



Pedagogická  
fakulta  
Faculty  
of Education

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Pedagogická fakulta  
Katedra aplikované chemie

Diplomová práce

# Tvorba barevných látek při zpracování česnekovitých rostlin

Vypracoval: Bc. Petr Curko  
Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

České Budějovice 2016

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

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

V Českých Budějovicích dne 26. dubna 2016

Podpis

**Curko, P. (2016):** Tvorba barevných látek při zpracování česnekovitých rostlin. [Formation of color compounds during processing of alliaceous species. Master's thesis, in Czech]. 82 p., Faculty of Education, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Tato diplomová práce je zaměřena na studium barevných sloučenin vznikajících při zpracování česnekovitých rostlin, zejména pak při zpracování česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.) a česneku sicilského (*Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.).

Barevné látky vznikající v česnekovitých rostlinách významně snižují jejich senzoryckou kvalitu vnímanou konzumenty, a pro potravinářský průmysl tak představují poměrně velkou finanční zátěž. Zatímco během zpracování česneku kuchyňského dochází ke tvorbě především látek modrých a žlutých, během zpracování česneku sicilského vznikají látky růžové až červené.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na dvě rostliny rodu *Allium* L. – česnek kuchyňský a česnek sicilský, jejich význam, rozšíření a využití. Práce se dále zabývá mechanismem vzniku barevných látek, kterého se účastní zejména sirné sloučeniny.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na izolaci a identifikaci hlavních barevných sloučenin vznikajících během zpracování česnekovitých rostlin a navržení pravděpodobného mechanismu jejich tvorby.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** zelenání česneku kuchyňského, červenání česneku sicilského, *Allium sativum*, *Nectaroscordum siculum*

## **Annotation**

This Master's thesis is focused on study of color compounds formed during processing of alliaceous plants, especially during processing of garlic (*Allium sativum* L.) and Sicilian honey garlic (*Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.).

Color compounds formed in alliaceous plants significantly reduce their sensory quality perceived by consumers and represent a relatively significant financial burden for the food industry. While especially blue and yellow compounds are formed during processing of garlic, pink to red compounds are formed during processing of Sicilian honey garlic.

The theoretical part of the Master's thesis is focused on two plants of the genus *Allium* L. – garlic and Sicilian honey garlic, their significance, occurrence and usage. The study also discusses the mechanism of color compounds formation, that involves mainly sulfur compounds.

The experimental part of the Master's thesis is focused on isolation and identification of the most significant color compounds formed during processing of alliaceous species and proposal probable mechanism of their formation.

**KEY WORDS:** garlic greening, Sicilian honey garlic redding, *Allium sativum*, *Nectaroscordum siculum*

## Poděkování

Tímto bych srdečně poděkoval svému školiteli doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, nespočet cenných rad, jichž se mi od něho v průběhu studia dostávalo a především pak za jeho vysoké nároky na kvalitu odvedené práce. Velké poděkování také patří Mgr. Ivetě Štefanové a Mgr. Kristýně Kupcové za nesmírnou pomoc při několika časově náročnějších experimentech a za vytvoření příjemného a inspirativního pracovního prostředí.

Dále bych poděkoval paní Mgr. Julii Olejníčkové, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity za asistenci při spektrofotometrické analýze, Ing. Petře Urajové, Ph.D. z MBÚ AV ČR v Třeboni a doktoru Josepu Vicentu Rubertu Bassedasovi z Ústavu analýzy potravin a výživy Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za spolupráci při MS analýzách a v neposlední řadě Jakubu Zápalovi z MBÚ AV ČR v Praze za spolupráci při analýzách NMR.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>4</b>
3.1	Historie rodu <i>Allium</i> .....	4
3.2	Charakteristika rodu <i>Allium</i> .....	5
3.3	Zařazení do systému .....	7
3.4	Česnek kuchyňský ( <i>Allium sativum</i> ) .....	8
3.4.1	Základní charakteristika .....	8
3.4.2	Využití česneku kuchyňského.....	9
3.5	Česnek sicilský ( <i>Nectaroscordum siculum</i> ) .....	11
3.5.1	Základní charakteristika .....	11
3.5.2	Využití česneku sicilského.....	12
3.6	Sírné sloučeniny v rostlinách rodu <i>Allium</i> .....	14
3.6.1	Sírné aminokyseliny přítomné v česnekovitých rostlinách.....	14
3.6.2	Alliinasa .....	16
3.6.3	Tvorba senzoricky aktivních sloučenin.....	16
3.6.4	Sekundární reakce thiosulfínátů.....	20
3.6.5	Tvorba barevných sloučenin .....	21
3.6.6	Redukce tvorby zbarvení při technologickém zpracování .....	29
<b>4</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>31</b>
4.1	Použité chemikálie a materiály.....	31
4.2	Přístroje .....	32
4.3	Gradientsy využívané v kapalinové chromatografii (HPLC) .....	34
4.4	Postupy spojené se studiem tvorby barevných látek v česneku kuchyňském a česneku sicilském .....	36
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>44</b>
5.1	Tvorba barevných sloučenin v česneku kuchyňském .....	44
5.1.1	Změna zastoupení barevných látek v čase .....	44
5.1.2	Vliv pH na probíhající barevné změny .....	46
5.1.3	UHPLC-HRMS/MS identifikace hlavních barevných sloučenin .....	49
5.1.4	Stanovení struktury látky G-371 .....	53
5.1.5	Pravděpodobné struktury hlavních barevných sloučenin.....	55

5.1.6	Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku kuchyňském .....	59
5.1.7	Testování protirakovinné aktivity sloučeniny G-371.....	61
5.2	Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském .....	64
5.2.1	Izolace barevných látek vznikajících v česneku sicilském .....	64
5.2.2	Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku sicilském .....	66
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Příloha.....</b>	<b>I</b>

# 1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Vypracovat literární rešerši se zaměřením na současný stav botanického a chemického poznání v souvislosti s rostlinami česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) a česnek sicilský (*Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.).
- Izolovat a identifikovat nejdůležitější barevné látky vznikající v těchto rostlinách při jejich dlouhodobém uchovávání nebo při jejich potravinářském zpracování.
- Navrhnout předpokládaný mechanismus tvorby barevných látek v česneku kuchyňském a v česneku sicilském.



## 2 Úvod

V posledních letech je možné na mnoha úrovních lidské činnosti zaznamenat velmi zajímavý trend, který se dá charakterizovat pojmem návrat k přírodním produktům. Lidé se stále více zajímají o suroviny přírodního charakteru, intenzivně se hovoří o tradičních a mnoha lety ověřených postupech v lidovém léčitelství a pominout nelze ani narůstající zájem o kulinářství, při kterém se využívají pokud možno co nejčerstvější suroviny.

S tímto vývojem pak přímo koresponduje neustále se zvyšující poptávka po česnekovité zelenině. Především česnek, cibule a pór patří k rostlinám, jež se staly naprosto nedílnou součástí potravinářského průmyslu. Konzumenti si česnekovité rostliny cení zejména pro jejich specifické sensorické vlastnosti, jakými jsou aroma a chuť, ale nezanedbatelnou roli zde určitě hraje i pozitivní vliv na lidský organismus. Vždyť o vlastnostech antimikrobiálních, protiplísňových nebo léčivých věděli už i naši dávní předkové.

Celosvětová roční produkce česneku kuchyňského činí dle posledních údajů z roku 2014 více než 47 milionů tun, přičemž jeho největším producentem je s drtivou převahou Čínská lidová republika. Ta vypěstuje 20 milionů tun česneku za rok, což v globálním měřítku činí 42 % jeho veškeré produkce. Na druhém místě se s poměrně významným odstupem nachází Indie, která ročně vypěstuje 1,15 milionu tun (v globálním měřítku přibližně 2 %) této zeleniny.<sup>1</sup> Většina domácí produkce zmíněných dominantních pěstitelů česneku směřuje na export, jenž nezřídka tvoří poměrně významnou část jejich hrubého domácího produktu. Jelikož ale náklady na dopravu neustále rostou, zpravidla se tak česnek určený pro další výrobu nevyváží v podobě původní, nýbrž ve formě sušeného prášku či granulí. Zde ale vyvstává problém. Během dlouhého skladování či dehydratace česneku spojené s jeho zpracováním totiž dochází ke tvorbě barevných sloučenin, jež významně snižují jakostní hodnotu této suroviny.

Zatímco česnek kuchyňský se těší oblibě celosvětové, v jihovýchodní Evropě, především pak na území Bulharska, se můžeme setkat s méně známým česnekem sicilským. Milovníci chuťově výrazných pokrmů z balkánských zemí nedají dopustit na samardalu, kořenící směs vyráběnou smícháním sušených částí česneku sicilského

a soli. I v tomto případě ale hrozí potenciální vznik barevných látek snižujících organoleptické vlastnosti potraviny.

Barevné látky vznikající v česneku sicilském se vyznačují zbarvením červeným, kdežto u sloučenin tvořících se v česneku kuchyňském dominuje především barva modrá až zelená. V současné době ještě stále není vyvinut dostatečně levný a technologicky nenáročný postup, který by vzniku barevných látek dokázal zabránit. Doposud využívané metody se vyznačují mnoha neduhy. Dehydratace za vysokých teplot, jež dokáže tvorbu barevných látek eliminovat, vede ke ztrátě ceněných sensorických vlastností. Podobně je na tom i metoda využívající okyselení suroviny slabými organickými kyselinami (například kyselinou octovou nebo citronovou). K omezení vzniku nežádoucího zbarvení se také může použít přídavek cysteinu. Tímto způsobem ošetřená surovina se ale vyznačuje přítomností nepříjemného sirného zápachu.

Cílem této diplomové práce bylo identifikovat významné barevné látky vznikající v česneku kuchyňském a česneku sicilském a popsat mechanismus jejich vzniku. Takto získané informace by mohly vést k navržení efektivního způsobu zabránění jejich tvorby při zpracování vybraných česnekovitých rostlin. Pokud tedy takový způsob vůbec existuje.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Historie rodu *Allium*

Z pohledu člověka patří rod *Allium* L. mezi jednu z nejvýznamnějších taxonomických jednotek v rámci krytosemenných jednoděložných rostlin. Vždyť zmínky o česneku kuchyňském můžeme najít dokonce v Bibli nebo Koránu – tedy dílech, jež měly nezastupitelný význam při formování lidských dějin. Latinské rodové označení *Allium* má své kořeny v řeckém slově „αλεω (aleo),“ které odkazuje na výrazné sensorické vlastnosti česnekovitých rostlin. V keltštině se zase vyskytoval pojem „all,“ jenž by se dal do češtiny přeložit jako pálivý.

Původ česnekovitých rostlin zůstává dodnes zahalen tajemstvím, ale podle nastřádaných dat dokázali botanici vymežit nejpravděpodobnější území, na kterých byly tyto rostliny poprvé pěstovány pro hospodářské využití. Jednalo se o hornaté oblasti dnešních států Turkmenistán, Uzbekistán, Írán a Afghánistán v době před více než 5 500 lety. Po obchodních stezkách se pak rostliny rodu *Allium* šířily v podobě cenných komodit vesměs všemi světovými směry, aby se z nich postupně stala téměř nenahraditelná surovina.<sup>2</sup>

Česnek kuchyňský (*Allium sativum*) se nejspíše vyvinul z planého druhu *Allium longicuspis* v oblasti Střední Asie, odkud byl posléze převezen do Mezopotámie, ze které se přes Etiopii dostal až do starověkého Egypta. Zde si velmi rychle vydobyl oblibu napříč všemi sociálními vrstvami obyvatel.<sup>3</sup> Mezi nesmírně významný archeobotanický zdroj informací o rané historii česnekovitých rostlin patří Harrisův papyrus. 40 m dlouhé a 42,5 cm široké dílo, jež nechal ve 12. století před naším letopočtem sepsat panovník Ramesse IV. Nachází se zde bohatý seznam darů, které jeho zavražděný otec Ramesse III. věnoval za svého života chrámům. V tomto prameni sociokulturního a hospodářského poznání je česnek zmíněn nesčetněkrát. Podle dostupných informací se česnekový extrakt využíval v dobách faraónů dokonce i při mumifikaci těl zesnulých a také jako jeden z mnoha cenných darů na věčnou pouť posmrtným životem. Stopy po česnekovém balzámu byly dokonce zaznamenány i ve slavné Tutanchamonově hrobce. Historikům se při několika archeologických odkryvech podařilo dokonce nalézt a zdokumentovat česnekové palice vyrobené z hlíny (obrázek 1), což svědčí o důležitosti česneku pro tamní lid.<sup>4</sup> K rozšíření

česnekovitých rostlin v období středověku se pak velkou měrou přičinil známý benátský kupec a cestovatel Marco Polo při svých výpravách směrem na východ.<sup>2</sup>



Obrázek 1 – Hliněné česnekové stroužky nalezené v egyptských hrobkách

O původu česneku sicilského (*Nectaroscordum siculum*) máme v tomto směru velmi sporadické informace, ale podle dostupných zdrojů pochází tato rostlina z podobné oblasti jako její známější příbuzný. Odtud se posléze rozšířila především do států jihovýchodní Evropy. Poměrně hojná je ale i v Itálii a oblastech jižní Francie.<sup>5</sup>

### 3.2 Charakteristika rodu *Allium*

Zatímco první monografie věnující se rodu *Allium* publikovaná v 70. letech 19. století popisovala 250 druhů česnekovitých rostlin, v současné době je popsáno druhů více než 1 000.<sup>6</sup> Rod *Allium* je tak jeden z nejpočetnějších rodů jednoděložných krytosemenných rostlin vůbec. Většinu jeho zástupců nacházíme na severní polokouli, přičemž výjimku tvoří *Allium dregeanum* rostoucí na území Jihoafrické republiky. Z dalších česnekovitých rostlin vyskytujících se na africkém kontinentu můžeme jmenovat rody *Agapanthus* nebo *Tulbaghia*.<sup>7,8,9</sup> Pro region Jižní Ameriky jsou zase typické rody *Leucocoryne* či *Nothoscordum*.<sup>10</sup> Jako nejbohatší oblast, co se výskytu a rozmanitosti česnekovitých rostlin týče, je botaniky označována Střední Asie, ve které si jejich pěstování vybudovalo dlouholetou tradici. Další poměrně významnou lokalitu rozšíření česnekovitých rostlin představuje severoamerický kontinent. Nejedná se o překvapivé údaje, neboť většina zástupců rodu *Allium* preferuje pro svůj růst dobře osluněné oblasti s mírně sušší půdou a přiměřeně vlhkým podnebím.

Z botanického hlediska se zástupci rodu *Allium* řadí mezi trvalky, eventuálně rostliny dvouleté, jež jsou charakterizovány výskytem rozmanitých cibulek. Cibule (ve smyslu zásobního orgánu) se fylogeneticky vyvinula postupnou přeměnou dolní části stonku a listů při jejich bázi. Stavba cibulí je buď celistvá, jednoduchá (cibule kuchyňská), nebo složená (česnek kuchyňský). Mezi základní funkce cibulek patří akumulace celé řady metabolitů v období, kdy v rostlinných buňkách může probíhat fotosyntéza. Při nástupu negativních podmínek pro život rostliny dochází k odumření nadzemního zeleného prýtu a rostlina vstupuje do klidové fáze (období dormance). Po jejím skončení se začnou v cibulích uložené metabolity katalyticky štěpit za vzniku látek, které jsou nezbytné pro výstavbu nových pletiv. Cibule mimo jiné slouží i k nepohlavnímu (vegetativnímu) rozmnožování.

Nadzemní část česnekovitých rostlin má pro tuto taxonomickou skupinu typický charakter. Pochvy listů se souběžnou žilnatinou pokrývají přibližně třetinu až polovinu délky dužnaté lodyhy. Poměrně úzké listy bývají jednoduché, ve vzácných případech se ale můžeme setkat i s listy řapíkatými. Při bližším prozkoumání květů bychom mohli vypožorovat, že se většinou jedná o rostliny jednodomé. Oboupohlavné květy nerostou na stoncích samostatně, ale tvoří květenství, které se pro zjednodušení označuje jako okolík (obrázek 2). Tato informace ale není z botanického hlediska úplně přesná. Ve skutečnosti se totiž jedná o vrcholičnaté květenství nazývané šroubel se zkráceným vřetenem. Zatímco v případě hroznovitého okolíku vyrůstají všechny květy z jednoho bodu, v případě šroubele má základ květenství charakter spirálovitý. Gyneceum se skládá ze tří plodolistů vzájemně srostlých, hovoříme o něm tedy jako o cenokarpním. Srůst jednotlivých plodolistů je charakteru apokarpního – během ontogeneze tedy dochází k jejich bočnímu spojení za tvorby vícepouzdrého semeníku. Okolo gynecea vyrůstá šest tyčinek ve dvou přeslenech tvořících uspořádání tři + tři. Plodem je tobolka (plod suchý a pukavý).<sup>2,6,11</sup>



Obrázek 2 – Detail květenství *Nectaroscordum siculum*

### 3.3 Zařazení do systému

Taxonomické zařazení rodu *Allium* zaznamenalo v posledních letech poměrně výrazné změny, což může v některých případech vést k obtížnější orientaci při studiu literatury staršího data vydání. Současný botanický systém byl vytvořen skupinou odborníků zvaných Angiosperm Phylogeny Group (APG), jež usiluje o pokud možno co nejpřesnější systematické vymezení krytosemenných rostlin. Zatímco dříve hrály při zařazování rostlin do taxonomických jednotek primární roli znaky morfologické, s rozvojem biochemických technik mají pro botaniky největší vypovídající hodnotu znaky genetické. Významným milníkem pro systém krytosemenných rostlin se stal rok 2009, ve kterém došlo k nahrazení doposud využívaného systému APG II modernějším systémem APG III.<sup>12,13</sup> Použití novějšího systému je odborníky sice doporučováno, ale řada autorů se dodnes odkazuje na systém APG II, který nebyl úplně zrušen. Pro srovnání je tedy uvedeno zařazení rodu *Allium* podle obou systémů:

#### Systém APG II:

říše: rostliny (*Plantae*)

klad: krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiosperms*)

klad: jednoděložné (*Liliopsida, Monocots*)

řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

čeleď: česnekovité (*Alliaceae*)

rod: *Allium*

#### Systém APG III:

říše: rostliny (*Plantae*)

klad: krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiosperms*)

klad: jednoděložné (*Liliopsida, Monocots*)

řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

čeleď: amarylkovité (*Amaryllidaceae*)

podčeleď: česnekové (*Alloideae*)

rod: *Allium*

Ze srovnání obou systémů je možné vypožorovat, že zatímco dříve tvořily česnekovité rostliny vlastní čeleď, v současném botanickém uspořádání se jedná o podčeleď česnekové (*Alloideae*) spadající do čeledi rostlin amarylkovitých (*Amaryllidaceae*). Tato změna ale nemusí být konečná, jelikož v odborné veřejnosti se už objevují zmínky o připravovaném systému APG IV.<sup>14,15</sup>

### 3.4 Česnek kuchyňský (*Allium sativum*)

#### 3.4.1 Základní charakteristika

Latinský název česneku kuchyňského *Allium sativum* L. (obrázek 3) pochází z roku 1753 a poprvé ho ve svém díle *Species Plantarum* použil švédský přírodovědec Carl Linné.<sup>16</sup> České pojmenování této zeleniny vychází ze slovanského slova „čes,“



jež tvoří základ slovesa česat. Jedná se o trvalku dorůstající až do výšky 1,2 metru, která je pěstována zejména pro své typické cibulky. Pro optimální vývoj česneku je ideální půda oligotrofní s menším obsahem vlhkosti. Stlačeně kulovité cibulky jsou většinou tvořeny několika dužnatými šupinami (stroužky), jež jsou kryty společným obalem bílé až narůžovělé barvy. Ze spodní části cibulky vyrůstají svazčité (adventivní) kořeny, z horní části stonků oblého průřezu, jenž je přibližně do poloviny kryt pochvami listů. Ty jsou jednoduché a přisedlé.<sup>17</sup>

Obrázek 3 – Česnek kuchyňský (*Allium sativum*)

Oboupohlavné květy jsou pravidelně uspořádány ve vrcholičnatém květenství šroubel se zkráceným vřetenem, jehož součástí nezřídka bývají specifické útvary zvané pacibulky. Pacibulka (*bulbillus*) je struktura vznikající ztloustnutím květního

pupenu, z níž po opadu vyrůstá nová rostlina. Ačkoliv bývají pacibulky česnekovitých rostlin součástí květenství, jedná se paradoxně o orgán sloužící k rozmnožování nepohlavnímu. Okvětí česneku kuchyňského se skládá z šesti drobných okvětních lístků většinou nazelenalé až růžové barvy. Gyneceum se sestává ze tří srostlých plodolistů. Plodem je tobolka.<sup>18</sup>

Česnek kuchyňský je chovateli včel považován za kvalitní pylodárnou a nektarodárnou rostlinu. Medníky česneku dokáží vyprodukovat 0,33 mg nektaru za 24 hodin.<sup>19</sup> I přes tvorbu květů se ale naprostá většina hospodářsky významných odrůd česneku pěstuje vegetativně ze stroužků či pacibulek, neboť jejich květy zpravidla nedokáží vyprodukovat semena. Podle odborné literatury se jedná o výsledek šlechtitelské práce dávných pěstitelů, kteří v jednotlivých generacích upřednostňovali rané odrůdy česneku s relativně velkými cibulkami. Dnes pěstované rostliny tak veškerou energii věnují vývoji cibulek na úkor plnohodnotného vývoje květů. Tato situace tak ztěžuje práci šlechtitelům, kteří se při snaze získat nové odrůdy musí spoléhat zejména na mutační změny vedoucí ke zvýšení variability znaků.<sup>20</sup>

### 3.4.2 Využití česneku kuchyňského

Pro svou typickou štiplavou chuť je česnek téměř po celém světě využíván především pro přípravu rozmanitých pokrmů. Z rostliny se většinou konzumují cibulky, ale výjimkou není ani využití zelených částí, které nemají tak výrazné senzorické vlastnosti. V případě konzumace nadzemního prýtu se rostliny sklízí nedozrálé a následně se prodávají jako takzvaný česnek zelený. Nalezli bychom ho zejména v kuchyni států jihovýchodní Asie (např. Vietnam, Laos, Kambodža).<sup>21</sup>

V rámci kulinářství prochází česnek vesměs všemi myslitelnými úpravami od dušení, vaření, pečení až po smažení. Hojně využití nachází i při výrobě kořenících směsí, past, omáček nebo dresinků. Za zmínku pak určitě stojí některé jeho netradiční úpravy. Při jedné z nich vzniká pochutina nazývaná černý česnek, o níž se v poslední době začíná velmi hojně diskutovat. Tento česnek původem z jihovýchodní Asie se připravuje několikátýdenním skladováním v boxech o teplotě kolem 70 °C. Během této doby dochází v jednotlivých stroužcích k Maillardovým reakcím, při nichž reagují redukující sacharidy s bílkovinami či aminokyselinami za vzniku typicky barevných



látek. Na obrázku 4 je demonstrována postupná změna zbarvení česnekové palice.



Obrázek 4 – Barevné změny česnekových stroužků způsobené Maillardovými reakcemi

Po dvou týdnech důkladného sušení je možné pozorovat hnědavé zbarvení, jež se po dalších dvou týdnech mění až v barvu černou. Kromě velmi specifického vzhledu získá tímto způsobem upravený česnek mimo jiné i typicky nasládlou chuť. Během inkubace dochází ve stroužcích ke snížení pH, zvýšení obsahu monosacharidů a nárůstu jeho antioxidačních účinků.<sup>22</sup>

S dalším poměrně netradičním zpracováním česneku se můžeme ve velké míře setkat především v severních oblastech Čínské lidové republiky v rámci takzvaného „Laba“ festivalu. „Laba“ znamená 8. den v prosinci čínského lunárního kalendáře. Festival ve své původní podobě sloužil k uctění památky zesnulých a k modlitbám směřovaných půdě a nebesům za bohatou úrodu, popřípadě za štěstí pro svou rodinu v nově přichozím roce. Festival také silně koreluje s buddhismem, neboť právě 8. prosincového dne dosáhl Sakyamuni buddhovství.<sup>23</sup> Mezi hlavní jídlo festivalu patří „Laba“ česnek (obrázek 5). Pokrm připravovaný máčením česneku v octě po dobu asi



Obrázek 5 – „Laba“ česnek konzumovaný v rámci „Laba“ festivalu

20 dnů, během nichž česnekové stroužky zezelenají a poté se jako mírně pikantní pochutina podávají při oslavách čínského Nového roku.<sup>24</sup> Černý a „Laba“ česnek tak představují jedny z mála úprav, při kterých je změna zbarvení stroužků žádoucí.

Vedle potravinářského využití má česnek svůj nezastupitelný význam i v medicíně, ať už ve formě potravinových doplňků nebo v rámci tradičního domácího léčitelství. Celosvětově se využívá především pro své antivirové,<sup>25</sup> antibakteriální,<sup>26</sup> antifungální<sup>27</sup> a antihypertenzivní<sup>28</sup> účinky. Své uplatnění tak nachází například při léčbě bronchitidy, chřipky, rýmy, plísňových infekcí, hnisavých zánětů nebo vysokého krevního tlaku. Znalosti týkající se antibakteriálních účinků přírodních látek začínají být v posledních letech velmi ceněné, neboť lékaři stále častěji zaznamenávají multirezistenci bakterií způsobenou nadužíváním komerčních antibiotik.<sup>29</sup> Vývoj zcela nových preparátů je pro farmakologické firmy nesmírně náročný nejen po časové, ale především po finanční stránce.

