

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

Senzoricky a biologicky aktivní sирné sloučeniny
cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.)

Vypracovala: Mgr. Iveta Štefanová
Školitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

České Budějovice 2018

Štefanová, I. (2018): Senzoricky a biologicky aktivní sírné sloučeniny cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.). [Sensory and biologically active sulfur-containing compounds of onion (*Allium cepa* L.)] – 116 pp., Faculty of Agriculture, Department of Applied Chemistry, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato disertační práce se zabývá studiem organosírných sloučenin cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.), které svou intenzivně hořkou chutí negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti zpracované cibule. S využitím HPLC frakcionací cibulových extraktů a následně provedenou senzorickou a instrumentální analýzou bylo nalezeno celkem devět zcela nových, v odborné literatuře dosud nepopsaných skupin organosírných sloučenin, triviálně pojmenovaných allithiolany A–I. Na základě spektroskopických dat (MS, NMR a IČ) bylo zjištěno, že tyto strukturně blízké skupiny sloučenin jsou deriváty 3,4-dimethylthiolan-S-oxidu odpovídající sumárním vzorcům $C_xH_yO_2S_4$, $C_xH_yO_3S_5$ a $C_xH_yO_4S_6$ ($x = 10–18$, $y = 18–30$). Chuť allithiolanů byla senzoricky hodnocena jako velmi nepříjemná, kovově hořká, s prahy detekce v rozmezí 15–30 ppm. Na základě získaných informací byl navržen i pravděpodobný mechanismus vzniku allithiolanů, na jehož základě bylo možné konstatovat, že tvorbě těchto hořkých látek patrně nelze zabránit bez současného ovlivnění typických senzorických vlastností cibule.

Během procesu izolace výše zmíněných hořkých látek bylo z cibulového extraktu izolováno i několik dalších, v odborné literatuře dosud nepopsaných sloučenin. Jedná se např. o cepadithiolakton A ($C_6H_{10}OS_2$), což je první přirozeně se vyskytující zástupce γ -dithiobutyrolaktonů, nebo onioniny B/C ($C_7H_{14}O_2S_2/C_9H_{18}O_2S_2$) a cepathiolany B/C ($C_7H_{14}O_2S_3/C_9H_{18}O_2S_3$). Byla též opravena v literatuře chybně uváděná struktura onioninu A ($C_9H_{16}O_2S_2$). Na základě získaných dat bylo ukázáno, že se ve skutečnosti jedná o 3,4-dimethyl-5-(1-propenylsulfinyl)thiolan-2-ol. Byly studovány organoleptické vlastnosti těchto látek, jakož i mechanismy jejich tvorby.

Klíčová slova: hořká chuť, cibule, sírné sloučeniny, isoalliin, allithiolan, onionin, cepadithiolakton A, cepathiolan, *Allium cepa*

Annotation

This dissertation thesis is aimed to identify the compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion (*Allium cepa* L.). Using a series of sensory-guided HPLC fractionations, the existence of nine groups of hitherto unknown sulfur compounds has been revealed. On the basis of spectroscopic data (MS, NMR, IR), it was found that these compounds, trivially named allithiolanes A–I, are members of a large family of structurally closely related derivatives of 3,4-dimethylthiolane *S*-oxide with the general formulas of $C_xH_yO_2S_4$, $C_xH_yO_3S_5$, or $C_xH_yO_4S_6$ ($x = 10–18$, $y = 18–30$).

The taste of allithiolanes could be described as very unpleasant, metallic bitter, with detection thresholds in the range of 15–30 ppm. The probable formation pathways of allithiolanes were proposed. On the basis of the information obtained, it may be concluded that the formation of these bitter compounds cannot be prevented without affecting the typical organoleptic characteristics of the onion.

During the isolation of allithiolanes, several other hitherto unknown compounds have been isolated from the onion extract. This is the case of cepadithiolactone A ($C_6H_{10}OS_2$), which is the very first example of naturally occurring γ -dithiobutyrolactone, or onionins B/C ($C_7H_{14}O_2S_2/C_9H_{18}O_2S_2$), and cepathiolanes B/C ($C_7H_{14}O_2S_3/C_9H_{18}O_2S_3$). In addition, the previously proposed structure of onionin A ($C_9H_{16}O_2S_2$) has also been corrected. Based on the data obtained, it has been shown that onionin A is in fact 3,4-dimethyl-5-(1-propenylsulfinyl)thiolane-2-ol. The organoleptic characteristics of these compounds as well as their formation pathways have been studied.

Key words: bitter taste, onion, sulfur compounds, isoalliin, allithiolane, onionin, cepadithiolactone A, cepathiolane, *Allium cepa*

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 30. října 2018

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, které mi v průběhu doktorského studia věnoval.

Za spolupráci při MS analýzách patří mé poděkování též Ing. Petře Urajové, Ph.D. (Laboratoř řasové biotechnologie, Mikrobiologický ústav AV ČR v Třeboni) a Ing. Martinu Moosovi, Ph.D. (Laboratoř analytické biochemie a metabolomiky, Biologické centrum AV ČR v Českých Budějovicích) a v neposlední řadě také Jakubu Zápalovi (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologický ústav AV ČR v Praze) za spolupráci při NMR analýzách.

Velké poděkování patří také všem ostatním, kteří se jakkoli podíleli na vzniku této disertační práce.

Disertační práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (GAJU 112/2016/Z).

