

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Sirné sloučeniny cibule Tropea
(*Allium cepa* var. *tropea*)

Bakalářská práce

Lenka Třísková

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.
katedra aplikované chemie, ZF JU

České Budějovice 2012

Třísková, I., 2011: Sírné sloučeniny cibule Tropea (*Allium cepa* var. *tropea*) [Sulfuric compounds of onion Tropea. Bc.Thesis, in Czech]- 34 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This thesis is focused on biologically active sulfur compounds of onions, especially cysteine derivatives occurring in the cultivar *Allium cepa* var. *tropea*. In this onion variety, a completely novel cysteine derivative (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteine *S*-oxide was found in 2008. The aim of this work was a laboratory synthesis of (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteine *S*-oxide and development of an analytical method for determination of this sulfur amino acid. The preparation procedure consisted of four steps, namely 1) reduction of (*E*)-pent-3-enoic acid (using LiAlH₄), 2) bromination of (*E*)-pent-3-en-1-ol to yield (*E*)-5-brompent-2-en, 3) its reaction with L-cysteine and 4) the subsequent oxidation of (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteine to form (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteine *S*-oxide. The resulting diastereomers of (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteine *S*-oxide were then separated by preparative HPLC and spectrally characterized.

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, 12. 4. 2012

.....

Poděkování

Děkuji doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za všestrannou pomoc a vedení mé bakalářské práce. Ráda bych dále poděkovala celému pracovnímu kolektivu doc. Kubce za rady a pomoc s experimentální částí práce a za příjemné prostředí, které mi bylo poskytnuto během jejího vypracování. Za změření NMR spekter děkuji Prof. RNDr. Janu Schramlovi, DrSc.

Děkuji rovněž mé rodině za to, že mi umožnila vysokoškolské studium.

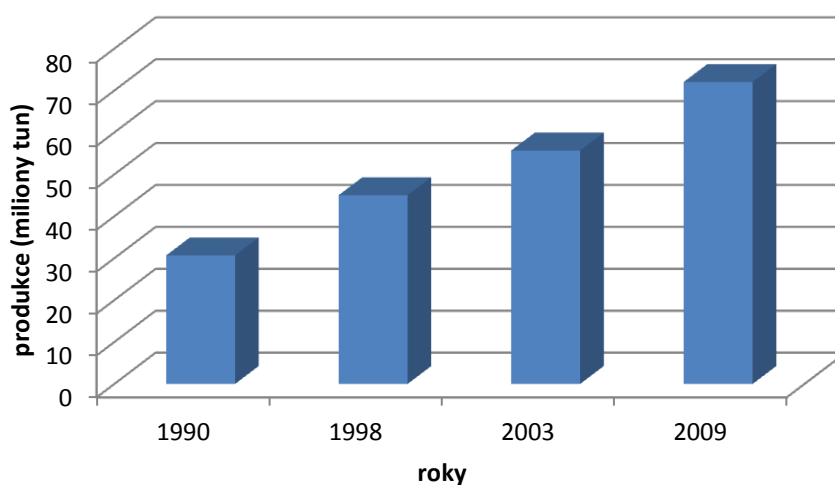
Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Jihočeské univerzity (GAJU 067/2010/Z)

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	2
2.1	Historie pěstování cibule	2
2.2	Botanické zařazení.....	3
2.3	Původ a tradice pěstování cibule Tropea v oblasti jižní Itálie	3
2.4	Senzorické vlastnosti cibule Tropea	4
2.5	Oblasti pěstování cibule Tropea pod registrovanou ochrannou známkou EU	6
2.6	Nutriční a biologicky významné vlastnosti cibule	7
2.7	Chemické složení cibule Tropea.....	8
2.8	Prekurzory sirných sloučenin cibule kuchyňské – <i>S</i> -alk(en)yl-L-cystein <i>S</i> -oxidy	8
3.	DOSAVADNÍ VÝZKUM SIRNÝCH SLOUČENIN CIBULE TROPEA	10
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
4.1	Použité přístroje, chemikálie a zařízení	11
4.1.1	Chemikálie.....	11
4.1.2	Použité přístroje.....	12
4.2	Metody a postupy	14
4.2.1	Syntéza (<i>E</i>)- <i>S</i> -(3-pentenyl)-L-cystein <i>S</i> -oxidu.....	14
4.2.2	Analytické stanovení (<i>E</i>)- <i>S</i> -(3-pentenyl)-L-cystein <i>S</i> -oxidu v reálném vzorku	17
5.	VÝSLEDKY	20
5.1	Syntéza (<i>E</i>)- <i>S</i> -(3-pentenyl)-L-cystein <i>S</i> -oxidu.....	20
5.2	Stanovení (<i>E</i>)- <i>S</i> -(3-pentenyl)-L-cystein <i>S</i> -oxidu ve vzorku cibule Tropeana Lunga	23
6.	DISKUZE	25
7.	ZÁVĚR	26
8.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	27
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	28
10.	PŘÍLOHY	29

1. ÚVOD

Česnekovité rostliny (čeleď *Alliaceae* L.) patří mezi celosvětově nejpoužívanější skupinu rostlin nejenom v gastronomii, ale i v lidovém léčitelství. Mají antifungicidní a antibakteriální vlastnosti, které jsou připisovány sírným sloučeninám v těchto rostlinách obsažených. Tato čeleď a zejména pak rod *Allium* L. zahrnuje například cibuli (*Allium cepa* L.), česnek (*A. sativum* L.) a pór (*A. porrum* L.)¹. Cibule je každodenní součástí potravy lidí na celém světě. Díky její oblibě světová produkce a spotřeba této zeleniny neustále roste. Tento vzrůst je zaznamenán na obr. 1. Po rajčatech je cibule druhou celosvětově nejobjemnější plodinou na seznamu pěstované zeleniny. Nejvyšší produkcí cibule na světě se pyšní asijské státy jako Čína, Indie spolu s USA².



Obr. 1: Celosvětová produkce cibule během let 1990 až 2009.

Cíle práce

- Zaměřit se na biologicky aktivní sírné sloučeniny cibule, zejména pak kultivaru *Allium cepa* var. *tropea*.
- Připravit (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid a vyvinout analytickou metodu pro jeho stanovení v reálných vzorcích.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Historie pěstování cibule

Historie pěstování cibule je dobře zdokumentována a lze vysledovat její původ do širokého okolí Indie a Izraele, kde její pěstování začalo zhruba 3000 let př. n. l. a poté byla přivezena Féničany do Evropy před 2000 lety. Její botanický název je „*Allium cepa*“, kde „*Allium*“, jméno používané Virgilem, je odvozeno z keltského all = horko a „*cepa*“ od „*caput*“³. V starověkém Egyptě se věřilo, že cibule je posvátné jídlo. Byla také hojně konzumována Římany a Řeky, kteří měli rádi její chuť a znali její léčivé schopnosti. Proto Plinius starší, v jeho *Naturalis historia*, sepsal seznam 30 onemocnění, která mohou být léčena cibulí, a poukázal na pokrmy obsahující cibuli, které jsou jak léčivé, stejně tak výživné a chutné⁴. Rozlišujeme celkem tři základní barevné odrůdy cibule a sice žlutou, bílou a červenou (obr. 2). Speciálním kultivarem červené cibule je Tropeana (*Allium cepa* var. *tropea*) (obr. 3). Zbarvení její slupky úzce souvisí s obsahem antokyaninů. *Allium cepa* var. *tropea* a její příbuzné druhy z velké skupiny *Alliaceae* se používaly hlavně jako jídlo, koření a bylinný prostředek po celém světě. Cibule jsou hlavní jedlou částí s výrazně silnou a pronikavou vůní, v menší míře jsou konzumovány i zelené části a semena⁵.



Obr. 2: Bílá, žlutá a červená odrůda cibule^a.



Obr. 3: Speciální odrůda cibule Tropea^b.

^a <http://www.healthytimesblog.com/2011/07/onion-skin-could-produce-a-new-superfood-study-reveals/>; staženo dne 30. 10. 2011.

^b http://freshplaza.it/news_detail.asp?id=39558; staženo dne 2. 11. 2011.

2.2 Botanické zařazení

Rostlinný druh *Allium cepa* var. *tropea* rodu *Allium* patří do čeledi Alliaceae (česnekovitě). Čeleď Alliaceae spadá do řádu *Asparagales* (chřestotvaré), dále do třídy *Liliopsida* (jednoděložné) a do oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny).

2.3 Původ a tradice pěstování cibule Tropea v oblasti jižní Itálie

Do oblasti Středozeří a Kalábrie byla cibule podle historických pramenů dovezena Féničany a poté Řeky. V období středověku a renesance se podílela na rozvoji místního hospodářství a výměnného obchodu. Prodejem do zámoří se rozšířila do Tuniska, Alžiru a Řecka. Ve spisech cestovatelů, kteří navštívili pobřeží Kalábrie, se objevily zmínky o běžné červené cibuli. Na obr. 4 je kostel Santa Maria dell'Isola na pobřeží Kalábrie. Ke konzumaci cibule vedla řadu zemědělců v městě Tropea především chudoba. Od 20. století se cibule z oblasti Tropea stala součástí jak rodinných zahrádek, tak rozsáhlejších ploch. Po vybudování zavlažovaných pěstebních ploch se zvýšila výnosnost a kvalita cibule. Na obr. 5 jsou ženy, které obdělávají plochy, na nichž se pěstuje cibule Tropea. Později se cibule dostala na trh země severní Evropy, kde je často vyhledávanou a oblíbenou plodinou.



Obr. 4: Pobřeží Kalábrie^a.



Obr. 5: Tradice pěstování^b.

^a <http://www.tropeaholiday.it/english/typical-products-of-calabria.php>; staženo dne 2. 1. 2012.

^b http://www.freshplaza.it/news_detail.asp?id=19700; staženo dne 13. 2. 2012.

Cibule „Cipolla Rossa di Tropea Calabria“ je známá po celé Itálii. Je typická pro venkov a promítla se v řadě odvětví v podobě místních kulinářských specialit, jako součást tradičních receptur, mluveného jazyka a lidových tradic, což zapříčinilo pokusy o padělání jejího označení a imitaci tohoto produktu. Na obr. 6 jsou místní obyvatelé během tradičních oslav, kde se objevuje cibule Tropea. V místních obchodech lze zakoupit nezvyklé výrobky z cibule, jako jsou trvanlivé salámy, těstoviny, marmelády nebo dokonce zmrzlina⁶. Na obr. 7 je marmeláda vyrobená z cibule Tropea.



Obr. 6: Místní obyvatelé v tradičních šatech^a.



Obr. 7: Marmeláda z cibule Tropea^b.

2.4 Senzorické vlastnosti cibule Tropea

A. cepa var. *tropea* kvete jak bílými tak fialovými květy. Charakteristická je výraznou cibulkou, která je rozměrově střední až velká, prodloužená nebo oválná⁷. Její slupka je červená až fialová. Jednotlivé vrstvy cibulky mají většinou nafialovělý povrch, dužina je bílá. Vzhled a barva cibule Tropea jsou patrné z obr. 8.

