destilované vody s 0,1 ml HCl bylo rozpuštěno 0,1 g připraveného *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu (0,56 mmol). Po kapkách bylo přidáváno 0,69 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,67 mmol) a směs se v baňce ponechala míchat při laboratorní teplotě do dalšího dne. Druhý den se přidalo malé množství MnO<sub>2</sub> k odstranění přebytku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Poté bylo přidáno aktivní uhlí, směs byla zfiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce při teplotě 40°C. Předpokladem bylo, že získaná sloučenina *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinsulfoxid by mohla být prekurzorem těkavých sírných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula* a při ověření této hypotézy byla použita jako standard.

Na obr. 15 je uvedena rovnice oxidace *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu.



2-amino-5-methyl-4-thiaheptanová kyselina  
[*S*-(*sek*-butyl)-L-cystein]

*S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinsulfoxid

**Obr. 15:** Oxidace *S*-(*sek*-butyl)-L-cysteinu.

#### 4.2.2.3. Izolace aminokyselin z *Ferula foetida*

Na laboratorních vahách bylo naváženo 37,7 g kořenů rostliny *F. foetida*, poté bylo ke kořenům přidáno 600 ml směsi methanolu/H<sub>2</sub>O/HCl (90/9/1; v/v/v) a ponechalo se několik minut vyluhovat. Potom byla směs rozmixována, převedena do varné baňky (1 litr) a vařena pod zpětným chladičem 15 minut. Po ochlazení následovala filtrace na Büchnerově nálevce. Filtrační koláč byl znovu přeextrahován 400 ml směsi methanol/H<sub>2</sub>O/HCl (90/9/1; v/v/v), zahříván v topném hnízdě 15 minut a přefiltrován za sníženého tlaku. Oba filtráty byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce při 40°C. Ve zbytku po odpaření bylo upraveno pH na hodnotu 2,5 pomocí KOH a pak byl roztok odstředěn na centrifuze (12000 ot./min, 12 min). Odstředěním se odstranily přítomné nerozpustné látky. Centrifugace byla provedena celkem dvakrát.

Aminokyseliny byly z extraktu izolovány pomocí katexu (kolona o rozměrech 15 cm × 2 cm). Kolona se nejdříve promyla malými objemy destilované vody a poté byl přidán získaný extrakt z kořenů rostliny (70 ml). V tomto okamžiku se zachytily aminokyseliny na katexu. Katex s navázanými aminokyselinami se ještě promyl 100 ml destilované vody pro odstranění interferujících látek ve vzorku. Kolona byla dále promyta 1 M roztokem amoniaku (200 ml), přičemž se uvolnily navázané aminokyseliny. Celkem byly jímány tři frakce, které byly následně použity jako vzorek pro GC/MS analýzu a HPLC/MS analýzu: 1. frakce se získala po ihned po uvolnění aminokyselin z katexu, přičemž nebyla použita destilovaná voda na promytí. 2. a 3. frakce se získaly po uvolnění aminokyselin z katexu, přičemž byla použita destilovaná voda na promytí.

#### 4.2.2.4. Důkaz přítomnosti aminokyselin

Důkaz přítomnosti aminokyselin v najímaném extraktu po katexu byl proveden chromatografií na tenké vrstvě (TLC), mobilní fází byla směs *n*-butanol/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (4/1/1; v/v/v). Vzorky byly nanášeny na tenkou vrstvu a nechaly se vyvinout v mobilní fázi. Přítomnost aminokyselin byla dokázána roztokem ninhydrinu v acetonu (0,2%). Došlo ke změně zbarvení nanášených vzorků.

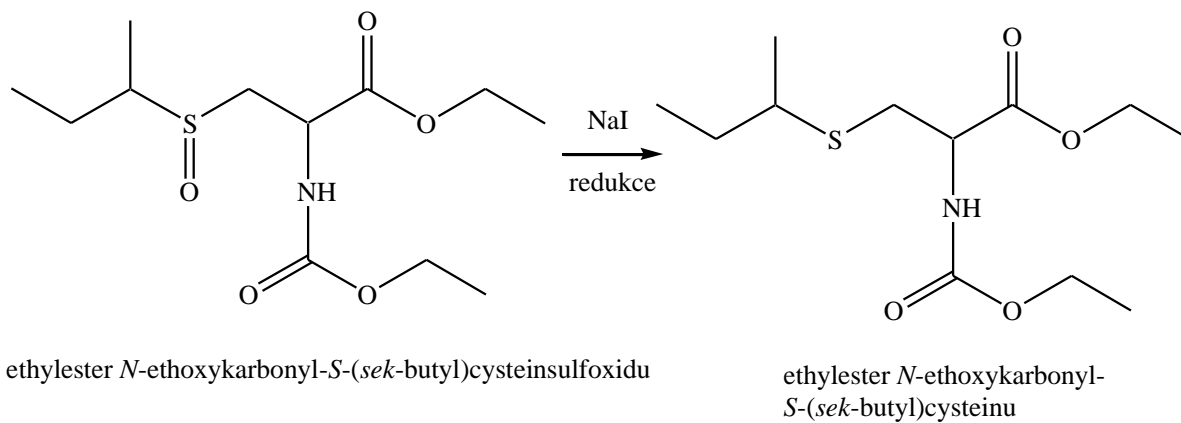
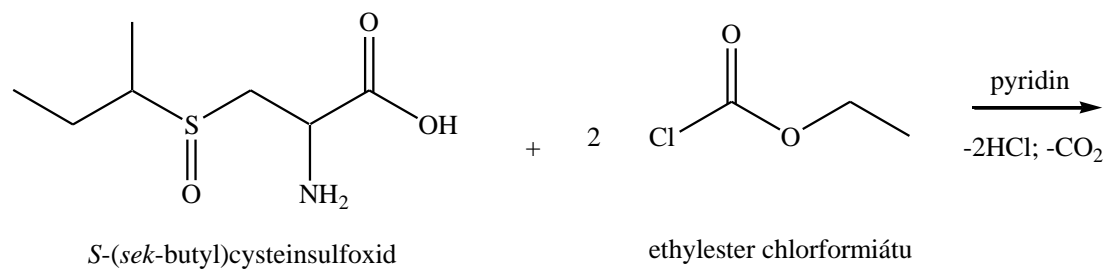
#### 4.2.2.5. Ověření identity prekurzoru těkavých sirných látek