### 3.5 Česnek sicilský (*Nectaroscordum siculum*)

#### 3.5.1 Základní charakteristika

Česnek sicilský (*Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.) byl dlouhou dobu řazen přímo do rodu *Allium* a v rámci odborné biologické nomenklatury ho bylo možné dohledat pod názvy *Allium bulgaricum*, *Allium dioscorides*, *Allium meliophilum*, *Allium nectaroscordum* nebo *Allium siculum*. Na základě analýz ribozomální DNA provedených u téměř 200 česnekovitých rostlin byl však při tvorbě aktuálního botanického systému APG III vyčleněn z rodu *Allium* podrod *Nectaroscordum*, jenž v současné době obsahuje pouze dva druhy – *Nectaroscordum siculum* a *Nectaroscordum tripedale*.<sup>30</sup>

První zmínky o česneku sicilském pocházejí z roku 1793, ve kterém byl odborně popsán italským botanikem Bernardinem Ucriou.<sup>31</sup> Jedná se o poměrně mohutnou rostlinu dosahující výšky kolem 120 cm. Její cibulky jsou jednoduché, nesegmentované, s průměrem kolem 30 mm. Spodní polovina stonku je ukryta v pochvě vrchního listu se souběžnou žilnatinou, který má na řezu typický trojúhelníkovitý profil.<sup>32</sup> Oboupohlavné květy bývají většinou bělavé s nachově

červeným nebo zeleným nádechem (obrázek 6). Na jednotlivá květní lůžka vždy



nasedá synkarpní gyneceum vzniklé srůstem tří plodolistů, jež je obklopeno šesti tyčinkami ve dvou kruzích (tři a tři). Mezi zajímavost u česneku sicilského patří postupné otáčení květních stopek, které při dozrávání pozvolna klesají směrem k zemi. Šroubelovité květenství má tak na začátku generativního období odlišnou podobu od jeho konce, což s sebou přináší originální estetický prvek při pěstování rostliny pro okrasné účely. Květy se objevují na přelomu jara a léta.<sup>33</sup>

Obrázek 6 – *Nectaroscordum siculum*

Výskyt česneku sicilského je situován především do teplejších oblastí jižní a jihovýchodní Evropy. Volně roste na území jižní Francie, severní Itálie, Rumunska, Bulharska a Turecka. Pro svůj růst nemá nikterak specifické nároky. K nalezení bývá na stinných lokalitách sušších oligotrofních půd spíše vápenatého charakteru, ale daří se mu i na půdách kyselějších. Jistou nevýhodou česneku sicilského může být relativně menší konkurenceschopnost mladé rostliny v počátečních fázích růstu. První dva roky ontogenetického vývoje jsou totiž přírůstky této trvalky velmi pozvolné, a tak nemůže příliš konkurovat rostlinám na půdách s vyšším obsahem živin. Navíc aby mohla semena česneku sicilského vyklíčit, musí na ně po delší dobu působit nižší teploty. Tento jev je odborně označován jako jarovizace.<sup>34</sup>

### 3.5.2 Využití česneku sicilského

Pro své dekorativní vlastnosti v podobě líbivých květů stoupá v posledních letech obliba této rostliny zejména mezi zahrádkáři. Česnek sicilský je ale také charakteristický svými vlastnostmi sensorickými. Díky poměrně výrazné chuti a vůni je využíván pro přípravu mnoha druhů pokrmů, a to zejména na území Bulharska, kde se dá téměř na každém trhu zakoupit kořenící směs pod označením samardala.<sup>5</sup> Ta se

připravuje smícháním usušených a rozemletých částí česneku sicilského se solí (obrázek 7 a 8).



Obrázek 7 a 8 – Kořenící směs samardala vyrobená z česneku sicilského

Kuchyně jihovýchodní Evropy je proslulá svými vysoce kořeněnými pokrmy. I přesto se ale cibulky česneku sicilského příliš nekonzumují v čerstvé podobě, neboť obsahují celou řadu látek zodpovědných za velmi výrazné sensorické vjemy. Už samotné rozetření zelených lístků rostliny je doprovázeno silně pronikavou vůní. Na základě této vlastnosti uvažovali bulharští odborníci o možnosti přímé destilace v rostlině obsažených silic. Velmi záhy se ale ukázalo, že jejich celkové množství je tak malé (hovoří se o 0,01 až 0,005 ml na 100 g čerstvé hmotnosti), že by se průmyslová výroba tohoto typu nevyplatila.

Jedinou významnější úpravou tak zatím zůstává výroba samardaly. Sušit se dají vesměs všechny části rostliny, ale nejvíce jsou využívána semena, neboť tímto postupem nedochází k poškození rostliny, jež tak může plodit po mnoho let. Sušení většinou probíhá v rozmezí 30–40 dnů, při kterých se v pravidelných intervalech kontroluje teplota, která nesmí dlouhodoběji přesáhnout 30 °C, jinak by hrozilo ztmavnutí a zdegradování produktu (ideálně usušenou směs zobrazuje obrázek 9). Na závěr se jednotlivé části nadrtí a smíchají se solí, která absorbuje sensoricky cenné látky a nedovolí jim ze směsi vytékat.<sup>34</sup>



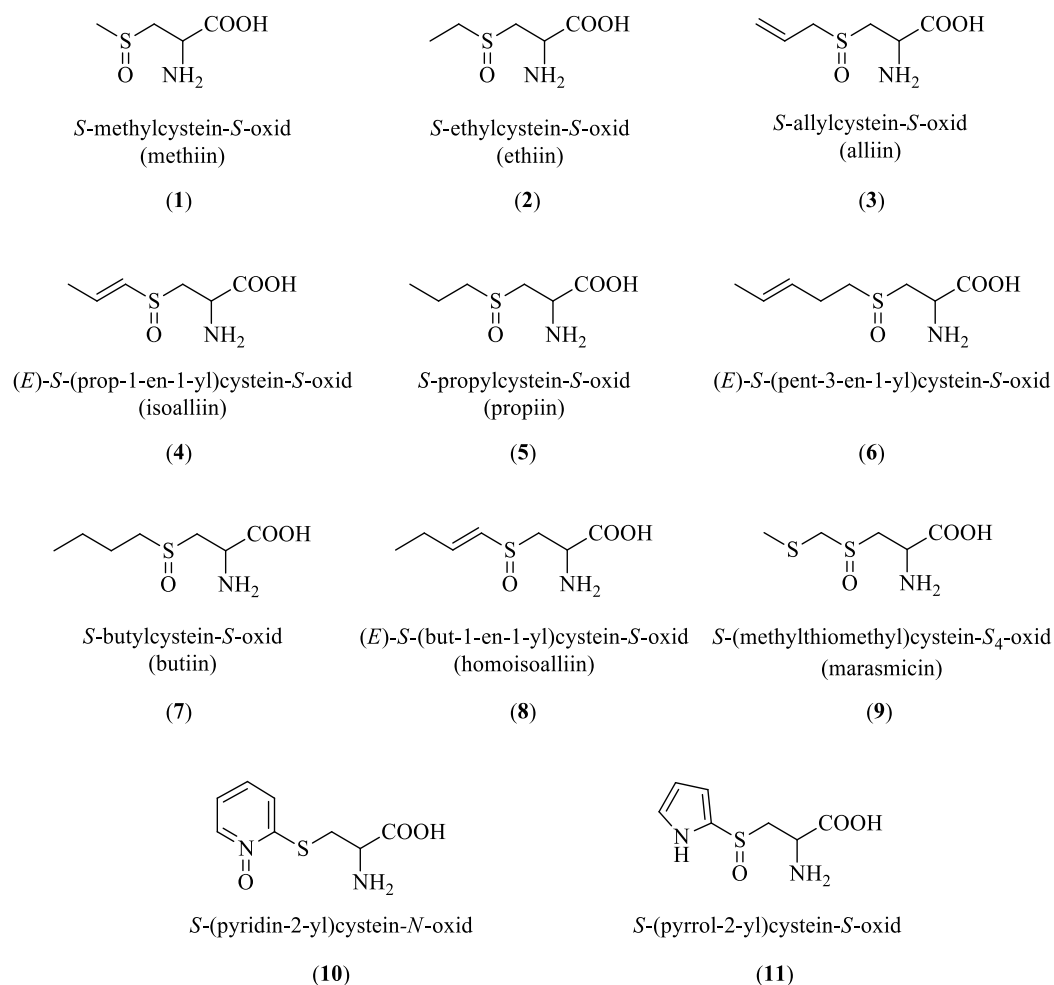
Obrázek 9 – Usušené části česneku sicilského těsně před dalším zpracováním

Podobně jako u česneku kuchyňského byly i v případě česneku sicilského zaznamenány antibakteriální účinky, a to u bakterií grampozitivních (*Staphylococcus aureus*) i bakterií gramnegativních (*Salmonella enterica*).<sup>35</sup> Nedávné studie také hovoří o poměrně zajímavých účincích antioxidačních, takže není vyloučeno, že se obliba této rostliny v potravinářském využití rozšíří i do dalších zemí.<sup>32,36</sup>

### 3.6 Sirné sloučeniny v rostlinách rodu *Allium*

#### 3.6.1 Sirné aminokyseliny přítomné v česnekovitých rostlinách

Česnekovité rostliny obsahují ve svých buňkách sekundární sirné metabolity, jež jsou zodpovědné za jejich typické sensorické vlastnosti. Mezi nesmírně významnou skupinu patří *S*-substituované deriváty cysteinu, které vystupují jako prekurzory při vzniku celé řady významných látek. Průměrné zastoupení nebílkovinných sekundárních metabolitů odvozených od cysteinu se v jednotlivých druzích spadajících do rodu *Allium* pohybuje mezi 1–3 % v sušině. Do dnešních dnů bylo v česnekovitých rostlinách nalezeno a popsáno 11 různých *S*-substituovaných derivátů cysteinu (1–11, obrázek 10).<sup>8</sup>



Obrázek 10 – Seznam *S*-substituovaných derivátů cysteinu přirozeně se vyskytujících v česnekovitých rostlinách

Zastoupení sírných aminokyselin není v jednotlivých druzích česnekovitých rostlin zcela totožné, ale liší se jejich koncentracemi či kombinacemi. Česnek kuchyňský a česnek sicilský obsahují relativně srovnatelné množství methiinu (1), čímž ale veškerá podobnost končí. Zatímco v česneku kuchyňském dále můžeme najít především alliin (3) a isoalliin (4),<sup>37,40</sup> v případě česneku sicilského se jedná o butiin (7) a zejména homoisoalliin (8), který je obsažen pouze v rostlinách podrodu *Nectaroscordum*.<sup>42</sup> Konkrétní situaci přibližuje tabulka 1, v níž je pro srovnání uvedeno zastoupení *S*-substituovaných derivátů cysteinu u další důležité česnekovité rostliny – cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.).<sup>37,42</sup> Mezi dominantní sekundární sírné metabolity vznikající v cibuli kuchyňské patří především methiin (1) a isoalliin (4), v menším zastoupení pak také propiin (5).

Tabulka 1 – Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů v česneku kuchyňském, česneku sicilském a cibuli kuchyňské<sup>38–43</sup>

	methiin (1)	alliin (3)	isoalliin (4)	propiin (5)	butiin (7)	homoisoalliin (8)
česnek kuchyňský	2–24	74–95	2–11	0–2	–	–
česnek sicilský	32	–	–	–	5	65
cibule kuchyňská	34	5	49	6	–	–

### 3.6.2 Alliinasa

Pro tvorbu sensoricky aktivních látek je vedle *S*-substituovaných derivátů cysteinu nezbytná přítomnost enzymu alliinasy (EC 4.4.1.4). Za normálních podmínek se alliinasa a sirmé prekurzory do kontaktu nedostávají, neboť zatímco enzym je přítomen v buněčných vakuolách, *S*-substituované deriváty cysteinu se postupně kumulují v cytoplazmě. Teprve až při mechanickém narušení vakuolových membrán dochází k vyjití alliinasy do cytoplazmatického prostoru, čímž se nastartuje celá kaskáda následných reakcí. Zmíněné uspořádání není v rostlinné říši nikterak neobvyklé. Jedná se vlastně o ochranný mechanismus, jehož primární funkcí je odradit herbivorní živočichy od konzumace takto uzpůsobených rostlin.<sup>43</sup>

Alliinasa byla objevena roku 1947 při studiu česneku kuchyňského,<sup>44</sup> ze kterého se jí přibližně o 20 let později podařilo izolovat v čisté podobě.<sup>45</sup> Ve své podstatě se jedná o homodimerický glykoprotein, pro jehož funkci je důležitá přítomnost pyridoxal-5-fosfátu jako kofaktoru.<sup>46</sup> Na základě experimentálního měření bylo zjištěno, že v laboratorních podmínkách vykazuje enzym nejvyšší aktivitu při teplotě pohybující se kolem 35 °C a při pH okolo hodnoty šest.<sup>47</sup> Alliinasu je možné kromě česnekovitých rostlin izolovat i z některých druhů bakterií. Popsána byla například její izolace z bakterie *Ensifer adhaerens*.<sup>48</sup>

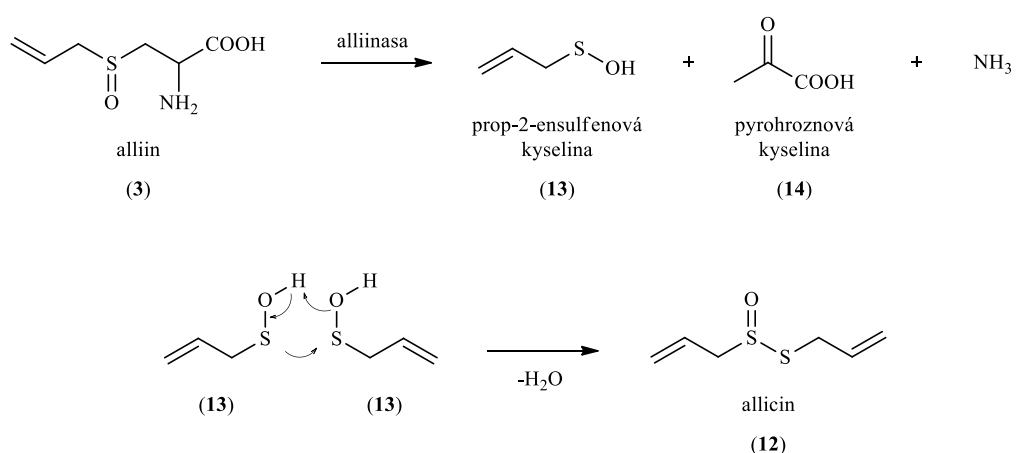
### 3.6.3 Tvorba sensoricky aktivních sloučenin

Jak už bylo zmíněno, vlastní sensoricky aktivní sloučeniny se v česnekovitých rostlinách utvářejí až během jejich mechanického zpracování (krájení, drcení, žvýkání), při němž se jednotlivé sirmé aminokyseliny dostávají do přímého kontaktu





působících na naše chuťové a čichové receptory. K jednomu z nejdiskutovanějších produktů vznikajících reakcí započaté vylitím alliinasy do buněčné cytoplazmy česneku patří jednoznačně *S*-allyl-prop-2-enthiosulfinát, jehož triviální označení allicin (**12**) je poměrně známé i širší veřejnosti. Princip biosyntézy allicinu (**12**) blíže znázorňuje obrázek 12. V první fázi dochází ke tvorbě prop-2-ensulfenové kyseliny (**13**), pyrohroznové kyseliny (**14**) a amoniaku. Následuje vzájemná kondenzace dvou prop-2-ensulfenových kyselin (**13**).<sup>50</sup> Allicin (**12**) je charakteristický svými

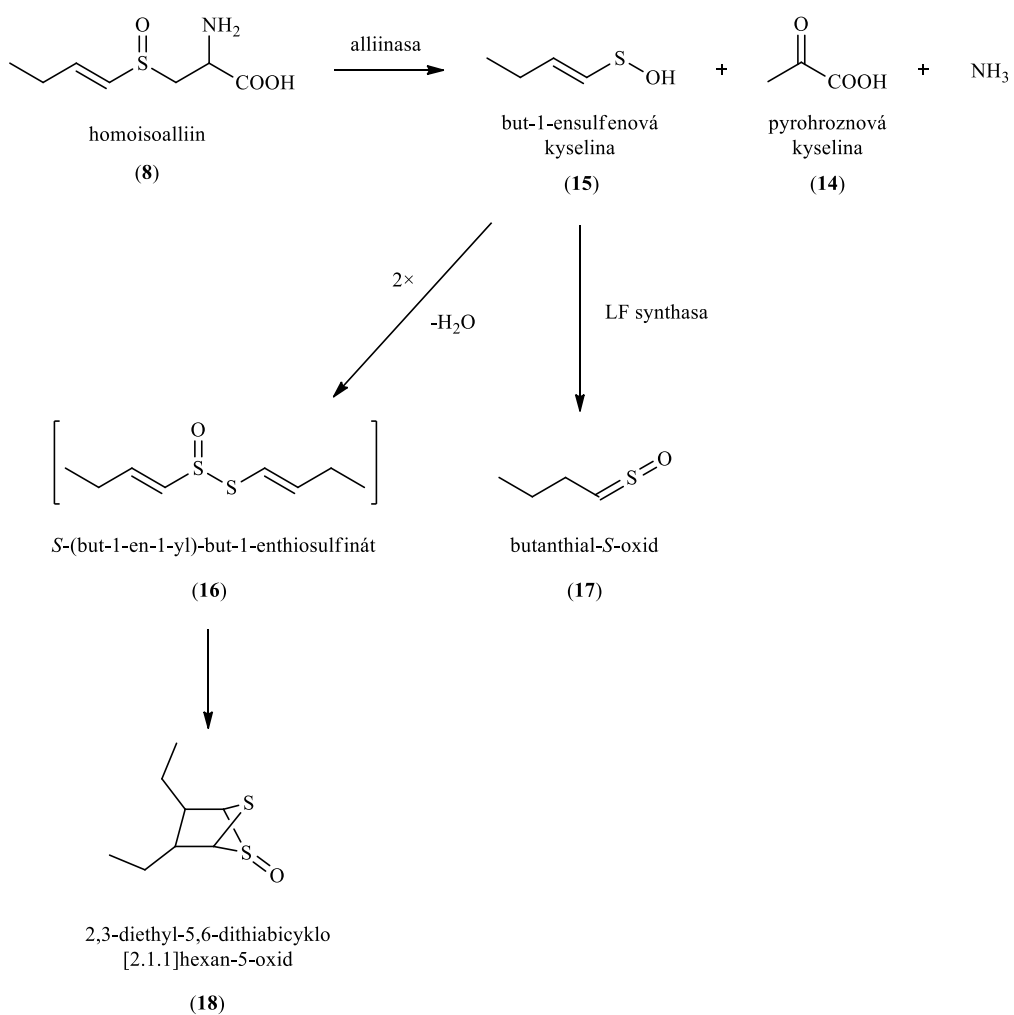


Obrázek 12 – Biosyntéza allicinu

výraznými sensorickými vlastnostmi a pominout nelze ani jeho mnoha studii prokázané účinky antibakteriální a fungicidní.<sup>51</sup> Z hlediska potravinářského zpracování zeleniny je ale třeba upozornit na jeho relativně nízkou stabilitu. Při skladování za pokojové teploty se většina allicinu (**12**) rozloží během následujících 24 hodin.<sup>52</sup>

Dominantním prekurzorem sensoricky aktivních látek česneku sicilského je homoisoalliin (**8**), který je v menší míře doprovázen methiinem (**1**) a butiinem (**7**). Po vylití alliinasy z buněčných vakuol kondenzuje vznikající but-1-ensulfenová kyselina (**15**) poměrně rychle v *S*-(but-1-en-1-yl)-but-1-enthiosulfinát (**16**). Na rozdíl od česneku kuchyňského se ale v buňkách česneku sicilského vyskytuje další enzym působící na sulfenové kyseliny. Nese označení LF synthasa a jeho účinkem dochází k produkci slzotvorné látky butanthial-*S*-oxidu (**17**).<sup>42</sup> LF synthasa se mimo jiné vyskytuje i v cibuli kuchyňské, kde také byla roku 2002 objevena.<sup>53</sup> Zmíněná fakta vysvětlují, proč nám při krájení cibule či česneku sicilského slzí oči, zatímco při

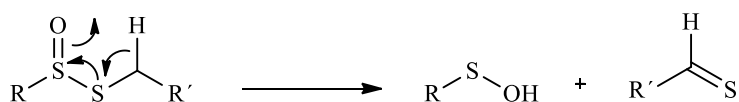
zpracování česneku kuchyňského se tak neděje. Velký podíl na objasnění mechanismu vzniku slzotvorné látky v česneku sicilském mají Kubec a kol.,<sup>41</sup> kteří pro výzkumné účely využili techniku označovanou jako DART-MS (direct analysis in real time mass spectrometry). Katalytický rozklad homoisoalliinu (**8**) v česneku sicilském znázorňuje obrázek 13. Můžeme si zde povšimnout přeměny látky *S*-(but-1-en-1-yl)-but-1-enthiosulfinátu (**16**) v bicyckickou sloučeninu 2,3-diethyl-5,6-dithiabicyklo[2.1.1]hexan-5-oxid (**18**). Jedná se o homolog podobný zwiebelanům z cibule kuchyňské, tedy látkám, které na kruhu v polohách 2 a 3 obsahují navázané methylové skupiny namísto zde přítomných ethylových. Označení zwiebelany má původ v německém jazyce (cibule = die Zwiebel). Tyto sloučeniny byly nezávisle na sobě objeveny na konci 80. let 20. století výzkumnými týmy z USA a Německa.<sup>54</sup>



Obrázek 13 – Katalytický rozklad homoisoalliinu (**8**) v česneku sicilském

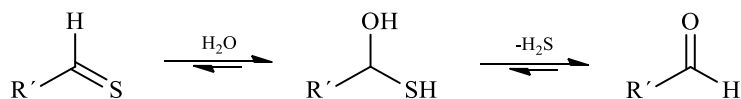
### 3.6.4 Sekundární reakce thiosulfinátů

Thiosulfináty vznikající kondenzací sulfenových kyselin patří mezi poměrně nestabilní sloučeniny. Jednou z hlavních příčin tohoto jevu je znatelně oslabená vazba spojující atomy síry. Vodík vázaný k uhlíku, jenž se účastní vazby se sírou, vykazuje účinkem záporného indukčního efektu relativně kyslejší charakter. K deprotonizaci tak může velmi snadno docházet i za mírných reakčních podmínek. Thiosulfináty se v následných krocích rozkládají na příslušné reaktivní thioaldehydy (obrázek 14), které mohou podle dosavadních poznatků hrát při tvorbě barevných látek poměrně významnou roli.<sup>55</sup> V případě česneku kuchyňského vznikají thioformaldehyd (**19**) a thioakrolein (**21**), u česneku sicilského se pak utváří thioformaldehyd (**19**) a butanthial (**22**).



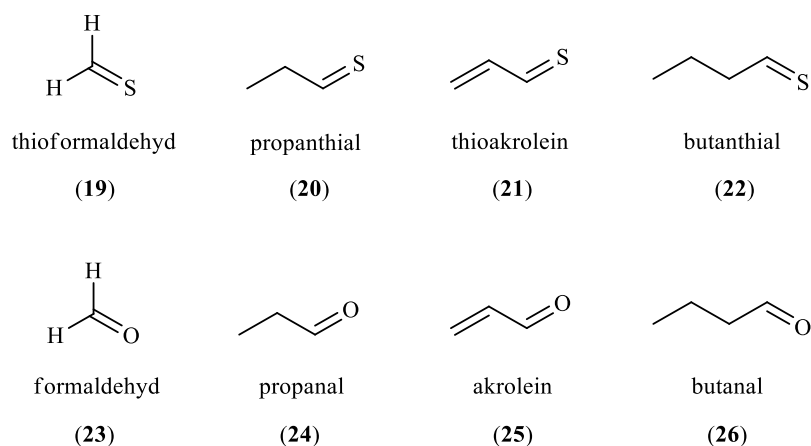
Obrázek 14 – Štěpení thiosulfinátů na reaktivní thioaldehydy

Ve vodném prostředí se na vznikající thioaldehydy adují molekuly vody za tvorby hemiacetalů, které obsahují geminálně vázanou thiolovou a hydroxylovou skupinu. Z nich se následnou eliminací sulfanu tvoří aldehydy (obrázek 15). V konečné bilanci se jedná o rovnovážné reakce, jež jsou vzhledem k nadbytku vody v reakčním systému posunuté ve směru vzniku aldehydických forem.



Obrázek 15 – Princip vzniku aldehydů z thioaldehydů ve vodném prostředí

Na obrázku 16 jsou pak znázorněny hlavní (thio)karbonylové sloučeniny, které samovolně vznikají při narušení pletiva česnekovitých rostlin.



Obrázek 16 – Hlavní (thio)karbonylové sloučeniny tvořící se v česnekovitých rostlinách

### 3.6.5 Tvorba barevných sloučenin

#### 3.6.5.1 Zelenání česneku kuchyňského

Faktory ovlivňující mechanismus zelenání česneku kuchyňského jsou předmětem intenzivních výzkumů již od 50. let 20. století. Mezi první autory věnující se této problematice patřili Joslyn a Sano, kteří roku 1959 publikovali vědecký článek,<sup>56</sup> ve kterém popsali základní principy týkající se vizuálních změn probíhajících v česneku kuchyňském. Joslyn a Sano zdokumentovali, že ke tvorbě barevných sloučenin dochází především v silně narušeném rostlinném pletivu. Samotné rozkrojení česnekových stroužků k pozorovatelným změnám většinou nestačí a čím více je pletivo narušené, tím intenzivněji zbarvení probíhá. Zelené látky vznikající při experimentech s česnekem kuchyňským se ukázaly být rozpustné v acetonu, zatímco v nepolárním petroletheru k jejich rozpouštění nedocházelo. Prvotní úvahy o struktuře barevných látek směřovaly vzhledem k zelené barvě homogenátu k chlorofylu, ale velmi brzy se ukázalo, že hledané struktury budou charakteru odlišného.

Téhož roku byl publikován Lukesův článek<sup>57</sup> zabývající se růžováním cibule, který v oblasti tvorby barevných sloučenin podhalil další neznámé. Především bylo zjištěno, že příčinou změny zbarvení rozhodně nejsou mikroorganismy, jelikož nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi běžným a sterilovaným cibulovým pletivem. Další Lukesovy úvahy tak vedly k enzymům. Ukázalo se, že po narušení buněk dochází

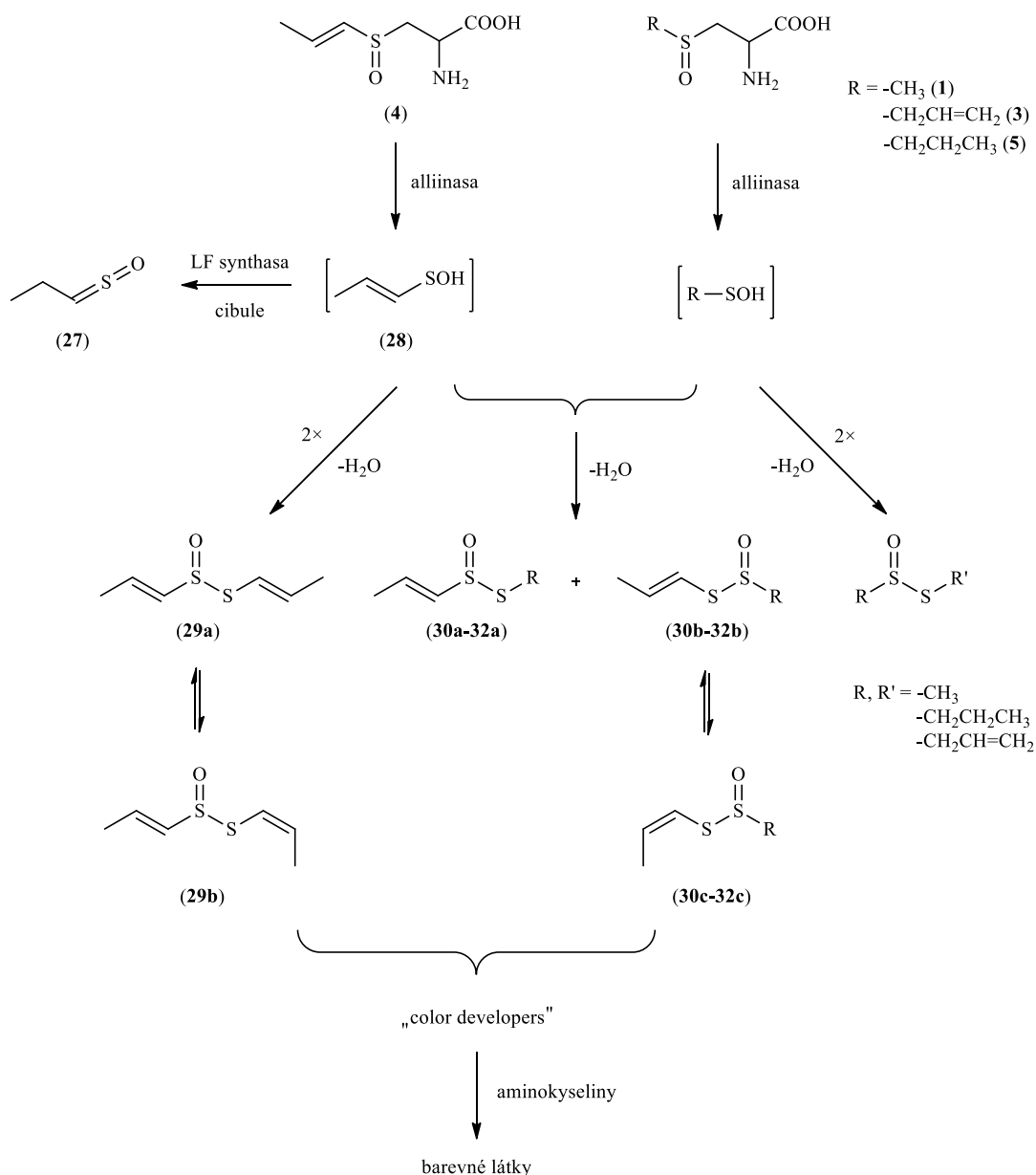
k velmi rychlým biochemickým procesům, jež opravdu probíhají díky enzymatické katalýze. U tepelně denaturovaného substrátu k barevným změnám nedocházelo. Je ale nutné podotknout, že při tvorbě barevných sloučenin v česnekovitých rostlinách nastává po enzymatické fázi sled celé řady reakcí neenzymatických.