^a <http://www.mondodelgusto.it/2008/05/11/eventi--sagre-e-feste-in-sardegna--sicilia--basilicata--calabria-e-molise--ndash--giugno-e-luglio-2008/>; staženo dne 15. 1. 2012.

^b <http://www.eterisaporidicalabria.com/prodotti-tipici-calabresi/la-tropeana-cipolla-dolce-di-tropea-gr-220-p-357.html?language=it>; staženo dne 17. 3. 2012.



Obr. 8: Řez cibulí Tropea^a.

Má jemně sladkou chuť a vyniká svou křehkostí⁸. Předností je výjimečně lehká stravitelnost cibulek, která je dána nízkým obsahem sirných látek. Díky tomu cibule při konzumaci nepálí a neštípe. Proto je cibule „Cipolla Rossa di Tropea Calabria“ v syrovém stavu hojně konzumována oproti běžné cibuli⁶. Výsev cibule Tropea se provádí od srpna většinou ve sponu 4–20 × 10–22 cm. Na jeden hektar půdy se vysévá 250000 až 900000 rostlin. V jednom hnízdě jsou 4 cibulky⁶. Příklad způsobu pěstování je na obr. 9.



Obr. 9: Příklad způsobu pěstování^b.

^a <http://www.agraria.org/coltivazionierbacee/aromatiche/cipolla.htm>; staženo dne 1. 3. 2012.

^b http://newfield.locallygrown.net/market?items_per_page=50; staženo dne 25. 10. 2011.

2.5 Oblasti pěstování cibule Tropea pod registrovanou ochrannou známkou EU

A. cepa var. *tropea* pěstovaná v Itálii (ital. „Cipolla Rossa di Tropea“) je zvláštní odrůda červené cibule, která roste v několika oblastech Kalábrie v jižní Itálii zejména v okresech Cosenza, Catanzaro a Vibo Valentia a nedaleko města Tropea⁶. Tyto oblasti jsou červeně označeny na obr. 10.



Obr. 10: Mapa certifikovaných oblastí pro pěstování cibule Tropea v Kalábrii v jižní Itálii (Amantea, Nocera Tenirese, Briatico, Capo Vaticano)^a.

Cibule Tropea se stala jedním z nejvíce oceňovaných italských zemědělských a potravinářských produktů. Díky svým charakteristikám v březnu 2008 získala chráněnou geografickou identifikaci (PGI) jako osvědčení Evropské unie. PGI se týká zemědělských produktů a potravin úzce souvisejících s geografickou oblastí alespoň v jednom bodu produkce, přípravy nebo zpracování. V každém případě PGI produkt roste v regionu, který je dán v jeho názvu a musí mít prestiž, která může být připsána jeho geografickému původu. Účelem této

^a http://www.bedandbreakfastincalabria.com/find_us.htm; staženo dne 1. 3. 2012, upraveno.

certifikace je chránit produkty proti podvodům a imitacím a k ochraně konzumentů tím, že se dozvědí informace o kvalitě, organoleptických vlastnostech a nutričních hodnotách dané potraviny⁷.

Díky svým speciálním vlastnostem je cibule Tropea produktem známým po celém světě, což se odráží v místní i mezinárodní ekonomice. V roce 2008 se její produkce v Kalábrii odhadovala na 20 000 tun. Skutečná produkce červené cibule Tropea charakterizované PGI značkou byla mnohonásobně větší, celkem 100 000 tun v uvedeném roce⁷.

2.6 Nutriční a biologicky významné vlastnosti cibule

Cibule (*A. cepa*) obsahuje tři hlavní typy sloučenin, které mají antioxidační účinky na lidský organismus, kterých se využívá pro medicínské účely. Mezi ně patří *S*-alk(en)yl-L-cystein *S*-oxidy, flavonoidy a sacharidy⁹. Antioxidační vlastnosti rostlin rodu *Allium* jsou zvláště zajímavé, protože mají spojitost s oxidativními stresy, špatnou kondicí a aterosklerosou, za které jsou zodpovědné především volné radikály. Proto je cibule užitečným prostředkem při léčbě a prevenci řady chorob, včetně rakoviny, koronárních chorob srdce, obezity, zvýšeného cholesterolu, druhého typu cukrovky, zvýšeného krevního tlaku, šedého zákalu a poruch gastrointestinálního traktu. Důležitou roli mají také saponiny obsažené především v cibuli Tropea (*A. cepa* var. *tropea*). Přináší široké spektrum biologického použití například proti rakovině, zánětu, trombóze, blokaci iontových kanálů, imunitní stimulaci a působí proti vysokému tlaku⁴.

2.7 Chemické složení cibule Tropea

Chemickou analýzou semen cibule *A. cepa* var. *tropea* byl zjištěn mírně vyšší obsah vody a sacharidů (především vlákniny), naopak nižší obsah bílkovin a lipidů oproti běžné cibuli (*A. cepa*)¹⁰. Tyto nutriční hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

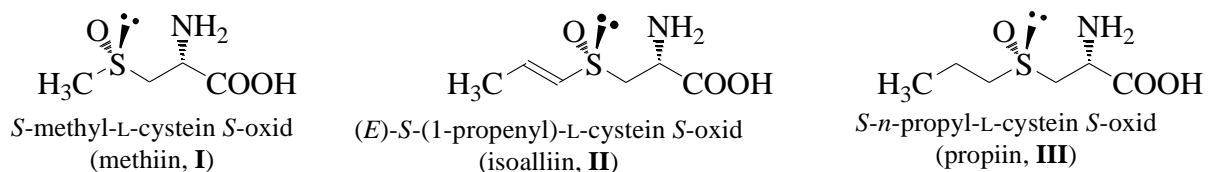
Tab. I: Chemické složení semen cibule *Allium cepa* var. *tropea* (%)¹⁰

	voda	bílkoviny	lipidy	sacharidy	vláknina
<i>Allium cepa</i> var. <i>tropea</i> (semena)	10,5	24,8	20,4	21,9	22,4
<i>Allium cepa</i> (semena)	6–8	27,9	23,6	20,4	16,1
<i>Allium cepa</i> (cibule)	89,1	1,1	0,1	9,3	1,7

Deriváty cystein *S*-oxidu tvoří 1–5 % sušiny. Tyto deriváty plní důležité funkce rostliny. Slouží ke správnému průběhu cyklu dusíku, síry a uhlíku, k jejich skladování, transportu v rostlině a schopnosti uchovávat proteiny⁹.

2.8 Prekurzory siřných sloučenin cibule kuchyňské – *S*-alk(en)yl-L-cystein *S*-oxidy

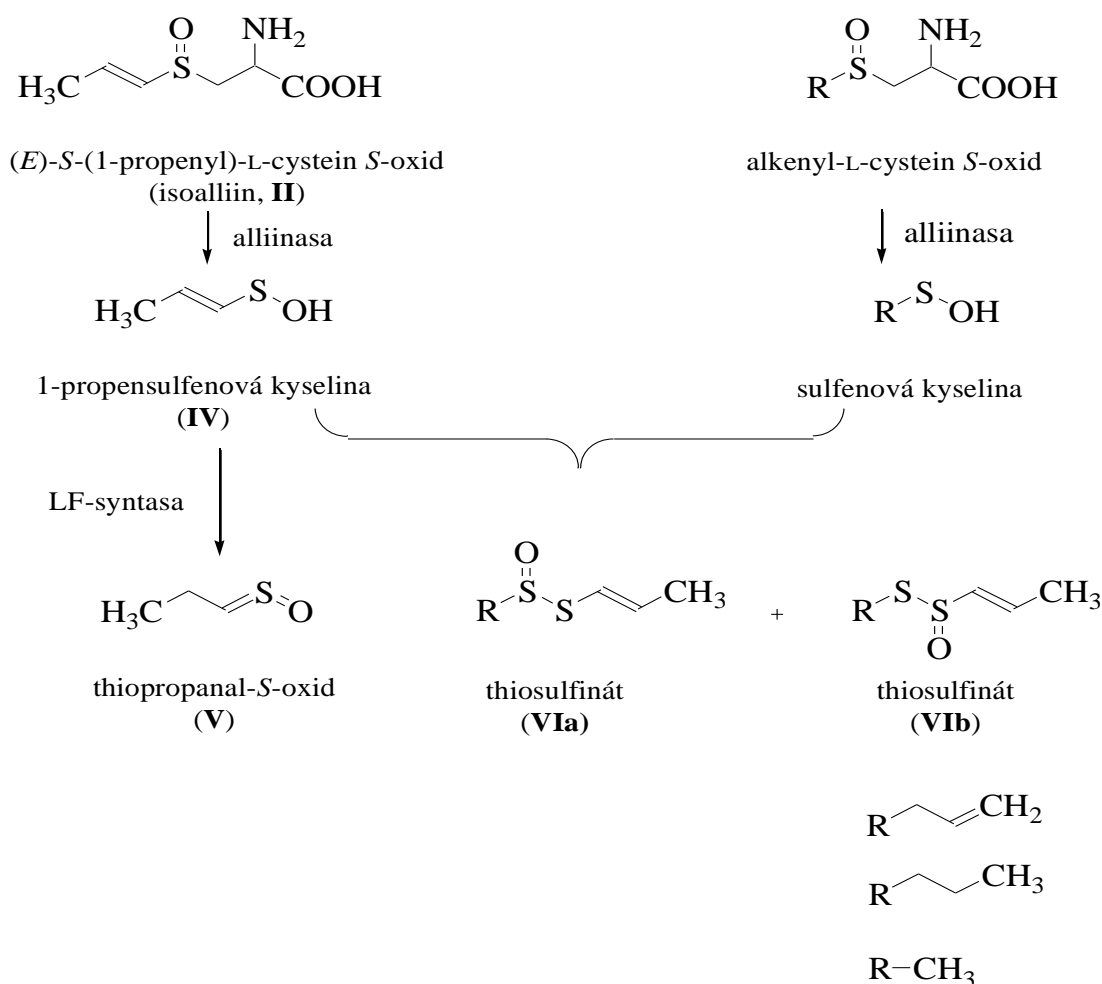
Rostliny rodu *Allium* syntetizují celou řadu siřných derivátů odvozených od cysteinu⁹. *A. cepa* syntetizuje celkem tři, a sice *S*-methylcystein *S*-oxid (methiin, **I**), (*E*)-*S*-(1-propenyl)-L-cystein *S*-oxid (isoalliin, **II**) a *S*-*n*-propyl-L-cystein *S*-oxid (propiin, **III**)⁵, jejichž struktury jsou uvedeny na obr. 11. Sloučeniny (**I**), (**II**) a (**III**) obsahují dvě asymetrická centra (α -uhlík a atom síry), u isoalliinu (**II**) je situace komplikovanější přítomností dvojné vazby.



Obr. 11: Deriváty cysteinu přítomné v cibuli kuchyňské.