Ověření identity prekurzoru těkavých sirných sloučenin bylo prováděno pomocí analýzy HPLC/MS a také GC/MS analýzou. Standardem byl syntetizovaný *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxid a vzorkem byl extrakt aminokyselin z rostliny. U plynové chromatografie musela být ještě před samotným chromatografickým dělením provedena derivatizace vzorku, neboť přítomnost volných funkčních skupin -NH<sub>2</sub> a -COOH, jejichž schopnost tvořit vodíkové můstky zvyšuje teplotu varu, je při stanovení těkavých látek pomocí GC/MS nežádoucí.

#### Derivatizace aminokyselin pro jejich stanovení pomocí GC/MS

Vzorek byl přelit do větší zkumavky, dále bylo přidáno 400 µl směsi ethanolu, vody, pyridinu a poté 200 µl ethylesteru kyseliny chlormravenčí (ethylesteru chlorformiátu). Po vyšumění vznikajícího oxidu uhličitého byl přidán roztok NaI (1 g v 1 ml vody) a dvě kapky acetylchloridu. Směs se ponechala 24 hodin v klidu a pak se přidal chlorid cínatý do odbarvení vzniklého jódu a 0,4 ml dichlormethanu. Dichlormethanová fáze byla poté analyzována pomocí GC/MS.

Na obr. 16 je rovnicí znázorněna derivatizace *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu pro stanovení pomocí GC/MS.