Obsah

1	CÍLE PRÁCE	1
2	ÚVOD.....	2
2.1	ČELEĎ ALLIACEAE (ČESNEKOVITÉ)	4
2.2	ROD <i>ALLIUM</i>	4
2.2.1	<i>Podrod Cepa</i>	6
2.2.2	<i>Podrod Allium</i>	6
2.2.3	<i>Podrod Nectaroscordum</i>	7
2.3	SIRNÉ SLOUČENINY ROSTLIN RODU <i>ALLIUM</i>	8
2.3.1	<i>S-Substituované deriváty cysteinu</i>	8
2.4	TVORBA ORGANOSIRNÝCH SLOUČENIN CIBULE KUCHYŇSKÉ.....	14
2.4.1	<i>Thiosulfináty</i>	17
2.4.2	<i>Slzotvorné látky</i>	19
2.4.3	<i>Cepaeny</i>	22
2.4.4	<i>Zwiebelany</i>	23
2.4.5	<i>Nedávno objevené organosirné sloučeniny cibule</i>	25
2.5	ZMĚNY ORGANOLEPTICKÝCH VLASTNOSTÍ PŘI ZPRACOVÁNÍ ČESNEKOVITÝCH ROSTLIN	29
2.5.1	<i>Barevné změny</i>	29
2.5.2	<i>Změny chuti</i>	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1	CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	34
3.1	PŘÍSTROJE	35
3.2	GRADIENTY POUŽÍVANÉ V HPLC.....	36
3.3	IZOLACE HOŘKÝCH SLOUČENIN Z EXTRAKTU CIBULE KUCHYŇSKÉ	39
3.3.1	<i>Příprava extraktu</i>	39
3.3.2	<i>Frakcionace extraktu</i>	39
3.3.3	<i>Senzorická analýza frakcí AC 1–9 metodou TDA</i>	40
3.3.4	<i>Optimalizované HPLC metody</i>	41
3.4	IZOLACE HOŘKÝCH SLOUČENIN Z MODELOVÝCH REAKČNÍCH SYSTÉMŮ	43
3.4.1	<i>Izolace alliinasy</i>	43
3.4.2	<i>Příprava S-alk(en)ylcystein-S-oxidů</i>	44

3.4.3	<i>Modelová reakce A</i>	44
3.4.4	<i>Modelová reakce B</i>	45
3.5	THIOSULFINÁTOVÝ TEST	52
3.6	SENZORICKÉ HODNOCENÍ IZOLOVANÝCH SLOUČENIN	54
3.7	PROCES RŮŽOVĚNÍ	55
3.8	TVORBA HOŘKÝCH LÁTEK V PÓRU A ČESNEKU	55
3.8.1	<i>Izolace hořkých látek z póru zahradního</i>	55
3.8.2	<i>Izolace hořkých látek z česneku kuchyňského</i>	56
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
4.1	SENZORICKÁ ANALÝZA – METODA TDA	57
4.2	IZOLACE A IDENTIFIKACE HOŘKÝCH SLOUČENIN	58
4.2.1	<i>Organoleptické vlastnosti allithiolanů</i>	77
4.2.2	<i>Mechanismus tvorby allithiolanů</i>	78
4.2.3	<i>Tvorba allithiolanů v dalších zástupcích rostlin rodu Allium</i>	82
4.3	IZOLACE A IDENTIFIKACE DALŠÍCH ORGANOSIRNÝCH SLOUČENIN.....	83
4.3.1	<i>Onioniny</i>	84
4.3.2	<i>Cepadithiolakton A</i>	90
4.3.3	<i>Cepathiolany</i>	94
4.3.4	<i>Mechanismy tvorby onioninů, cepadithiolaktonu a cepathiolanů</i>	96
4.3.5	<i>Organoleptické vlastnosti</i>	97
4.4	PROCES RŮŽOVĚNÍ	98
5	ZÁVĚR	99
6	LITERATURA	103
7	POUŽITÉ ZKRATKY	112
8	PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY	114
9	PŘÍLOHY	116

1 Cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo získat detailní informace o chemické struktuře látek, které nesou zodpovědnost za hořkou chuť zpracované cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.), případně dalších zástupců rostlin rodu *Allium*. Společně s určením struktur hořkých látek také navrhnout pravděpodobný mechanismus jejich vzniku a na základě získaných informací určit, zdali je možné vzniku těchto chuťově nežádoucích látek zabránit bez současné ztráty typických organoleptických vlastností cibule.

Dalším cílem této práce byla izolace také jiných, v odborné literatuře dosud nepopsaných organosírných sloučenin vznikajících při zpracování cibule, identifikace jejich struktury a charakterizace jejich organoleptických vlastností.