2.9 Přeměna sirných sloučenin v cibuli

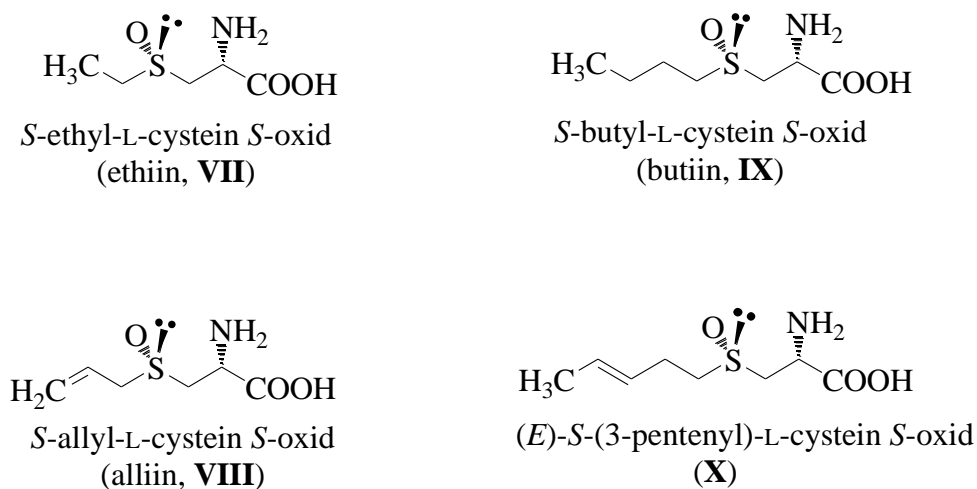
Po rozrušení buněk jsou tyto deriváty aminokyselin rozštěpeny pomocí enzymu alliinasy (C-S lyasy, E.C. 4.4.1.4) na příslušné sulfenové kyseliny. Například rozkladem isoalliinu (**II**) vzniká 1-propensulfenová kyselina (**IV**), která je účinkem dalšího enzymu, lachrymatory factor syntasy (LFS), konvertována na slzotvorný thiopropanal *S*-oxid (**V**). Naopak spontánní kondenzací jednotlivých sulfenových kyseliny vznikají chuťově výrazné thiosulfináty (**VIa**, **VIb**). Schéma rozkladu isoalliinu je zaznamenáno na obr. 12. Většina vznikajících sloučenin (**V**, **VIa**, **VIb**) je poměrně nestálých a dále se rozkládá na polysulfidy, thiosulfonáty a cyklické sirné sloučeniny⁹.



Obr. 12: Schéma enzymového rozkladu isoalliinu a dalších derivátů cysteinu¹¹.

3. DOSAVADNÍ VÝZKUM SIRNÝCH SLOUČENIN CIBULE TROPEA

Obsahem a strukturou sloučenin síry, především *S*-alk(en)yl-L-cystein *S*-oxidů, v semenech *A. cepa* var. *tropea* pěstované v oblasti Tropeana se doposud zabývala pouze skupina Dr. Dini z Neapolské univerzity^{5,10}. Analýza *S*-alk(en)yl-L-cystein *S*-oxidů přítomných v semenech cibule Tropea poskytla překvapivé poznatky, neboť byla identifikována řada nových *S*-alk(en)yl-L-cystein *S*-oxidů. Kromě derivátů již dříve objevených v *A. cepa*, jako jsou methiin (**I**), isoalliin (**II**) a propiin (**III**), byly v *A. cepa* var. *tropea* údajně identifikovány další sloučeniny, a to *S*-ethyl-L-cystein *S*-oxid (ethiin, **VII**), *S*-allyl-L-cystein *S*-oxid (alliin, **VIII**) a *S*-butyl-L-cystein *S*-oxid (butiin, **IX**). Jejich přítomnost je velmi překvapivá, neboť v cibuli kuchyňské se tyto deriváty nevyskytují. Společně s nimi byla identifikována ještě jedna nová aminokyselina, a to (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**). Přítomnost tohoto derivátu byla údajně prokázána pouze v rostlinách rodu *Allium cepa* var. *tropea* vypěstovaných v jižní Itálii⁵. Je zřejmé, že přítomnost (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) v rostlině by potencionálně vedla k tvorbě celé řady nových biologicky významných látek obsahujících 3-penten-1-ylovou skupinu.



Obr. 13: Deriváty cysteinu přítomné v cibuli Tropea^{5,10}.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje, chemikálie a zařízení

4.1.1 Chemikálie

Pro syntézy byly použity lithium aluminium hydrid (LiAlH_4 , 95%), diethylether (extra suchý), trifenyfosfin, dichlormetan (extra suchý), brom (99%) a L-cystein firmy ACROS Organics (Geel, Belgie), (*E*)-pent-3-enová kyselina od firmy ALDRICH (Steinheim, Německo), hydroxid sodný, bezvodý síran hořečnatý, peroxid vodíku (30%) a pentan firmy LACHNER (Neratovice, ČR), pyridin (99,8%) a aktivní uhlí od firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko), aceton a kyselina chlorovodíková od firmy PENTA (Chrudim, ČR).

Pro izolaci aminokyselin a stanovení (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu ve vzorku byly použity kyselina chlorovodíková (35%), amoniak (25%) a acetylchlorid firmy PENTA (Chrudim, ČR), hydroxid draselný, jodid sodný, chlorid cínatý a ninhydrin od společnosti LACHEMA (Neratovice, ČR), kyselina mravenčí (98%) a dichlormethan firmy LACHNER (Neratovice, ČR), pyridin a ethylester kyseliny chlormravenčí firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko) a methanol (100%) firmy J. T. BAKER (Nizozemí).

Pro izolaci aminokyselin a stanovení (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu ve vzorku byly použity kyselina chlorovodíková (35%), amoniak (25%) a acetylchlorid firmy PENTA (Chrudim, ČR), hydroxid draselný, jodid sodný, chlorid cínatý a ninhydrin od společnosti LACHEMA (Neratovice, ČR), kyselina mravenčí (98%) a dichlormethan firmy LACHNER (Neratovice, ČR), pyridin a ethylester kyseliny chlormravenčí firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko) a methanol (100%) firmy J. T. BAKER (Nizozemí).

Jako mobilní fáze při HPLC analýzách byl použit acetonitril firmy J. T. BAKER (Nizozemí). Pro přípravu pufrů byly použity dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný firmy LACHEMA (Brno, ČR).

4.1.2 Použité přístroje

- Plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)

Při plynové chromatografii byl použit plynový chromatograf Varian 3800 (Varian, Palo Alto, USA) s hmotnostním detektorem Varian 4000 MS (Varian, Palo Alto, USA) a kapilární kolonou HP-5MS (30 m × 0,25 mm) s tloušťkou filmu 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Nastříkovaná 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 3 minutách začala stoupat až na 220°C tak, že se každou minutu zvýšila o 2°C. Byla použita chemická ionizace (CI, acetonitril) a ionizace elektronovým nárazem (EI, 70 eV).

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

Pro kapalinovou chromatografii byl použit binární systém vysokotlakých pump Dynamax SD-210 (Varian, Palo Alto, USA), PDA detektor Varian ProStar 210 (Varian, Palo Alto, USA) a:

a) analytická kolona Varian Microsorb - MV 100-5 C-18 (250 × 4,6 mm, 5 μm). Dávkovací stříkačkou Hamilton Varian (20 μl) byl nastříkován objem 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 = 5,5)

B – acetonitril

Mobilní fáze	Čas (min)				
	0	15	18	23	25
Zastoupení A (%)	97	97	20	20	97
Zastoupení B (%)	3	3	80	80	3

b) preparativní kolona Varian Microsorb – MV 100-5 C-18 (250 × 21,4 mm, 5 μm). Nastříkovaný objem byl 1 ml jednorázovou injekční stříkačkou NORM-JECT (1 ml). Průtok

mobilní fáze byl 18 ml/min. Měření probíhalo při vlnové délce 240 nm. V tab. III je uveden poměr složek mobilní fáze HPLC v jednotlivých časových intervalech.

Tab. III: Mobilní fáze HPLC.

Složení mobilní fáze: **A** – dihydrogenfosforečnan draselný (50 mM; pH = 5,5)

B – acetonitril

Mobilní fáze	Čas (min)				
	0	17	20	23	25
Zastoupení A (%)	97	97	50	50	97
Zastoupení B (%)	3	3	50	50	3

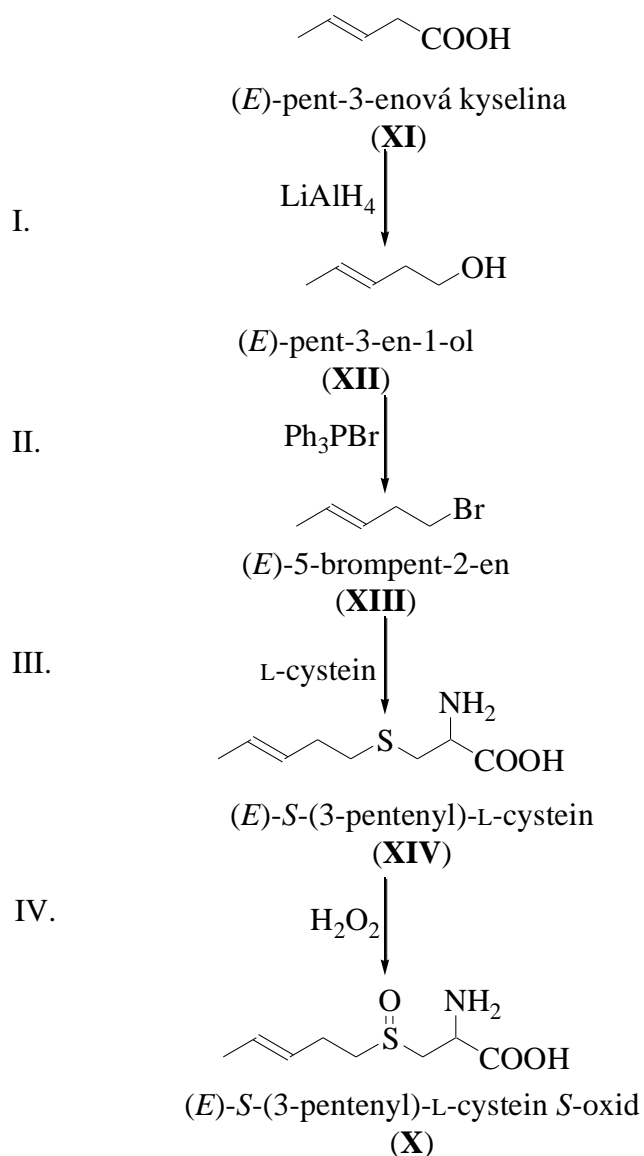
- NMR spektrometr

Pro měření byl použit NMR spektrometr Varian INOVA (500 MHz). ^1H , ^{13}C NMR spektra byla změřena Prof. RNDr. Janem Schramlem, DrSc. (Ústav chemických procesů, AV ČR). Spektra byla měřena v CDCl_3 .

4.2 Metody a postupy

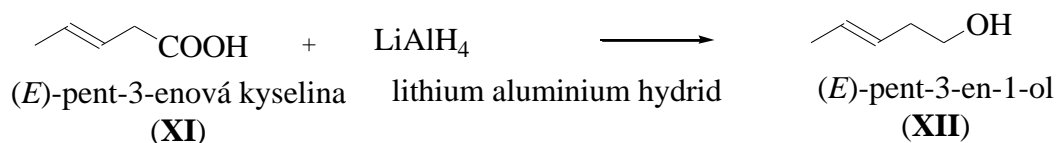
4.2.1 Syntéza (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu

Na obr. 14 je uvedeno schéma syntézy (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (**X**), kterou lze rozdělit celkem do čtyř kroků:



Obr. 14: Schéma syntézy (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu.