**Obr. 16:** Derivatizace *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu.

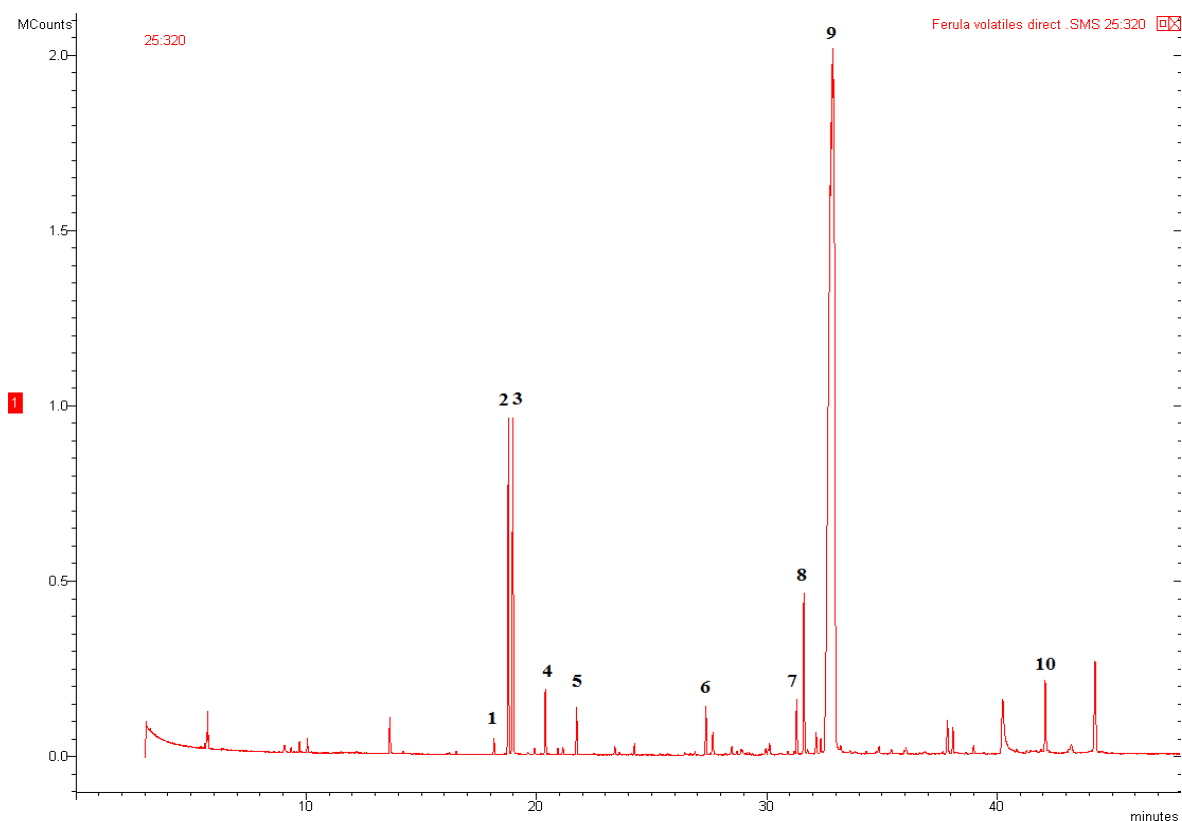


## 5. Výsledky

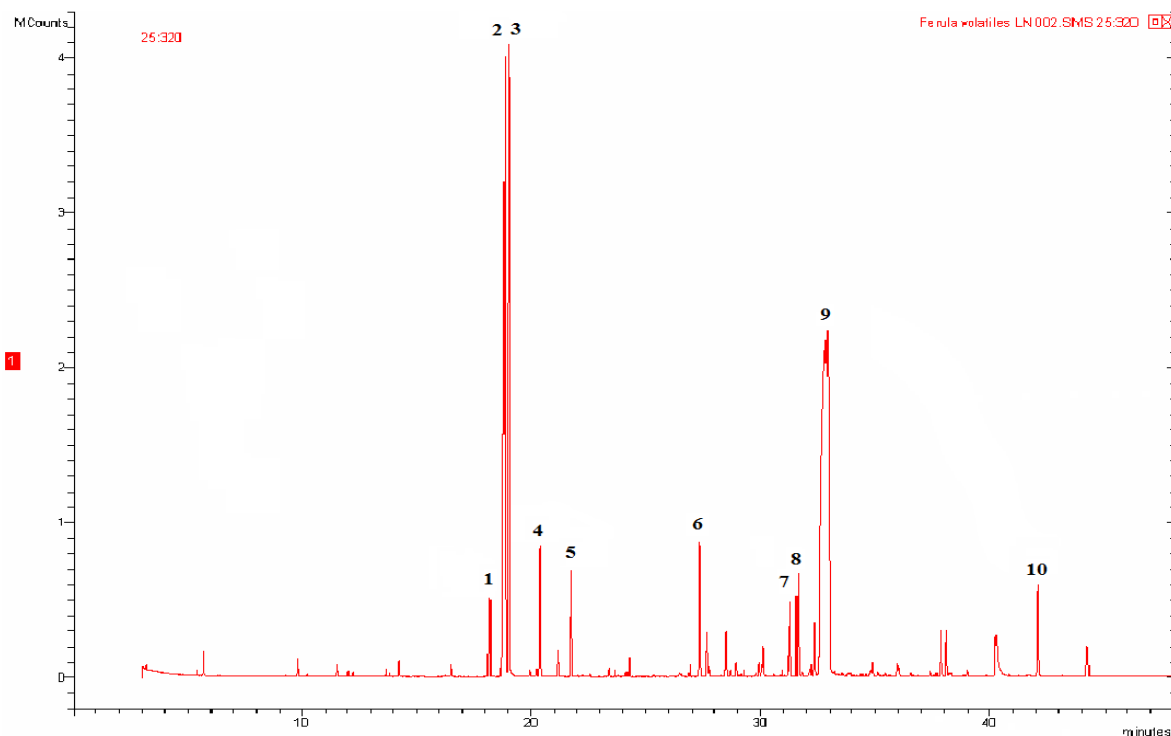
### 5.1. Přítomnost nejvýznamnějších těkavých sirných látek v rostlině *Ferula foetida*

V první fázi tohoto projektu byly izolovány těkavé sirné látky ze zkoumané rostliny. Cílem daného kroku bylo prokázat přítomnost těkavých sirných sloučenin v konkrétním analyzovaném vzorku, ve kterém byl následně sledován i jejich potenciální prekurzor. Tyto sloučeniny byly získány dvěma různými extrakčními technikami, avšak některé velmi těkavé sirné sloučeniny nemohly být identifikovány vzhledem k tomu, že pravděpodobně došlo k jejich ztrátě během izolace z kořenů rostliny. Nicméně ostatní méně těkavé látky byly podrobeny analýze GC/MS.

Při plynové chromatografii nejdříve došlo k vlastnímu rozdělení jednotlivých sloučenin ze vzorku. Dvěma extrakčním technikám tak odpovídají dva chromatogramy, které jsou zobrazeny na obr. 17 a obr. 18.



**Obr. 17:** Chromatogram těkavých sirných látek získaných metodou přímé extrakce.



**Obr. 18:** Chromatogram těkavých sirných látek získaných použitím Likens-Nickersonovy aparatury.

Jednotlivá čísla (1-10) označují nejvýznamnější těkavé sirné látky, které byly vybrány k následné identifikaci užitím hmotnostní spektrometrie. Z chromatogramů je patrné, že majoritními sloučeninami v rostlině *F. foetida* jsou sirné látky označené čísly 2, 3 a 9. Obě metody extrakce poskytly prakticky ty samé sirné sloučeniny, které byly v největším zastoupení ve vzorku. Hmotnostní detekce byla prováděna ionizací elektronovým nárazem (EI, 70 eV), na základě této detekce byla stanovena molekulová hmotnost, hmotnostní spektrum a byla přiřazena pravděpodobná sirná sloučenina příp. sumární vzorec k jednotlivým píkům v chromatogramech. Výsledky jsou zaznamenány v tab. III.