2 Úvod

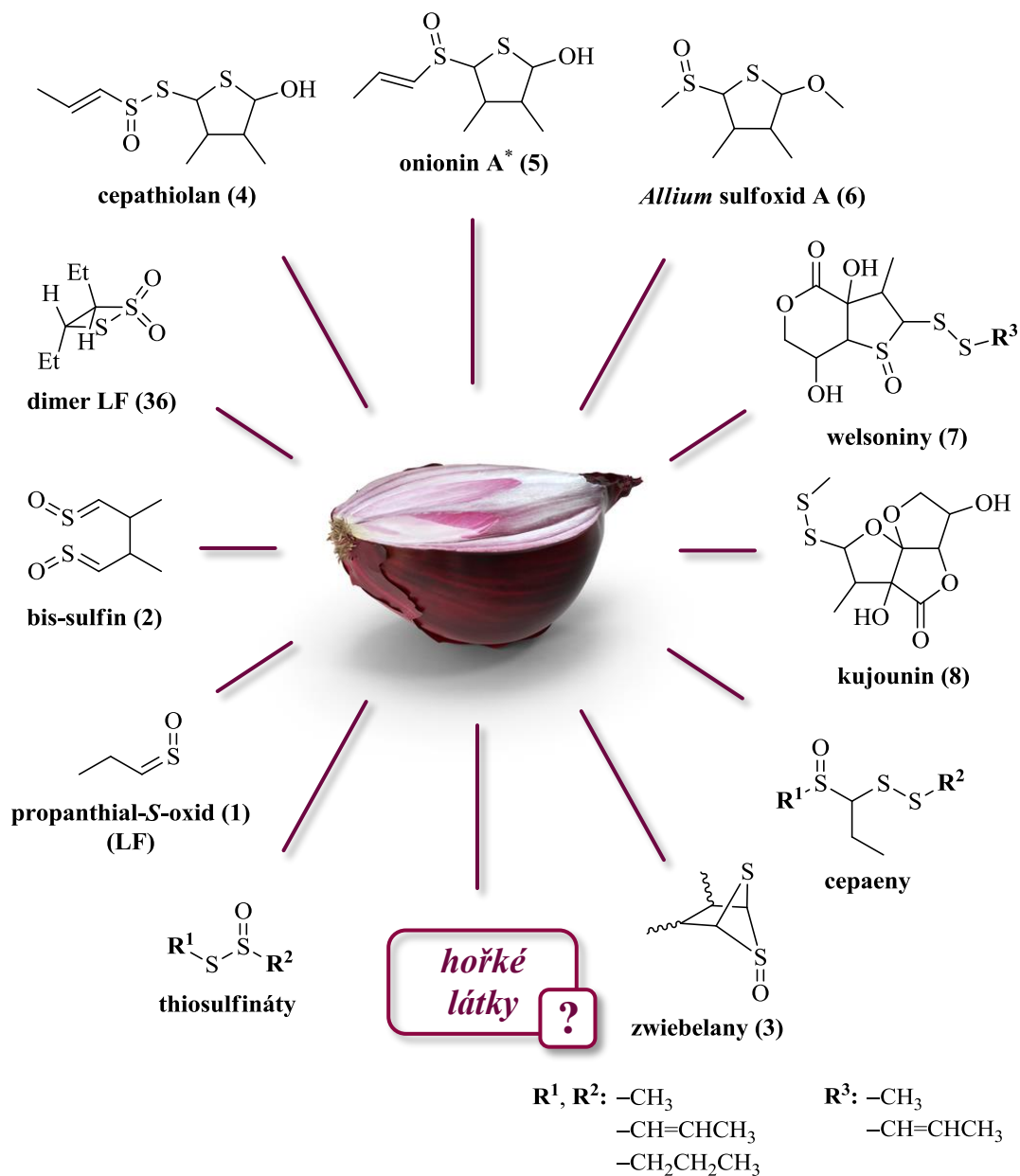
Česnekovité rostliny (rod *Allium* L.), např. cibule kuchyňská (*A. cepa*), česnek setý (*A. sativum*) a pór zahradní (*A. porrum*), jsou díky svým výrazným organoleptickým vlastnostem známé téměř po celém světě a staly se také nedílnou součástí potravinářského průmyslu. Nositeli velmi intenzivních organoleptických vlastností těchto rostlin jsou převážně organosírné sloučeniny, které vznikají enzymově katalyzovaným rozkladem prekurzorů odvozených od cysteinu. Struktura či mechanismy tvorby celé řady dalších sírných sloučenin, v některých případech technologicky nežádoucích, však zůstávají i nadále nezodpovězeny.

Současné vědecké studie neustále přispívají k lepšímu porozumění chemických procesů probíhajících při zpracování česnekovitých rostlin a popisují izolaci a identifikaci dalších nově objevených sloučenin. Cibule disponuje mimořádně pestrou paletou sírných sloučenin, která se za posledních několik let výrazně rozrostla. K tradičním skupinám sírných látek vznikajících při zpracování cibule, mezi kterými lze jmenovat slzotvorný propanthial-*S*-oxid (LF – z angl. *lachrymatory factor*, **1**), bis-sulfín (**2**), thiosulfináty, zwiebelany (**3**) či cepaeny, v nedávné době přibyla i strukturně velmi rozmanitá skupina heterocyklických sírných sloučenin jako např. cepathiolany (**4**), onioniny A (**5**), *Allium* sulfoxid A (**6**), welsoniny (**7**) či kujounin (**8**), **Obrázek 1.**¹⁻¹⁶

Velký pokrok byl v posledních letech zaznamenán také v pochopení procesů vedoucích k tvorbě nežádoucího růžového zbarvení cibule během jejího zpracování. Přestože se jedná o zcela přirozený jev, producentům způsobuje kvůli estetickému znehodnocení cibule výrazné ekonomické ztráty. V současné době je již znám mechanismus tohoto jevu i struktura sloučenin, které v cibuli toto technologicky velmi nežádoucí růžové zbarvení způsobují.¹⁷⁻²⁰

Za vědecky téměř nedotčenou oblast lze bezpochyby označit proces hořknutí cibule, který je i mezi laickou veřejností poměrně dobře znám a jehož rozklíčování se stalo hlavním cílem této disertační práce. Podobně jako růžovění cibule je i její hořknutí naprosto přirozeným jevem, který však působí velké problémy při jejím zpracování. Přestože tvorba hořkých látek v cibuli výrazně negativně mění organoleptické vlastnosti a není pouze estetickým problémem jako v případě jejího

růžovění, byly do současné doby touto problematikou inspirovány pouze dvě vědecké studie publikované již v šedesátých letech minulého století.^{21,22}



Obrázek 1: Organosírné sloučeniny vznikající při zpracování cibule.[†]

Lze předpokládat, že česnekovité rostliny jsou bezpochyby stále zdrojem celé řady dalších sloučenin, které na své objevení teprve čekají.