Jako průlomová se dá označit vědecká práce publikovaná roku 1965 Yamaguchim a kol.,<sup>58</sup> kteří smíchali homogenáty z cibule a česneku a nechali je inkubovat při teplotě 40 °C. Bylo zjištěno, že zelená barva je zapříčiněna kombinacemi modrých a žlutých látek. Absorpční maximum modrých látek se nachází v oblasti kolem 590 nm, zatímco absorpční maximum látek žlutých v oblasti kolem 435 nm. Jestliže se do homogenátu z cibule přidají nenasyčené karbonylové sloučeniny, tvoří se místo pro cibuli typicky růžového zbarvení modré. Začalo se tedy předpokládat, že karbonylové sloučeniny mohou v česneku vznikat z alliinu (**3**). A ten byl také o něco později označen za nejpravděpodobnější prekurzor stojící na počátku celého sledu reakcí směřujících ke vzniku barevných sloučenin v česneku kuchyňském.<sup>59</sup>

Na vznik barevných látek má vliv celá řada různých faktorů. Bylo odhaleno, že česnekové palice jsou k zelenání náchylnější při dlouhodobějším skladování za nižších teplot pohybujících se mezi 0 a 10 °C. Lee a kol.<sup>60</sup> provedli experiment, ve kterém sledovali koncentrace *S*-substituovaných derivátů cysteinu u česneku uloženého po dobu pěti měsíců při teplotě nepřesahující 10 °C. Při vyhodnocování experimentu byl pozorován postupný nárůst koncentrace alliinu (**3**), zatímco množství methiinu (**1**) se průběžně snižovalo.

Nezastupitelný význam pro řízenou tvorbu barevných sloučenin mají dále především teplota a pH. Pro maximalizaci jejich výtěžku v homogenátu česneku kuchyňského se jako nejvhodnější jeví teplota kolem 40 °C a pH v oblasti 5,5.<sup>61,62</sup> Cho a kol.<sup>63</sup> poukazují na fakt, že celkového zbarvení česnekového substrátu se účastní minimálně osm různých barevných sloučenin. Lee a kol.<sup>64</sup> si pak všímají vzájemného zastoupení modrých a žlutých látek. Při optimálně pro tvorbu barevných sloučenin nastavených podmínkách nejprve roste absorbance v oblasti 590 nm, jejíž kulminace se dá očekávat zhruba po 24 hodinách. V tento okamžik převažuje zbarvení sytě modré. Po následujících šest dnů od započetí tvorby barevných látek přechází modrý odstín přes zelený až po žlutý a absorbance v oblasti 435 nm roste téměř kontinuální rychlostí na úkor absorbance při 590 nm.

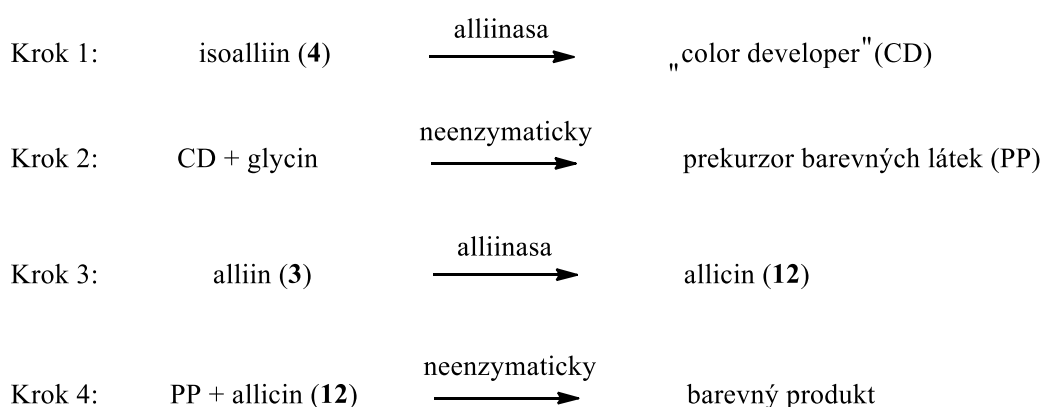
K odhalení mechanismu tvorby barevných látek v česnekovitých rostlinách, a tedy i v česneku kuchyňském, přispěli Kubec a kol.,<sup>55</sup> kteří vycházeli z předpokladu nutné přítomnosti *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů jako výchozích prekurzorů. Navržený reakční mechanismus znázorňuje obrázek 17. Na něm je možné si povšimnout propanthial-*S*-oxidu (**27**) vznikajícího z prop-1-ensulfenové kyseliny (**28**). Jedná se o významnou reakci dominantně probíhající především v cibuli kuchyňské. Z prop-1-ensulfenové kyseliny (**28**) vznikají následnou kondenzací dva geometrické izomery



Obrázek 17 – Reakční mechanismus tvorby barevných látek v rodu *Allium* navržený Kubcem a kol.<sup>55</sup>

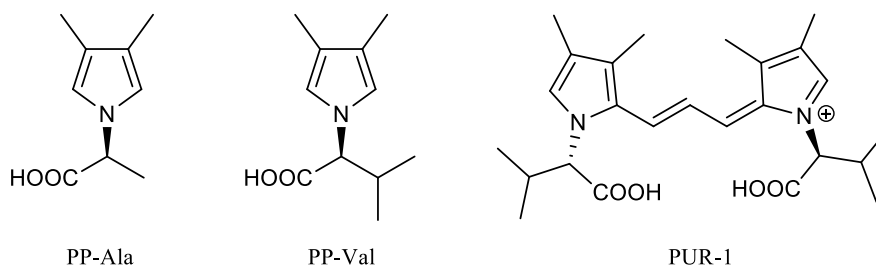
*S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-1-enthiosulfínátu (**29a**, **29b**). Bylo zjištěno, že zelenání česneku se dá charakterizovat jako specifický typ Maillardových reakcí, neboť v jisté fázi spolu reagují aminokyseliny a (thio)karbonylové sloučeniny.

Tvorbou barevných látek se přibližně ve stejném okamžiku zabývali Imai a kol.<sup>65,66</sup> Tento vědecký tým si připravil reakční systém, jenž obsahoval alliin (**3**), isoalliin (**4**), alliinasa a glycin (popřípadě jinou aminokyselinu). Jejich úvahy týkající se tvorby barevných sloučenin zahrnovaly čtyři základní kroky, které jsou popsány v obrázku 18. Žádné látky vznikající v prvních třech krocích nevykazují pozorovatelné



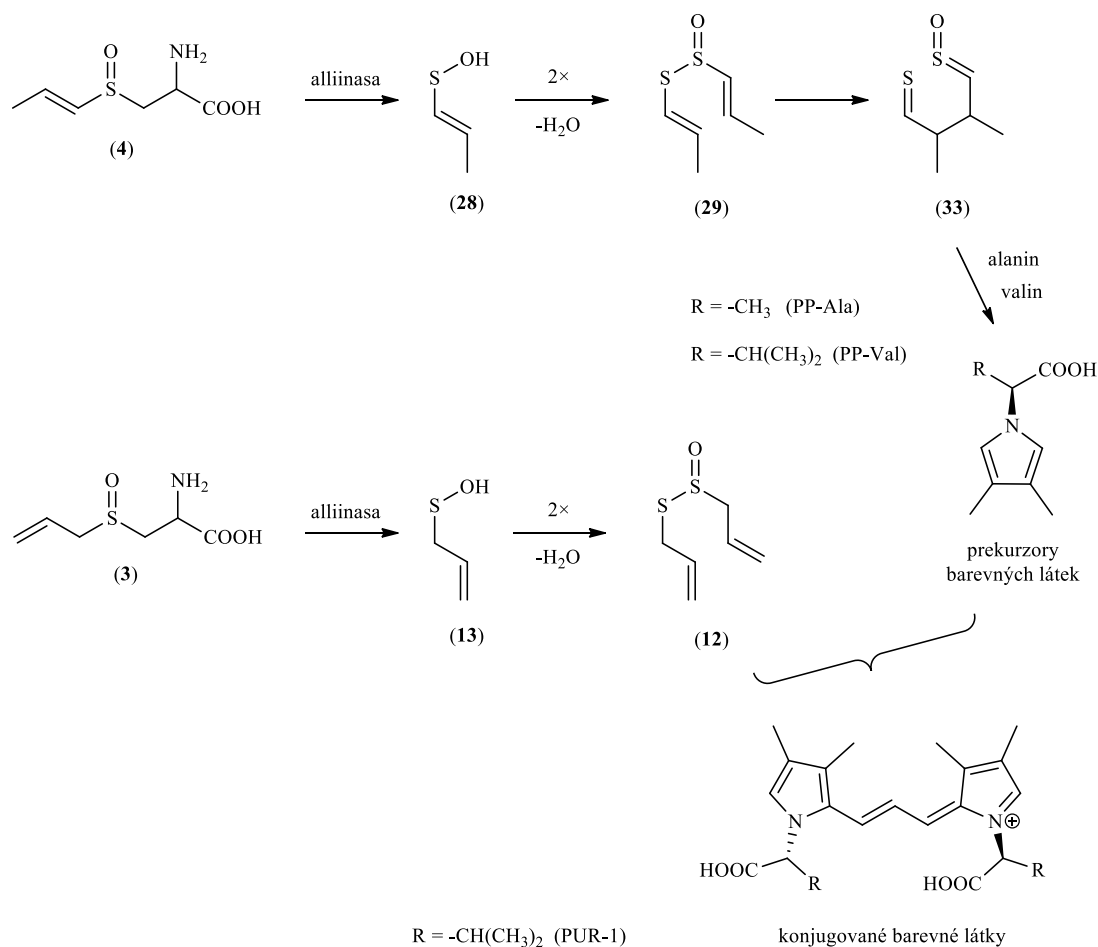
Obrázek 18 – Reakční kroky vedoucí ke tvorbě barevných látek dle Imaie a kol.<sup>65</sup>

zbarvení. To se projevuje až v kroku čtvrtém. Imaiův tým dokázal v průběhu dalších experimentů izolovat dva bezbarvé prekurzory barevných látek (PP-Ala a PP-Val) a dokonce i jednu látku fialovou (PUR-1,  $\lambda_{max} = 570$  nm). Jejich struktury přibližuje obrázek 19.



Obrázek 19 – Struktury bezbarvých prekurzorů a fialové látky navržené Imaiem a kol.<sup>66</sup>

Fialová sloučenina PUR-1 vznikla následnou reakcí prekursoru PP-Val s allicinem (12). Nejpravděpodobnější mechanismus tvorby barevných sloučenin popisuje obrázek 20. Je možné si povšimnout, že působením alliinasy vznikají sulfenové kyseliny, které ihned kondenzují v thiosulfináty. Významným krokem v celém mechanismu se zdá být [3,3]-sigmatropní přesmyk, při němž se z *S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-1-enthiosulfinátu (29) tvoří 2,3-dimethylbutandithialmono-*S*-oxid (33).

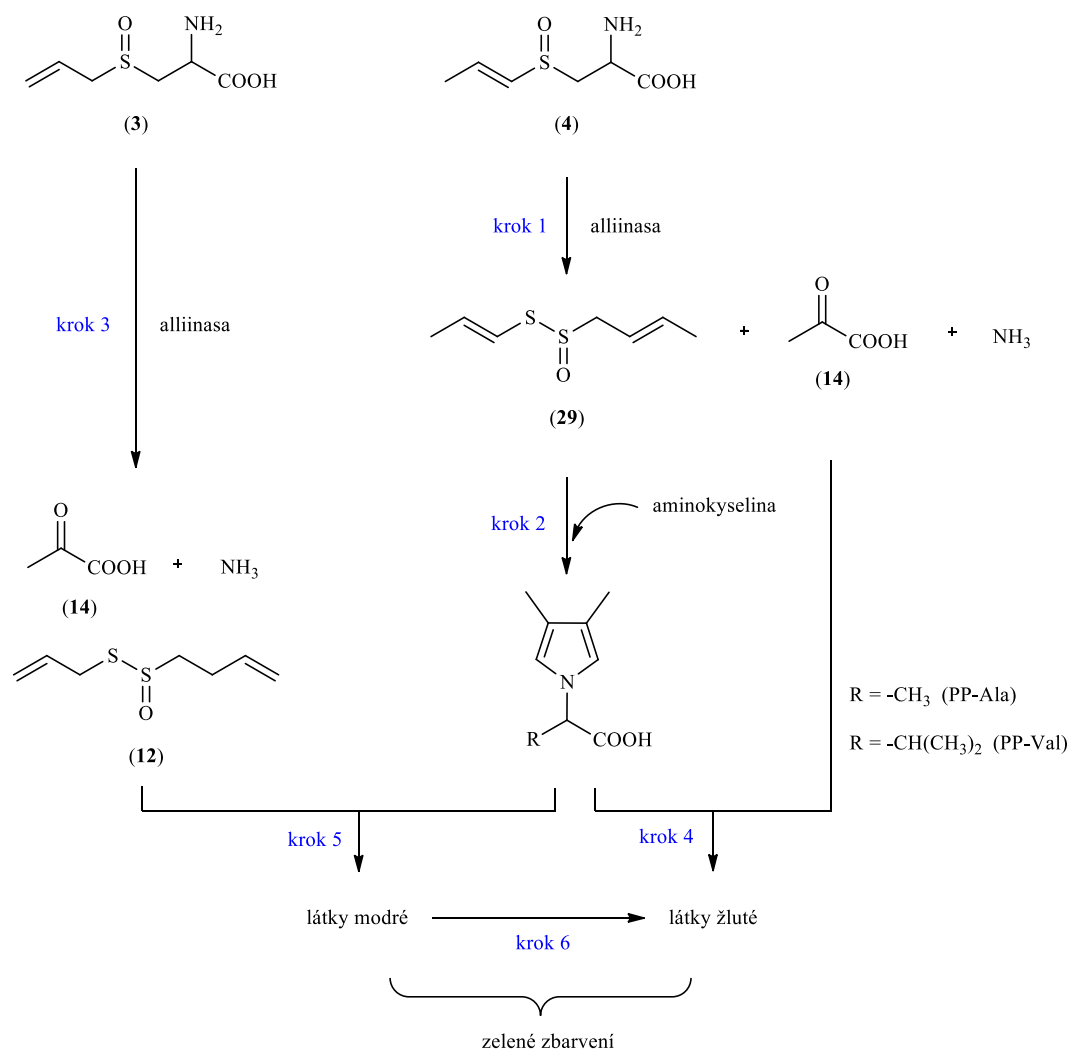


Obrázek 20 – Mechanismus tvorby barevných látek dle Imaie a kol.<sup>66</sup>

Wang a kol.<sup>67</sup> při dalším studiu mechanismu tvorby sloučenin PP-Ala a PP-Val dospěli k závěru, že zelenání česneku se odehrává v šesti základních krocích. Za zmínku stojí především krok čtvrtý, při kterém dle Wangova týmu dochází k reakci mezi pyrrolovým prekurzorem a pyrohroznovou kyselinou (14), jež v systému vzniká katalytickým působením alliinasy na isoalliin (4). Reakční schéma (obrázek 21)



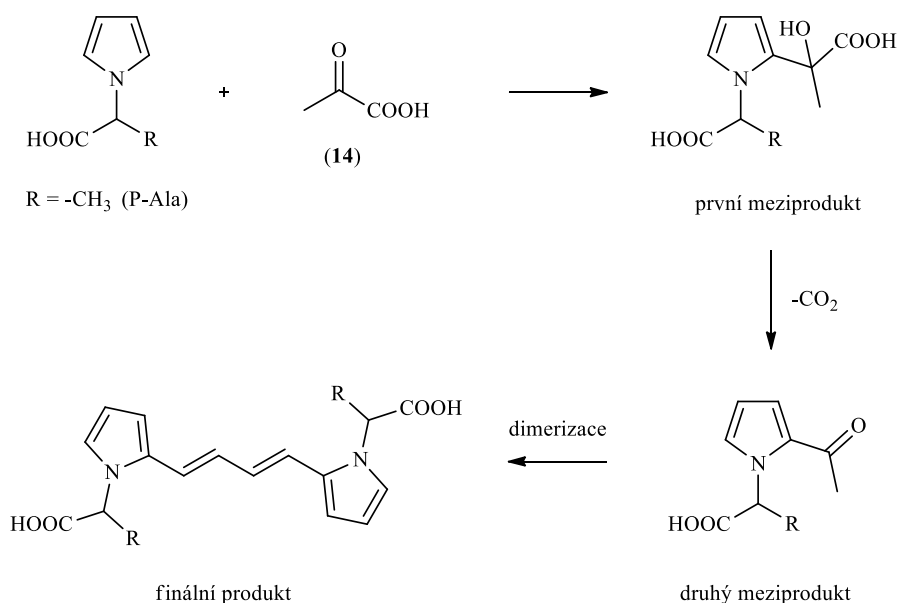
zároveň pracuje s myšlenkou postupné tvorby žlutých sloučenin ze sloučenin modrých.



Obrázek 21 – Reakční šestikrokové schéma navržené Wangem a kol.<sup>67</sup>

Na základě předpokládaného reakčního schématu a se znalostmi týkajícími se účasti pyrrolového jádra při vzniku barevných sloučenin se Wang a kol.<sup>68</sup> dále zaměřili na pravděpodobnou strukturu doposud neznámých žlutých látek. Byl proveden modelový experiment, při kterém se nechala látka označená jako P-Ala (homolog PP-Ala) zreagovat s pyrohroznovou kyselinou (14). S využitím získaných dat byl navržen reakční mechanismus (obrázek 22) popisující pravděpodobný vznik žlutých látek. Podle něj se na dvojnou vazbu pyrrolového jádra nejprve aduje pyrohroznová kyselina (14). V dalších krocích dochází k její dekarboxylaci a postupné dimerizaci

dvou vzniklých meziproductů. Tímto se pyrrolová jádra propojí čtyřuhlíkatým můstkem.

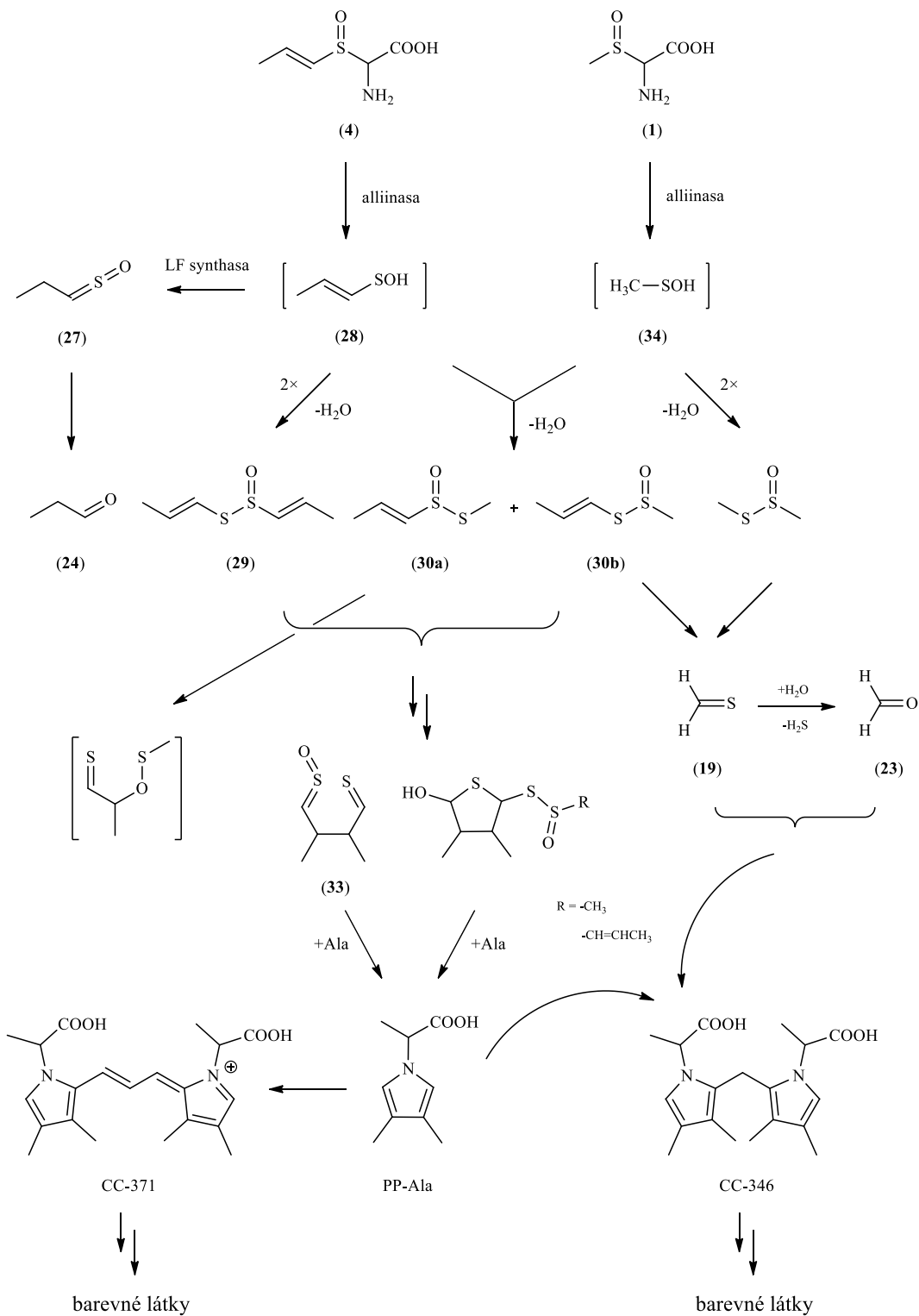


Obrázek 22 – Mechanismus tvorby žlutých látek v česneku kuchyňském navržený Wangem a kol.<sup>68</sup>

### 3.6.5.2 Červenání česneku sicilského

Zatímco česnek kuchyňský byl v posledních několika desetiletích pod drobnohledem mnoha vědeckých týmů, informací o česneku sicilském máme o poznání méně. Tvorba barevných sloučenin v této především okrasné rostlině sice nepředstavuje pro potravinářský průmysl výraznější problém, ale studium mechanismu barevných změn v česneku sicilském může přispět k odhalení zákonitostí při vzniku barevných sloučenin v česnekovitých rostlinách vůbec. Kubic a Velíšek<sup>62</sup> potvrdili, že thiosulfináty obsahující but-1-en-1-ylou skupinu odvozené od homoisoalliinu (**8**) také vytvářejí barevné sloučeniny, a to především červeného odstínu. S největší pravděpodobností lze předpokládat, že úvodní fáze vzniku barevných sloučenin v česneku sicilském je podobná té u cibule kuchyňské, jen s tím rozdílem, že namísto isoalliinu (**4**) bude stát na počátku kaskády biochemických reakcí homoisoalliin (**8**), jenž má řetězec o jednu methylenovou skupinu delší. Důležitou roli hraje také methiin (**1**), z něhož působením alliinasy vzniká methansulfenová kyselina

(34). Detailní mechanismus tvorby základních pyrrolických skeletů, od nichž je různými modifikacemi odvozena celá řada látek zodpovědných za červení cibule kuchyňské, navrhl Kubec a kol.<sup>69</sup> (obrázek 23).



Obrázek 23 – Mechanismus červení cibule kuchyňské dle Kubce a kol.<sup>69</sup>

### 3.6.6 Redukce tvorby zbarvení při technologickém zpracování

Zpracování hlavních česnekovitých rostlin do podoby prášku, granulí, pyré či mleté pasty přináší pro konečné spotřebitele úsporu času a zjednodušuje dávkování rostlinných produktů při další technologické úpravě. Změna zbarvení, ačkoliv probíhá naprosto přirozenými biochemickými procesy, je však z hlediska jakostního vnímání konzumenty naprosto nežádoucí, a pro potravinářské firmy tak představuje výraznou finanční zátěž.<sup>70</sup> Není tedy s podivem, že je vynakládáno poměrně velké úsilí k odhalení mechanismu barevných změn u rostlin využívaných v potravinářství.