**Tab. III:** Molekulová hmotnost, hmotnostní spektrum a pravděpodobná sirná sloučenina příp. sumární vzorec sirných sloučenin ve vzorku rostliny *Ferula*.

Sloučenina	Molekulová hmotnost	Hmotnostní spektrum (m/z, %)	Pravděpodobná sirná sloučenina příp. sumární vzorec
1	162	164 (5, M <sup>+</sup> +2), 162 (44, M <sup>+</sup> ), 106 (92), 73 (26), 57 (36), 41 (70), 39 (30)	isobutyl (1-propenyl)disulfid
2	162	164 (9, M <sup>+</sup> +2), 162 (100, M <sup>+</sup> ), 106 (59), 72 (18), 57 (20), 41 (32)	<i>sek</i> -butyl (1-propenyl)disulfid
3	162	164 (10, M <sup>+</sup> +2), 162 (100, M <sup>+</sup> ), 106 (85), 78 (15), 72 (22), 59 (22), 41 (38)	<i>sek</i> -butyl (1-propenyl)disulfid
4	178	180 (6, M <sup>+</sup> +2), 178 (56, M <sup>+</sup> ), 122 (33), 89 (8), 57 (97), 41 (42)	di( <i>sek</i> -butyl)disulfid
5	176	178 (5, M <sup>+</sup> +2), 176 (50, M <sup>+</sup> ) 120 (42), 59 (26), 55 (98), 41 (21)	1(popř. 2)-butenyl ( <i>sek</i> -butyl)disulfid
6	209	211 (0,033, M <sup>+</sup> +2), 209 (0,145, M <sup>+</sup> ), 161 (28), 147 (20), 133 (68), 112 (22), 119 (38), 105 (64), 93 (75), 91 (100), 69 (40), 41 (42)	nelze identifikovat
7	220	222 (0,7, M <sup>+</sup> +2), 220 (14, M <sup>+</sup> ), 103 (100), 104 (44), 105 (15), 57 (12), 43 (29), 41 (15)	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
8	220	222 (1,5, M <sup>+</sup> +2), 220 (15, M <sup>+</sup> ), 105 (22), 104 (44), 103 (100), 57 (20), 43 (46), 41 (22)	struktura obsahující zřejmě butenylsulfanyl (mol.hmotnost 119)
9	207	209 (0,02, M <sup>+</sup> +2), 207 (0,02, M <sup>+</sup> ), 103 (3,4), 87 (100), 45 (10,5), 85 (6,5)	nelze identifikovat
10	278	280 (0,01, M <sup>+</sup> +2), 278 (0,7, M <sup>+</sup> ), 223 (5), 205 (4), 149 (100), 150 (9), 104 (4,5), 76 (4), 41 (4)	asadisulfid

Do údajů o hmotnostních spektrech byly zapsány izotopické píky síry, které odpovídají procentuálnímu výskytu jejich izotopů. Údaj M<sup>+</sup>+2 odpovídá zastoupení izotopu síry <sup>34</sup>S, zatímco údaj M<sup>+</sup> odpovídá zastoupení izotopu síry <sup>32</sup>S. Z poměru intenzit těchto

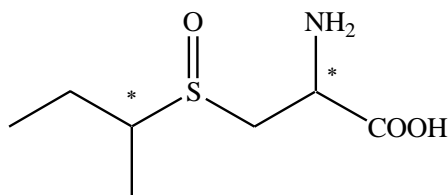
dvou iontů  $M^+ + 2/M^+$  lze odhadnout i pravděpodobný počet atomů síry v dané sloučenině (přirozený výskyt izotopu  $^{34}\text{S}$  je přibližně 4,6 %).

V tab. III bylo provedeno přiřazení těkavých sirných sloučenin k molekulovým hmotnostem a fragmentacím na základě výsledků identifikací sirných sloučenin publikovaných ve vědeckých člancích jiných autorů<sup>13,16,19,21</sup>. Jelikož knihovna spekter NIST (součást používaného GC/MS systému) neobsahovala hmotnostní spektra těchto nalezených látek, muselo být přiřazení spekter k jednotlivým sloučeninám provedeno pouze na základě porovnání s hmotnostními spektry v uvedených vědeckých člancích.

Jak je z tab. III zřejmé, většina těkavých sirných sloučenin obsahovala ve své struktuře *sek*-butylovou skupinu, což vedlo k hypotéze o potenciálním prekurzoru sirných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula* – *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu.