* opravená struktura onioninu A (5) (viz **kap. 4.3.1**)

† <https://atlas-content-cdn.pixelsquid.com/stock-images/red-onion-B5wQon0-600.jpg>; staženo dne 9. 9. 2018

2.1 Čeleď Alliaceae (česnekovité)

Čeleď Alliaceae zahrnuje okolo 900 druhů rostlin, včetně ekonomicky velmi důležitých zástupců používaných v potravinářství (např. cibule, česnek a pór). Celá řada rostlin čeledi Alliaceae je také využívána v lidovém léčitelství a farmaceutickém průmyslu.

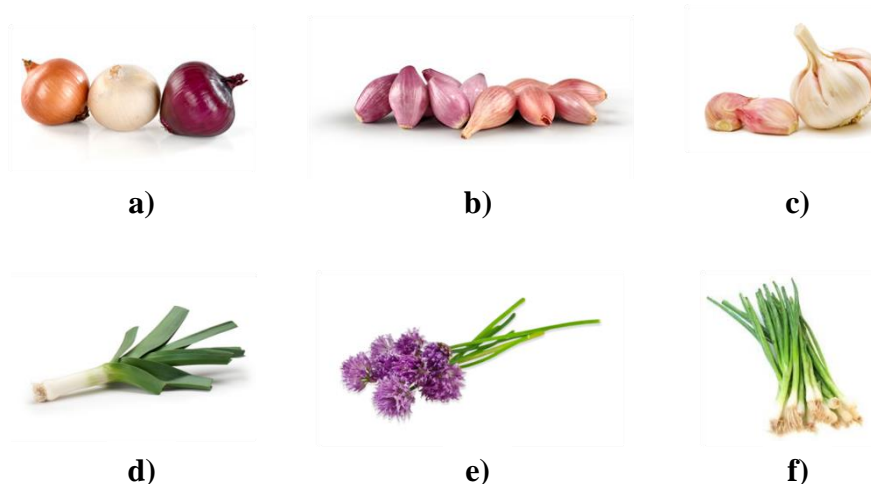
Taxonomicky je tato čeleď členěna do tří podčeledí – *Allioideae* Herb., *Tulbaghioideae* (Endl. ex Meisn.) Fay & Chase a *Gilliesioideae* (Lindl.) Arn. (Fay & Chase, 1996). Největší podčeleď *Allioideae* zahrnuje rod *Allium* L. (včetně několika podrodů), rozšířený převážně na severní polokouli. Podčeleď *Tulbaghioideae* zahrnuje pouze dva rody – *Tulbaghia* L. (okolo 25 druhů) a *Prototulbaghia* Vosa (jeden druh), přirozeně se vyskytující v jižních částech Afriky.²³ Podčeleď *Gilliesioideae* zahrnuje rostliny pocházející výhradně z Jižní Ameriky, převážně z jižních částí Chile a Argentiny. Výjimku tvoří někteří zástupci rodu *Nothoscordum* Kunth, které lze nalézt též v Severní Americe.²⁴

2.2 Rod *Allium*

Rod *Allium* je největším a nejtypičtějším rodem čeledi Alliaceae zahrnující odhadem 750 druhů, většinou cibulovitých trvalek, eventuálně dvouletých rostlin, které jsou rozšířené zejména na severní polokouli. Friesen a kol.²⁵ na základě studia jaderné ribozomální DNA rozdělili tento rod do patnácti monofyletických podrodů, které ještě rozčlenili do dalších sekcí a podsekcí.

Do rodu *Allium* náleží i některé z plodin pěstovaných již ve starověku, které v současnosti patří mezi ekonomicky velmi významné druhy zeleniny, zvláště *A. sativum* L. (česnek) a *A. cepa* L. (cibule). Z ekonomického pohledu méně významnými rostlinami rodu *Allium* jsou například *A. schoenoprasum* L. (pažitka), *A. ampeloprasum* L. (pór letní), *A. tuberosum* Rottler ex Spreng. (pažitka česneková), *A. fistulosum* L. (cibule zimní) či *A. ursinum* L. (česnek medvědí). Okrasné druhy jsou také neodmyslitelnou součástí rodu *Allium*, charakteristické svou rozmanitostí barev a velikostí (*A. moly* L. – česnek zlatožlutý, *A. giganteum* Regel – česnek obrovský,

A. flavum L. – česnek žlutý, *A. roseum* L. – česnek růžový, *A. sicutum* Ucria – česnek sicilský).^{26,27} Typické zástupce rostlin rodu *Allium* znázorňuje **Obrázek 2**.



Obrázek 2: Zástupci rodu *Allium*: a) barevné kultivary cibule;* b) šalotka;† c) česnek;‡ d) pór;§ e) pažitka;** f) jarní cibulka.††

Cibule společně s česnekem jsou nepochybně nejznámějšími zástupci rodu *Allium*, kteří si svou obrovskou popularitu získali nejen svými velmi výraznými organoleptickými vlastnostmi, ale i poměrně nenáročným pěstováním, jakož i možností jejich dlouhodobého skladování, které při vhodných podmínkách dosahuje i mnoha měsíců.