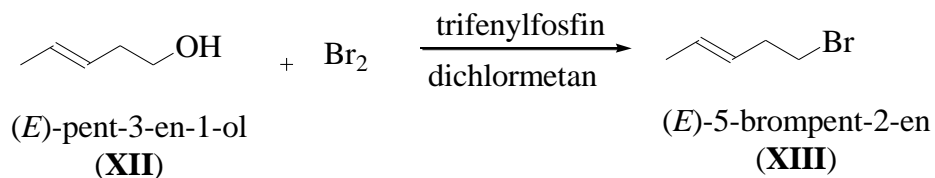
Redukce (*E*)-pent-3-enové kyseliny: I.krok



Obr. 14 : Příprava pent-3-en-1-olu.

Syntéza byla provedena podle následujícího postupu¹². Tříhrdlá baňka (1 l) byla opatřena zpětným chladičem se zátkou (NaOH) a přikapávací nálevkou. Do této baňky bylo odměřeno 200 ml diethyletheru a pomalu přisypáno 4,572 g lithium aluminium hydridu za chlazení ledovou tříští. Pomocí přikapávací nálevky bylo pomalu za neustálého míchání přikapáváno 10 ml (*E*)-pent-3-enové kyseliny v 75 ml diethyletheru. Po 45 min bylo k reakční směsi přikapáno 10 ml destilované vody a 150 ml kyseliny chlorovodíkové (1 M). Vytvořily se dvě vrstvy, vodná fáze byla znovu extrahována 150 ml diethyletheru. Spojené organické fáze byly přesušeny přidávkem síranu hořečnatého a zakoncentrovány na rotační vakuové odparce. Takto získaný produkt byl přečištěn destilací za sníženého tlaku (70–75°C/110 mm). Čistota a identita získaného (*E*)-pent-3-en-1-olu (**XII**) byly ověřeny pomocí GC/MS (obr. 17 a 18). Výtěžek této reakce byl 79 %.

Bromace (*E*)-pent-3-en-1-olu: II. krok

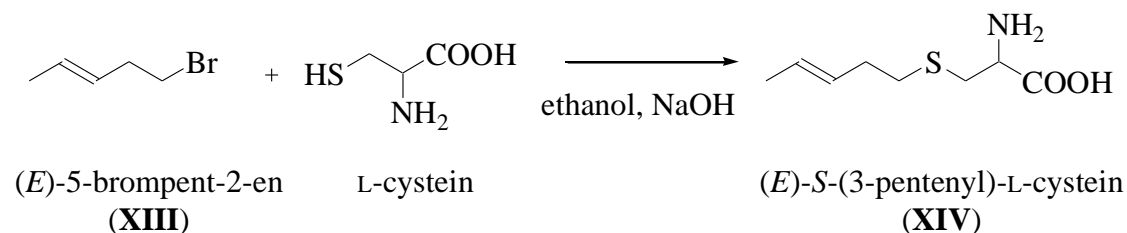


Obr. 14: Příprava (*E*)-5-brompent-2-enu.

Syntéza byla provedena podle následujícího postupu^{13, 14}. V tříhrdlé baňce (1 l) bylo ve 200 ml dichlormetanu rozpuštěno 41,48 g trifenylofosfinu. Obsah tříhrdlé baňky byl chlazen na vodní lázni s ledem za neustálého míchání. K obsahu tříhrdlé baňky byl přidán roztok 25,25 g bromu ve 20 ml dichlormetanu a poté ještě dalších 50 ml dichlormetanu. Po 30 min míchání byla po kapkách přidána směs 10 ml dichlormetanu, 6,4 ml pyridínu a 6,8 g připraveného (*E*)-pent-3-en-1-olu (**XII**). Po 3 hodinách míchání při laboratorní teplotě bylo přidáno 180 ml dichlormetanu. Obsah tříhrdlé baňky byl třepán 3 × 100 ml destilované vody. Spojené organické

fáze byly přesušeny pomocí síranu hořečnatého, zahuštěny na RVO při 25°C za vzniku krystalů trifenyfosfoxidu. Ke vzorku bylo přidáno 250 ml pentanu a po 15 min stání byl vysrážený trifenyfosfoxid odfiltrován za současného promytí 100 ml pentanu. Získaný filtrát byl zahuštěn na RVO. Vznikla čirá viskózní kapalina, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí GC/MS (obr. 19 a 20). Výtěžek této reakce byl 34,9%.

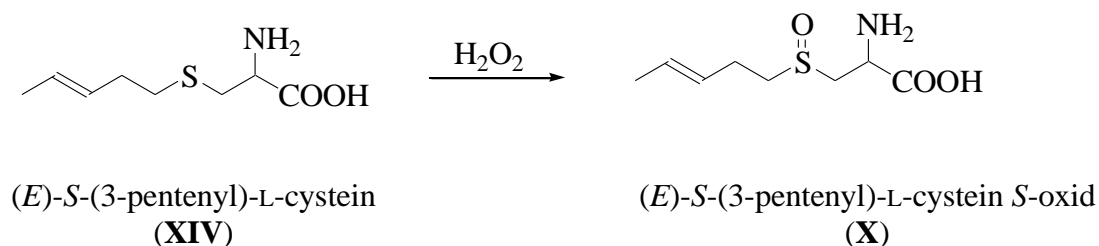
Reakce (*E*)-5-brompent-2-enu a L-cysteinu: III. krok



Obr. 14: Příprava (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu.

Tento krok syntézy byl proveden podle následujícího postupu¹⁵. V reakční baňce bylo smícháno 3,03 g L-cysteinu (25 mmol), 50 ml ethanolu a 40 ml 1 M hydroxidu sodného. Po ochlazení směsi na laboratorní teplotu k ní bylo přidáno 5,0 g (*E*)-5-brompent-2-enu (XIII) (33% přebytek). Směs byla v baňce míchána při laboratorní teplotě do druhého dne, pak byla okyselena koncentrovanou kyselinou mravenčí na pH = 6. Během této neutralizace došlo k vysrážení bílé krystalické látky, která byla zfiltrována. Čistota a identita produktu byly ověřeny pomocí NMR (obr. 23). Výtěžek této reakce byl 67 %.

Oxidace (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu: IV. krok



Obr. 14: Příprava (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu.

Další krok syntézy byl proveden podle následujícího postupu¹⁵. V baňce obsahující roztok složený ze 70 ml destilované vody a 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo rozpuštěno 1,89 g (0,01 mol) (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu (XIV). Ke vzniklé suspenzi bylo

za neustálého míchání při laboratorní teplotě přikapáváno 1,2 ml 30% peroxidu vodíku (15% přebytek). Směs byla míchána přes noc. Druhý den byla ke směsi přisypána lžička aktivního uhlí, směs byla zfiltrována a odpařena na RVO při 40°C za vzniku bílé krystalické látky (viz obr. 24). Tento produkt byl poté přečištěn pomocí preparativní HPLC.

Rozdělení látek pomocí preparativní HPLC

Do srdcové baňky (50 ml) bylo naváženo 506 mg produktu a následně rozpuštěno ve 20 ml pufru (KH₂PO₄, 50 mM, pH 5,5). Roztok byl přefiltrován přes stříkačkový filtr. Nastříkávalo se 1 ml roztoku. Nástříky byly opakovány až do úplného spotřebování roztoku (celkem 19 nástříků), přičemž se žádané frakce jímaly do zásobních lahví (100 ml). Najímané frakce (retenční čas 14,8 min) byly spojeny a následně lyofilizovány až do kompletního vysublimování rozpouštědla. Získané krystalky byly rozpuštěny v malém množství vody nutném k úplnému rozpuštění vzorku a postupně byl přikapáván aceton v poměru 1:1 k vodě. K dokončení krystalizace byla baňka uchovávána přes noc v lednici. Následovala filtrace přes Hirschovu nálevku za sníženého tlaku, filtrační koláč byl převeden do váženky a nechal se volně odpařit zbytek rozpouštědla. Čistota a identita produktu byly ověřeny pomocí NMR (obr. 24).

4.2.2 Analytické stanovení (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu v reálném vzorku

Vzorkem byla cibule Tropeana Lunga (*Allium cepa* var. *tropea*) vypěstovaná ze semínek zakoupených od společnosti Nohel Garden (Dobříš), číslo šarže: 8-0051-69505-01 (obr. 15). Tato cibule byla vypěstována na pozemcích Pedagogické fakulty v areálu JU ve Čtyřech Dvorech v roce 2011.

Izolace aminokyselin z rostlin

Vzorek cibule Tropeana Lunga (*A. cepa* var. *tropea*) (52,3 g) byl extrahován 2 × 200 ml směsí methanolu/H₂O/HCl (90/9/1; v/v/v)¹⁵. Po odpaření rozpouštědla na rotační vakuové odparce při 40°C byl objem doplněn na 50 ml a hodnota pH extraktu upravena na 2,5 pomocí pevného KOH. Takto připravený extrakt (25 ml) byl nanesen na kolonu katexu (Amberlite

IR-120, H⁺; 15 cm × 2 cm). Kolona byla promyta 100 ml destilované vody, čímž se odstranily interferující látky ze vzorku. Aminokyselinová frakce byla získána promytím kolony 200 ml 1 M roztoku amoniaku. Získaná frakce byla odpařena na RVO a derivatizována pomocí ethylchlormravenčanu.



Obr. 15: Sáček se semeny cibule Tropeana Lunga zakoupené od společnosti NOHEL GARDEN^a.