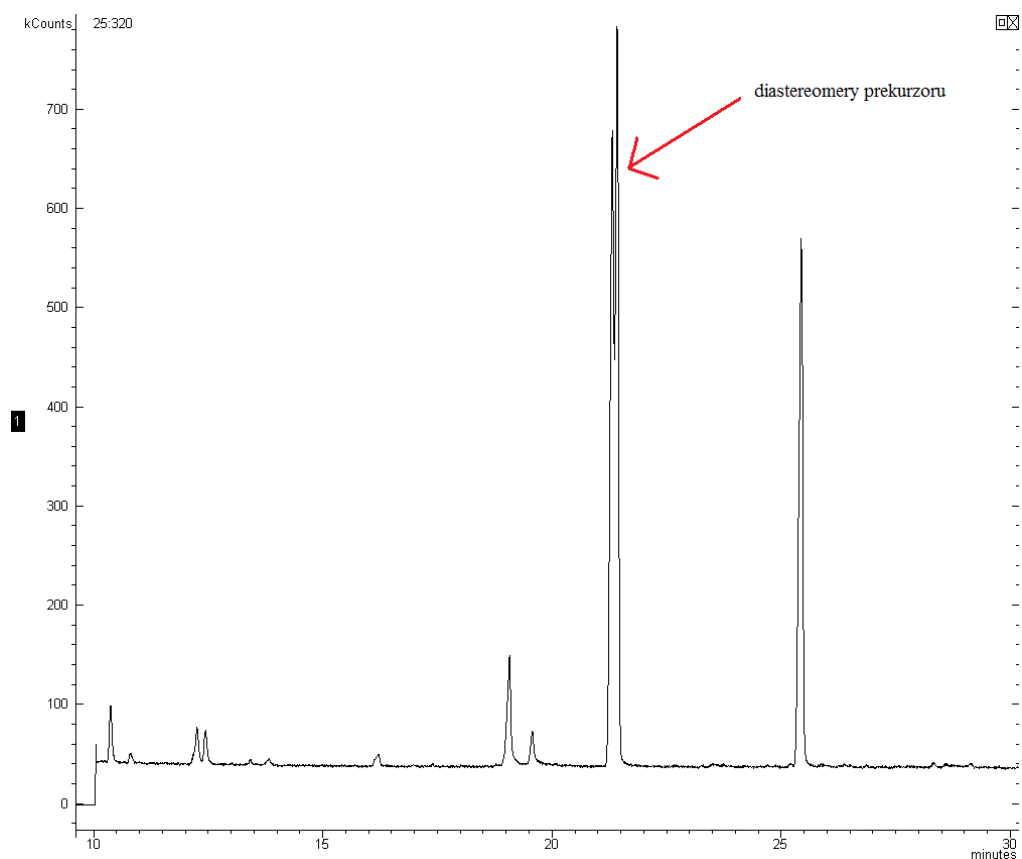
## 5.2. Syntéza potenciálního prekurzoru

Identita syntetizovaného prekurzoru, *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu, byla jednoznačně potvrzena pomocí GC/MS. Sloučenina obsahuje celkově dva chirální atomy uhlíku, první je  $\alpha$ -uhlík cysteinu, druhý je v *sek*-butylové skupině. Jelikož byl k syntéze této sloučeniny použit L-cystein, absolutní konfigurace na  $\alpha$ -uhlíku je *R*. Připravená látka byla tedy směsí dvou diastereomerů lišících se pouze absolutní konfigurací na chirálním uhlíkovém atomu v *sek*-butylové skupině. Nebyly provedeny žádné pokusy k rozdělení těchto diastereomerů, neboť by to bylo experimentálně obtížné a v rámci této práce toto rozdělení nebylo nutné. Chirální centra prekurzoru jsou označena hvězdičkou na obr. 19.



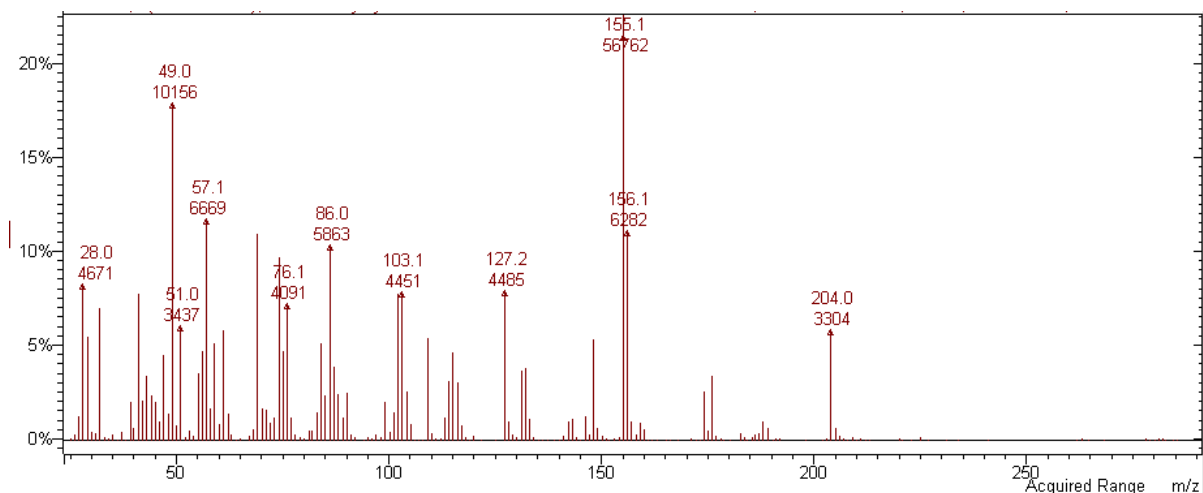
**Obr. 19:** Chirální centra *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu.

Na obr. 20 je pak chromatogram z GC/MS analýzy syntetizovaného prekurzoru (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí) s očividným zastoupením dvou diastereomerů.



**Obr. 20:** Chromatogram syntetizovaného standardu *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí).

Vzhledem k tomu, že diastereomery mají téměř identická hmotnostní spektra, je na obr. 21 znázorněno hmotnostní spektrum pouze jednoho z diastereomerů.