K potlačení vzniku barevných látek byla doposud testována celá řada organických i anorganických sloučenin.<sup>71</sup> Jako nejefektivnější se ukázaly být cystein, kyselina askorbová, fosforečnan sodný a disiřičitan sodný, přičemž poslední jmenovaný patří zatím mezi inhibitory nejúčinnější. Přidávky těchto sloučenin s sebou ovšem mohou přinášet určité problémy. Příkladem může být nežádoucí sirný přípach potravinářské suroviny po přidání cysteinu nebo alergická odezva na disiřičitan sodný.<sup>72</sup> Vyzkoušena byla i metoda výroby česnekové pasty s přidavkem soli nebo octa. Takto ošetřený produkt ovšem ztratil vůni a chuť, kterou zákazníci od česneku očekávají.<sup>56</sup>

V posledních letech směřují úvahy odborníků zabývajících se pěstováním a zpracováním česneku kuchyňského k omezení přítomnosti isoalliinu (**4**). Jedna potenciální cesta, ukrývající se v oblastech šlechtitelství a genetického inženýrství, by mohla vést k vyšlechtění odrůd na isoalliin (**4**) chudých. Druhou možností je důsledné dodržování teplot panujících při skladování a zpracování česneku. Lukes ve své práci uvádí, že k zelenání je česnek náchylnější při skladování za nižších teplot (3–12 °C).<sup>59</sup> K podobnému závěru došli Lee a kol.<sup>60</sup> Během skladování za teplot nepřesahujících v průměru 12 °C dochází podle všeho k reakci, při které se isoalliin (**4**) uvolňuje ze svého prekurzoru  $\gamma$ -glutamyl-S-(prop-1-en-1-yl)cysteinu. Optimálním postupem pro komerční výrobu se zdá být dvanáctitýdenní skladování česnekových palic při 3 °C, po němž následují další dva týdny s teplotou 40 °C.<sup>74</sup>

Jako další možností pro eliminaci vzniku nežádoucího zbarvení se zdá být snížení hodnoty pH pod 4, neboť pH optimum pro tvorbu barevných sloučenin se pohybuje v oblasti mezi 4 a 6.<sup>65</sup> Tento krok by měl ovšem následovat co nejdříve po rozmělnění rostlinného materiálu. K technologické úpravě meziproduktů z česneku

kuchyňského se v neposlední řadě využívá i vysokotlakého parního ošetření, které je v potravinářství uplatňováno zejména při potlačení výskytu nežádoucích bakterií.<sup>75</sup>

Relativně nedávno navrhli Lee a kol.<sup>76</sup> novou metodu zabraňující zelenání česneku. Pokud se k česnekovému homogenátu přidá lyofilizovaný prášek z cibule kuchyňské s aktivními enzymy alliinasou a LF synthasou, dojde k potlačení barevných změn, aniž by se výrazněji změnilo kýžené česnekové aroma.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie a materiály

#### Chemikálie pro analýzu, syntézu a preparaci

L-Alanin (99 %), allylbromid (99 %), 1,2-dibromethan (99+ %), 1-bromprop-1-en (98 %), *m*-CPBA (70–75 %), cystein (99+ %), kyanid draselný (97 %), tetrahydrofuran (extra suchý) a  $\alpha$ -toluensulfonylfluorid (99 %) byly zakoupeny od firmy Acros Organics (Geel, Belgie). Dichlorethan ( $\geq 99$  %) byl zakoupen od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Acetonitril (HPLC grade) byl zakoupen od firmy J. T. Baker (Griesheim, Spolková republika Německo). Diethylether (p.a.), hořčík (99,98 %), methanol (HPLC grade), pyridoxal-5-fosfát ( $\geq 97$  %) a síran hořečnatý (bezvodý) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

EDTA (p.a.), hydroxid draselný (p.a.), kyselina trihydrogenfosforečná (čistá) a peroxid vodíku (30 %) byly zakoupeny od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.), dichlormethan (p.a.), kyselina chlorovodíková (35 %), kyselina mravenčí (98 %), methanol (99,97 %) a pentan (čistý) byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Glycerol (p.a.) a chlorid amonný (p.a.) byly zakoupeny od firmy Penta (Praha, Česká republika).

D,L-(1- $^{13}\text{C}$ )Alanin (99 % atomů  $^{13}\text{C}$ ), D,L-(2-D)alanin (99 % atomů D), D,L-(3-D<sub>3</sub>)alanin (99 % atomů D) a D,L-( $^{15}\text{N}$ )alanin (99 % atomů  $^{15}\text{N}$ ) byly zakoupeny od firmy Isotec (St. Louis, MO, USA).

#### Chemikálie pro testování protirakovinné aktivity

Antibiotika (směs penicilinu, streptomycinu a amphotericinu B), fetální bovinní sérum (FBS, standardizované), médium DMEM, médium RPMI a sulfanylethanol (55 mM) byly zakoupeny od firmy Gibco, Life Technologies (Waltham, MA, USA).

L-Glutamin (čistý), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid] a isotonický fosfátový pufr PBS (pH 7,4) byly zakoupeny od firmy Sigma

Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimethylsulfid-S-oxid (99,99 %) byl zakoupen od firmy Scharlau (Legden, Spolková republika Německo).

### **Ostatní materiál**

Kolonky C18-SPE (6 ml/1 g a 70 ml/10 g) byly zakoupeny od firmy Supelco (Bellefonte, PE, USA). Membránové PTFE filtry (0,45  $\mu\text{m}$ , 17 mm) byly zakoupeny od firmy Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dialyzační membrána (plochá šířka 23 mm, hraniční molekulová hmotnost 12 400 Da) byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **Rostlinný materiál**

Cibulky česneku sicilského (*Nectaroscordum siculum*) byly zakoupeny od firmy Eurobulb (Zwanenburg, Nizozemsko) v září 2014. Palice česneku kuchyňského (*Allium sativum*) byly zakoupeny v období říjen 2015 až březen 2016 v místním obchodě, kam byly dovezeny z Čínské lidové republiky.

## **4.2 Přístroje**

HPLC separace byly prováděny na přístroji Dynamax SD-210 (Varian, Palo Alto, CA, USA) s využitím detektoru Varian PDA 335. Pro analytické účely byla využívána kolona C-8 (Ascentis, 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), pro účely preparativní pak kolona C-8 (Ascentis, 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  21,2 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

UHPLC-HRMS data byla získána s využitím chromatografu UltiMate 3000 RS UHPLC (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). Použita byla kolona Acquity UHPLC HSS T3 (100  $\times$  2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ , Waters; Milford, MA, USA) vyhřívána na 45  $^{\circ}\text{C}$ . Mobilní fáze se skládala z 10 mM roztoku kyseliny mravenčí v Milli-Q vodě (rozpuštědlo A) a methanolu (rozpuštědlo B). Gradient byl nastaven následovně: A/B 80:20 (0 min, průtokový objem 0,4 ml/min) a 0:100 (15 min, průtokový objem 0,6 ml/min). Jednotlivé vzorky byly uchovávány v autosampleru při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ . Objem nástřiku činil 5  $\mu\text{l}$ . Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena

pomocí detektoru AB SCIEX TripleTOF 5600 (AB SCIEX, Toronto, ON, Kanada). Ten byl opatřen iontovým zdrojem DuoSpray. Napětí na jehle pro (+)ESI činilo +5,0 kV a pro (-)ESI -4,5 kV. Další parametry byly pro obě polariry společné: tlak zmlžovacího plynu 35 psi, tlak sušícího plynu 60 psi, ionizační teplota 600 °C, potenciál Coulombické exploze 60 V. Spektra byla získána metodou IDA (information-dependent acquisition), a to při komplexním skenování ( $m/z$  100–800, akumulací čas 100 ms) a při skenování vybraných produkovaných iontů ( $m/z$  50–800, akumulací čas 40 ms). Rozlišovací schopnost přístroje v celém rozsahu měření činila  $R > 30\,000$  FWHM.

GC analýzy byly prováděny na chromatografu Varian 3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA), který byl opatřený MS detektorem Varian 4000. Vzorky o objemu 1  $\mu$ l byly vstříkovány s využitím splitteru 1:100 na křemennou kapilární kolonu HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm i.d.; tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Provozní podmínky byly nastaveny následovně: teplota nástřiku 170 °C, teplota detektoru 250 °C, nosným plynem bylo helium o průtoku 1,3 ml/min; lineární teplotní gradient byl nastaven od 130 °C (první 3 min stálý) do 220 °C, krok 2 °C/min.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrální data byla získána s využitím spektrometru Bruker AVANCE III 700 MHz (Bruker, Billerica, MA, USA), který byl opatřen kryosondou s vysokou citlivostí jádra.  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  chemické posuny byly vztaženy k signálu methanolu ( $\delta$  3,31 a  $\delta$  49,0).

Spektrofotometrická data byla získána pomocí přístroje Specord 210 PLUS (Analytik Jena AG, Jena, Spolková republika Německo) v rozpětí 300–700 nm. Vlastní nárůst vlnové délky byl nastaven na 1 nm při rychlosti 50 nm/s.

K dokumentaci morfologie buněk při testování protirakovinné aktivity byl využit invertovaný mikroskop ZEISS Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Jena, Spolková republika Německo), který byl vybaven komorou pro udržení stálé teploty (37 °C) a přívodem  $\text{CO}_2$ .

### **Použitý software**

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



### 4.3 Gradienty využívané v kapalinové chromatografii (HPLC)

METODA A – analýza modrých látek z česneku kuchyňského

<b>průtok 0,8 ml/min</b>	<b>čas (min)</b>	<b>10 mM HCOOH (%)</b>	<b>methanol (%)</b>
	0	52	48
	30	40	60
	35	15	85
	40	15	85
	43	52	48
	45	52	48

METODA B – preparace modrých látek z česneku kuchyňského

<b>průtok 16,8 ml/min</b>	<b>čas (min)</b>	<b>10 mM HCOOH (%)</b>	<b>methanol (%)</b>
	0	52	48
	30	40	60
	35	15	85
	40	15	85
	43	52	48
	45	52	48

METODA C – analýza žlutých látek z česneku kuchyňského

<b>průtok 0,8 ml/min</b>	<b>čas (min)</b>	<b>10 mM HCOOH (%)</b>	<b>methanol (%)</b>
	0	57	43
	30	45	55
	34	43	57
	35	15	85
	40	15	85
	43	52	48
45	52	48	

METODA D – preparace žlutých látek z česneku kuchyňského

průtok 15,8 ml/min	čas (min)	10 mM HCOOH (%)	methanol (%)
	0	57	43
	30	45	55
	34	43	57
	35	15	85
	40	15	85
	43	52	48
	45	52	48

METODA E – analýza barevných látek z česneku sicilského

průtok 0,8 ml/min	čas (min)	10 mM HCOOH (%)	methanol (%)
	0	43	57
	35	15	85
	40	15	85
	43	43	57
	45	43	57

METODA F – preparace barevných látek z česneku sicilského

průtok 16,8 ml/min	čas (min)	10 mM HCOOH (%)	methanol (%)
	0	43	57
	35	15	85
	40	15	85
	43	43	57
	45	43	57

## 4.4 Postupy spojené se studiem tvorby barevných látek v česneku kuchyňském a česneku sicilském

### Izolace alliinasy z česneku sicilského

K izolaci alliinasy z cibulek česneku sicilského byla využita metoda dle Shena a Parkina.<sup>77</sup> Jednotlivé kroky probíhaly vždy za snížené teploty (0–4 °C). 500 g oloupaných cibulek bylo vloženo do odšťavňovače. Vzniklá šťáva ostrého aromatu byla smíchána s 250 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  extrakčního pufru (0,1 M, pH 7,5, zásobní roztok o objemu 2 l obsahoval 1 g cysteinu, 2,92 g EDTA, 200 ml glycerolu, 27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mg pyridoxal-5-fosfátu a 174 mg  $\alpha$ -toluensulfonylfluoridu). Takto připravený česnekový homogenát byl za sníženého tlaku zfiltrován přes Büchnerovu nálevku s plátnem. Po odstředění filtrátu při 9 000 rpm (15 min, 4 °C) byl ze systému odstraněn precipitát. K supernatantu byl přidán síran amonný na úroveň 65% nasycení a směs se nechala po dobu 60 minut míchat v ledové lázni. Po dalším odstředění při 9 000 rpm (20 min, 4 °C) byl supernatant slit a sediment rozpuštěna v minimálním objemu extrakčního pufru (přibližně 20 ml). Vzniklý roztok byl přemístěn do 40 cm dlouhé dialyzační membrány s konci zafixovanými na okrajích dialyzační nádoby. Následně byla provedena dialýza nejprve proti extrakčnímu pufru (19 hodin) a poté proti destilované vodě (2 × 3 hodiny). Aktivita alliinasy byla vizuálně otestována na roztoku *S*-(pyrrol-2-yl)cystein-*S*-oxidu, který po přidání enzymu zoranžověl.

### Příprava *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů

Methiin (**1**) byl syntetizován doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D. alkyací *L*-cysteinu jodmethanem a následnou oxidací meziproductu za využití  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>78</sup> Analogickým způsobem byl připraven butiin (**7**) z *S*-butylcysteinu. V 60 ml destilované vody bylo rozpuštěno 3,4 g *S*-butylcysteinu. Do vzniklého roztoku bylo vzápětí přidáno 2,2 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a směs se nechala za stálého míchání reagovat po dobu 20 hodin, a to při laboratorní teplotě. Pro odstranění zbytkového  $\text{H}_2\text{O}_2$  bylo do roztoku přisypáno přiměřené množství  $\text{MnO}_2$ . Jakmile ustala tvorba bublinek vyvolaná katalytickým štěpením  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bylo do roztoku přidáno malé množství aktivního uhlí. Směs byla následně zfiltrována přes skládaný filtr a odpařena za sníženého tlaku při 30 °C. Vysrážené krystalky byly promyty 200 ml acetonu,

zfiltrvány a na závěr vysušeny za pokojové teploty. Třetí *S*-alkenylcystein-*S*-oxid, homoisoalliin (**8**), byl izolován Mgr. Ivetou Štefanovou dle postupu Kubce a kol.<sup>41</sup>

### Modelové reakce *S*-substituovaných derivátů cysteinu vyskytujících se v česneku sicilském s alliinasou

Pro potvrzení účasti *S*-substituovaných derivátů cysteinu přítomných v česneku sicilském na vzniku barevných látek byly připraveny modelové reakční směsi o různých kombinacích *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů (**1**, **7**, **8**, tabulka 2). Reakce probíhaly v desetimilitrových skleněných vialkách, přičemž celkový objem každé modelové směsi činil 5 ml. Jako reakční prostředí byl využit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr (0,1 M, pH 5,5). Jednotlivé zásobní roztoky byly připravené tak, aby výsledná koncentrace ve vialkách činila 0,12 mol/l v případě alaninu a 0,04 mol/l u jednotlivých *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Do vialek bylo odpipetováno vždy po 1 ml roztoku alaninu, 0,5 ml roztoku alliinasy a dle zvolených kombinací po 1 ml příslušného roztoku *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidu. Každá vialka byla následně doplněna fosfátovým pufrem na objem 5 ml a uzavřena víčkem. Reakce probíhaly za stálého míchání po dobu 19 hodin ve vodní lázni vyhřívané na 40 °C. Na závěr bylo provedeno vizuální zhodnocení změn zbarvení.

Tabulka 2 – Složení modelových směsí s různými kombinacemi *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů

	alanin	methiin (1)	butiin (7)	homoisoalliin (8)	alliinasa
<b>modelová směs 1</b>	+	+	+	+	+
<b>modelová směs 2</b>	+	+		+	+
<b>modelová směs 3</b>	+		+	+	+
<b>modelová směs 4</b>	+			+	+
<b>modelová směs 5</b>	+		+		+
<b>modelová směs 6</b>	+				+

### Extrakce směsi thiosulfinátů

Přibližně 750 g palic česneku kuchyňského nebo cibulek česneku sicilského bylo homogenizováno a odstředěno v odšťavňovači. Do vzniklého roztoku bylo

přidáno 100 ml vody a následně byla směs extrahována diethyletherem ( $2 \times 400$  ml). Zbylé homogenizované rostlinné pletivo bylo umístěno do Büchnerovy nálevky s filtrační tkaninou a za sníženého tlaku promyto  $2 \times 150$  ml diethyletheru. Obě etherové frakce byly spojeny, zakoncentrovány za sníženého tlaku ( $< 30$  °C) a uchovány při  $-28$  °C.

### **Tvorba barevných látek v česneku kuchyňském – časový experiment**

Podle výše popsaných postupů byly připraveny dva extrakty, každý ze 750 g palic česneku kuchyňského. Extrakty byly rozpuštěny v minimálním množství ethanolu, spojeny a následně smíchány se 1 700 ml fosfátového pufru (0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,5) s rozpuštěným alaninem (0,1 mol/l). Takto připravený roztok byl ponořen do vodní lázně vyhřívané na 40 °C. Reakce probíhala za stálého míchání po dobu následujících 7 dní, během kterých bylo v předem zvolených intervalech odebíráno 200 ml roztoku. Intervaly odběrů byly následující: 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 7 dní. Všechny vzorky byly zfiltrány a od každého z nich se uchovalo 5 ml pro spektrofotometrickou analýzu. V dalším kroku probíhalo přečištění barevných látek s využitím kolonek C18-SPE (70 ml/10 g). Na závěr byly jednotlivé vzorky podrobeny HPLC analýze.

### **Tvorba barevných látek v česneku kuchyňském – pH experiment**

Dva smíchané extrakty česneku kuchyňského (každý ze 750 g palic) byly rozpuštěny v minimálním množství ethanolu a rozděleny na osm totožných dílů, které byly přelity do stejného počtu 250 ml baněk umístěných ve vodní lázni. Mezitím bylo připraveno 1 200 ml fosfátového pufru (0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) s rozpuštěným alaninem (0,1 mol/l). Tento roztok byl také rozdělen na osm dílů, přičemž objem každého z nich činil 150 ml. Následně bylo za využití  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a KOH upraveno pH jednotlivých dílů na hodnoty 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 9. Připravená sada roztoků byla přidána k česnekovým extraktům a umístěna do vodní lázně, jež byla vyhřívána na 40 °C. Reakce probíhaly za stálého míchání po dobu 7 dnů, během nichž bylo ve zvolených intervalech odebíráno 10 ml od každého roztoku. Tentokrát byly intervaly odběrů zvoleny následovně: 4 hodiny, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 72 hodin a 7 dnů. Po každém

odběru byly vzorky ihned zfiltrvány a uloženy při  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí sedmidenní reakční doby byl opticky vyhodnocen vliv pH na průběh zbarvení roztoků.

### **Tvorba hlavních barevných látek z připravených extraktů**

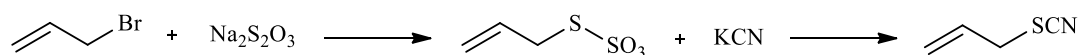
Připravené extrakty byly po vytemperování na pokojovou teplotu rozpuštěny v malém množství ethanolu (asi 10 ml). Vzniklý nažloutlý roztok byl smíchán s alaninem ve fosfátovém pufru (500 ml, 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,5), přičemž koncentrace alaninu činila 0,1 mol/l. Finální roztok byl ponořen do vodní lázně o teplotě  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakce probíhala za stálého míchání po dobu 4, 24 či 48 hodin (v případě česneku kuchyňského) nebo 19 hodin (v případě česneku sicilského). Analogickým způsobem byly prováděny i modelové experimenty s izotopicky substituovaným alaninem [ $\text{D,L-(1-}^{13}\text{C)Ala}$ ,  $\text{D,L-(2-D)Ala}$ ,  $\text{D,L-(3-D}_3\text{)Ala}$  a  $\text{D,L-(}^{15}\text{N)Ala}$ ].

### **Přečištění sloučenin vzniklých reakcí směsi etherového extraktu s alaninem**

Jednotlivé směsi se vzniklými barevnými sloučeninami byly nejprve zfiltrvány pomocí skládaného filtračního papíru a poté naneseny na kolonky C18-SPE (70 ml/10 g) při zpracování česneku kuchyňského či C18-SPE (6 ml/1 g) při zpracování česneku sicilského. Následně byly kolonky promyty vodou, pentanem a dichlormethanem, a to vždy v uvedeném pořadí. Při použití kolonek C18-SPE (70 ml/10 g) činil objem každého promývacího rozpouštědla 50 ml, při použití menších kolonek C18-SPE (6 ml/1 g) se jednalo o objem 5 ml. Takto eluované frakce byly většinou bezbarvé či lehce nažloutlé. K eluci žádaných barevných sloučenin bylo využito vždy minimálního potřebného množství methanolu a na úplný závěr methanolu okyseleného HCl ( $\text{CH}_3\text{OH/HCl}$ , 99/1, v/v). Barva roztoku s látkami vznikajícími v česneku kuchyňském byla tmavě modrá (reakční doba 4 hod) či žlutozelená (reakční doba 24 a 48 hod), barva roztoku s látkami vznikajícími v česneku sicilském měla zbarvení růžovočervené. Methanol byl na závěr odpařen za sníženého tlaku ( $< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a vzorky uloženy při  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro následné HPLC analýzy byly barevné sloučeniny po vytemperování na pokojovou teplotu rozpuštěny v minimálním množství methanolu, jenž byl doplněn stejným objemem vody.

## Syntéza allylthiokyanátu

Syntéza allylthiokyanátu byla provedena na základě lehce modifikované metody dle Slatera<sup>79</sup> (obrázek 24).

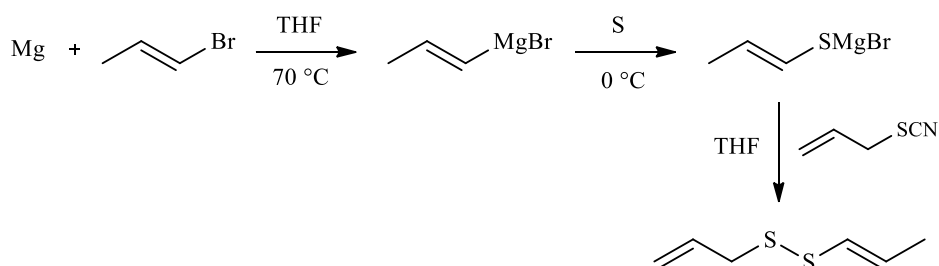


Obrázek 24 – Syntéza allylthiokyanátu

Allylbromid (48,4 g, 0,4 mol) byl rozpuštěn ve 140 ml ethanolu. V jiné nádobě bylo rozpuštěno 63,3 g (0,4 mol)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ve 140 ml vody. Obě směsi byly smíchány dohromady a výsledný roztok byl zahříván hodinu pod refluxem. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl roztok extrahován  $2 \times 200$  ml diethyletheru. Do vodné vrstvy bylo přidáno 26,5 g (0,4 mol) KCN a směs byla po dobu 60 minut míchána za stálého chlazení v ledové lázni. Během probíhající reakce se v roztoku vytvořily dvě vrstvy. Vzniklá emulze byla následně extrahována  $2 \times 250$  ml pentanu, načež byly organické vrstvy spojeny a přesušeny bezvodým  $\text{MgSO}_4$ . Odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku při teplotě  $25^\circ\text{C}$  bylo získáno 27 g světle žluté kapaliny, jejíž čistota byla ověřena za využití GC-MS.

## Syntéza allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu

Syntéza allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu byla provedena podle metody Wijerse a kol.<sup>80</sup> (obrázek 25).



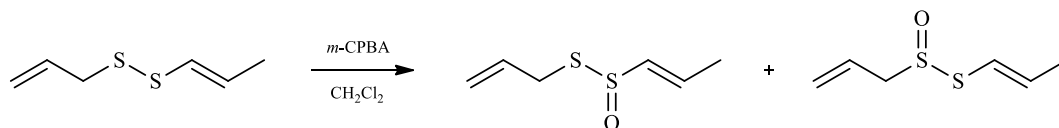
Obrázek 25 – Syntéza allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu

Hořčík (8,5 g, 0,34 mol) byl suspendován ve 30 ml extra suchého THF umístěného v trojhrdlé baňce opatřené přikapávací baňkou, teploměrem a zpětným chladičem. Za stálého míchání byl ke směsi pomalu přikapáván roztok 37 g (0,3 mol) prop-1-en-1-ylbromidu a 3,5 g (35 mmol) 1,2-dichlorethanu ve 120 ml THF. Reakce byla zahájena velmi opatrným zahříváním pomocí fénu a po nastartování probíhala pod refluxem (teplota směsi činila 60–70 °C). V okamžiku, kdy většina hořčíku zreagovala, byla směs ochlazena na pokojovou teplotu. Za stálého míchání a chlazení bylo do reakční směsi po malých dávkách přidáno 9,6 g (0,3 mol) síry.

Přibližně 20 minut od přidání veškerého množství síry bylo do směsi přikapáno 30 g (0,3 mol) allylthiokyanátu ve 30 ml THF. Za dalších 30 minut důkladného míchání bylo do směsi přidáno 150 ml 25% NH<sub>4</sub>Cl. Proběhla relativně bouřlivá reakce, při níž se utvořily dvě vrstvy. Vodná (spodní) vrstva byla extrahována 2 × 150 ml dichlormethanu. Všechny organické fáze byly spojeny a přesušeny bezvodým MgSO<sub>4</sub>. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno za sníženého tlaku (< 30 °C). Po odpaření zůstalo v baňce přibližně 40 ml hnědé, silně zapáchající kapaliny. Ta byla vydestilována za sníženého tlaku při 60–70 °C (8 mm Hg) a analyzována pomocí GC-MS. Konečný výtěžek syntézy činil asi 20 g kapaliny světle žlutého zbarvení.

### Oxidace allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu na thiosulfináty

Oxidace připraveného allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu na *S*-allyl-prop-1-en-thiosulfinát a *S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-2-enthiosulfinát byla provedena dle metody Kubce a kol.<sup>55</sup> (obrázek 26).



Obrázek 26 – Oxidace allyl(prop-1-en-1-yl)disulfidu na thiosulfináty

Allyl(prop-1-en-1-yl)disulfid (2,92 g, 0,02 mol) byl smíchán se 100 ml dichlormethanu podchlazeného na –20 °C. Vzniklá směs byla umístěna do vodní lázně s ledovou tříští a za stálého míchání k ní bylo přidáno 4,5 g 70% *m*-CPBA (0,02 mol).



Postupně se vytvořila zakalená směs bílé barvy, která byla po 60 minutách zfiltrována přes Büchnerovu nálevku. Na závěr bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku (< 30 °C). Po jeho odpaření zůstalo v baňce asi 5 ml žlutavé kapaliny medovitého charakteru, jež byla do dalšího zpracování uchována při –28 °C.

### **Příprava barevných látek z modelové směsi syntetických thiosulfínátů**

Roztok syntetických *S*-allyl-prop-1-enthiosulfínátu a *S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-2-enthiosulfínátu (2,4 g thiosulfínátů ve 24 ml acetonitrilu) byl smíchán s 500 ml 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,5), v němž bylo rozpuštěno 0,05 mol L-alaninu. Reakce probíhala za stálého míchání ve vodní lázni vytemperované na 40 °C po dobu 4, 24 či 48 hodin. Vzniklé barevné roztoky byly pokaždé naneseny na kolonku C18-SPE (70 ml/10 g), která byla následně promyta 50 ml vody, pentanu a dichlormethanu. K eluci žádaných látek bylo využito minimálního množství methanolu a methanolu okyseleného HCl (CH<sub>3</sub>OH/HCl, 99/1, v/v). Rozpouštědlo bylo následně odpařeno za sníženého tlaku (< 30 °C) a odparek byl uchován při –28 °C.