S konzumací rostlin rodu *Allium* je spojena i celá řada příznivých účinků na lidské zdraví, které jsou velmi rozšířeny v povědomí nejen vědecké komunity. Podzemní části většiny česnekovitých rostlin jsou hlavní jedlou částí charakteristickou svou výraznou chutí a pronikavým aroma, které je umocněno během zpracování při přípravě pokrmů, zejména pak krájením či mixováním. Během těchto operací dochází vlivem narušení rostlinného pletiva k enzymaticky katalyzované tvorbě široké palety sensoricky aktivních sirných sloučenin.

Mimořádný ekonomický význam rostlin rodu *Allium*, především česneku a cibule, podtrhují statistická data FAO²⁸ (Food and Agriculture Organization of the United Nations), dle kterých činila celosvětová produkce cibule v roce 2016

* <http://media.mercola.com/assets/images/foodfacts/onion-nutrition-facts.jpg>; staženo dne 12. 9. 2018

† <http://www.cipollefreddi.it/wp-content/uploads/2016/09/scalogno-emilia-freddi.jpg>; staženo dne 12. 9. 2018

‡ <http://www.petpoisonhelpline.com/wp-content/uploads/2011/10/Garlic.jpg>; staženo dne 12. 9. 2018

§ <http://thewateringmouth.com/wp-content/uploads/2016/01/bigstock-Leeks-On-A-White-Background-84509525-768x510.jpg>; staženo dne 12. 9. 2018

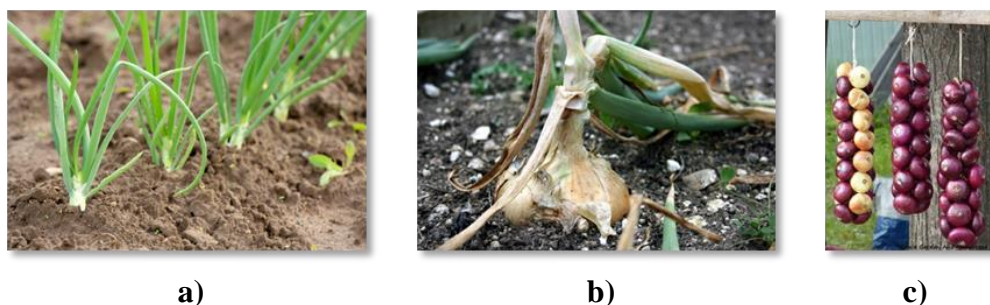
** https://www.marxfoods.com/images/Buy-Chive-Blossoms_ChiveBlossoms-1.jpg; staženo dne 12. 9. 2018; upraveno

†† https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTZSgNIq5p4jFV-mrSHkEONuJC4K6Fb-x6IAkmeO3_vXxWh9EFE; staženo dne 12. 9. 2018

více než 117 milionů tun a česneku necelých 48 milionů tun. Česká republika přispěla k celosvětové produkci v roce 2016 celkem 835 tunami česneku a více než 42 tisíci tun cibule.

2.2.1 Podrod *Cepa*

Podrod *Cepa* rostlin rodu *Allium* obsahuje druhy s rourkovitými listy, dobře vyvinutými cibulemi a krátkým vertikálním oddenkem. Zahrnuje sekce: i) *Cepa* – zástupce cibule kuchyňská (*A. cepa*) a cibule zimní (*A. fistulosum* L.); ii) *Schoenoprasum* – pažitka (*A. schoenoprasum* L.); iii) *Sacculiferum* – česnek čínský (*A. chinense* G. Don); iv) *Annuloprason* a v) *Condensatum*.^{25,29}



Obrázek 3: *A. cepa*: a) způsob pěstování; * b) detail růstu; † c) skladování.[‡]

Cibule kuchyňská (**Obrázek 3**) zaujímá první pozici v celosvětové produkci česnekovitých rostlin. Její pěstování je možné v různých klimatických zónách, včetně tropických oblastí. Cibule je běžnou součástí stravy lidí všech kontinentů. Běžně se pěstuje několik barevných kultivarů – žlutá cibule (v české kuchyni nejběžnější), červená (zpravidla vykazující mírnější organoleptické vlastnosti) nebo bílá (oblíbená zejména v Mexiku, vyznačující se silnějším aroma a chutí).

2.2.2 Podrod *Allium*

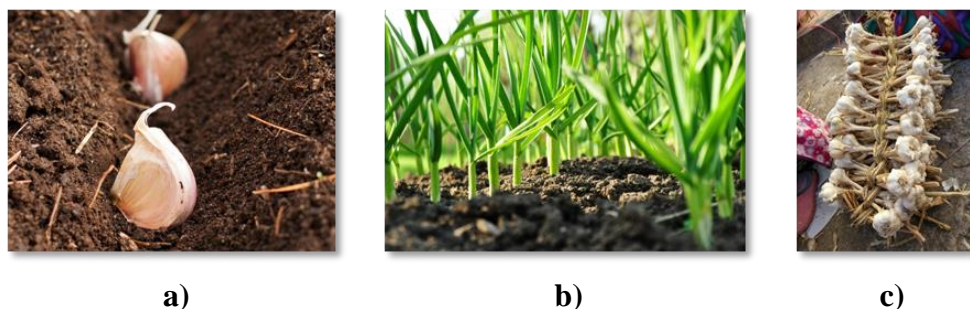
Česnek kuchyňský (**Obrázek 4**) je v pořadí druhým nejvíce konzumovaným zástupcem rodu *Allium*. Zahrnuje pět odlišných podskupin – *Sativum*, *Ophioscorodon*,

* <https://www.harvesttotable.com/wp-content/uploads/2011/05/Onion-Row-300x200.jpg>; staženo 13. 9. 2018