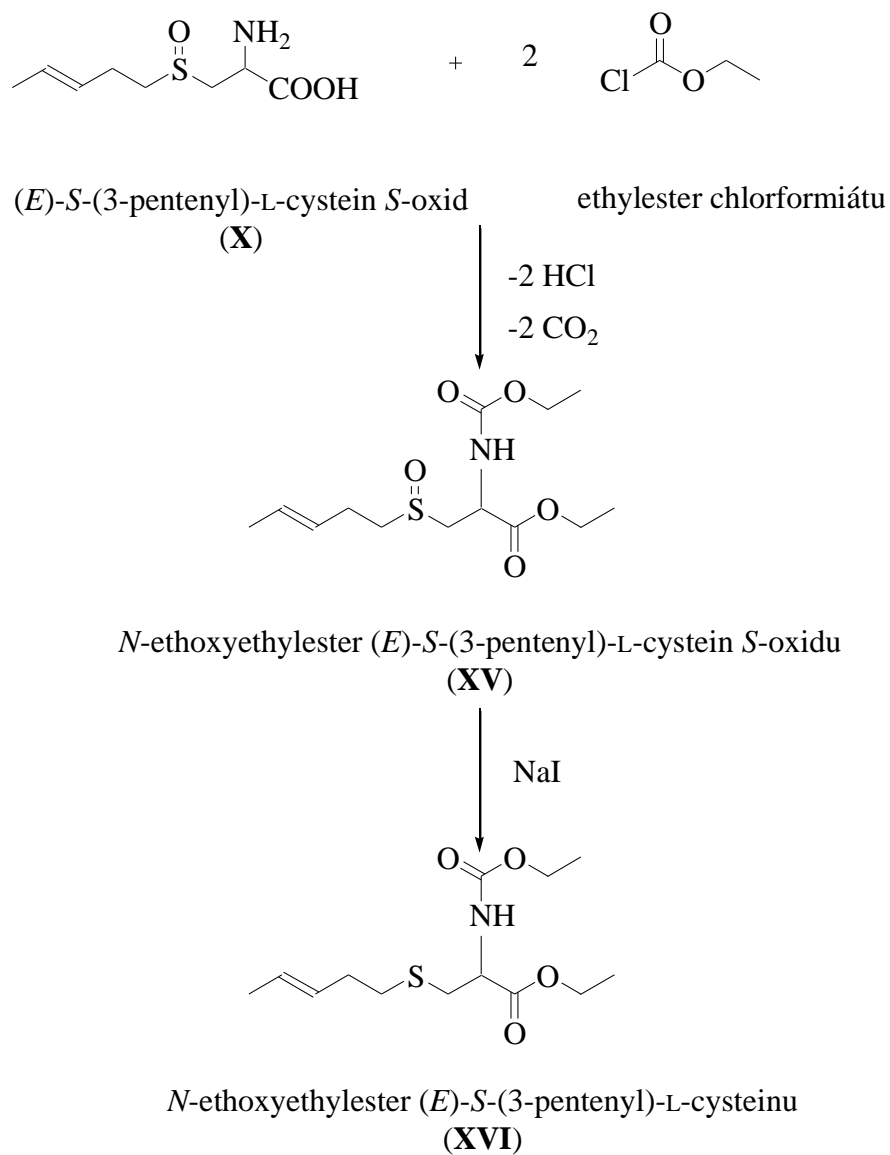
Ověření přítomnosti (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (X**) pomocí GC/MS**

Ověření přítomnosti (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (**X**) ve vzorku cibule Tropea bylo prováděno pomocí plynové chromatografie (GC/MS). Standardem byl syntetizovaný (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxid (**X**) a vzorkem byl extrakt z cibule Tropeana Lunga (*Allium cepa* var. *tropea*). Před chromatografickým dělením byla provedena derivatizace pomocí ethylchlormravenčanu (obr. 16). K extraktu aminokyselin ze vzorku bylo přidáno 400 μ l směsi ethanol/voda/pyridin (32/60/8, v/v/v) a dále se přidalo 200 μ l ethylesteru kyseliny chlormravenčí. K této směsi se přidal vodný roztok NaI (1 g/ml) a dvě kapky acetylchloridu.

^a foto autorky.

Vzorek byl ponechán 24 hodin v klidu při laboratorní teplotě a poté se přidal chlorid cínatý do odbarvení jódu. Vzniklá směs byla extrahována 0,4 ml dichlormethanu. Dichlormethanová fáze byla poté analyzována pomocí GC/MS¹⁵.

Schéma derivatizace a redukce (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (**X**) je na obr. 16.



Obr. 16: Derivatizace a redukce (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu.

5. VÝSLEDKY

5.1 Syntéza (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu

Syntézu (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (**X**) lze rozdělit celkem do čtyř kroků:

I. Redukce (*E*)-pent-3-enové kyseliny (pomocí LiAlH_4)

Výchozí látkou byla (*E*)-pent-3-enová kyselina (**XI**) (95% čistota), která má žádanou geometrickou konfiguraci (*E*) na dvojně vazbě. Tato sloučenina je komerčně dostupná. Redukčním činidlem byl lithium aluminium hydrid, který neovlivňuje (*E*) konfiguraci dvojně vazby a zároveň je schopen redukovat karboxylovou skupinu na skupinu hydroxylovou. Redukcí (*E*)-pent-3-enové kyseliny (**XI**) se podařilo získat (*E*)-pent-3-en-1-ol (**XII**) s výtěžkem 79 %. Tento produkt obsahoval i nepatrné množství (*Z*) izomeru (dle GC analýzy). Bod varu této kapaliny je 70-75°C (při 110 mm Hg). Při ověřování čistoty získaného produktu pomocí plynové chromatografie (GC/MS) byl získán chromatogram, který je uveden na obr. 17 (viz příloha) a hmotnostní spektrum, které je uvedeno na obr. 18 (viz příloha).

(*E*)-Pent-3-en-1-ol (**XII**) má molekulovou hmotnost 86 g/mol. Jeho hmotnostní spektrum je: 86 (1) 71 (19) 68 (32) 55,1 (25) 41 (35) 32 (100) 28 (16) (m/z, rel. %).

II. Bromace (*E*)-pent-3-en-1-olu za vzniku (*E*)-5-brompent-2-en

Alkoholová skupina je substituována bromem. K bromaci se používá brom navázaný na trifenylfosfin (Ph_3PBr), který je šetrnější vzhledem ke konfiguraci dvojně vazby (*E*). Vznikla čirá viskózní kapalina (*E*)-5-brompent-2-en (**XIII**) s výtěžkem 35 % a nepatrné množství (*Z*) izomeru. Při ověřování jeho čistoty pomocí plynové chromatografie (GC/MS) byly získány chromatogramy (*E*)-5-brompent-2-enu (**XIII**), které jsou uvedeny na obr. 19 a 21 (viz přílohy), a hmotnostní spektra, jejichž záznam je uveden na obr. 20 a 22 (viz přílohy).

(*E*)-5-Brompent-2-en (**XIII**) má molekulovou hmotnost 150 g/mol. Při použití ionizace nárazem elektronu (EI) bylo jeho hmotnostní spektrum: 149 (1,5) 148 (1,8) 95 (4,5) 81 (6) 69 (100) 67 (17) 55 (10,5) 39 (7,5) (m/z, rel. %). Při použití chemické ionizace (CI) bylo jeho hmotnostní spektrum: 151 (98) 149 (100) 108 (3,5) 94 (2,8) 83 (10,5) 81 (12) (m/z, rel. %). Tato spektra

obsahovala izotopické klastry typické pro monobromderiváty (brom se vyskytuje ve 2 izotopech, ^{79}Br a ^{81}Br), proto hmotnostní spektrum končí molekulovými ionty 151 (98) a 149 (100).

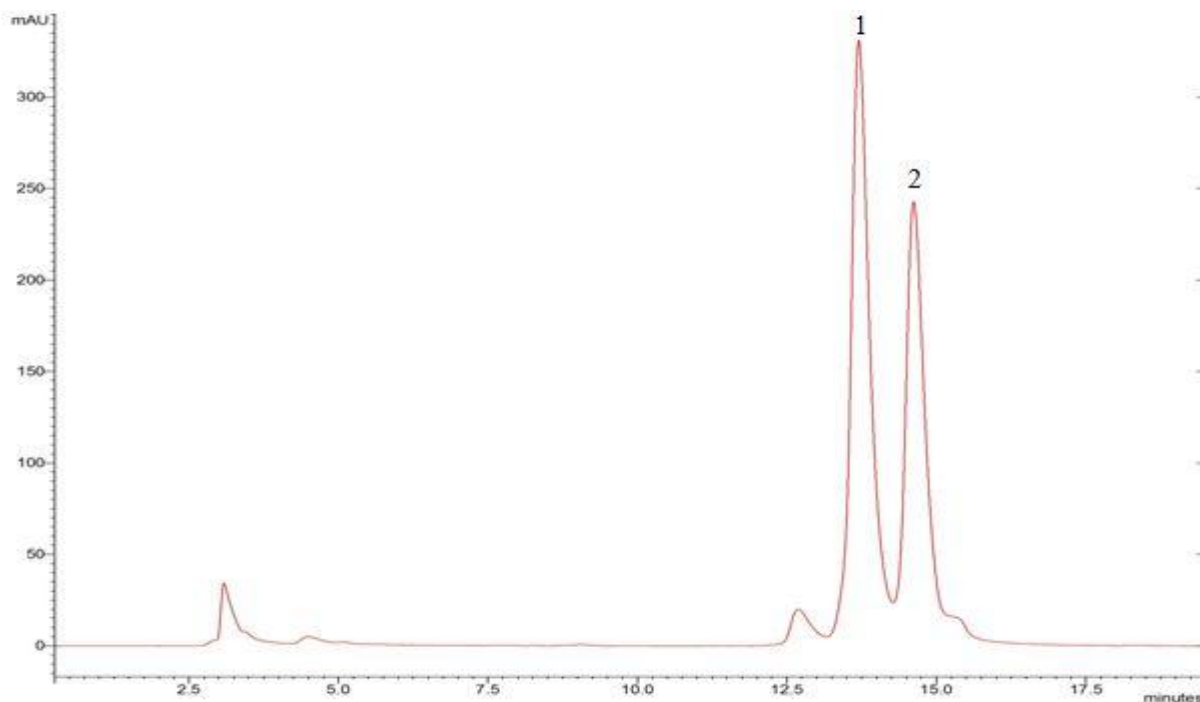
III. Reakce (*E*)-5-brompent-2-enu s L-cysteinem

Dochází k substituci za použití hydroxidu sodného, který vytváří sodnou sůl L-cysteinu. Sůl poté reaguje s (*E*)-5-brompent-2-enem (**XIII**) za vzniku (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu (**XIV**). Vznikl (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein (**XIV**) s 67% výtěžkem. Jeho čistota byla ověřena pomocí NMR spektrometrie. Bylo získáno ^1H NMR spektrum, které je uvedeno na obr. 23 (viz příloha) a hodnoty ^1H a ^{13}C chemických posunů jsou uvedeny v tabulce IV.

IV. Následná oxidace (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu za vzniku (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu

Oxidací (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu (**XIV**) peroxidem vodíku byla získána směs dvou diastereomerů (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) lišících se absolutní konfigurací na atomu síry.

Na obr. 24 je uveden HPLC chromatogram těchto látek. Výsledné diastereomery (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu byly poté odděleny pomocí preparativní HPLC/DAD. V přírodě se vyskytující diastereomer (R_C, S_S) byl eluován ve 14,8 minutě.



Obr. 24: Chromatogram produktů oxidace (čísky 1 a 2 jsou označeny diastereomery *S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu, jímána byla sloučenina označena číslem 2).

Čistota najímané látky byla kontrolována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Chromatogram najímané frakce je součástí přílohy na obr. 25. Tato sloučenina byla také spektrálně charakterizována pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). NMR spektrum (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) je na obr. 26 (viz příloha). V tab. IV jsou porovnány hodnoty chemických posunů (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) syntetizovaného v této práci s hodnotami posunů publikovanými pro tutéž sloučeninu získanou z cibule Tropea⁵. Dále jsou zaznamenány hodnoty ¹H a ¹³C chemických posunů (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu (**XIV**).

Tab. IV: Porovnání chemických posunů naměřených signálů.