### **Izolace vybraných barevných sloučenin**

Ze směsi barevných sloučenin vzniklých reakcemi alaninu s příslušnými diethyletherovými extrakty byly pomocí C8 preparativní HPLC (česnek kuchyňský – METODY B a D, česnek sicilský – METODA F) izolovány barevné látky, jejichž čistota byla ověřena C8 analytickou HPLC (česnek kuchyňský – METODA A, česnek sicilský – METODA E). Frakce s potřebnou čistotou byly následně podrobeny NMR analýze.

### **Testování protirakovinné aktivity sloučeniny G-371**

Experimenty související s protirakovinnou aktivitou byly prováděny Mgr. Kristýnou Kupcovou. Aktivita sloučeniny G-371 byla testována na lidských nádorových buňkách děložního čípku (HeLa), jater (Hep2G) a slinivky břišní (PATU),

které byly kultivovány v inkubátoru za konstantní teploty 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>.

V úvodní fázi testování byla upravena a do zásobních lahví převedena zakoupená média. 500 ml připraveného vodného roztoku média DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) určeného pro nádorové buňky jater a slinivky břišní ve výsledku obsahovalo 5,7 ml antibiotik, 57 ml fetálního bovinního séra, 5,7 ml L-glutaminu a 0,57 ml sulfanylethanolu. 500 ml vodného roztoku RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) určeného pro nádorové buňky děložního čípku obsahovalo 5,7 ml antibiotik, 57 ml fetálního bovinního séra a 5,7 ml L-glutaminu.

Zásobní lahve s médii byly společně s PBS a roztokem trypsinu (3 díly trypsinu, 7 dílů vody) umístěny do vodní lázně vytemperované na 37 °C. Mezitím byly z inkubátoru odebrány kultivační nádoby s buňkami, z nichž bylo vylito staré médium. Nádorové buňky přichycené na stěnách nádob byly propláchnuty malým množstvím PBS a následně 0,5 ml roztoku trypsinu. Jakmile se buňky začaly oddělovat od stěn, bylo k nim přilito malé množství vhodně zvoleného média. Pomocí nasávání a vypouštění buněčného roztoku pipetou bylo dosaženo homogenizace směsi.

S využitím Bürkerovy komůrky a mikroskopu byl roztok ředěn přídatkem dalšího média až do okamžiku, kdy 1 ml roztoku obsahoval přibližně 200 000 buněk. Takto upravený roztok byl mikropipetou převeden na kultivační destičku (jedna jamka obsahovala 200 µl roztoku, což odpovídalo 40 000 buňkám na jamku). Destička byla posléze umístěna do inkubátoru při teplotě 37 °C.

Následující den bylo do jamek přidáno po 10 µl roztoku média s rozpuštěnou látkou G-371. Zvolené koncentrace vypadaly následovně: 100 µmol/l, 10 µmol/l, 1 µmol/l a 0,1 µmol/l. Kultivační destička se nechala inkubovat dalších 72 hodin v inkubátoru. Po uplynutí potřebné doby bylo do jednotlivých jamek přidáno po 10 µl roztoku MTT (koncentrace 4 mg/ml), který se nechal působit po dobu 4 hodin. Posléze byla kapalná fáze z jamek vylita a místo ní bylo přidáno po 200 µl dimethylsulfid-S-oxidu. Proběhla další inkubace, tentokrát po dobu 60 minut. Na úplný závěr bylo provedeno spektrofotometrické stanovení pro určení životaschopnosti sledovaných buněk v jednotlivých jamkách.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Tvorba barevných sloučenin v česneku kuchyňském

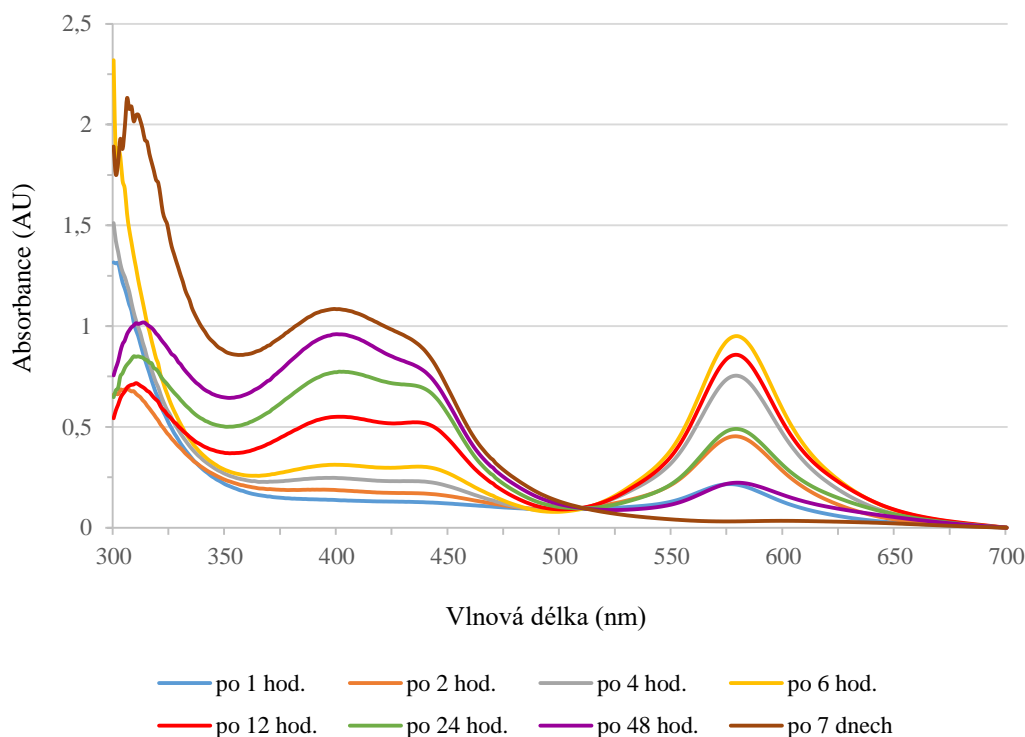
Pro studium barevných sloučenin byly jednotlivé experimenty prováděny s využitím modelových směsí připravených z diethyletherových extraktů česneku kuchyňského (popřípadě česneku sicilského) nebo ze syntetických thiosulfínátů. Prvně zmíněné uspořádání je využíváno velkou částí vědeckých týmů, které se barevnými změnami probíhajícími v česnekovitých rostlinách zabývají, jelikož manipulace přímo s česnekovým homogenátem značně komplikuje laboratorní analýzy. Za hlavní výhody extraktů převedených do roztoku lze považovat lepší regulaci reakčních podmínek a poměrně kvalitní reprodukovatelnost výsledků.

V současné době je v odborné literatuře již poměrně dobře zdokumentován význam sirných derivátů cysteinu coby výchozích prekurzorů reakcí vedoucích k barevným změnám v česnekovitých rostlinách. Dále bylo zjištěno, že svou významnou úlohu ve studované problematice sehrávají také aminokyseliny. Pro tuto práci byl zvolen L-alanin, a to zejména s přihlédnutím k dostupnosti jeho izotopicky substituovaných forem, které byly využity pro snazší interpretaci MS spekter.

#### 5.1.1 Změna zastoupení barevných látek v čase

Ke zjištění změn v zastoupení barevných látek v čase byly podle výše uvedených postupů připraveny dva diethyletherové extrakty celkem z 1 500 g česneku kuchyňského, které byly spojeny a smíchány s alaninem rozpuštěným v 1 700 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufru (pH 5,5). Ve zvolených intervalech bylo odebíráno po 200 ml roztoku, přičemž intervaly odběrů byly zvoleny následovně: 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 7 dnů. Po zfiltrování přes PTFE filtry byla změřena UV-vis spektra jednotlivých vzorků při vlnové délce 300–700 nm (graf 1).

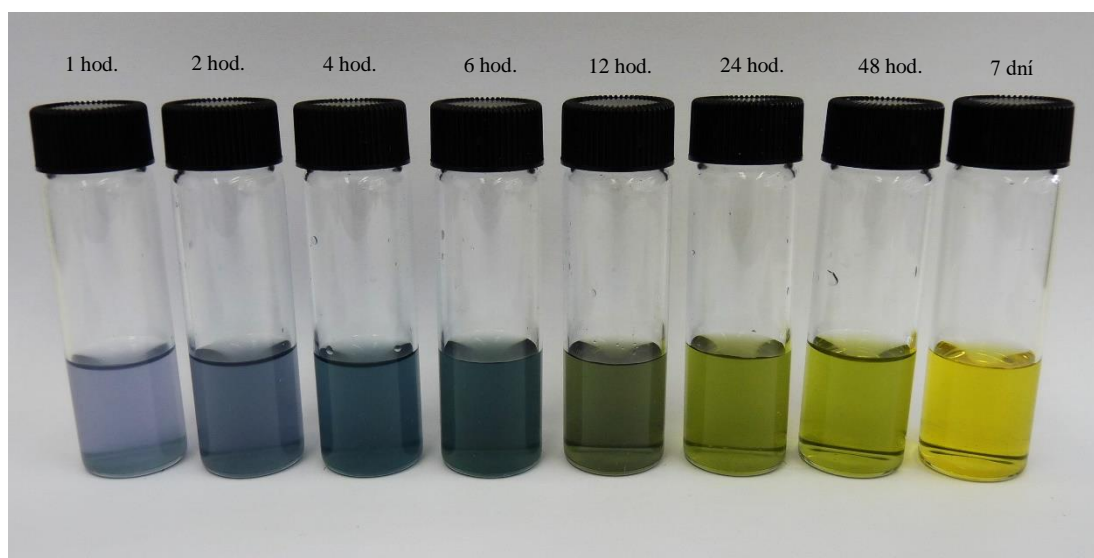
Naměřené výsledky se shodují s poznatky, které ve své práci uvádí Lee a kol.<sup>64</sup> Je možné si povšimnout, že největší absorbanci při vlnové délce těsně pod 600 nm vykazují roztoky po 4, 6 a 12 hodinách. Z těchto tří má pak nejmenší absorbanci v oblasti kolem 435 nm roztok čtyřhodinový, který se tak jeví jako ideální k preparaci



Graf 1 – Vývoj absorpance směsi česnekového extraktu s alaninem v čase (pH 5,5)

modrých látek. Naopak největší absorpance v této oblasti světelného spektra vykazují roztoky po 7 dnech, následované roztoky po 48 a 24 hodinách. Z časového hlediska se tedy pro preparaci žlutých látek jeví jako nejvhodnější poslední dva jmenované roztoky, tedy ty inkubované po dobu 24 a 48 hodin. Z celkového pohledu na graf 1 vyplývá, že v prvních několika hodinách po zahájení reakcí dominují v systému látky modré, jejichž množství se s přibývajícím časem snižuje. Protichůdným trendem je postupné zvyšování absorpance v oblasti kolem 435 nm.

Na obrázku 27 je zdokumentován vývoj zbarvení směsi česnekového extraktu s alaninem v čase prostřednictvím vyfotografovaných vial s roztoky odebraných ve zvolených intervalech. Je možné si povšimnout, že již po 1 hodině od zahájení experimentu bylo pozorováno lehce namodralé zbarvení, jehož intenzita se postupně zvyšovala až do roztoku odebraného po šestihodinové inkubaci. V tomto okamžiku se ve směsi začala objevovat barva zelená, jež byla s velkou pravděpodobností zapříčiněna současným výskytem látek modrých a žlutých, jejichž kombinace se dle odborné literatury podílí na zelenání česnekových stroužků. S postupem času se zelené zbarvení roztoku snižovalo za postupné tvorby žlutého odstínu.



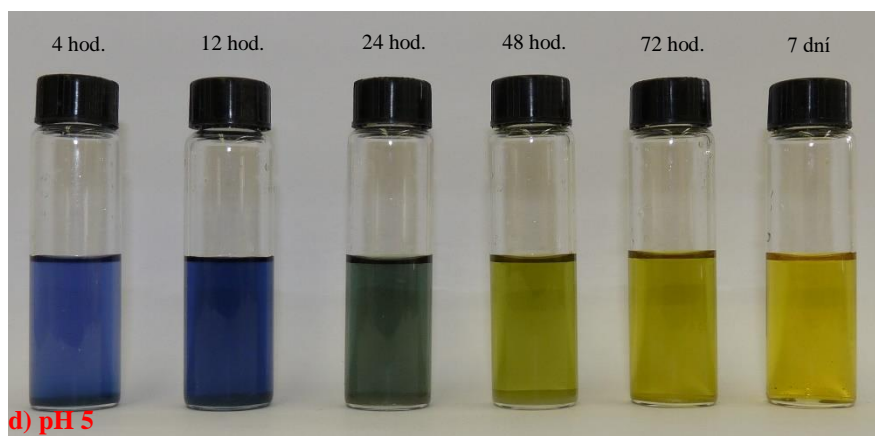
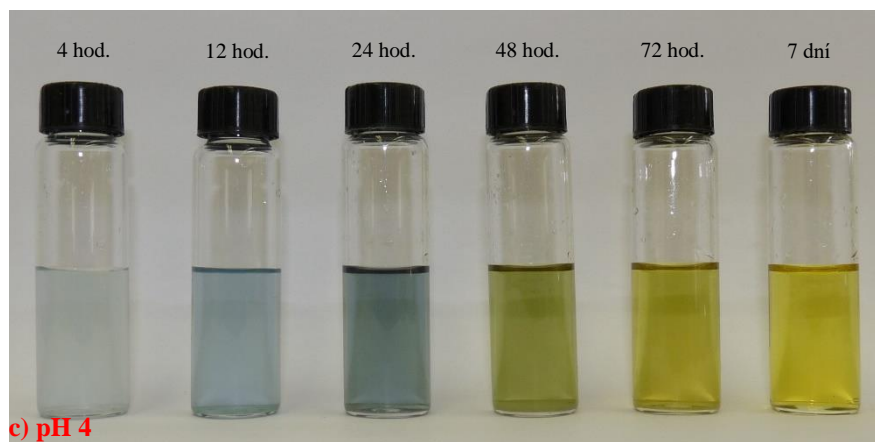
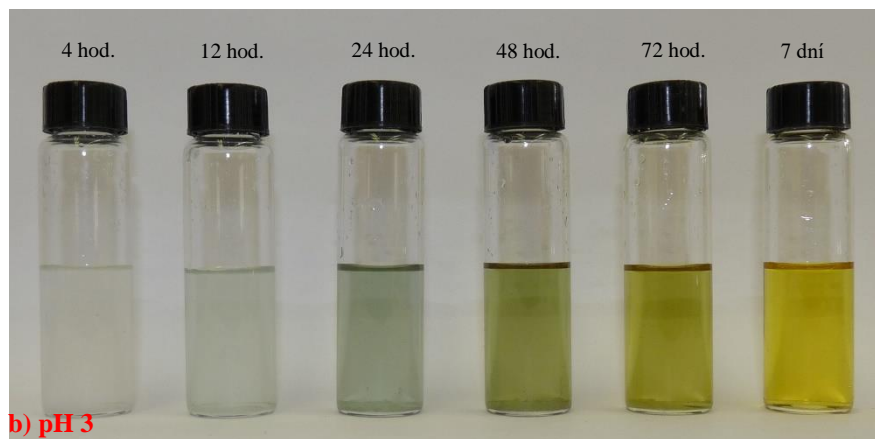
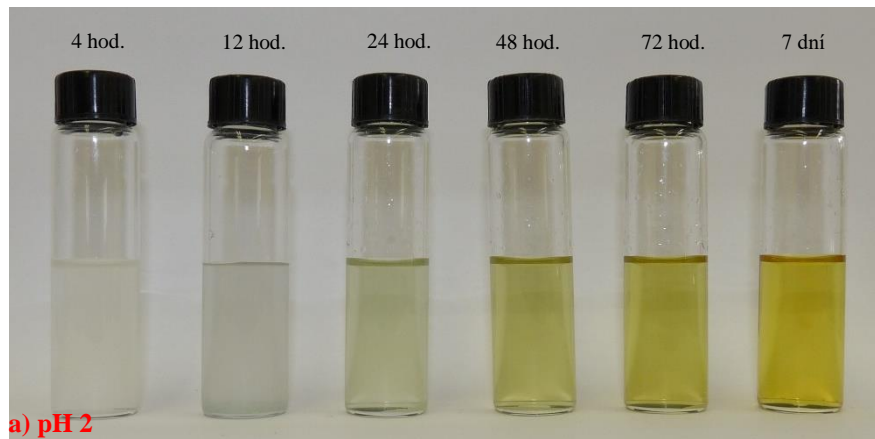
Obrázek 27 – Změna zbarvení směsi česnekového extraktu s alaninem v čase (pH 5,5)

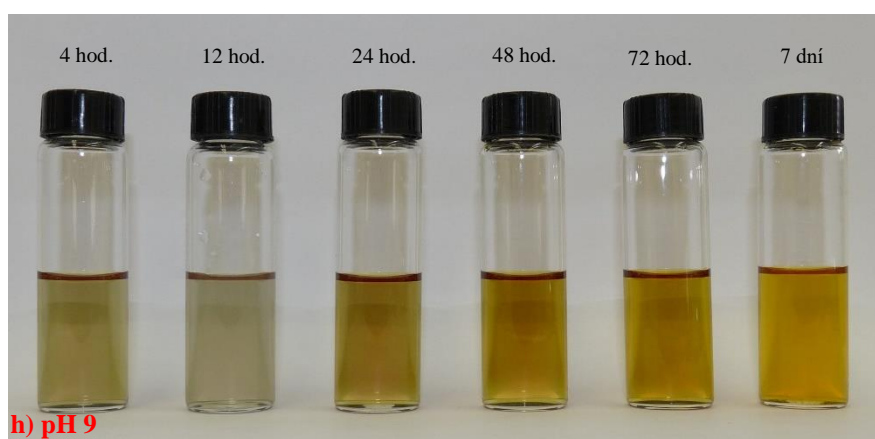
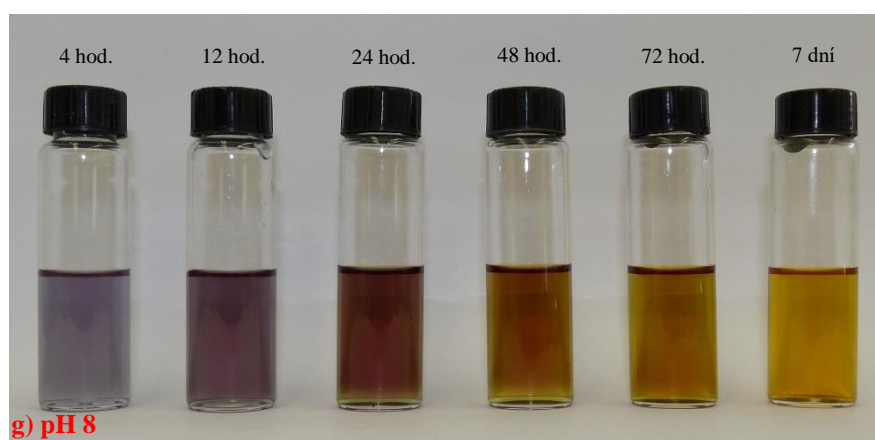
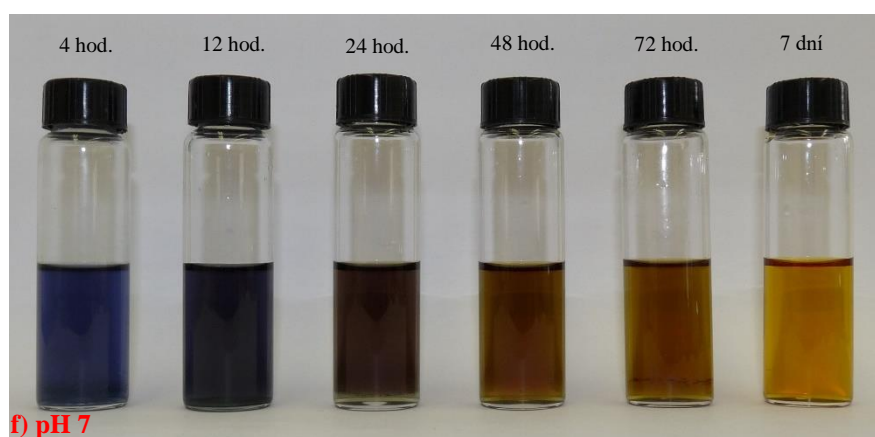
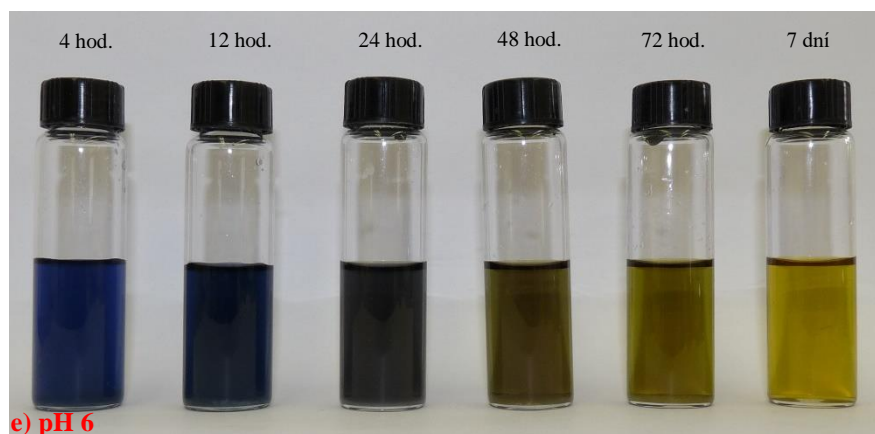
### 5.1.2 Vliv pH na probíhající barevné změny

Pro zjištění vlivu pH na probíhající barevné změny ve směsi extraktu z česneku kuchyňského s alaninem bylo dle výše uvedených postupů připraveno celkem osm reakčních systémů s pH v hodnotách 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 9, z nichž bylo ve zvolených intervalech odebíráno po 10 ml roztoku. Intervaly odběrů byly tentokrát následující: 4 hodiny, 12 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 72 hodin a 7 dní. Produkované zbarvení roztoků dokumentují obrázky 28a–h.

Experiment s různými hodnotami pH přinesl celou řadu zajímavých poznatků. Především bylo potvrzeno pH optimum pro maximalizaci výtěžku barevných látek z česneku kuchyňského, zmiňované například v odborných pracích Kima<sup>61</sup> či Kubce a kol.,<sup>62</sup> v nichž se hovoří o pH blízké hodnotě 6. Když porovnáme níže uvedené fotografie, můžeme si povšimnout, že nejsytější modré zbarvení po 4 a 12 hodinách od započetí experimentu vykazují roztoky s pH 5, 6 a 7 (obrázky 28d, 28e a 28f). S přihlédnutím k faktu, že silně narušené pletivo česnekových stroužků postupně zelená, jeví se pH 5,5 zvolené pro modelové experimenty jako nejvhodnější.

Dle předpokladů vedly extrémní hodnoty pH v kyselé i zásadité oblasti spektra k odlišnému průběhu zbarvení reakčních systémů. V nejkyselejších roztocích (obrázek 28a a 28b) nebylo pozorováno žádné modré zbarvení, ale i přesto se zde začalo po 48 hodinách od začátku experimentu objevovat zbarvení žluté, kterému při hodnotě





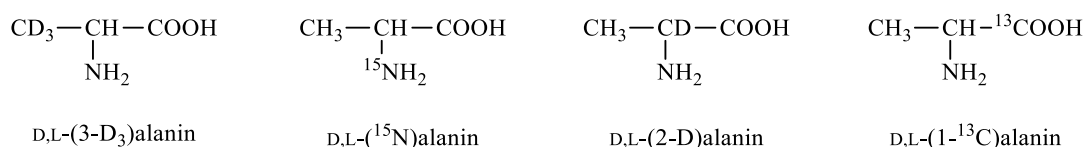
Obrázky 28a–h – Vliv pH na zbarvení jednotlivých směsí

pH 3 ještě předcházel lehce nazelenalý odstín. To není překvapením, neboť jak již bylo uvedeno v teoretické části této diplomové práce, proces zelenání česnekových stroužků naložených v kyselém octovém roztoku se v některých oblastech Čínské lidové republiky využívá pro získání zeleného „Laba“ česneku, jenž tvoří hlavní pokrm podávaný při oslavách čínského Nového roku. Při pH 8 (obrázek 28g) se zprvu vytvořil nařiaľovĕlý roztok, jenž ale po 24 hodinách začal přecházet v roztok žlutohnĕděho zbarvení, které bylo zaznamenáno vesměs při všech odbĕrech z modelové směsi s pH 9 (obrázek 28h).

Při komplexním pohledu na uvedené fotografie lze vypořovat, že doba kolem 24 hodin od započetí reakcí (s výjimkou u systému s pH 9) se jeví jako jakýsi bod zlomu, při němž se dosavadní barevný charakter jednotlivých roztoků mění. Do tohoto okamžiku je obecným trendem zvyšování intenzity zbarvení, jež ale posléze začne klesat za vzniku světlejšího žlutého až žlutohnĕděho odstínu, který lze pozorovat v sedmidenních vzorcích.

### 5.1.3 UHPLC-HRMS/MS identifikace hlavních barevných sloučenin

Pro UHPLC-HRMS/MS analýzu byly využity tři barevné roztoky získané reakcí směsi diethyletherového extraktu z česneku kuchyňského s alaninem, jejichž reakční čas činil 4 hodiny, 24 hodin a 48 hodin. Návrhy předpokládaných struktur dominantních látek byly posléze vytvořeny na základě porovnání HRMS/MS spekter barevných sloučenin vytvořených reakcí směsi česnekového extraktu s alaninem a reakcí směsi česnekového extraktu se čtyřmi různými izotopicky substituovanými alaniny [D,L-(3-D<sub>3</sub>)alanin, D,L-(<sup>15</sup>N)alanin, D,L-(2-D)alanin a D,L-(1-<sup>13</sup>C)alanin], jejichž struktury přibližuje obrázek 29.