† <https://fieldviewgardens.files.wordpress.com/2011/08/drying-onion.jpg?w=500&h=334>; staženo 13. 9. 2018

‡ <http://cdn.goodshomedesign.com/wp-content/uploads/2017/07/braid-onions-garlic.jpg>; staženo 13. 9. 2018

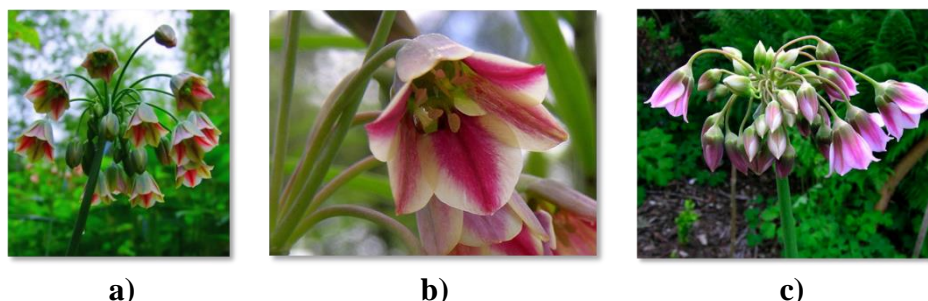
Longicuspis, *Subtropical* a *Pekinese*. Podskupina *Sativum*, původem z oblasti Středomoří, představuje nejběžnější formu česneku. „*Sativum*“ v botanickém názvu česneku znamená „kultivovaný“ a odpovídá skutečnosti, že „divoký“ česnek je v přírodě neznámý.³⁰



Obrázek 4: *Allium sativum*: a) výsadba;^{*} b) pěstování;[†] c) skladování.[‡]

2.2.3 Podrod *Nectaroscordum*

Nejméně dva druhy rostlin rodu *Allium* jsou taxonomicky řazeny do podrodu *Nectaroscordum* – *A. siculum* Ucria a *A. tripedale* Trautv.²⁵



Obrázek 5: *Allium siculum*: a) rostlina,[§] b) detail květu;^{**} c) *Allium tripedale*.^{††}

A. siculum (česnek sicilský, **Obrázek 5a–b**) je cibulovitá rostlina původem z Malé Asie, jižní Francie a Sicílie rostoucí zejména ve vlhčích, stinných lesích a křovinách. Vyznačuje se svými široce zvonkovitými, barevně proměnlivými květy. Pro své nenáročné pěstování i dekorativní vlastnosti se stala velmi oblíbenou rostlinou

^{*} <https://i1.wp.com/coffee-breaktime.com/wp-content/uploads/2017/10/How-to-Grow-Garlic-Over-the-Winter-2.jpg?w=630>; staženo 15. 9. 2018

[†] https://d1x143wvd30375.cloudfront.net/wp-content/uploads/2015/01/680px-Growing-garlic-Fotolia_32628027_Subscription_Monthly_M.jpg; staženo 15. 9. 2018

[‡] <http://www.sseyyo.com/wp-content/uploads/2017/02/garlic.jpeg>; staženo 15. 9. 2018

[§] <https://terra4incognita.files.wordpress.com/2012/05/dscf3232.jpg?w=500&h=582>; staženo 10. 6. 2018; upraveno

^{**} <http://botany.cz/foto3/nectaroscordumherb3.jpg>; staženo 10. 6. 2018

^{††} http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/files/Allium/Allium_tripedale2KS.jpg; staženo 10. 6. 2018

pěstovanou po celém světě. Charakteristická je i svou pronikavou česnekovou vůní a chutí. V Bulharsku je tato rostlina známá pod místním názvem „samardala“ nebo „medový česnek“. Právě Bulharsko je zemí, kde *A. siculum* nachází uplatnění nejenom jako léčivá rostlina, ale také jako velmi oblíbená součást místní kuchyně. Jsou to nejčastěji listy, které často nahrazují klasický česnek a jsou zdrojem výrazné chuti salátů, polévek, omáček a celé řady dalších pokrmů. Čerstvé rostliny využívané v kulinářství jsou k dispozici pouze v období května až června. Z tohoto důvodu se rostliny suší a k dostání jsou například ve formě ochucené soli nebo drcených kořenících směsí.^{31–33}

A. tripedale (**Obrázek 5c**), druhý dosud známý zástupce podrodu *Nectaroscordum*, roste zejména v Iránu, Iráku, Turecku, Předkavkazsku a Zakavkazsku. V západním Iránu je tato rostlina hojně využívána v lidovém léčitelství. Čerstvé nebo sušené listy jsou v podobě koření běžnou součástí stravy místních obyvatel. Tradiční léčitelé používají tuto rostlinu například k léčbě ledvinových a močových kamenů.³⁴