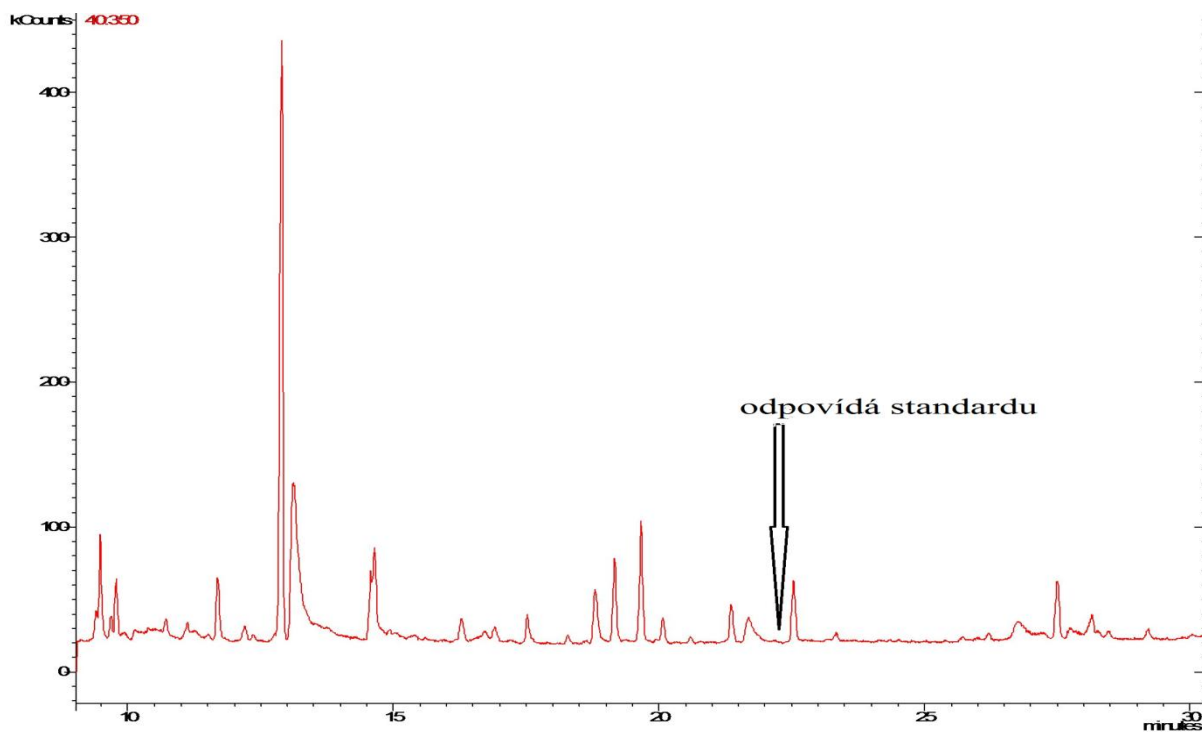
		1	2	3	5	6	7	8	9
(X)^a	¹ H		4,08	3,10	2,91	2,35	5,54	5,39	1,53
				3,33					
	¹³ C	171,7	50,9	51,0	52,2	25,2	127,0	129,1	17,3
(X)^b	¹ H		3,76	3,06	3,78	2,94	5,82	5,82	1,55
				3,40		3,06			
	¹³ C	173,2	55,0	54,3	53,8	33,7	132	120,4	18,0
(XIV)	¹ H		3,77	2,80	2,41	2,06	5,36	5,23	1,40
				2,91					
	¹³ C	172,3	53,3	31,8	31,7	31,4	127,8	129,1	17,2

^a Látka získaná v této práci (měřeno v D₂O). ^b Posuny uvedené pro látku **(X)** v práci Dini a spol. (měřeno v CD₃OD)⁵.

5.2 Stanovení (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu ve vzorku cibule *Tropeana Lunga*

Pro ověření přítomnosti (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu (**X**) v rostlině rodu *A. cepa* var. *tropea* byla použita plynová chromatografie s hmotnostní detektorem (GC/MS). Jako standard byl použit syntetizovaný (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxid (**X**) a vzorkem byl aminokyselinový extrakt z rostliny cibule *Tropeana Lunga* po derivatizaci ethyl chlormravenčanem.

Chromatogram aminokyselinového extraktu získaný při plynové chromatografii s hmotnostní detekcí (GC/MS) je uveden na obr. 27.



Obr. 27: Chromatogram aminokyselin obsažených ve vzorku cibule Tropeana Lunga.

Šipka v chromatogramu označuje místo, kde by se měl nacházet pík (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) (retenční čas 22,3 min). Z chromatogramu je jasné, že (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**) nebyl v analyzované rostlině cibule Tropeana Lunga přítomen.

6. DISKUZE

Pomocí čtyřkrokové organické syntézy a preparativní HPLC byl získán (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**), který byl použit jako standard při jeho stanovení v reálném vzorku cibule Tropea. Hodnoty chemických posunů NMR spekter získané ze syntetizovaného (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) byly porovnány s hodnotami uvedenými v literatuře⁵. Byly zjištěny určité rozdíly v chemických posunech jednotlivých signálů, které však mohly být způsobeny použitím rozdílných rozpouštědel při měření, které jsou zaznamenány v tab. IV. Z hodnot chemických posunů NMR spekter je jasné, že se jedná o (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**) objevený Dr. Dini a spol. v cibuli Tropea.

V cibuli Tropeana Lunga vypěstované v našich podmínkách nebyla prokázána přítomnost (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) identifikovaného v roce 2008 Dini a spol. v semenech cibule Tropea vypěstované v oblasti Kalábrie. Je možné, že přítomnost (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu (**X**) úzce souvisí s podmínkami, za kterých je rostlina pěstována, jako jsou například složení půdy, obsah živin v půdě a podnebí v dané oblasti.

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**). Tuto sloučeninu se podařilo získat pomocí čtyřkrokové syntézy a závěrečného přečištění pomocí preparativní HPLC. Identita této sloučeniny byla jednoznačně potvrzena pomocí ^1H a ^{13}C NMR spektrometrie.

Dalším cílem bylo vyvinout analytickou metodu pro stanovení této sloučeniny v reálných vzorcích konkrétně ve vzorku cibule *Tropeana Lunga*. Použitá metoda spočívá v derivatizaci ethyl-chlormravenčanem a následné analýze pomocí GC/MS. Touto metodou bylo zjištěno, že (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxid (**X**) nebyl v analyzovaném vzorku přítomen.

Výskyt této sирné sloučeniny v cibuli *Tropea* je předmětem dalšího zkoumání. Otázkou zůstává, zda je tato látka v cibuli *Tropea* skutečně přítomna. A pokud ano, zdali je její výskyt podmíněn místem, kde je tato cibule pěstována.

8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

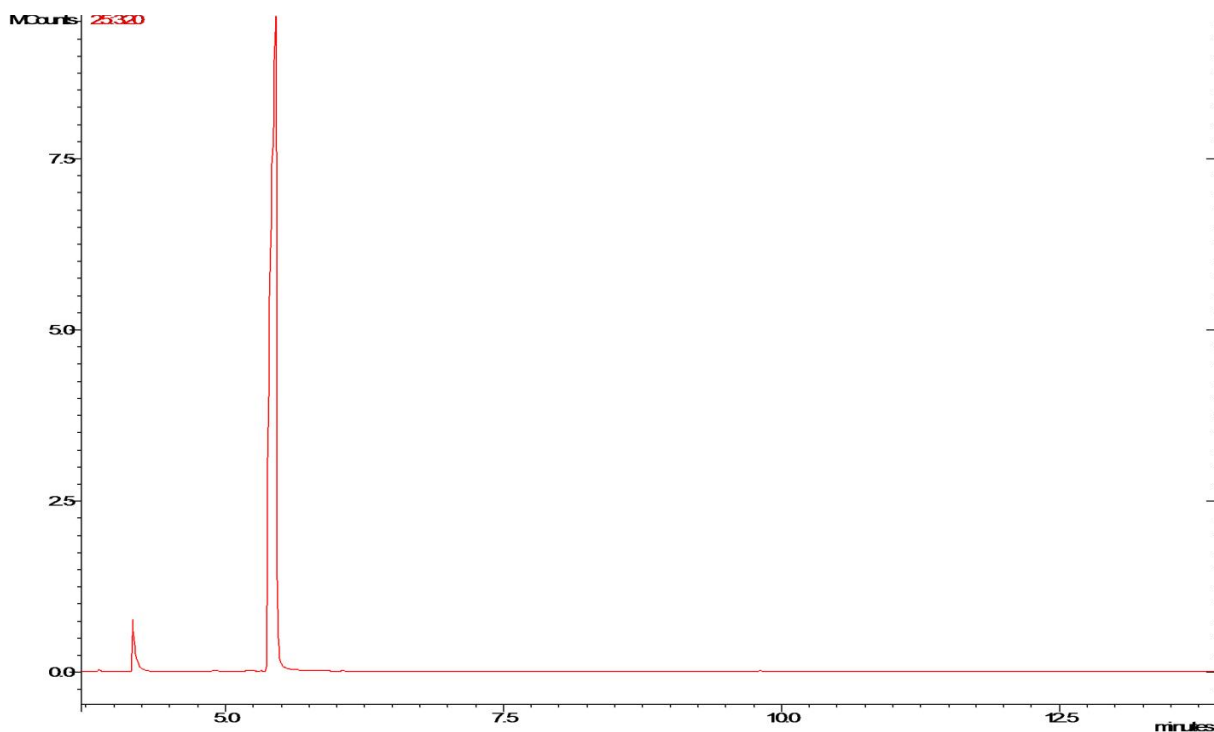
1. Rabinowitch H. D., Currah L.: *Allium Crop Science: Recent Advances*, 5, CAB International UK (2002).
2. [http://www.fao.org/FAOSTAT AGRICULTURE DATA-Agriculture Production](http://www.fao.org/FAOSTAT_AGRICULTURE_DATA-Agriculture_Production) [staženo dne: 2.11.2011]
3. <http://www.tropeaholiday.it/english/red-onion-of-tropea-features.php> [staženo dne: 20.12.2011]
4. Corea G., Fattoruso E., Lanzotti V., Capasso R., Izzo A. A.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 935 (2005).
5. Dini I., Tenore G. C., Dini A.: *J. Nat. Prod.* **71**, 2036 (2008).
6. Zveřejnění žádosti podle čl. 6 odst. 2 nařízení Rady (ES) č. 510/2006 o ochraně zeměpisných označení a označení původu zemědělských produktů a potravin
<file:///C:/Users/hp/Desktop/bakal%C3%A1%C5%99ka/Zverejneni-zadosti-cl-6-odst-2-narizeni-Rady,405160,d.htm>.
7. Furia E., Naccrato A., Sindona G., Stabile G., Tagarelli A.: *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8450 (2011).
8. <http://myfolia.com/plants/911-onion-allium-cepa-var-cepa/varieties/134463-tropeana-lunga> [staženo dne: 2.1.2012].
9. Brewster J. – L.: *Onions and other vegetable alliums*, 347, CAB International UK (2008).
10. Dini I., Tenore G. C., Dini A.: *Food Chem.* **107**, 613 (2008).
11. Krest I., Keusgen M.: *Planta Med.* **65**, 139 (1999).
12. Koppenhoefer B., Schurig V.: *Org. Synth.* **66**, 151 (1988).
13. Schwarz M., Oliver J. E., Sonnet P. E.: *J. Org. Chem.* **40**, 2410 (1975).
14. P. E. Sonnet: *Synthetic Commun.* **6**, 21 (1976).
15. Kubec R., Dadáková E.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 6957 (2009).