**Obr. 21:** Hmotnostní spektrum *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí).

V tab. IV je pak zaznamenána molekulová hmotnost a hmotnostní spektrum syntetizovaného *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí).

**Tab. IV:** Hmotnostní spektrum syntetizovaného prekurzoru (po derivatizaci).

Látka	Molekulová hmotnost	Hmotnostní spektrum (m/z, %)
<i>S</i> -( <i>sek</i> -butyl)cysteinsulfoxid	277	279 (0,06, M <sup>+</sup> +2), 277 (0,2, M <sup>+</sup> ), 204 (6), 156 (11), 155 (100), 103 (8), 86 (11), 69 (11), 57 (12), 49 (18)

### 5.3. Detekce potenciálního prekurzoru

Pomocí iontovýměnné chromatografie byly získány aminokyselinové frakce z kořene *F. foetida*. Přítomnost aminokyselin v těchto extraktech byla dokázána reakcí s ninhydrinem. Byla pozorována výsledná červenohnědá barva vzorků, což signalizuje přítomnost aminokyselin v extraktech rostliny.

U frakcí získaných uvolněním aminokyselin na katexu byly dále změřeny hodnoty pH a zaznamenány jejich optické vlastnosti. Výsledky jsou shrnuty v tab. V.

**Tab. V:** Hodnoty pH a optické vlastnosti aminokyselinových frakcí.

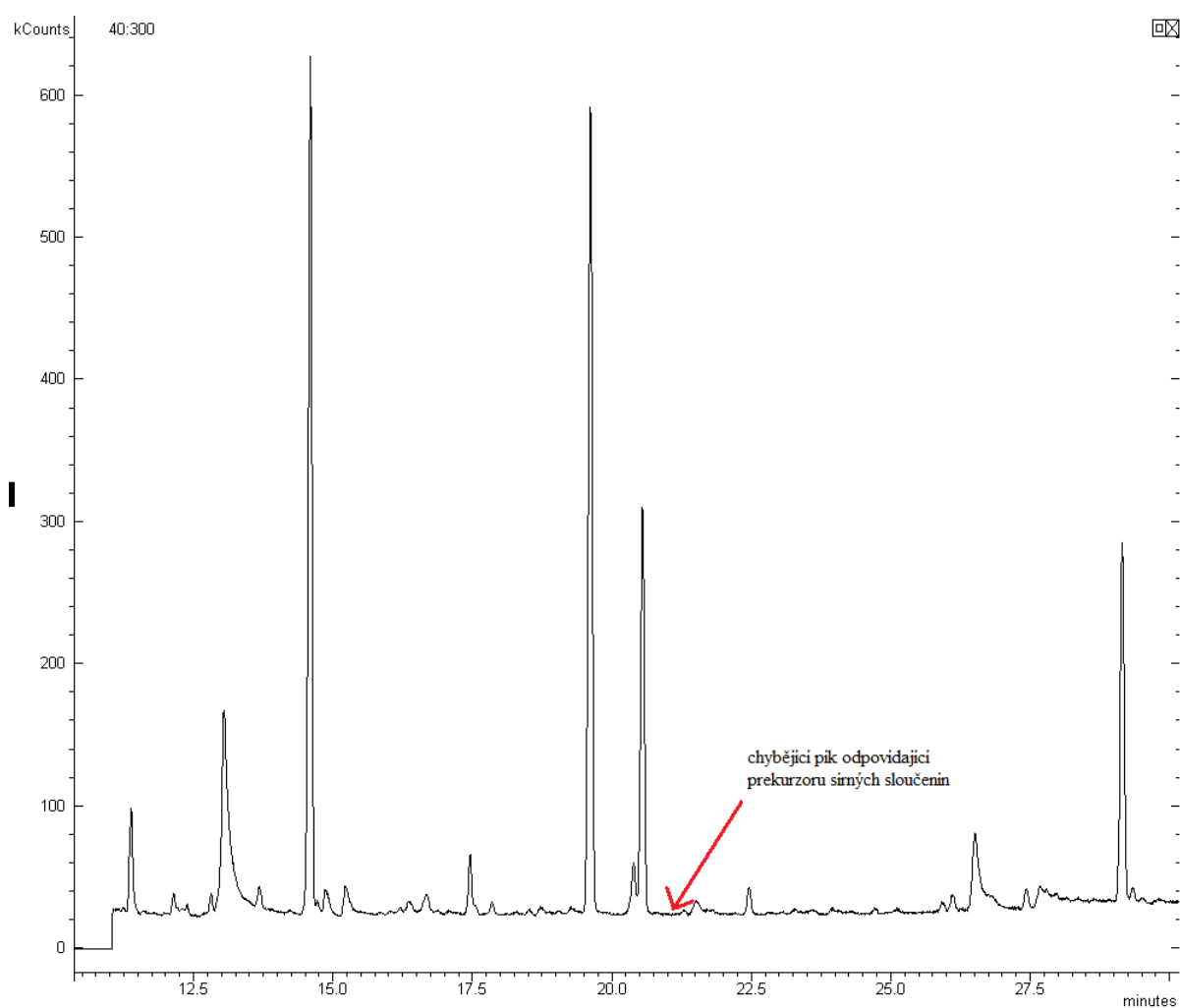
Frakce	Promytí destilovanou vodou	Hodnota pH	Optické vlastnosti
1.	ne	10,40	zakalená
2.	ano	11,33	čirá
3.	ano	11,45	čirá

V získaných aminokyselinových frakcích byla poté sledována přítomnost *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu dvěma různými chromatografickými metodami, a sice pomocí GC/MS (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí) a HPLC/MS (bez použití derivatizace).