Obrázek 29 – Izotopově substituované alaniny využité pro tvorbu barevných látek

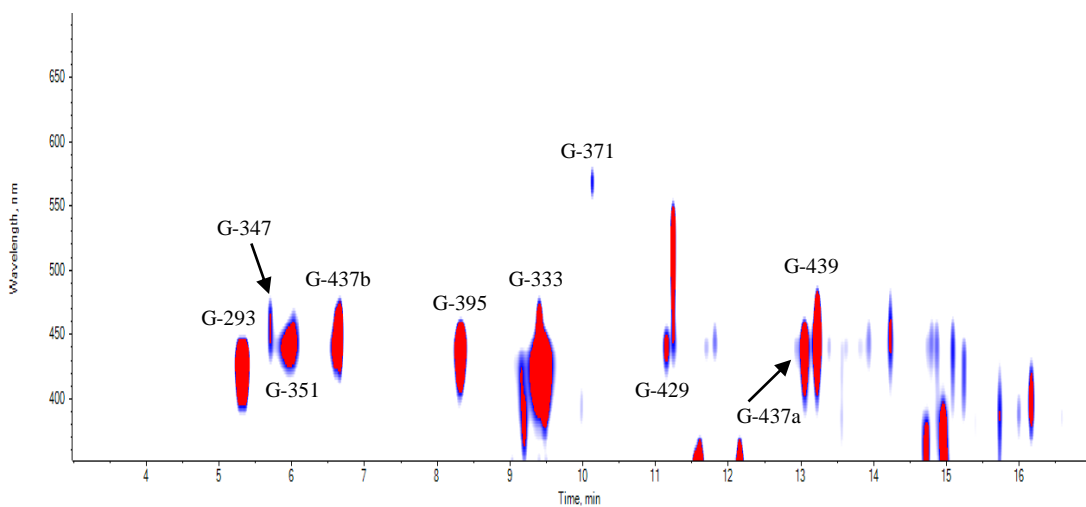
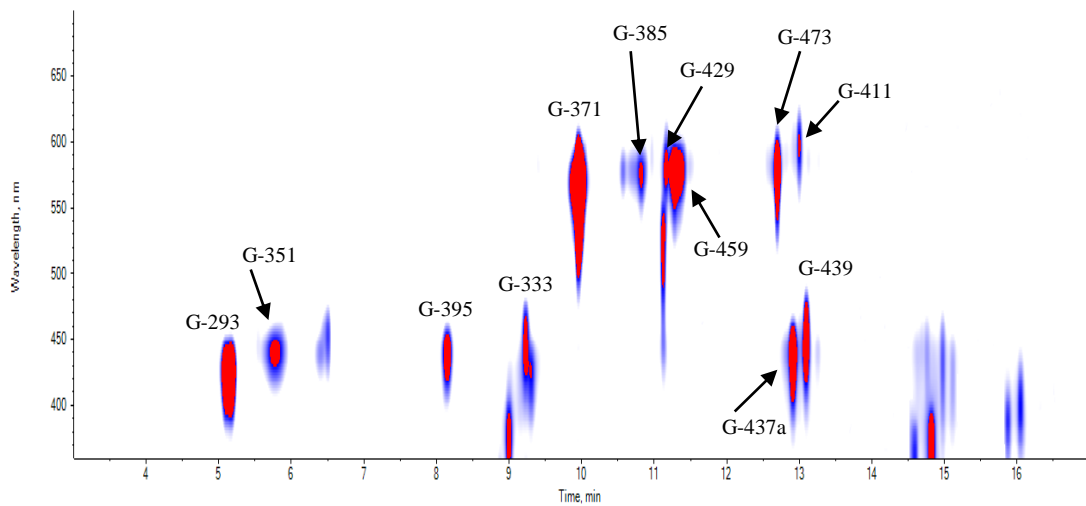
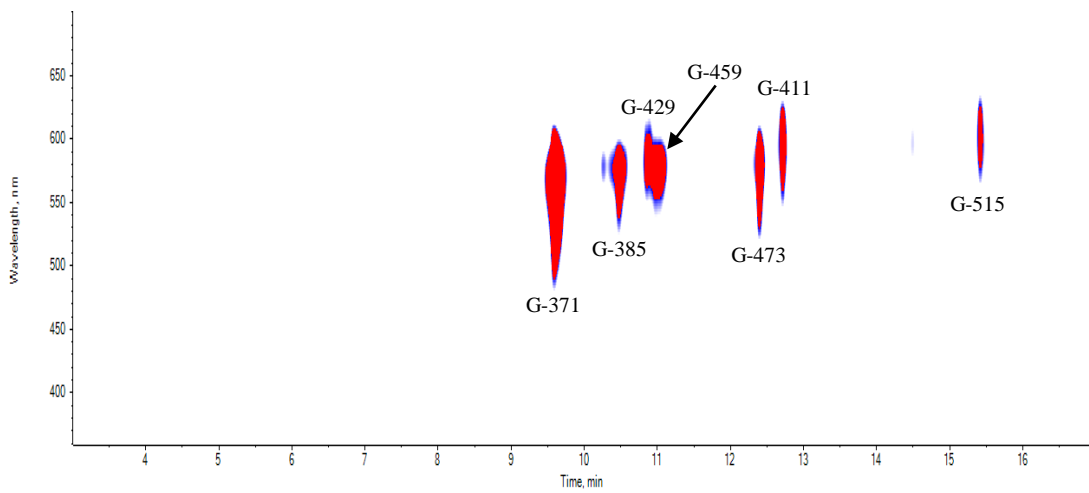


Celkem se podařilo detekovat patnáct hlavních sloučenin, které se podílejí na barevných změnách probíhajících při zpracování česneku kuchyňského. Pro větší přehlednost v uváděných výsledcích byl pro tuto diplomovou práci zvolen systém značení jednotlivých barevných látek na základě jejich výskytu v daném druhu zeleniny a stanovené relativní molekulové hmotnosti. Pro česnek kuchyňský bylo tedy zvoleno kódové označení G (z anglického výrazu „garlic“), pro česnek sicilský pak označení S (z anglického pojmu „sicilian honey garlic“). Číslo za pomlčkou označuje relativní molekulovou hmotnost dané sloučeniny, jež byla zjištěna pomocí HRMS/MS analýz.

S využitím UHPLC dat (obrázek 30) se podařilo potvrdit skutečnost, že postupně vznikající zelené zbarvení česneku kuchyňského je zapříčiněno současným výskytem žlutých a modrých sloučenin. Absorpční maximum látek modrých se nachází hlavně v oblasti 560–580 nm, absorpční maximum látek žlutých pak v oblasti 420–450 nm. Přítomnost těchto dvou dominantních skupin barevných látek již dříve detekovali Yamaguchi a kol.,<sup>58</sup> kteří jako první vyslovili hypotézu o příčinách vzniku zeleného zbarvení česnekových stroužků. Získané výsledky se také shodují se závěry Cho a kol.,<sup>63</sup> kteří poukazují na fakt, že barevných změn probíhajících v česneku kuchyňském se účastní minimálně osm různých látek.

Na základě bližšího srovnání UHPLC chromatogramů jednotlivých reakčních systémů z obrázku 30 bylo opět potvrzeno i pozorování Leehe a kol.,<sup>64</sup> týkající se vzájemného zastoupení modrých a žlutých sloučenin. Po čtyřech hodinách od započetí reakcí dominovaly v roztoku látky modré, u nichž byl po 24 hodinách od začátku experimentu pozorován jejich postupný úbytek ve prospěch výskytu látek žlutých. V reakčním systému po 48 hodinách pak převažovaly látky žluté a začala se také objevovat celá řada produktů nebarevných.

Za zmínku stojí především sloučenina G-371, která podle dosavadních informací hraje při tvorbě barevných látek v česneku kuchyňském velmi důležitou roli. Tato sloučenina se ve velkém zastoupení vyskytovala ve směsích po 4 a 24 hodinách, ale podařilo se ji identifikovat dokonce i po 48 hodinách od započetí reakcí. Při pohledu na látky s absorpčním maximem v oblasti kolem 420 nm lze vyslovit hypotézu, že významnou roli pro tvorbu sloučenin žlutého zbarvení bude hrát látka G-293, jejíž zastoupení bylo v pozdějších odběrech také poměrně velké.



Obrázek 30 – UHPLC chromatogramy barevných látek vznikajících v česneku kuchyňském (nahore po 4 hodinách, uprostřed po 24 hodinách, dole po 48 hodinách)

Tabulka 3 – HRMS data dominantních barevných sloučenin z česneku kuchyňského

sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-293	424	293,1502	293,1496	2,1	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7
G-333	445	333,1813	333,1809	1,2	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8
G-347	453	347,1607	347,1601	1,6	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
G-351	440	351,1915	351,1914	0,1	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7
G-371	567	371,1958	371,1965	1,2	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-385	575	385,2123	385,2122	0,6	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-395	439	395,2177	395,2177	0,1	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	7
G-411	598	411,2278	411,2278	0,1	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
G-429	580	429,2378	429,2384	0,5	C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
G-437a	437	437,1560	437,1563	0,7	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	9
G-437b	451	437,1734	437,1741	1,6	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	9
G-439	447	439,1719	439,1720	0,2	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	8
G-459	577	459,2486	459,2490	1,0	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-473	578	473,2639	473,2646	1,3	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-515	602	515,2029	515,2033	0,7	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	12

V tabulce 3 jsou dále uvedena HRMS data patnácti dominantních barevných sloučenin vznikajících smícháním diethyletherového extraktu připraveného ze stroužků česneku kuchyňského s alaninem. Pro závěrečné vyhodnocení byly využity údaje získané v pozitivním módu ionizace (+)ESI, a jednotlivé molekulové hmotnosti jsou tak uváděny ve formě [M + H]<sup>+</sup> aduktů. Je ale nutné podotknout, že hmotnosti některých látek odpovídají pouze ionizovanému stavu M<sup>+</sup>, jelikož se tyto sloučeniny vyskytují v již protonizované formě. Ke spolehlivému rozlišení obou ionizovaných forem by bylo zapotřebí znát přesnou strukturu uvedených sloučenin.

Při bližším studiu tabulky 3 je možné povšimnout si několika základních faktů. Ačkoliv jsou výchozími prekurzory pro tvorbu barevných látek S-substituované deriváty cysteinu, na základě dostupných informací týkajících se zejména mechanismu červení cibule kuchyňské se očekávalo, že barevné sloučeniny vznikající v česneku kuchyňském již síru obsahovat nebudou. Přesto byly zaznamenány čtyři sloučeniny, ve kterých je síra zabudována. Ze sumárních vzorců identifikovaných látek dále vyplývá, že se na jejich stavbě podílí vždy dvě molekuly alaninu, což bylo následně potvrzeno s využitím experimentů s jejich izotopicky substituovanými formami (příloha, tabulky a–d). Dvě molekuly alaninu přispívají do sumárního vzorce celkem

dvěma atomy dusíku, čtyřmi atomy kyslíku, šesti atomy uhlíku a deseti atomy vodíku. Z tabulek a–d uvedených v příloze je patrné, že při použití D,L-(3-D<sub>3</sub>)alaninu vzrostla molekulová hmotnost barevných látek o 6 Da a při použití D,L-(<sup>15</sup>N)alaninu, D,L-(2-D)alaninu a D,L-(1-<sup>13</sup>C)alaninu činil nárůst molekulové hmotnosti vždy 2 Da.

#### 5.1.4 Stanovení struktury látky G-371

Sloučenina G-371 patří k látkám, které se po 4 hodinách od započetí reakce směsi diethyletherového extraktu z česneku kuchyňského s alaninem tvoří ve srovnání s ostatními sloučeninami v poměrně dominantním množství. Za využití preparativní HPLC (METODA B) se tuto významnou látku podařilo izolovat v čistotě potřebné pro NMR analýzu.

Sloučenina G-371 byla již částečně popsána Imaiem a kol.,<sup>66</sup> kterým se ale nepodařilo dopracovat až k její spektrální analýze. Tu se v roce 2015 povedlo uskutečnit Kubcovi a kol.<sup>69</sup> při studiu barevných látek izolovaných z cibule a póru. Na základě doposud zjištěných dat můžeme říci, že sloučenina G-371 se účastní barevných změn probíhajících u potravinářsky nejvýznamnějších česnekovitých rostlin. Její UV-vis absorpční maximum činí  $\lambda_{max} = 567$  nm a rozpuštěním v minimálním množství methanolu tvoří sytě fialový roztok, v němž je za nízkých teplot kolem  $-28$  °C poměrně stabilní (k jejímu rozkladu nedošlo dokonce ani po několikaměsíčním skladování). (+)ESI HRMS data (tabulka 3) odpovídají sumárnímu vzorci C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M<sub>r</sub> změřená = 371,1958 Da, M<sub>r</sub> teoretická = 371,1965 Da, číslo nenasycenosti = 10).

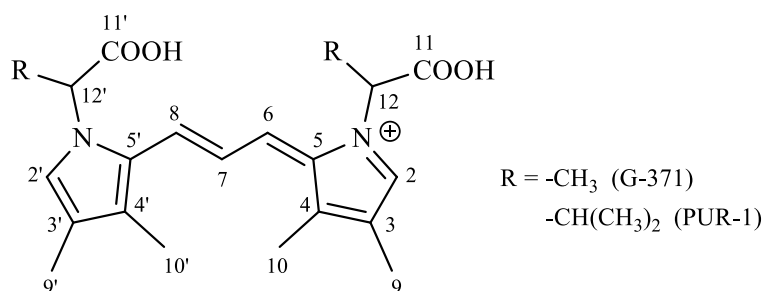
Na základě experimentů s jednotlivými izotopicky substituovanými alaniny (příloha, tabulky a–d) bylo zjištěno, že se na stavbě této barevné látky podílí dvě molekuly zmíněné aminokyseliny. Ty jsou podle dostupných dat zabudované ve dvou pyrrolových jádrech propojených tříuhlíkatým můstkem. <sup>1</sup>H NMR spektrum sloučeniny G-371 (tabulka 4) obsahovalo sedm signálů odpovídajících přítomnosti tří různých skupin CH<sub>3</sub>– ( $\delta$  1,84, 2,14 a 2,46), jednomu uspořádání –CH– ( $\delta$  2,42) a třem –CH= ( $\delta$  7,41, 7,82 a 8,00). <sup>13</sup>C data ukázala na přítomnost jedenácti různých atomů uhlíku (čtyři se nacházely v hybridizaci *sp*<sup>3</sup>, šest vykazovalo hybridizaci *sp*<sup>2</sup> a jeden byl součástí karboxylové skupiny). V tabulce 4 jsou pro srovnání uvedena také NMR

data sloučeni PUR-1 získaná Imaiem a kol.<sup>66</sup> Hodnoty chemických posunů v aromatické části molekul jsou u obou látek velmi podobné. Jejich struktury pak přibližuje obrázek 31.

Tabulka 4 – NMR data sloučenin G-371 a PUR-1

G-371				PUR-1				
<sup>1</sup> H			<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H			<sup>13</sup> C	
atom	δ (ppm)	intenzita signálu, multiplicita	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	intenzita signálu, multiplicita	J (Hz)	δ (ppm)
2/2'	7,82	2H, s		140,9	7,75	s	H-9'	140,9
3/3'				127,9				128,0
4/4'				140,2				138,8
5/5'				135,0				135,4
6/8	8,00	2H, d	13,2	146,4	8,07	d	13,5	146,4
7	7,41	1H, t	13,2	119,4	7,39	dd	13,5	119,6
9/9'	2,14	6H, s		9,8	2,02	s		9,8
10/10'	2,46	6H, s		13,4	2,36	s		13,5
11/11'				173,4				173,6
12/12'	5,42	2H, q	7,1	56,1				
13/13'	1,84	6H, d	7,1	18,2				

Systematický název sloučeniny G-371 bude tedy (2*E*)-1-(karboxyethyl)-2-[(2*E*)-3-[1-(1-karboxyethyl)-3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl]prop-2-en-1-yliden]-3,4-dimethyl-2*H*-pyrrolium.



Obrázek 31 – Struktura sloučenin G-371 a PUR-1

### 5.1.5 Pravděpodobné struktury hlavních barevných sloučenin

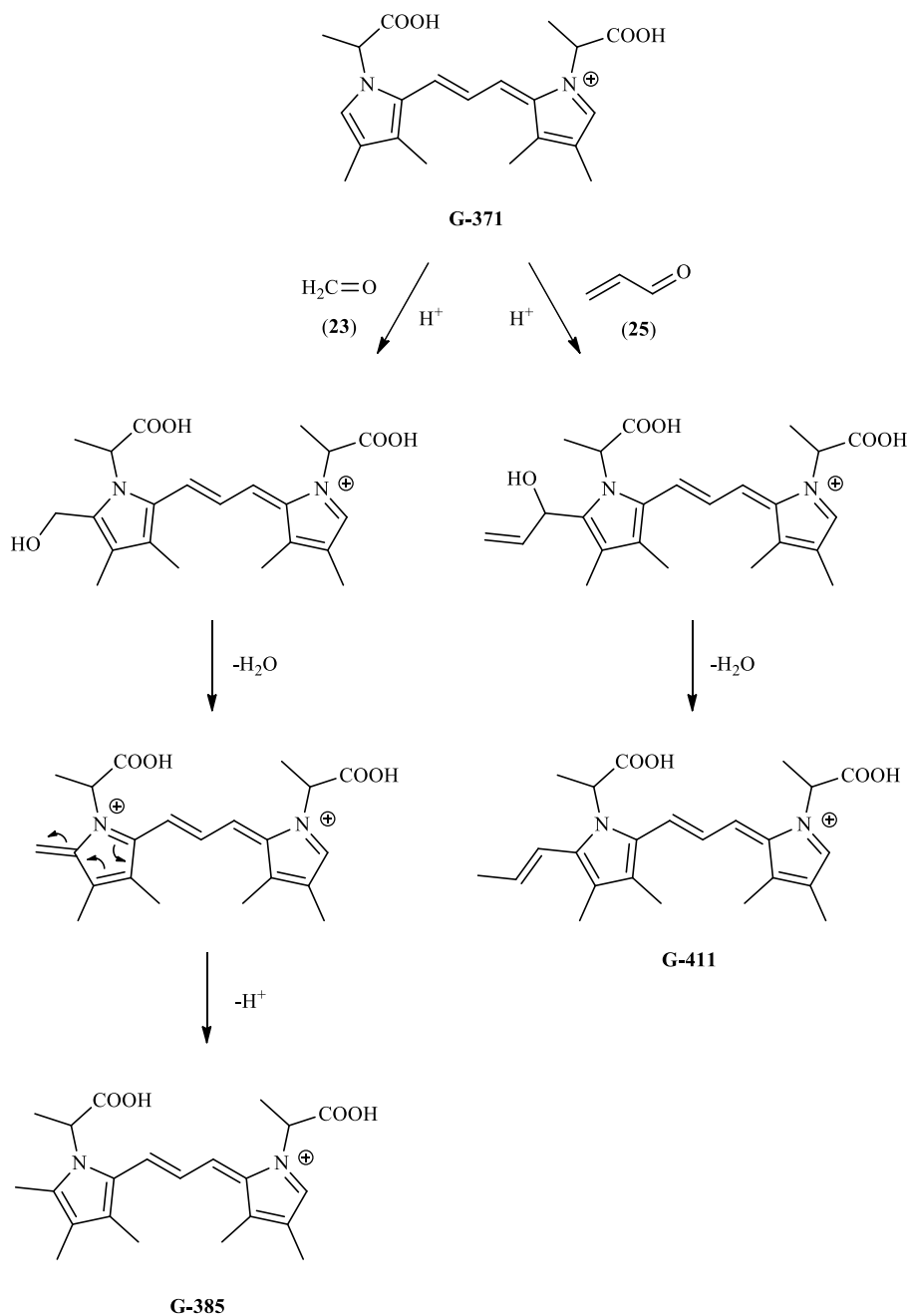
Na základě všech získaných dat lze vyvodit podobu obecného sumárního vzorce studovaných barevných sloučenin, jenž tedy bude  $C_vH_xN_2O_yS_z$ , kde  $v = 15-27$ ,  $x = 21-37$ ,  $y = 4-6$  a  $z = 0-2$ . Podle dosavadních znalostí by měla většina látek obsahovat dvě molekuly 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanové kyseliny spojené tříuhlíkatým můstkem s tím, že pyrrolová jádra mohou nést další postranní řetězce. Základní skelet těchto sloučenin tedy nejspíše obsahuje dvacet jedna atomů uhlíku. Uhlíky nad rámec základního skeletu budou součástí postranních řetězců navázaných na pyrrolová jádra v polohách 2 a/nebo 5. Z těchto informací vyplývá, že sloučenina G-293, obsahující ve svém řetězci patnáct uhlíků, bude tvořena pouze jednou 2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanovou kyselinou. Jak ale indikují HRMS data látek vzniklých reakcí česnekového extraktu s izotopicky substituovanými alaniny, žlutá sloučenina G-293 obsahuje i přes výskyt pouze jednoho pyrrolového jádra dvě zabudované molekuly alaninu. Jeden alanin bude tedy přímou součástí pyrrolového jádra, zatímco druhý se bude podílet na stavbě postranního řetězce molekuly. Podobné uspořádání lze tedy podle všeho očekávat u většiny žlutých látek.

### Navržené struktury hlavních barevných látek s $\lambda_{max} = 560-600$ nm

S využitím HRMS dat a simulované fragmentace provedené v programu Peak View byly navrženy pravděpodobné struktury hlavních barevných sloučenin, jejichž  $\lambda_{max}$  se pohybuje v oblasti 560–600 nm. Jako naprosto základní se v procesu vzniku těchto barevných sloučenin jeví látka G-371, jejíž strukturu se podařilo potvrdit NMR analýzou. Od tohoto základního skeletu jsou dále odvozeny především látky G-385 a G-411 (obrázek 32).

K modifikaci postranního řetězce sloučeniny G-371 dochází s největší pravděpodobností za účasti karbonylových sloučenin, které ve vodném prostředí vznikají přeměnou z thiosulfínátů. V případě česneku kuchyňského se tedy jedná zejména o formaldehyd (**23**) a akrolein (**25**). Jak naznačuje obrázek 32, z hlediska reakčního mechanismu se lze oprávněně domnívat, že navázání karbonylových sloučenin na pyrrolové jádro proběhne formou kyselého katalyzované elektrofilní substituce. V další fázi bude následovat dehydratace postranních řetězců doprovázená

posunem  $\pi$  elektronů na pyrrolovém jádře. Tento stav ale nezůstane po delší časový úsek a pyrrolové jádro začne podle všeho vykazovat tendenci k návratu do energeticky výhodnějšího stavu, čímž dojde k vytvoření původního uspořádání dvojných vazeb. V případě tvorby sloučeniny G-411 proběhne posun dvojných vazeb pravděpodobně i na postranním řetězci molekuly.

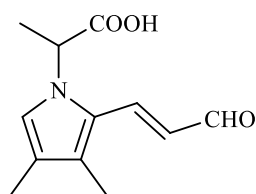


Obrázek 32 – Navržené struktury hlavních barevných látek s  $\lambda_{\text{max}} = 560\text{--}600\text{ nm}$  a pravděpodobný mechanismus jejich vzniku

## Navržené struktury hlavních barevných látek s $\lambda_{max} = 420\text{--}460\text{ nm}$

Značná pozornost při studiu změn zbarvení odehrávajících se v česneku kuchyňském byla věnována žlutým látkám, jejichž  $\lambda_{max}$  můžeme očekávat v oblasti 420–460 nm. Informace z odborných článků věnujících se těmto strukturám jsou ale doposud velmi sporadické, a jedná se tedy o poměrně neprobádané téma.

I v tomto případě byly na základě HRMS dat a simulované fragmentace v programu Peak View navrženy pravděpodobné struktury žlutě zbarvených sloučenin. Základním skeletem pro tvorbu celé řady odvozených látek se zdá být (*E*)-2-[3,4-dimethyl-2-(3-oxoprop-1-en-1-yl)-1*H*-pyrrol-1-yl]propanová kyselina (G-222, obrázek 33). Zdrojem postranního tříuhlíkatého řetězce navázaného na pyrrolové jádro bude s největší pravděpodobností akrolein (**25**).



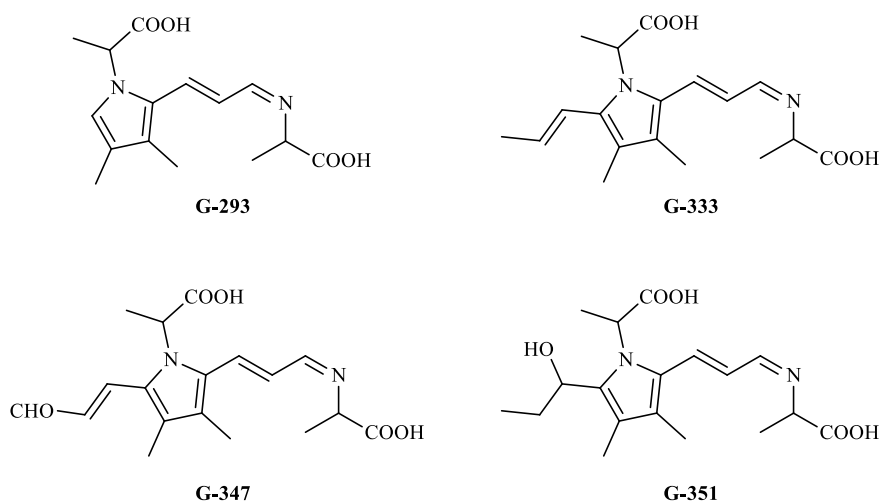
G-222

Obrázek 33 – (*E*)-2-[3,4-dimethyl-2-(3-oxoprop-1-en-1-yl)-1*H*-pyrrol-1-yl]propanová kyselina

Základní studované sloučeniny s  $\lambda_{max}$  v oblasti 420–460 nm, jež ve svých řetězcích nemají zabudované atomy síry, se vyznačují jedním společným znakem, kterým je přítomnost maximálně osmnácti atomů uhlíku obsažených v každé molekule. I když tento počet nestačí na utvoření tříuhlíkatého můstku mezi pyrrolovými jádry, experimenty s izotopově značenými alaniny odhalily, že všechny identifikované barevné sloučeniny obsahují vždy dvě molekuly této aminokyseliny. Jedna molekula alaninu se tedy bude podílet na stavbě pyrrolového jádra, zatímco druhá bude navázána v postranním řetězci. Navržené struktury hlavních žlutých sloučenin znázorňuje obrázek 34.

Kromě těchto základních látek se s využitím HRMS/MS analýz (tabulka 3) podařilo identifikovat několik sloučenin, jejichž sekelet je s velkou pravděpodobností

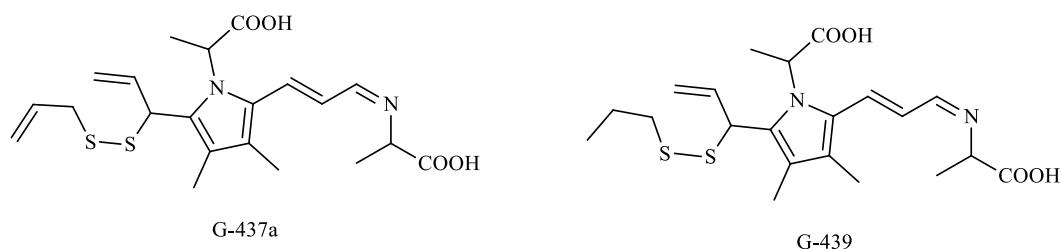




Obrázek 34 – Pravděpodobné struktury hlavních žlutých látek z česneku kuchyňského

tvořen také jedním či dvěma atomy síry. Pomocí modelové fragmentace se podařilo navrhnout předpokládané struktury látek G-437a a G-439 (obrázek 35). Sumární vzorec sloučeniny G-437a je  $C_{21}H_{29}N_2O_4S_2$  (číslo nenasycenosti 9) a sumární vzorec látky G-439 lze vyjádřit zápisem  $C_{21}H_{31}N_2O_4S_2$  (číslo nenasycenosti 8). Při pohledu na uvedená data lze usoudit, že celkový počet uhlíků těchto barevných sloučenin by sice teoreticky stačil na utvoření dvou pyrrolových jader propojených tříuhlíkatým můstkem, ale modelová fragmentace provedená v programu Peak View naznačuje přítomnost pouze jednoho pyrrolového jádra.