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

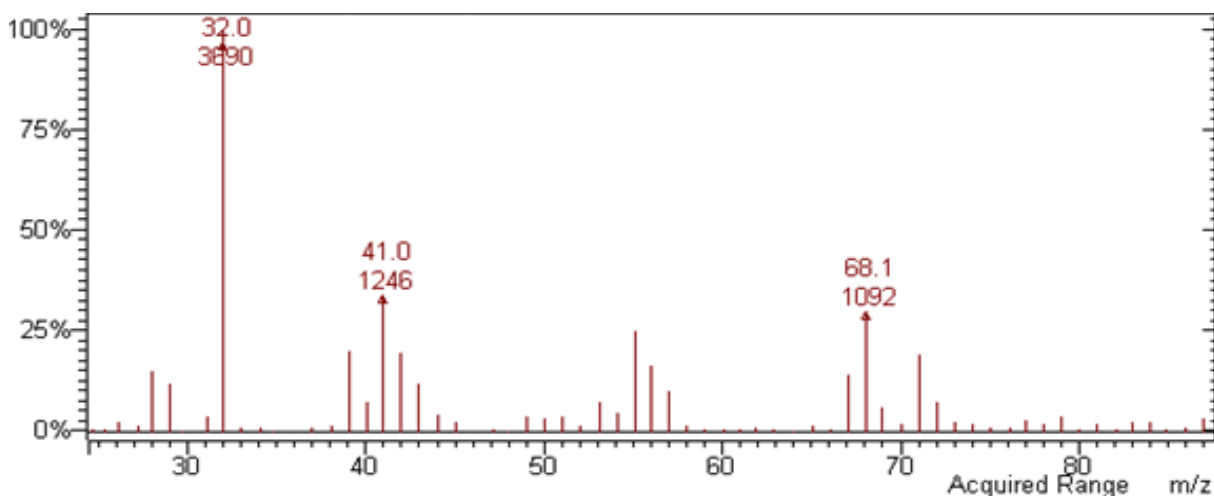
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
NMR	nukleární magnetická rezonance
MS	hmotnostní detekce
DAD	detektor diodového pole
EI	ionizace elektronovým nárazem
CI	chemická ionizace
RVO	rotační vakuová odparka

10. PŘÍLOHY

Při ověřování čistoty (*E*)-pent-3-en-1-olu pomocí plynové chromatografie (GC) byl získán chromatogram, který je na následujícím obrázku a pod ním následuje obrázek jeho hmotnostního spektra.

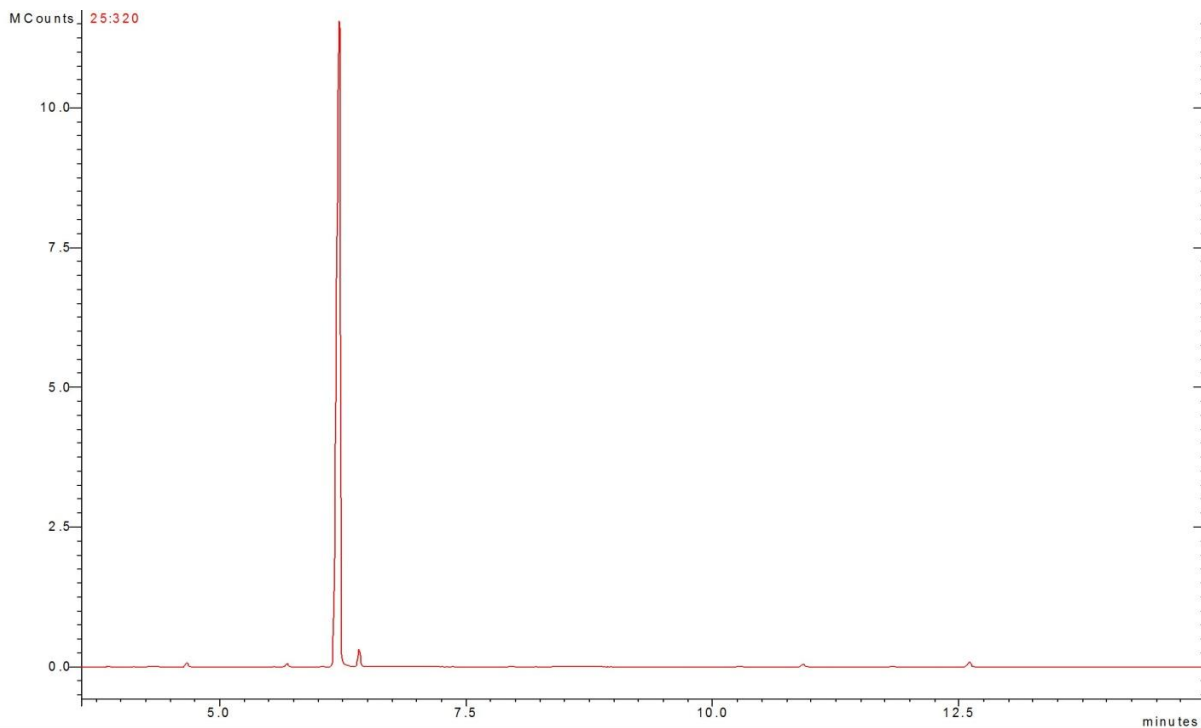


Obr. 17: GC chromatogram (*E*)-pent-3-en-1-olu.

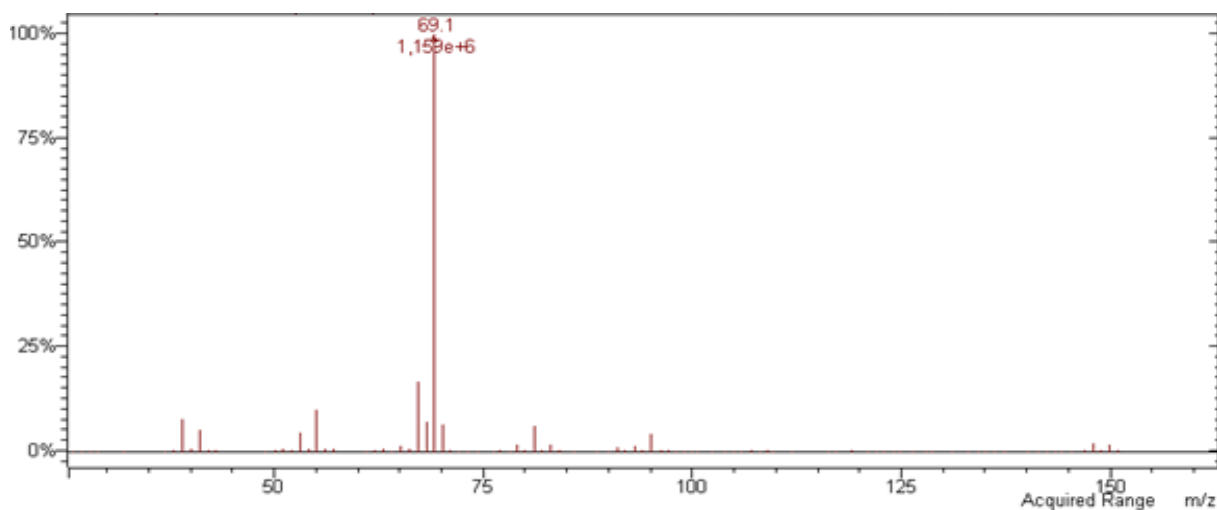


Obr. 18: Hmotnostní spektrum (*E*)-pent-3-en-1-olu za ionizace EI.

Při ověřování čistoty (*E*)-5-brompent-2-enu pomocí plynové chromatografie (GC) byl získán chromatogram, který je na následujícím obrázku a pod ním následuje obrázek jeho hmotnostního spektra.

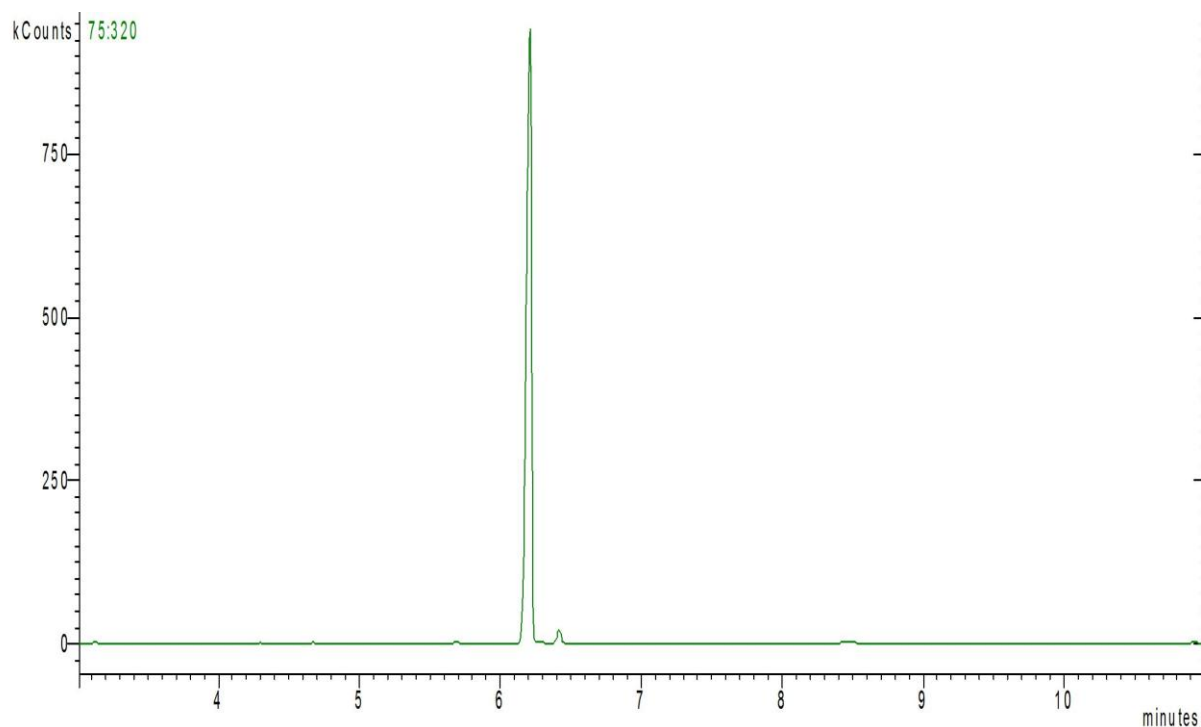


Obr. 19: GC chromatogram (*E*)-5-brompent-2-enu.