Při HPLC/MS analýze byl standardem syntetizovaný *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxid a vzorkem extrakty z analyzované rostliny. Hmotnostní detekce se zaměřila především na sledování přítomnosti látek o relativní molekulové hmotnosti 193 Da, která odpovídá

molekulové hmotnosti hledaného prekursoru. Tato analýza nepotvrdila přítomnost žádné takovéto hledané sloučeniny.

Získaný aminokyselinový extrakt byl zároveň analyzován pomocí GC/MS (po derivatizaci ethylesterem kyseliny chlormravenčí), kde byla hledána sloučenina o relativní molekulové hmotnosti 277 Da. Tato analýza poskytla chromatogram (obr. 22), na kterém je zřetelně vidět chybějící pík odpovídající hledanému prekursoru těkavých sírných sloučenin ve zkoumaném extraktu rostliny.



**Obr. 22:** Chromatogram analyzovaného vzorku rostliny s naznačeným místem absence píku, který by odpovídal hledanému prekursoru.

## 6. Diskuse

Přítomnost těkavých sirných sloučenin, které byly uvedeny v publikovaných pracích<sup>13,16,19,21</sup> jako nejvýznamnější, byla potvrzena v analyzované rostlině *F. foetida*. Z porovnání chromatogramů získaných při stanovení těchto těkavých sirných látek je patrné, že sloučeniny označené čísly 1-10 byly ve většinovém podílu jak při použití přímé extrakce, tak při použití Likens-Nickersonovy aparatury. Dále je z hmotnostních spekter zřejmé, že sloučeniny označené čísly 2 a 3 jsou strukturně velmi podobné, na chromatogramech se vyskytují v těsné blízkosti a lze předpokládat, že se jedná o geometrické izomery se stejnou molekulovou hmotností.

Mezi nejvýznamnější těkavé sirné sloučeniny, které se vyskytují v analyzovaném vzorku *F. foetida*, patří disulfidy obsahující *sek*-butylovou skupinu, na základě jejich přítomnosti ve vzorku byla vyslovena hypotéza o potenciálním prekurzoru těkavých sirných sloučenin, *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu. Sice se nepodařilo identifikovat všechny majoritní látky z GC/MS analýzy, u některých sloučenin bylo možné pouze odhadnout sumární vzorec, nicméně potvrzení přítomnosti látek se *sek*-butylovou skupinou bylo hlavním předpokladem pro další část této práce.

Nejdůležitějšími těkavými sirnými sloučeninami v rostlině *F. foetida* jsou bezpochyby (*E*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid a (*Z*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid. Z předcházejících výsledků lze překvapivě usoudit, že se tyto geometrické izomery v rostlině *F. foetida* vyskytují ve stejném poměru 1:1, zatímco Kjaer a kol.<sup>22</sup> došli k závěru, že poměr mezi *E* a *Z* izomerem je 70:30, s čímž souhlasí i Noleau a kol.<sup>5</sup>, kteří uvádějí podobný poměr 67:33. Naopak Sefidkon a kol.<sup>1</sup> identifikovali izomer (*E*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid ve výrazně větším poměru (59:4) v rostlině *F. assafoetida*. Podobně rozporuplný výsledek uvádí i Zhi-da a kol.<sup>16</sup>, kteří zjistili poměr mezi *E* a *Z* izomery 44:31 u rostliny *F. sinkiangensis*, zatímco u rostliny *F. fukanensis* určili přibližný poměr 40:10. Z chromatogramů se dále dá usoudit, že první pík patří *Z* izomeru, neboť má větší polaritu a byl kratší dobu zadržen na nepolární stacionární fázi. Z hlediska použití metody přímé extrakce a metody za použití Likens-Nickersonovy aparatury lze říci, že obě metody poskytly podobné výsledky, pouze se lišilo relativní zastoupení některých těkavých látek.

Přítomnost aminokyselin v extraktu rostliny *F. foetida* byla ověřena chromatografií na tenké vrstvě (TLC), nicméně přítomnost aminokyseliny, která byla považována



za potenciální prekurzor těkavých sirných sloučenin v této rostlině, *S*-(*sek*-butyl)cystein-sulfoxidu, nebyla potvrzena ani vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostním detektorem (HPLC/MS), ani plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem (GC/MS). Hypotéza o analogických přeměnách těkavých sirných sloučenin, které by mohly probíhat v rostlinách rodu *Allium* a *Ferula*, byla tedy těmito identifikačními metodami vyvrácena.

## 7. Závěr

Mezi nejvýznamnější těkavé sírné sloučeniny v rostlině *F. foetida* patří (*E*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid a (*Z*)-*sek*-butyl(1-propenyl)disulfid, které se ve zkoumaném vzorku rostliny vyskytovaly v poměru 1:1 a byly určeny jako majoritní těkavé sloučeniny rostlin rodu *Ferula*, dále pak byly s vysokou pravděpodobností identifikovány isobutyl(1-propenyl)disulfid, di(*sek*-butyl)disulfid, 1(popř. 2)-butenyl(*sek*-butyl)disulfid.