Při modifikaci postranní části pyrrolového jádra hrají v tomto případě s největší pravděpodobností důležitou roli thiosloučeniny, které se podle všeho mohou propojit za vzniku disulfidického můstku.



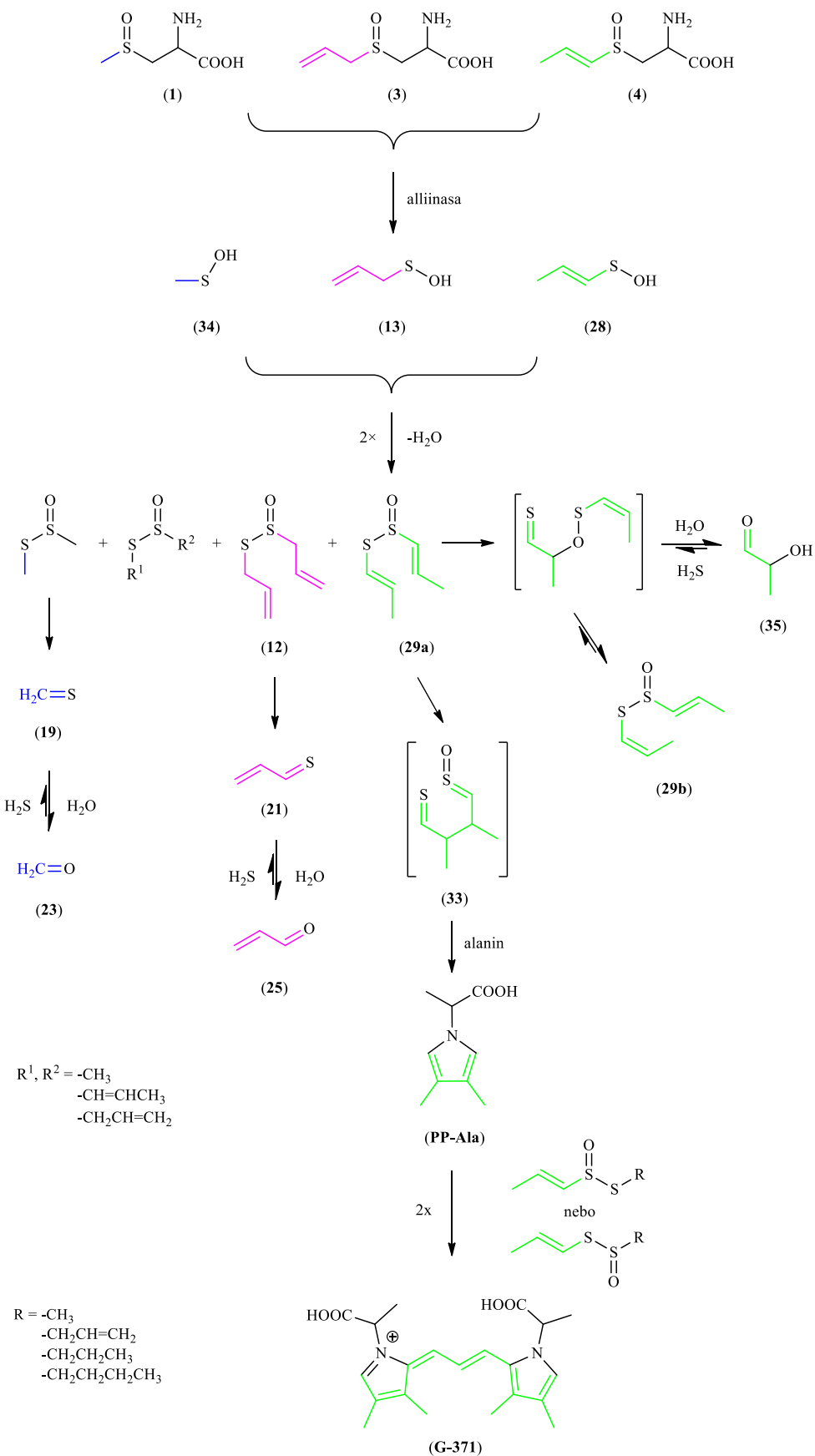
Obrázek 35 – Pravděpodobné struktury sloučenin G-437a a G-439

### 5.1.6 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku kuchyňském

S využitím všech dosavadních znalostí je možné sestavit pravděpodobný mechanismus vzniku barevných sloučenin v česneku kuchyňském (obrázek 36). Výchozími prekurzory celého procesu jsou tři *S*-substituované deriváty cysteinu – methiin (**1**), alliin (**3**) a isoalliin (**4**), které se postupně hromadí v cytoplazmě buněk. Chemickým či fyzikálním narušením buněčných membrán dochází k vyjití enzymu alliinasy z vakuol do cytoplazmatického prostoru. Jejím působením na sirné prekurzory se začnou tvořit příslušné sulfenové kyseliny, jež spolu kondenzují za vzniku celé řady thiosulfínátů.

Nezastupitelný význam thiosulfínátů pro tvorbu barevných sloučenin v česnekovitých rostlinách byl potvrzen za využití modelových reakčních směsí synteticky připravených *S*-allyl-prop-1-en-thiosulfínátu a *S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-2-enthiosulfínátu s alaninem. I když v takto uspořádaném reakčním systému chyběla fáze katalytického působení alliinasy na *S*-substituované deriváty cysteinu, zbarvení směsi thiosulfínátů s alaninem probíhalo podobně jako při použití diethyletherových extraktů připravených z česneku kuchyňského. V úvodní fázi experimentu se vytvořilo zbarvení modré, které přibližně po 24 hodinách přešlo do zeleného odstínu. Bohužel vzhledem k časové zaneprázdněnosti odborníků ze spolupracující laboratoře, kteří se podíleli na UHPLC-HRMS analýzách barevných látek vytvořených ve směsi česnekového extraktu s alaninem, se do závěrky této diplomové práce nepodařilo získat stejnou metodou naměřená data, která by názorně dokumentovala srovnání zastoupení barevných látek v obou reakčních systémech.

Rozkladem allicinu (**12**) dochází ke tvorbě poměrně reaktivního thioakroleinu (**21**), který přechází v akrolein (**25**). Analogickým způsobem pak z přítomných thiosulfínátů obsahujících ve svém řetězci methylovou skupinu vzniká formaldehyd (**23**). Tyto dva aldehydy se mohou vázat na pyrrolové jádro primárně vznikajících barevných sloučenin, což potvrzují i naměřená HRMS data (například u látek G-371 a G-385 odpovídá rozdílu jejich relativních molekulových hmotností právě jedna navázaná -CH<sub>3</sub> skupina). U thiosulfínátů s prop-1-en-1-ylovou skupinou pak dochází k *E/Z* izomeraci přes meziproduct, z něhož s velkou pravděpodobností vzniká ve vodném prostředí další tříuhlíkatý aldehyd, tentokrát 2-hydroxypropanal (**35**).



Obrázek 36 – Pravděpodobný mechanismus úvodní fáze vzniku barevných látek v česneku kuchyňském

Poměrně významným krokem při tvorbě barevných sloučenin v česneku kuchyňském je [3,3]-sigmatropní přesmyk *S*-(prop-1-en-1-yl)-prop-1-enthiosulfinátu (**29a**) za vzniku 2,3-dimethylbutandithialmono-*S*-oxidu (**33**). Následnou reakcí tohoto „color developeru“ s alaninem vzniká bezbarvá sloučenina PP-Ala [2-(3,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina], jež za účasti tříuhlíkatých karbonylových sloučenin tvořících se ve vodném prostředí zejména z thiosulfinátů obsahujících prop-1-en-1-ylovou skupinou přechází v základní barevnou látku G-371. To je ostatně také hlavním důvodem toho, proč se řada odborníků na česnek snaží vypěstovat odrůdy na isoalliin (**4**) chudé při snaze omezit tendenci ke tvorbě nežádoucího zeleného zbarvení.

### 5.1.7 Testování protirakovinné aktivity sloučeniny G-371

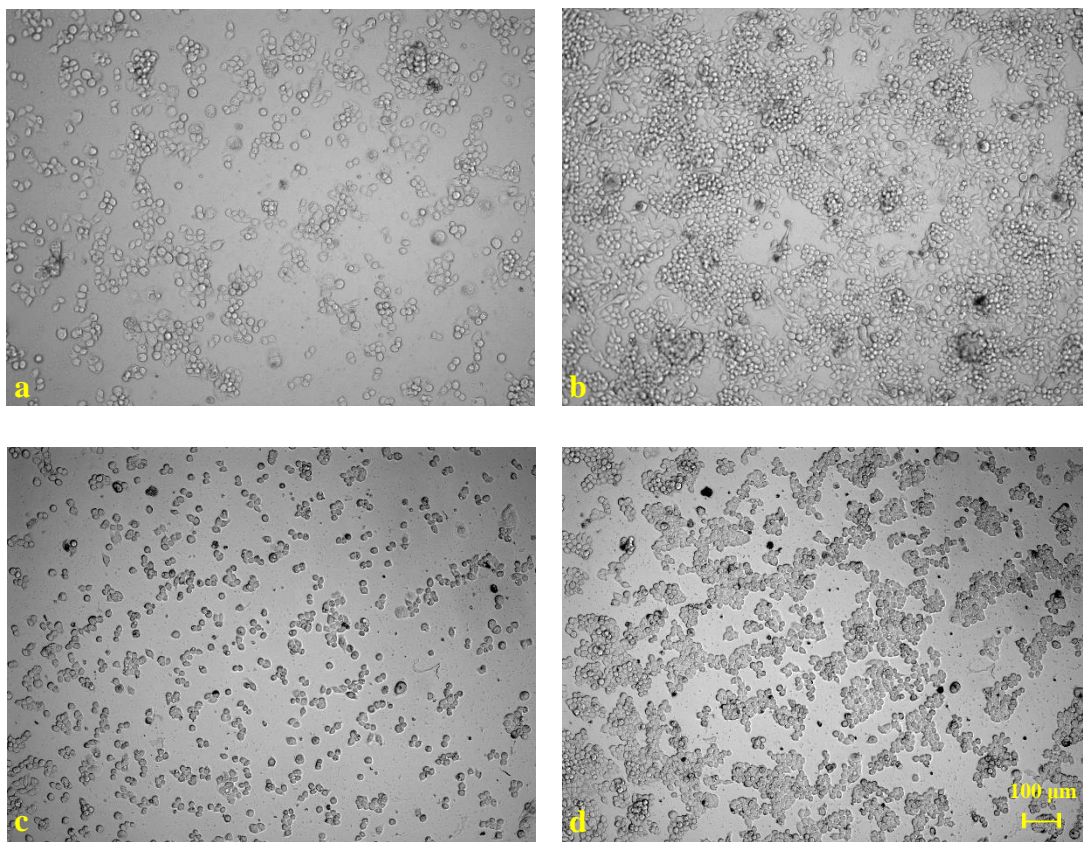
O biologické aktivitě barevných látek vznikajících v česneku kuchyňském nebyly doposud publikovány žádné vědecké práce. Většina podobně zaměřených výzkumů se týká především studia allicinu (**12**), u něhož byla zaznamenána celá řada významných biologických účinků. Jelikož se tedy podařilo vypreparovat sloučeninu G-371 v čistotě potřebné pro NMR analýzu a zároveň se naskytla možnost využití rakovinných buněk kultivovaných v souvislosti s paralelně probíhajícím výzkumem Mgr. Kristýny Kupcové zabývající se biologickou aktivitou látek z houževnatce jedlého, byla sloučenina G-371 otestována na její případnou protirakovinnou aktivitu.

Jak ukazuje tabulka 5, protirakovinná aktivita látky G-371 byla testována na lidských nádorových buňkách děložního čípku (HeLa), jater (Hep2G) a slinivky břišní (PATU), a to v koncentracích 100  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$  a 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . V 1 ml roztoku bylo tedy přítomno 37,1  $\mu\text{g}$ , 3,71  $\mu\text{g}$ , 0,371  $\mu\text{g}$  a 0,0371  $\mu\text{g}$  testované barevné látky. Naměřené hodnoty životaschopnosti testovaných buněk jsou uváděny v procentech, a jedná se tedy o vyjádření relativního počtu životaschopných buněk ve srovnání se standardním vzorkem. Nejvyšší úmrtnost je možné pozorovat v případě buněk jaterních (Hep2G). Ty ale na základě dostupných informací patří v podobných testech k těm vůbec nejcitlivějším.<sup>81</sup> Úmrtnost jednotlivých typů rakovinných buněk nepřekročila v průběhu testování hranici 25 %, a to ani v případě nejvyšší použité koncentrace látky G-371. Průměrná životaschopnost buněk se pohybovala kolem 87 %, z čehož lze usuzovat na velmi malou inhibiční aktivitu látky G-371 vůči testovaným rakovinným buňkám.

Tabulka 5 – Životaschopnost testovaných buněk po působení barevné látky G-371

	100 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$	0,1 $\mu\text{mol/l}$
HeLa	92	88	93	93
Hep2G	77	80	86	98
PATU	83	94	84	84

Pro srovnání hodnota  $\text{IC}_{50}$  (koncentrace látky pro 50% inhibiční účinek *in vitro*) poměrně běžného chemoterapeutika epirubicinu se podle typů buněk pohybuje v desetinách až jednotkách  $\mu\text{g}$  na ml roztoku.<sup>82</sup> Na obrázcích 37a–d jsou uvedeny mikroskopické snímky rakovinných buněk jater (Hep2G) v průběhu testování sloučeniny G-371 ve srovnání se standardním vzorkem bez jakéhokoliv přídatku. Nahoře je možné pozorovat buňky v roztoku látky G-371 na začátku testování (obrázek 37a) a po 72 hodinách inkubace (obrázek 37b), pod nimi jsou v analogickém pořadí uvedeny snímky standardů (obrázek 37c a 37d).



Obrázky 37a–d – Mikroskopické snímky z testování protirakovinné aktivity látky G-371 na rakovinných buňkách jater (Hep2G)

Ačkoliv tedy u látky G-371 nebyl prokázán účinek protirakovinný, bylo by jistě velmi zajímavé otestovat její biologickou aktivitu vůči buňkám zdravým. Získání těchto buněk pro laboratorní účely je ale finančně velmi nákladné, a proto tento typ výzkumu nemohl být zrealizován.

## 5.2 Tvorba barevných sloučenin v česneku sicilském

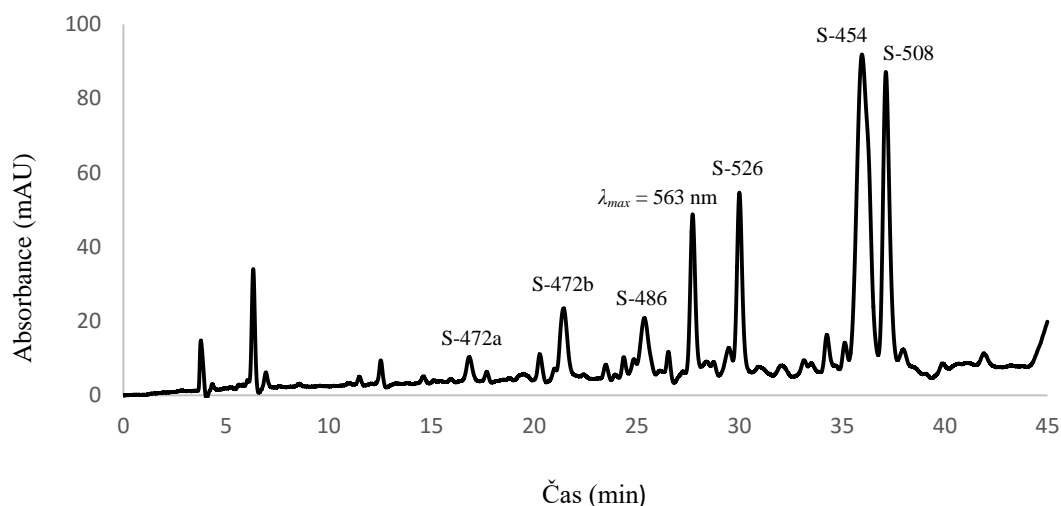
### 5.2.1 Izolace barevných látek vznikajících v česneku sicilském

V případě studia barevných látek vznikajících při zpracování česneku sicilského bylo přímo navázáno na výzkum Petry Kučerové, jenž byl publikován v její disertační práci roku 2013.<sup>83</sup> Vycházelo se především ze zde uvedených (+)ESI HRMS dat, která se týkají sedmi dominantních barevných sloučenin tvořících se ve směsi extraktu z česneku sicilského s alaninem (tabulka 6). I v tomto případě je využíváno kódového označení sloučenin, které je složeno z písmene odpovídajícímu dané zelenině (S od pojmu „sicilian honey garlic“) a relativních molekulových hmotností analyzovaných látek.

Tabulka 6 – (+)ESI HRMS data hlavních barevných látek tvořících se v homogenátu česneku sicilského dle Kučerové

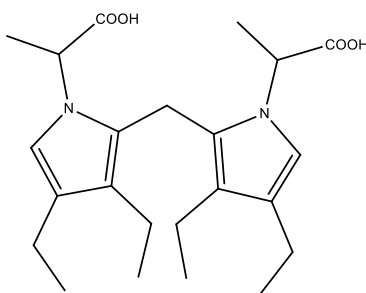
sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
S-472a	533	473,3020	473,3010	2,1	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
S-472b	533	473,3024	473,3010	3,0	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
S-486	535	487,3177	487,3166	2,2	C <sub>28</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
S-526	566	527,3506	527,3479	5,0	C <sub>31</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
S-494	551	495,3219	495,3217	0,3	C <sub>30</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
S-454	557	455,2909	455,2904	1,0	C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
S-508	580	509,3388	509,3374	2,8	C <sub>31</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11

Jedním z cílů této diplomové práce bylo získat dostatečné množství barevných látek z česneku sicilského zejména pro NMR analýzy, které by mohly potvrdit dosavadní předpoklady o struktuře studovaných sloučenin. Ve srovnání s česnekem kuchyňským jsou ale výtěžky reakce směsi extraktu česneku sicilského s alaninem znatelně menší, a tak bylo postupně zpracováno kolem deseti kilogramů cibulek této trvalky. Na základě výsledků z provedených HPLC analýz (obrázek 38) a srovnáním absorpčních maxim studovaných sloučenin s výše uvedenými HRMS daty (tabulka 6) se podařilo k většině dominantních píků přiřadit jejich pravděpodobný sumární vzorec. Pouze k látce S-494 nebyla nalezena odpovídající  $\lambda_{max}$ , a namísto ní byla zaznamenána blíže neidentifikovaná sloučenina s  $\lambda_{max} = 563$  nm.



Obrázek 38 – HPLC chromatogram barevných látek z česneku sicilského s identifikací na základě HRMS dat dle Kučerové

Bohužel ani poměrně velké množství zpracovaných cibulek česneku sicilského však nestačilo k získání dostatečného množství jednotlivých barevných látek. S narůstajícím stářím biologického materiálu navíc klesala schopnost tvorby barevných sloučenin, a tak byly jejich výtěžky čím dál nižší. I přesto lze ale na základě HRMS dat vyvodit zajímavé závěry. Všechny analyzované barevné látky obsahují ve svém řetězci minimálně dvacet sedm atomů uhlíku. Jde o větší počet než u česneku kuchyňského, což se ale vzhledem ke zjištěné přítomnosti butiinu (**7**) a homoisoalliinu (**8**) coby výchozích prekurzorů očekávalo. Dále ve sloučeninách nacházíme vždy dva atomy dusíku a minimálně čtyři atomy kyslíku. Lze se tedy oprávněně domnívat, že i v tomto případě bude mít výchozí skelet pyrrolický charakter. S přihlédnutím k dosavadním znalostem spojených zejména s cibulí kuchyňskou se bude pravděpodobně jednat o 2,2'-[methandiylbis(3,4-diethyl-1H-pyrrol-1,2-diyl)] dipropanovou kyselinu (obrázek 39). Vzhledem ke zjištěným absorpčním maximům



Obrázek 39 – 2,2'-[Methandiylbis(3,4-diethyl-1H-pyrrol-1,2-diyl)]dipropanová kyselina

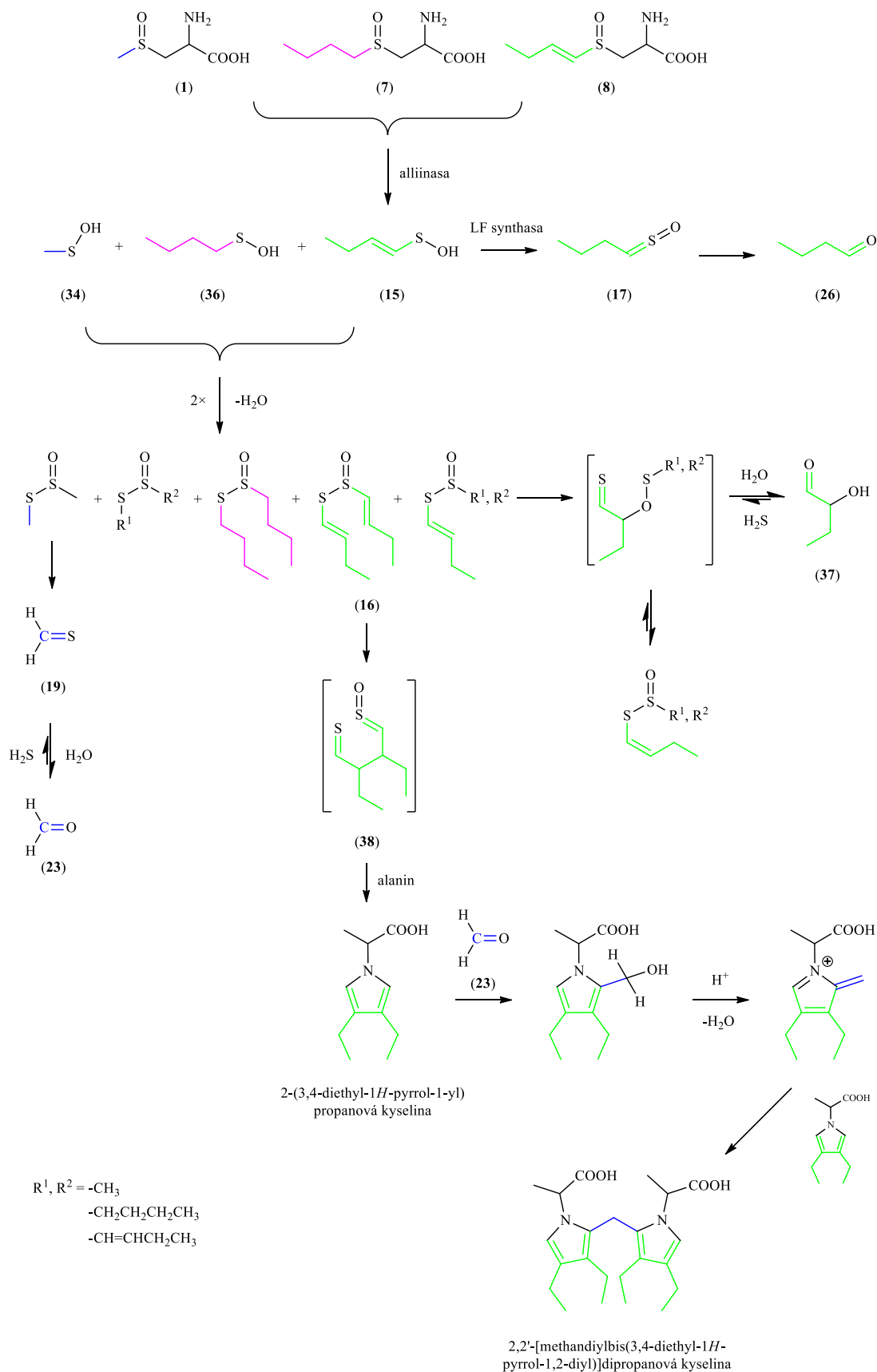


barevných látek ( $\lambda_{max} = 533\text{--}580\text{ nm}$ ) směřují úvahy o možných strukturách k předpokladu, že můstek mezi jádry bude tedy pouze jednouhlíkatý. Základní skelet těchto sloučenin by měl tedy obsahovat minimálně dvacet tři atomů uhlíku, čtyři atomy kyslíku a dva atomy dusíku. Ostatní atomy připadají na tvorbu postranních řetězců v poloze 2 a/nebo 5 podobně jako u česneku kuchyňského.

### 5.2.2 Pravděpodobný mechanismus vzniku barevných látek v česneku sicilském

Lze oprávněně předpokládat, že barevné změny doprovázející narušení pletiva cibulek česneku sicilského (obrázek 40) budou probíhat analogickým mechanismem jako u česneku kuchyňského (obrázek 36). Sirnými prekurzy celého procesu jsou v tomto případě methiin (**1**), butiin (**7**) a především homoisoalliin (**8**), které působením alliinasy vylité z buněčných vakuol přechází poměrně rychle na methansulfenovou (**34**), butansulfenovou (**36**) a but-1-ensulfenovou (**15**) kyselinu. V tomto okamžiku vstupuje do celého procesu enzym LF synthasa, který se v česneku kuchyňském netvoří. Jeho účinkem dochází k přeměně but-1-ensulfenové kyseliny (**15**) na slzotvorný butanthial-*S*-oxid (**17**), jenž dále samovolně přechází v butanal (**26**). Tato karbonylová sloučenina bude s velkou pravděpodobností hrát významnou roli při tvorbě postranních řetězců na pyrrolových jádrech primárně vznikajících barevných sloučenin. Přítomnost LF synthasy v buňkách česneku sicilského je také hlavní odpovědí na otázku, proč nám při jeho zpracování slzí oči podobně jako při zpracování cibule kuchyňské, u níž dochází působením LF synthasy na prop-1-ensulfenovou kyselinu (**28**) k produkci slzotvorného propanthial-*S*-oxidu (**27**).

Vzniklé sulfenové kyseliny kondenzují opět za vzniku celé řady thiosulfínátů, jejichž nezastupitelný význam pro tvorbu barevných látek byl již diskutován v kapitole věnující se barevným změnám probíhajících v česneku kuchyňském. Významnou roli při vzniku barevných sloučenin bude také hrát v systému přítomný thioformaldehyd (**19**), který ve vodném prostředí postupně přechází v reaktivní formaldehyd (**23**). O funkci této základní karbonylové sloučeniny bude pojednáno níže. Thiosulfínáty obsahující but-1-en-1-yllovou skupinu podléhají v roztoku *E/Z* izomeraci přes meziproduct, jenž může ve vodném prostředí tvořit další karbonylovou sloučeninu, tentokrát 2-hydroxybutanal (**37**).