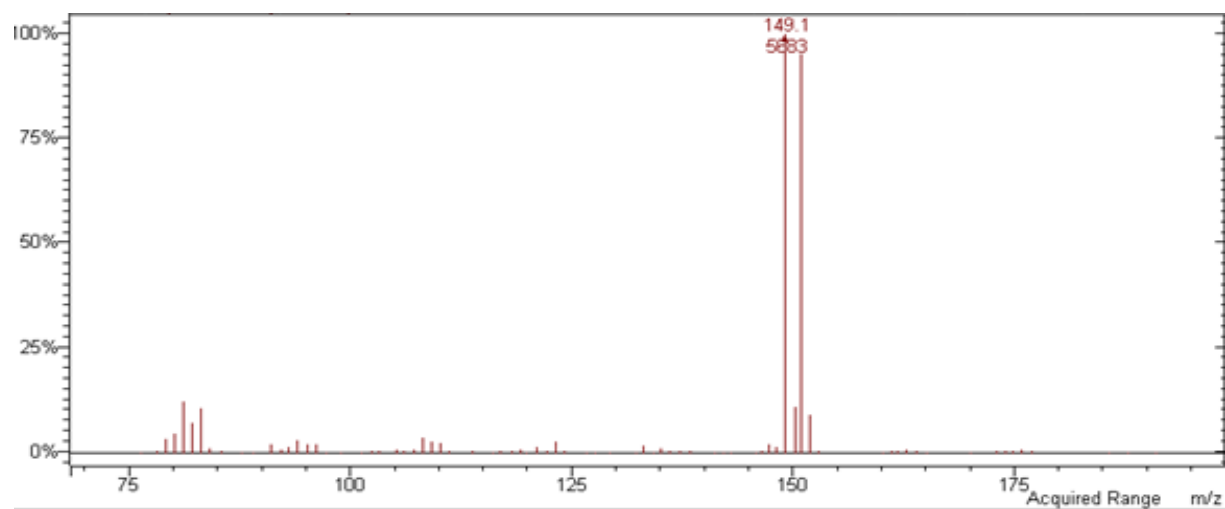


Obr. 20: Hmotnostní spektrum (*E*)-5-brompent-2-enu za ionizace EI.

Při ověřování čistoty (*E*)-5-brompent-2-enu pomocí plynové chromatografie (GC) byl získán chromatogram, který je na následujícím obrázku a pod ním následuje obrázek jeho hmotnostního spektra za použití chemické ionizace.

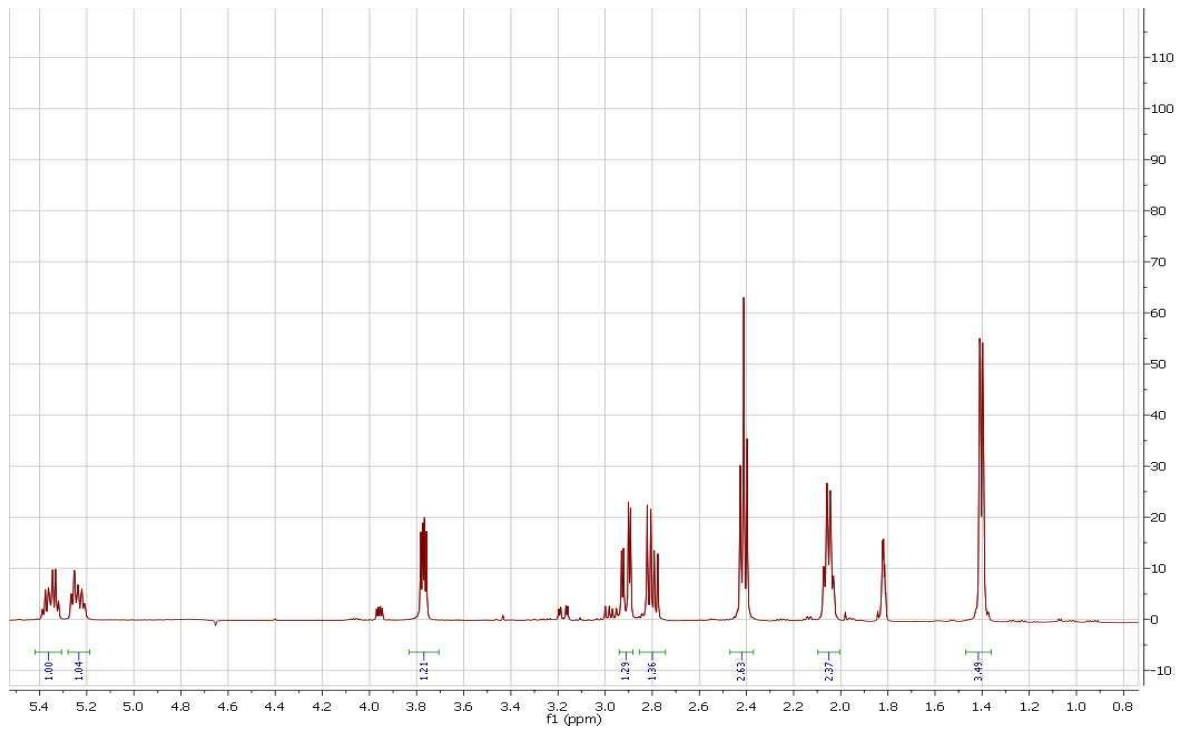


Obr. 21: GC chromatogram (*E*)-5-brompent-2-enu za ionizace CI.



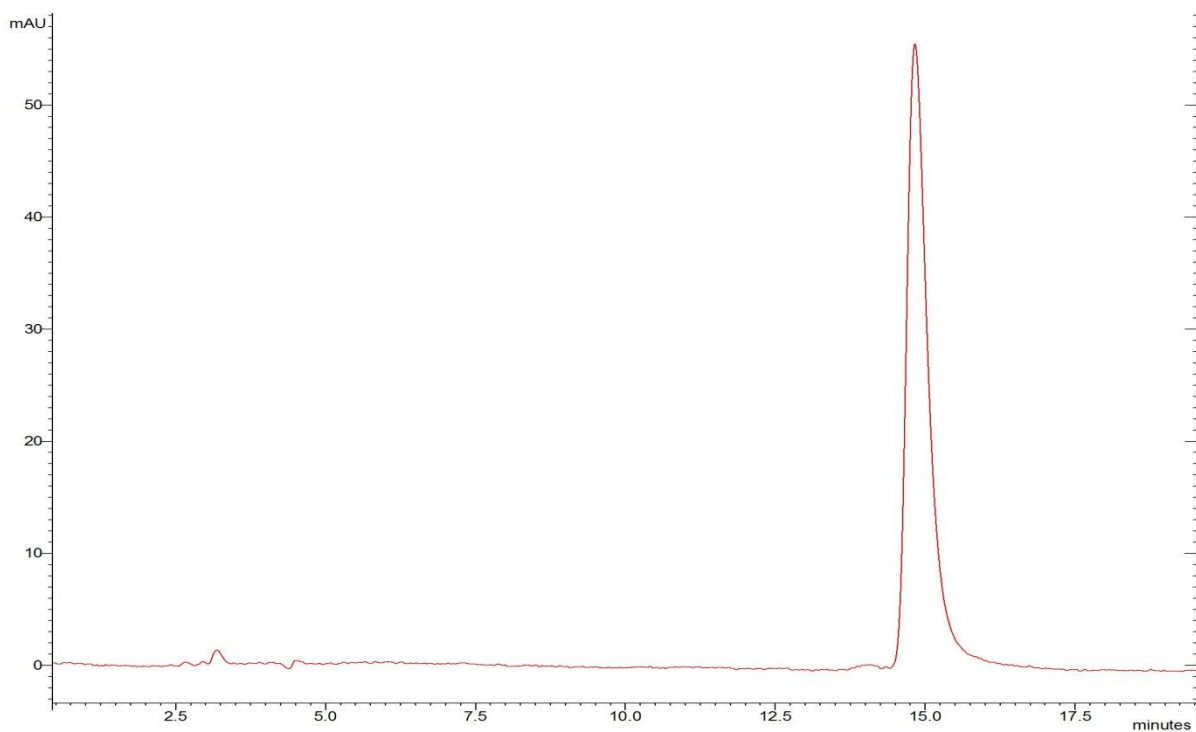
Obr. 22: Hmotnostní spektrum (*E*)-5-brompent-2-enu za ionizace CI.

Na obrázku 23 je NMR spektrum (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu.



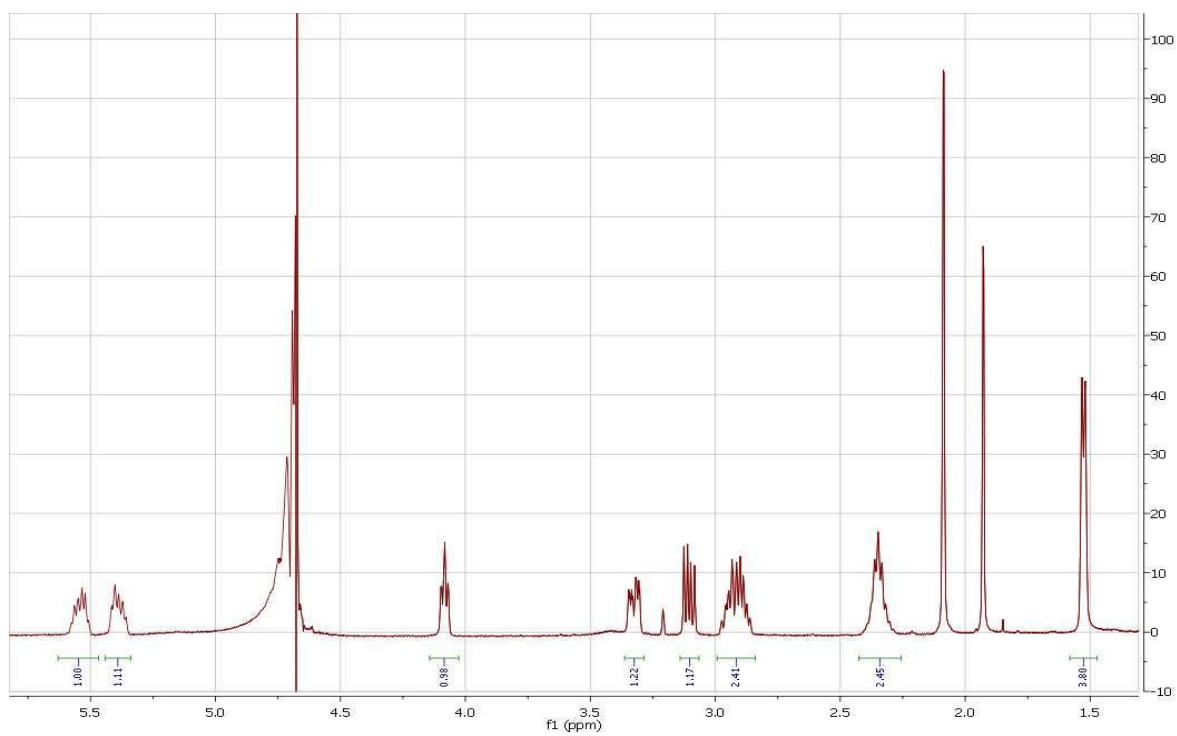
Obr. 23: NMR spektrum (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cysteinu.

Na obrázku 25 je chromatogram (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu získaný pomocí preparativní HPLC.



Obr. 25: HPLC chromatogram kontroly čistoty (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-L-cystein *S*-oxidu.

Na následujícím obrázku 26 je NMR spektrum (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu získaného při jeho syntéze.



Obr. 26: NMR spektrum (*E*)-*S*-(3-pentenyl)-*L*-cystein *S*-oxidu.