2.3 Sirné sloučeniny rostlin rodu *Allium*

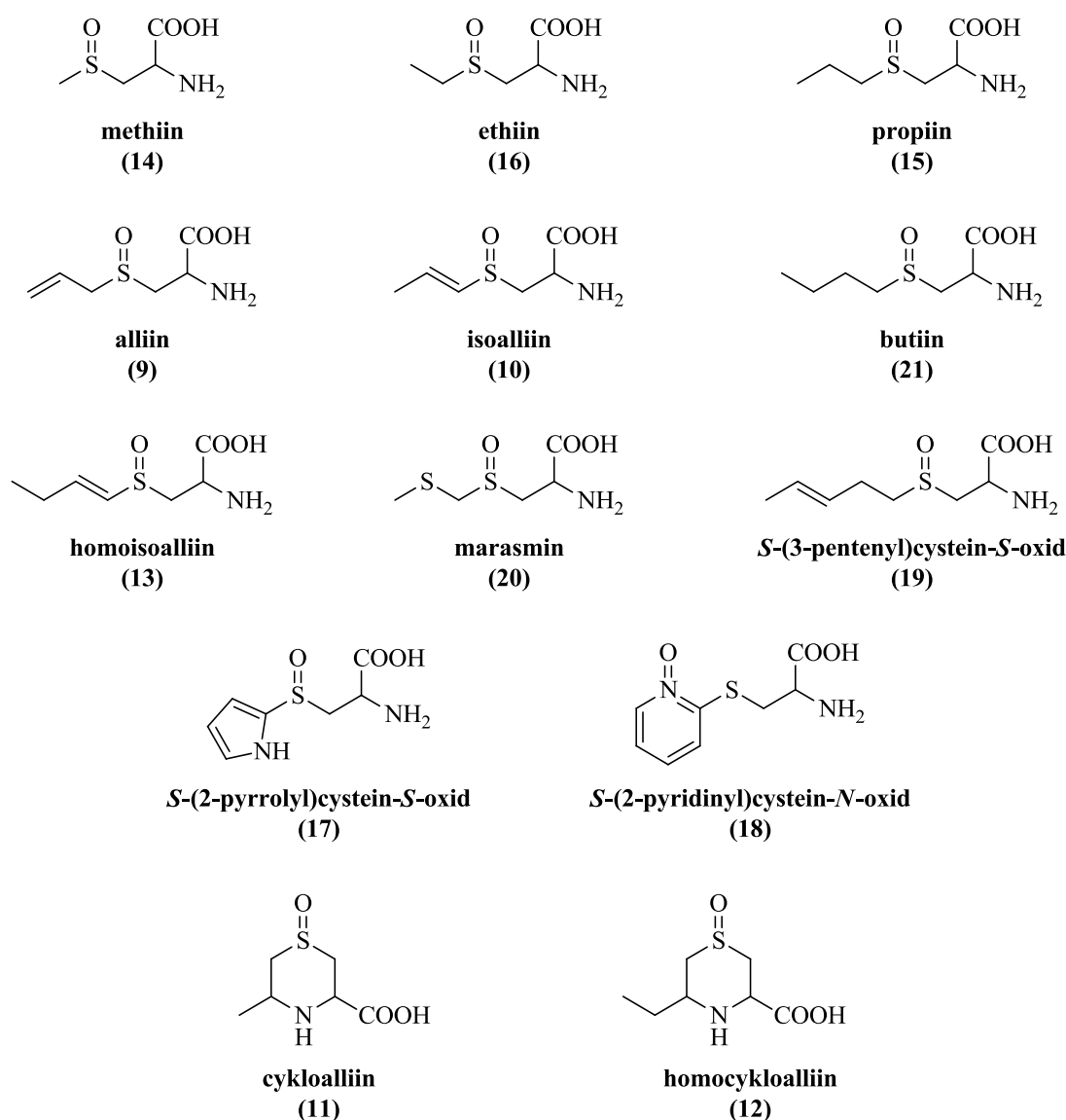
Organické sirné sloučeniny česnekovitých rostlin jsou tvořeny jako součást obranných mechanismů, které se v rostlinách aktivují po narušení rostlinného pletiva. Předpokládá se, že produkcí těchto látek, které jsou charakteristické svými velmi výraznými organoleptickými vlastnostmi (často doprovázenými silnými slzotvornými účinky), se rostliny snaží odradit býložravce, zamezit rozvoji mikrobiálního napadení, případně nalákat opylovače. Těmto látkám je také připisována většina známých léčivých účinků rostlin rodu *Allium*.³⁵

2.3.1 S-Substituované deriváty cysteinu

S-Substituované deriváty cysteinu jsou významnými sekundárními metabolity mnoha druhů rostlin, hub a řas. Nejdůležitější skupinou těchto sirných aminokyselin jsou S-alk(en)ylcystein-S-oxidy, které jsou hlavními prekurzory sensoricky a biologicky

aktivních organosírných látek rostlin rodu *Allium*. V nenarušených rostlinách jsou *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy lokalizovány v cytoplazmě a enzym alliinasa (E.C. 4.4.1.4) ve vakuolách.³⁶ K rozkladu těchto prekurzorů a následné tvorbě sensoricky aktivních sloučenin dochází až během zpracování rostlin, kdy se *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy dostanou do přímého kontaktu s alliinase, která katalyzuje jejich rozklad.

Zastoupení *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů se v různých druzích česnekovitých rostlin výrazně liší. *S*-Allylcystein-*S*-oxid (alliin, **9**) je majoritním prekurzorem v česneku, zatímco v cibuli má největší relativní zastoupení jeho polohový izomer, (*E*)-*S*-(1-propenyl)cystein-*S*-oxid (isoalliin, **10**). Do současnosti bylo v česnekovitých rostlinách nalezeno a identifikováno celkem 11 *S*-substituovaných cystein-*S*-oxidů a dvě cyklické formy těchto látek (**Obrázek 6**).



Obrázek 6: *S*-Substituované deriváty cysteinu česnekovitých rostlin.