Obrázek 40 – Pravděpodobný mechanismus úvodní fáze vzniku barevných látek v česneku sicilském

Z *S*-(but-1-en-1-yl)-but-1-enthisulfinátu (**16**) vzniká [3,3]-sigmatropním přesmykem 2,3-diethylbutandithialmono-*S*-oxid (**38**), který je také označován anglickým výrazem „color developer.“ Jeho následnou reakcí s alaninem se tvoří 2-(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanová kyselina. Tato základní struktura obsahující ve svém řetězci jeden pyrrolový kruh bude v následných krocích přecházet do podoby molekul se dvěma navzájem propojenými pyrrolovými jádry.

Nyní sehraje svou významnou úlohu formaldehyd (**23**) a prostřednictvím kyselě katalyzované elektrofilní substituce se utvoří základní skelet barevných látek přítomných v česneku sicilském, kterým je 2,2'-[methandiylobis(3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-1,2-diyl)]dipropanová kyselina, od níž se bude odvíjet struktura dalších načervenalých sloučenin.

## 6 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena především na izolaci a identifikaci hlavních barevných látek vznikajících při zpracování česnekovitých rostlin, a to zejména při zpracování česneku kuchyňského a česneku sicilského.

Na základě experimentů s diethyletherovými extrakty připravenými zejména z česneku kuchyňského se podařilo zdokumentovat vliv hlavních parametrů, jež hrají při vzniku barevných látek nejvýznamnější roli. Podařilo se potvrdit pH optimum pro maximalizaci výtěžků barevných sloučenin, byla diskutována reakční doba potřebná pro tvorbu látek s absorpčním maximem v oblasti  $\lambda_{max} = 420\text{--}460$  nm a v oblasti  $\lambda_{max} = 560\text{--}600$  nm a dále bylo potvrzeno, že zelené zbarvení česneku kuchyňského je způsobeno kombinacemi látek žlutých a modrých.

Postupnou optimalizací metod pro preparativní HPLC se podařilo izolovat a identifikovat nejvýznamnější barevné látky tvořící se ve vybraných česnekovitých rostlinách. S využitím metody NMR byla stanovena struktura sloučeniny G-371, jež podle všeho hraje při vzniku barevných látek v česnekovitých rostlinách velmi významnou roli, jelikož přítomnost této látky byla zaznamenána dokonce i v cibuli kuchyňské nebo póru zahradním.

S využitím UHPLC/HRMS dat byly stanoveny pravděpodobné sumární vzorce hlavních patnácti barevných sloučenin tvořících se v česneku kuchyňském. Velká pozornost pak byla věnována především látkám žlutým, o nichž se odborná literatura zmiňuje pouze sporadicky. V rámci této diplomové práce byla navržena jejich pravděpodobná struktura, jež vyvrací dosavadní předpoklady o nutné přítomnosti dvou pyrrolových jader ve všech barevných sloučeninách vznikajících v česnekovitých rostlinách.

Kombinací dostupných informací a naměřených dat byly navrženy reakční mechanismy, které s největší pravděpodobností vedou ke vzniku celé řady barevných sloučenin v česneku kuchyňském a česneku sicilském.

## 7 Seznam použitých zdrojů

- 1) *Onion and Garlic Crop Report*, Cochin, **2014**. In: Champagne Foods Ltd. [online]. Dostupné z: <http://www.champagnefoods.com/4.4%20Onion%20&%20Garlic.pdf> [k 28. 3. 2016].
- 2) Block, E. *Garlic and other Alliums. The lore and the science*; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2010**. ISBN 978-0-85404-190-9.
- 3) Brewster, J. L. *Onions and other vegetable Alliums*, 2. vydání; CABI Publishing, Cambridge, UK, **2008**. ISBN 978-1-84593-399-9.
- 4) Nicholson, P. T. a Shaw, I. *Ancient Egyptian materials and technology*; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **2000**. ISBN 0-521-45257-0.
- 5) Dzhurmanski, A. Peculiarities of growth and development *Nectaroscordum Siculum* Lindl. in terms of Kazanlak field. *International conference Stara Zagora*. **2007**, 7–8 June, 95–102.
- 6) Rabinowitch, H. D. a Currah, L. *Allium crop science: Recent advances*; NY: CABI Publishing, New York, USA, **2002**. ISBN 0-85199-510-1.
- 7) De Sarker, D., Johnson, M. A. T., Reynolds, A. a Brandham, P. E. Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (*Alliaceae*), and of some Eurasian relatives. *Bot. J. Linn. Soc.* **1997**, *124*, 361–373.
- 8) Kubec, R., Krejčová, P., Mansur, L. a García, N. Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in *Alliaceae* species native to South Africa and South America. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1335–1342.
- 9) Lyantagaye, S. L. Ethnopharmacological and phytochemical review of *Allium* species (sweet garlic) and *Tulbaghia* species (wild garlic) from Southern Africa. *Tanz. J. Sci.* **2011**, *37*, 58–72.

- 10) Rudall, P. J., Bateman, R. M., Fay, M. F. a Eastman, A. Floral anatomy and systematics of *Alliaceae* with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers. *Am. J. Bot.* **2002**, *89*, 1867–1883.
- 11) Sell, P. a Murrell, G. *Flora of Great Britain and Ireland, volume 5, Butomaceae–Orchidaceae*; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1996**. ISBN 978-0-521-55339-1.
- 12) The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, *161*, 105–121.
- 13) Dubouzet, J. G. a Shinoda, K. Phylogeny of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb et Berth.) rouy based on DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer region of nrDNA. *Theor. Appl. Genet.* **1998**, *97*, 541–549.
- 14) Cole, T. C. H. Angiosperm Phylogeny Group (APG) in jeopardy – Where have the flowers gone? *PeerJ PrePrints.* **2015**, *3*: e1517. <https://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.1238v1>.
- 15) Christenhusz, M. J. M., Vorontsova, M. S., Fay, M. F. a Chase, M. W. Results from an online survey of family delimitation in *Angiosperms* and *Ferns*: Recommendations to the Angiosperm Phylogeny Group for thorny problems in plant classification. *Bot. J. Linn. Soc.* **2015**, *178*, 501–528.
- 16) Linnaeus, C. *Species Plantarum*; Laurentius Salvius, Stockholm, Sweden, **1753**.
- 17) Salunkhe, D. K. a Kadam, S. S. *Handbook of vegetable science and technology: Production, composition, storage and processing*; Marcel Dekker, Inc., New York, USA, **1998**. ISBN 0-8247-0105-4.
- 18) Štěpánková, J. a kol. *Květena ČR, sv. 8*; Academia, Praha, **2010**. ISBN 78-80-200-1824-3.

- 19) Haragsim, O. *Včelařské byliny*; Grada Publishing, Praha, **2007**. ISBN 978-80-247-2157-6.
- 20) Kamenetsky, R., Shafir, I. L., Zemah, H., Barzilay, A. a Rabinowitch, H. D. Environmental control of garlic growth and florogenesis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2004**, *129*, 144–151.
- 21) Thompson, S. *The kitchen garden*; Bantam, New York, USA, **1997**. ISBN 0-553-37476-1.
- 22) Zhang, Z., Lei, M., Liu, R., Gao, Y., Xu, M. a Zhang, M. Evaluation of alliin, saccharide contents and antioxidant activities of black garlic during thermal processing. *J. Food Biochem.* **2015**, *39*, 39–47.
- 23) Lyons, E. a Heather, P. *Buddhism: History and diversity of a great tradition*; University of Pennsylvania museum publication, Philadelphia, USA, **1985**. ISBN 0-934718-76-8.
- 24) Bai, B., Chen, F., Wang, Z., Liao, X., Zhao, G. a Hu, X. Mechanism of the greening color formation of „Laba“ garlic, a traditional homemade Chinese food product. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7103–7107.
- 25) Li, Y. N., Huang, F., Liu, X. L., Shu, S. N., Huang, Y. J. a Cheng, H. J. *Allium sativum* – Derived allitridin inhibits treg amplification in cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* **2013**, *85*, 493–500.
- 26) Li, G., Ma, X., Deng, L., Zhao, X., Wei, Y., Gao, Z., Jia, J., Xu, J. a Sun, Ch. Fresh garlic extract enhances the antimicrobial activities of antibiotics on resistant strains *in vitro*. *Jundishapur J. Microbiol.* **2015**, *8*: e14814.
- 27) Kundaković, T. D., Ćirić, A. D., Soković, M. D., Milenković, M. T., Nikolić, V. D. a Nikolić, G. S. Antimicrobial activity of the lozeng with garlic bulb powder. *Hem. Ind.* **2011**, *65*, 607–610.

- 28) Borek, C. Garlic reduces dementia and heart disease risk. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 810–812.
- 29) Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119–146.
- 30) Friesen, N., Fritsch, R. M. a Blattner, F. R. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso.* **2006**, *22*, 372–395.
- 31) The Plant List. In: *Theplantlist.org* [online]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-296603> [k 9. 3. 2016].
- 32) Popova, A. T., Mihaylova, D. S. a Alexieva, I. N. Comparative study on the antioxidant activity of selected culinary plants growing in Bulgaria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2014**, *3*, 436–444.
- 33) Brickell, Ch. a kol. *Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin*, 2. vydání; Euromedia Group – Ikar, Praha, **2000**. ISBN 80-7202-719-0.
- 34) D`Antuono, L. F. a Alexieva, I. Plants and food reports. Bulgaria, August 2011. *BaSeFood.* **2011**, *11*, 2.
- 35) Sapundjieva, T., Alexieva, I., Stoyanova, A., Merdzhanov, A. a Popova, A. Antibacterial activity of some local Bulgarian culinary spices. Poster in Traditional Food International (TFI, 2012), Traditional foods: From culture, ecology and diversity, to human health and potential for exploitation. Cesena, Italy, 4–6 October, **2012**.
- 36) Alexieva, I., Mihaylova, D. a Popova, A. Evaluation of the antioxidant capacity of aqueous extracts of fresh samardala (*Allium Bulgaricum* L.) leaves. *Food Science, Engineerig and Technologies, Scientific Works of UFT.* **2013**, *LX*, 826–831.



- 37) Yoo, K. S. a Pike, L. M. Determination of flavor precursor compound *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Sci. Hortic.* **1998**, *75*, 1–10.
- 38) Randle, W. M., Lancaster, J. E., Shaw, M. L., Sutton, K. H., Hay, R. L. a Bussard, M. L. Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility-sulfur increases levels of alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1995**, *120*, 1075–1081.
- 39) Thomas, D. J. a Parkin, K. L. Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1632–1638.
- 40) Freeman, G. G. a Whenham, R. J. A survey of volatile components of some *Allium* species in terms of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides present as flavour precursors. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 1869–1886.
- 41) Kubec, R., Cody, R. B., Dane, A. J., Musah, R. A., Schraml, J., Vattekkatte, A. a Block, E. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. (*Z*)-Butanethial *S*-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their *S*-(*E*)-1-butenylcysteine *S*-oxide precursor from *Allium sicutum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1121–1128.
- 42) Fritsch, R. M. a Keusgen, M. Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (*Alliaceae*). *Phytochemistry.* **2006**, *67*, 1127–1135.
- 43) Unsicker, S. B., Kunert, G. a Gershenzon, J. Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 479–485.
- 44) Stoll, A. a Seebeck, E. Über alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. *Experientia.* **1947**, *3*, 114–115.
- 45) Mazelis, M. a Crews, L. Purification of the alliin lyase of garlic, *Allium sativum*. L. *Biochem J.* **1968**, *108*, 725–730.

- 46) Weiner, L., Shin, I., Shimon, L. J., Miron, T., Wilchek, M., Mirelman, D., Frolow, F. a Rabinkov, A. Thiol-disulfide organization in alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). *Protein Sci.* **2009**, *18*, 196–205.
- 47) Zhou, J. Immobilization of alliinase and its application: Flow injection enzymatic analysis for alliin. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 1337–1342.
- 48) Yutani, M., Taniguchi, H., Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K. a Tanaka, T. Alliinase from *Ensifer adhaerens* and its use for generation of fungicidal activity. *AMB Express.* **2011**, *1:2*, 1–8.
- 49) Block, E., Dane, A. J., Thomas, S. a Cody, R. B. Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyl trisulfane S-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4617–4625.
- 50) Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z., Stanojević, L. P. a Cakić, M. D. Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *FU Phys. Chem. Tech.* **2011**, *9*, 9–20.
- 51) Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z. a Stanojević, L. P. Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin and allicin incorporated in gel. *Chem. Ind.* **2010**, *6*, 85–93.
- 52) Koch, H. P. a Lawson, L. D. *Garlic: The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*, 2. vydání; Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, **1996**. ISBN 0683181475.
- 53) Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T. a Kumagai, H. Plant biochemistry: An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature.* **2002**, *419*, 685.

- 54) Bayer, T., Wagner, H., Block, E., Grisoni, S., Zhao, S. H. a Neszmelyi, A. Zwiebelanes: Novel 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexanes from onion. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3085–3086.
- 55) Kubec, R., Hrbáčová, M., Musah, R. A. a Velíšek, J. *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5089–5094.
- 56) Joslyn, M. A. a Sano, T. The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue. *J. Food. Sci.* **1956**, *21*, 170–183.
- 57) Lukes, T. M. Pinking of onions during dehydration. *Food Technol.* **1959**, *13*, 391–393.
- 58) Yamaguchi, M., Shannon, S., Howard, F. D. a Joslyn, M. A. Factors affecting the formation of a pink pigment in purees of onion. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1965**, *86*, 475–483.
- 59) Lukes, T. M. Factors governing the greening of garlic puree. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1577–1578.
- 60) Lee, E. J., Cho, J. E. a Lee, S. K. Effect of storage temperature and S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide on green pigment formation in crushed garlic (*Allium sativum* L.) cloves. *Hort. Environ. Biotechnol.* **2006**, *47*, 165–173.
- 61) Kim, D. M. a Kim, K. H. On the development of flesh greening of the stored garlic. *Korean. J. Food Sci. Technol.* **1990**, *22*, 50–55.
- 62) Kubec, R. a Velíšek, J. *Allium* discoloration: The color-forming potential of individual thiosulfinates and amino acids: structural requirements for the color-developing precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3491–3497.
- 63) Cho, J., Lee, E. J., Yoo, K. S., Lee, S. K. a Patil, B. S. Identification of candidate amino acids involved in the formation of blue pigments in crushed garlic cloves (*Allium sativum* L.). *J. Food. Sci.* **2009**, *74*, 11–16.

- 64) Lee, H. J., Shin, Y. K., Kyu, H. K. a Chung, C. H. Green pigmentation and pH change of homogenized garlic. *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, *23*, 121–124.
- 65) Imai, S., Akita, K., Muneaki, T. a Sawada, H. Model studies on precursor system generating blue pigment in onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 848–852.
- 66) Imai, S., Akita, K., Tomotake, M. a Sawada, H. Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in the blue-green discoloration of onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 843–847.
- 67) Wang, D., Nanding, H., Han, N., Chen, F. a Zhao, G. 2-(1*H*-Pyrrolyl) carboxylic acids as pigment precursors in garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1495–1500.
- 68) Wang, D., Yang, X., Wang, Z., Hu, X. a Zhao, G. Isolation and identification of one kind of yellow pigments from model reaction systems related to garlic greening. *Food Chem.* **2009**, *117*, 296–301.
- 69) Kubec, R., Urajová, P., Lacina, O., Hajšlová, J., Kuzma, M. a Zápál, J. *Allium* discoloration: Color compounds formed during pinking of onion and leek. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10192–10199.
- 70) Zang, J., Wang, D. a Zhao, G. Mechanism of discoloration in processed garlic and onion. *Trends Food Sci. Tech.* **2013**, *30*, 162–173.
- 71) Kim, W. J., Cho, J. S. a Kim, K. H. Stabilization of ground garlic color by cysteine, ascorbic acid, trisodium phosphate and sodium metabisulfite. *J. Food Qual.* **1999**, *22*, 681–691.
- 72) Cussans, A., McFadden, J. a Ostlere, L. Systemic sodium metabisulfite allergy. *Contact Dermatitis.* **2015**, *73*, 316–317.
- 73) Ichikawa, M., Ide, N. a Ono, K. Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4849–4854.

- 74) Yamazaki, Y., Yamamoto, T. a Toshikatsu, O. Causes and remedies for green discoloration of processed garlic puree: Effects of storage conditions on ingredient bulbs. *Food Sci. Technol. Res.* **2012**, *18*, 187–193.
- 75) Hong, S. I. a Kim, D. M. Storage quality of chopped garlic as influenced by organic acids and high-pressure treatment. *J. Sci. Food Agr.* **2001**, *81*, 397–403.
- 76) Lee, E. J., Yoo, K. S. a Patil, B. S. Freeze-dried fresh onion powder prevents green discolouration (greening) in macerated garlic. *Food Chem.* **2012**, *131*, 397–404.
- 77) Shen, C. a Parkin, K. L. *In vitro* biogenesis of pure thiosulfinates and propanethial-S-oxide. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6254–6260.
- 78) Kubec, R., Svobodová, M. a Velíšek, J. Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *862*, 85–94.
- 79) Slater, G. P. Allyl thiocyanate – Natural product or artifact in crucifer extracts? *Chromatographia.* **1992**, *34*, 461–467.
- 80) Wijers, H. E., Boelens, H., Gen, van der, A. a Brandsma, L. Synthesis and some properties of 1-alkenyl alkyl disulfides and di(1-alkenyl) disulfides. *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas.* **1969**, *88*, 519–529.
- 81) Eriksson, J. E., Hägerstrand, H. a Isomaa, B. Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, *930*, 304–310.
- 82) Gyémant, N., Tanaka, M., Antus, S., Hohmann, J., Csuka, O., Mandoky, L. a Molnar, J. *In vitro* search for synergy between flavonoids and epirubicin on multidrug-resistant cancer cells. *In Vivo.* **2005**, *19*, 367–374.
- 83) Kučerová, P. *Barevné sloučeniny vznikající během zpracování česnekovitých rostlin*. České Budějovice, **2013**. Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra aplikované chemie.

## Zdroje obrázků

- 1) Clay models of garlic bulb. In: *Cow of Gold, an Encyclopedia of Egyptian Mythology* [online]. © 2016, Tangient LLC [k 9. 1. 2016]. Dostupné z: <https://cowofgold.wikispaces.com/Garlic>.
- 2) Sicilian honey garlic bulbs. In: Crocus, Online Garden Centre [online]. © 2016, Crocus [k 9. 1. 2016]. Dostupné z: [http://www.crocus.co.uk/plants/\\_/nectaroscordum-siculum/classid.2000004525/](http://www.crocus.co.uk/plants/_/nectaroscordum-siculum/classid.2000004525/).
- 3) *Allium sativum*. In: Prodifact [online]. © 2005–2010, Prodifact.com [k 1. 2. 2016]. Dostupné z: <http://www.prodifact.com/1allium-sativum.html>.
- 4) Del morado al negro: Ajo negro. In: GASTROMKG [online]. © 2015, WordPress.com [k 1. 2. 2016]. Dostupné z: <https://gastromkg.wordpress.com/2015/12/11/del-morado-al-negro-ajo-negro>.
- 5) Laba garlic. In: Cooking Master Girl [online]. © 2013–2016, Cooking Master Girl, by WordPress.com [k 5. 3. 2016]. Dostupné z: <https://xzone-lidemin.rhcloud.com/fast/laba-garlic>.
- 6) *Allium siculum* syn. *Nectaroscordum siculum*. In: Zahra Seeds, Organic Seeds & Bulbs [online]. © 2015–2016, Zahra Seeds [k 5. 3. 2016]. Dostupné z: <http://www.zahraseeds.eu/nl/category/alliums-biologisch/#prettyPhoto>.
- 7) Samardala salty mix. In: Shiderov Spices [online]. © 2016, Shiderov.com [k 5. 3. 2016]. Dostupné z: <http://shiderov.com/en/articles/seasonings-ready-to-use>.
- 8) Samardala salty mix. In: Shiderov Spices [online]. © 2016, Shiderov.com [k 5. 3. 2016]. Dostupné z: <http://shiderov.com/en/articles/seasonings-in-jars>.
- 9) Sushena podpravka ot samardala. In: Elena Dimitrova, Kulinare blog za surovoyadstvo, veganstvo i vegetarianstvo [online]. © 2015, Elena Dimitrova,

by Blogger.com [k 7. 3. 2016]. Dostupné z: [http://naturalnakuhnia.blogspot.cz/2015/04/blog-post\\_54.html](http://naturalnakuhnia.blogspot.cz/2015/04/blog-post_54.html).

## 8 Seznam zkratek

**APG** – „Angiosperm Phylogeny Group“ (skupina odborníků věnující se co nejpresnějšímu systematickému vymezení krytosemenných rostlin)

**m-CPBA** – *m*-chlorperoxybenzoová kyselina

**DART** – „direct analysis in real time“ (přímá analýza v reálném čase)

**DMEM** – „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (Eaglovo médium modifikované Dulbecem)

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina

**ESI** – „electrospray ionisation“ (ionizace elektrosprejem)

**FBS** – „fetal bovine serum“ (fetální bovinní sérum)

**FWHM** – „full width at half maximum“ (plná šířka v polovině maxima)

**GC** – „gas chromatography“ (plynová chromatografie)

**GC-MS** – „gas chromatography-mass spectrometry“ (plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)

**HeLa** – nádorové buňky děložního čípku, označení pochází ze jména pacientky, z níž byly buňky poprvé izolovány – He(nrietta) La(cks)

**HepG2** – „hepatocellular liver cells“ (hepatocelulární jaterní buňky)

**HPLC** – „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

**HRMS** – „high resolution mass spectrometry“ (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením)

**IC<sub>50</sub>** – „half maximal inhibitory concentration“ (polovina maximální inhibiční koncentrace)

**IDA** – „information-dependent acquisition“ (sběr dat na základě předchozích informací)

**LC-MS** – „liquid-chromatography-mass spectrometry“ (kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)



**LC-NMR** – „liquid chromatography-nuclear magnetic resonance“ (kapalinová chromatografie-nukleární magnetická rezonance)

**LF** – „lachrymatory factor“ (slzotvorná látka)

**MS** – „mass spectrometry“ (hmotnostní spektrometrie)

**NMR** – „nuclear magnetic resonance“ (nukleární magnetická rezonance)

**PATU** – „pancreatic tumor cells“ (nádorové buňky slinivky břišní)

**PBS** – „phosphate-buffered saline“ (isotonický fosfátový pufr)

**PTFE** – polytetrafluorethylen

**RDB** – „rings and double bonds“ (počet kruhů a dvojných vazeb)

**rpm** – „rounds per minute“ (počet otáček za minutu)

**RPMI** – „Roswell Park Memorial Institute Medium“ (médium Roswell Park Memorial Institute)

**THF** – tetrahydrofuran

**UHPLC** – „ultra-high performance liquid chromatography“ (ultraúčinná kapalinová chromatografie)

## 9 Příloha

### HRMS data barevných látek (česnek kuchyňský, izotopicky značený alanin)

Tabulka a – Barevné látky, extrakt z česneku kuchyňského s D,L-(3-D<sub>3</sub>)alaninem

sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-293	424	299,1872	299,1872	0,1	C <sub>15</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7
G-333	445	339,2183	339,2185	0,5	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8
G-347	453	353,1977	353,1978	0,3	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
G-351	440	357,2290	357,2291	0,3	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7
G-371	567	377,2342	377,2342	0,0	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-385	575	391,2496	391,2498	0,6	C <sub>22</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-395	439	401,2551	401,2553	0,6	C <sub>20</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	7
G-411	598	417,2659	417,2655	1,0	C <sub>24</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
G-429	580	435,2759	435,2761	0,4	C <sub>24</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
G-437a	437	443,1940	443,1940	0,0	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	9
G-437b	451	443,2119	443,2117	0,3	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	9
G-439	447	445,2096	445,2096	0,1	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	8
G-459	577	465,2868	465,2866	0,4	C <sub>25</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-473	578	479,3018	479,3023	1,0	C <sub>26</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-515	602	521,2403	521,2409	1,2	C <sub>27</sub> <sup>2</sup> H <sub>6</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	12

Tabulka b – Barevné látky, extrakt z česneku kuchyňského s D,L-(<sup>15</sup>N)alaninem

sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-293	424	295,1440	295,1437	1,2	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7
G-333	445	335,1748	335,1750	0,5	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8
G-347	453	349,1544	349,1542	0,5	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
G-351	440	353,1855	353,1855	0,1	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7
G-371	567	373,1906	373,1906	0,0	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-385	575	387,2060	387,2063	0,4	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-395	439	397,2121	397,2117	0,9	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	7
G-411	598	413,2217	413,2219	0,5	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
G-429	580	431,2329	431,2325	1,0	C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
G-437a	437	439,1502	439,1504	0,5	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	9
G-437b	451	439,1681	439,1682	0,1	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	9
G-439	447	441,1666	441,1660	1,3	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	8
G-459	577	461,2432	461,2430	0,4	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-473	578	475,2594	475,2587	1,5	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-515	602	517,1970	517,1973	0,7	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	12

Tabulka c – Barevné látky, extrakt z česneku kuchyňského s D,L-(2-D)alaninem

sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-293	424	295,1625	295,1621	1,6	C <sub>15</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7
G-333	445	335,1936	335,1934	0,5	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8
G-347	453	349,1731	349,1727	1,1	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
G-351	440	353,2045	353,2040	1,4	C <sub>18</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7
G-371	567	373,2095	373,2091	1,1	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-385	575	387,2246	387,2247	0,4	C <sub>22</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-395	439	397,2304	397,2302	0,5	C <sub>20</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	7
G-411	598	413,2406	413,2404	0,5	C <sub>24</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
G-429	580	431,2503	431,2510	1,5	C <sub>24</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
G-437a	437	439,1688	439,1689	0,2	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	9
G-437b	451	439,1869	439,1866	0,6	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	9
G-439	447	441,1840	441,1845	1,2	C <sub>21</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	8
G-459	577	461,2608	461,2615	1,6	C <sub>25</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-473	578	475,2765	475,2772	1,4	C <sub>26</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-515	602	517,2158	517,2154	0,8	C <sub>27</sub> <sup>2</sup> H <sub>2</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	12

Tabulka d – Barevné látky, extrakt z česneku kuchyňského s D,L-(1-<sup>13</sup>C)alaninem

sloučenina	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> změřená (Da)	[M + H] <sup>+</sup> teoretická (Da)	rozdíl (ppm)	sumární vzorec	RDB
G-293	424	295,1566	295,1563	1,0	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7
G-333	445	335,1881	335,1876	1,5	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8
G-347	453	349,1665	349,1669	1,0	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9
G-351	440	353,1982	353,1982	0,1	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7
G-371	567	373,2029	373,2032	0,9	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-385	575	387,2188	387,2189	0,2	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10
G-395	439	397,2239	397,2244	1,2	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	7
G-411	598	413,2339	413,2345	1,8	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11
G-429	580	431,2446	431,2451	1,2	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10
G-437a	437	439,1633	439,1630	0,6	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	9
G-437b	451	439,1804	439,1808	0,9	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	9
G-439	447	441,1777	441,1787	2,2	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	8
G-459	577	461,2548	461,2557	1,9	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-473	578	475,2703	475,2713	2,2	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10
G-515	602	517,2091	517,2084	1,3	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	12