Přítomnost potenciálního prekurzoru těkavých sírných sloučenin, *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxidu, který byl navržen na základě přítomnosti analogických sírných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula* a rodu *Allium*, nebyla potvrzena. Je tedy zřejmé, že přeměna sírných sloučenin v rostlinách rodu *Ferula* neprobíhá analogickým způsobem jako u rostlin rodu *Allium*, ale zcela jiným mechanismem.

## 8. Shrnutí

- Byly identifikovány nejvýznamnější těkavé sírné látky rostlin rodu *Ferula*.
- Byl syntetizován domnělý prekurzor těchto sírných sloučenin – *S*-(*sek*-butyl)cysteinsulfoxid.
- Byla navržena metoda identifikace tohoto prekurzoru ve vzorku rostliny.
- Bylo jednoznačně prokázáno, že se tento prekurzor v rostlině *Ferula foetida* nenachází.

## 9. Seznam použité literatury

1. Sefidkon F., Askari F., Mirza M.: *Journal of Essential Oil Research* **10**, 687 (1998).
2. Iranshahy M., Iranshahi M.: *Journal of Ethnopharmacology* **134**, 1 (2011).
3. Behpour M., Ghoreishi S.M., Khayatkashani M., Soltani N.: *Corrosion Science* **53**, 2489 (2011).
4. Raghavan B., Abraham K.O., Shankaranarayana M.L., Sastry L.V.L., Natarajan C.P.: *The Flavour Industry* **5**, 179 (1974).
5. Noleau I., Richard H., Peyroux A.S.: *Journal of Essential Oil Research* **3**, 241 (1991).
6. Iranshahi M., Noroozi S., Behravan J., Karimi G., Schneider B.: *Natural Product Research* **23**, 1584 (2009).
7. Takeoka G.R. In *Aroma Active Compounds in Foods: Chemistry and Sensory Properties*; Takeoka G.R., Güntert M., Engel K.-H., Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 33, 2001.
8. Kanani M.R., Rahiminejad M.R., Sonboli A., Mozaffarian V., Osaloo S. K., Ebrahimi S.N.: *Chemistry and Biodiversity* **8**, 503 (2011).
9. Yousefi M., Mohammadi M., Habibi Z., Shafiee A.: *Natural Product Research* **24**, 1352 (2010).
10. Akhgar M.R., Moradalizadeh M., Faghihi-Zarandi A.: *Chemistry of Natural Compounds* **47**, 639 (2011).
11. Eigner D., Scholz D.: *Journal of Ethnopharmacology* **67**, 1 (1999).
12. Mirjani R., Shahverdi A.R., Iranshahi M., Amin G., Shafiee A.: *Pharmaceutical Biology* **43**, 293 (2005).
13. Rajanikanth B., Ravindranath B., Shankaranarayana M. L.: *Phytochemistry* **23**, 899 (1984).
14. Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F., Pirmoradei M.R.: *Food Chemistry* **91**, 639 (2005).

15. Naimie H., Samek Z., Dolejš L., Řeháček Z.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **37**, 1166 (1972).
16. Zhi-Da M., Qi-Fi M., Mizuno M., Tanaka T., Iinuma M.: *Planta Medica* **53**, 300 (1987).
17. Iranshahi M., Amin G.R., Amini M., Shafiee A.: *Phytochemistry* **63**, 965 (2003).
18. Iranshahi M., Amin G., Salehi-Sourmaghi M.H., Shafiee A., Hadjiakhoondi A.: *Flavour and Fragrance Journal* **21**, 260 (2006).
19. Kajimoto T., Yahiro K., Nohara T.: *Phytochemistry* **28**, 1761 (1989).
20. Banerji A., Mallick B., Chatterjee A., Budzikiewicz H., Breuer M.: *Tetrahedron Letters* **29**, 1557 (1988).
21. Duan H., Takaishi Y., Tori M., Takaoka S., Honda G., Ito M., Takeda Y., Kodzhimatov O.K., Kodzhimatov K., Ashurmetov O.: *Journal of Natural Products* **65**, 1667 (2002).
22. Kjaer A., Sponholtz M., Abraham K.O., Shankaranarayana M.L., Raghavan R., Natarajan C.P.: *Acta Chemica Scandinavica B* **30**, 137 (1976).
23. Khar A., Banerjee K., Jadhav M.R., Lawande K.E.: *Food Chemistry* **128**, 988 (2011).
24. Iciek M., Kwiecień I., Wlodek L.: *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50**, 247 (2009).
25. Horníčková J., Kubec R., Cejpek K., Velišek J., Ovesná J., Stavělíková H.: *Czech Journal of Food Science* **28**, 298 (2010).
26. Miron T., Bercovici T., Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D.: *Analytical Biochemistry* **331**, 364 (2004).

## 10. Dodatek

V této práci bylo použito názvosloví organických sloučenin, které sice přesně neodpovídá názvosloví IUPAC, ale je přehlednější, vhodnější a často používané i v odborné literatuře. Proto namísto doporučeného „prop-1-en-1-yl“ bylo použito „1-propenyl“.

## 11. Seznam použitých zkratk

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
MS	hmotnostní detekce
HPLC/PDA	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
EI	ionizace elektronovým nárazem
CI	chemická ionizace