Neobvyklou cyklickou sekundární sирnou aminokyselinou, která se vyskytuje v rostlinách rodu *Allium* obsahujících isoalliin (**10**), je cykloalliin (3-karboxy-5-methyl-1,4-thiazan-*S*-oxid, **11**). Úloha této cyklické aminokyseliny je však zatím neznámá, nelze ani vyloučit možnost, že vzniká pouze jako artefakt cyklizací isoalliinu (**10**) během jeho izolace.³⁷ Homolog cykloalliinu (**11**), homocykloalliin (3-karboxy-5-ethyl-1,4-thiazan-*S*-oxid, **12**), byl identifikován v česneku sicilském (*A. siculum*), kde tato sekundární aminokyselina doprovází homoisoalliin (**13**). Podobně jako u cykloalliinu (**11**) nelze jednoznačně potvrdit přítomnost homocykloalliinu (**12**) v nenarušených rostlinách. S největší pravděpodobností k jeho vzniku dochází cyklizací homoisoalliinu (**13**).³¹

Výskyt pěti zástupců těchto sирných aminokyselin je typický pro nejčastěji konzumované česnekovité rostliny. Jedná se o *S*-methyl-, *S*-allyl-, (*E*)-*S*-(1-propenyl)-, *S*-propyl- a *S*-ethylcystein-*S*-oxid (methiin, **14**; alliin, **9**; isoalliin, **10**; propiin, **15** a ethiin, **16**). Další dva deriváty cysteinu, a sice *S*-(2-pyrrolyl)cystein-*S*-oxid (**17**) a *S*-(2-pyridinyl)cystein-*N*-oxid (**18**), byly izolovány z druhů rostoucích (a často hojně konzumovaných) zejména ve střední Asii (např. *A. stipitatum*, **Obrázek 7a**), zatímco *S*-(3-pentenyl)cystein-*S*-oxid (**19**) byl doposud nalezen pouze v semenech cibule rodu *Allium cepa* var. *tropeana* pěstované v regionu Tropea (Kalábrie).



a)

b)

Obrázek 7: a) *Allium stipitatum*;* b) *Tulbaghia violacea* – detail květu.[†]

Sloučenina *S*-(methylthiomethyl)cystein-*S*₄-oxid (triviálně marasmin, **20**) se vyskytuje zejména v rostlinách rodu *Tulbaghia* (**Obrázek 7b**) či zástupcích podrodu *Melanocrommyum*. Dva prekurzory obsahující čtyřuhlíkatý alifatický postranní řetězec, tj. *S*-butyl- (**21**) a (*E*)-*S*-(1-butenyl)cystein-*S*-oxid (**13**) (triviálně butiin resp.

* <https://www.biolib.cz/IMG/GAL/85251.jpg>; staženo 22. 10. 2018

† http://www.plantbook.co.za/wp-content/uploads/plantbook.co.za_tulbaghia-violacea1.jpg; staženo 5. 4. 2018

homoisoalliin), se vyskytují výhradně v rostlinách podrodu *Nectaroscordum*.^{23,31,35,38–40}

Relativní zastoupení *S*-substituovaných derivátů cysteinu v některých zástupcích česnekovitých rostlin uvádí **Tabulka I**.

Tabulka I: Relativní zastoupení a celkový obsah *S*-substituovaných derivátů cysteinu ve vybraných česnekovitých rostlinách.

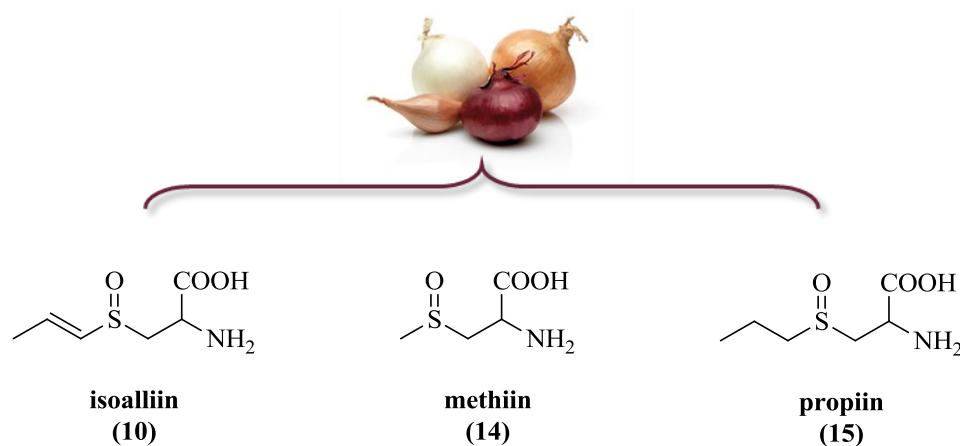
rostlina/ část	cibule/ cibule		česnek/ stroužky		pór/ nadzemní část		sicilský česnek/ cibulky
	relativní zastoupení [%]						
alliin (9)	stopy	–	84	84	–	stopy	–
butiin (21)	–	–	–	–	–	–	5
homoisoalliin (13)	–	–	–	–	–	–	64
isoalliin (10)	78	85–87	11	± ^a	92	81	–
methiin (14)	16	13–15	5	16	8	19	31
propiin (15)	6	–	–	–	–	stopy	–
celkový obsah [mg/g]^b	0,56 ± 0,03		12,7 ± 0,4		1,44 ± 0,07		5,3 ± 0,4
odkaz	40–43		40–43		40,43,44		31

^a identifikace pouze v některých vzorcích

^b celkový obsah *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů v čerstvých rostlinách

S-Substituované deriváty cysteinu cibule kuchyňské

V cibuli se vyskytují celkem tři *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy – isoalliin (10), methiin (14) a propiin (15), **Obrázek 8**.



Obrázek 8: Prekurzory sírných sloučenin cibule kuchyňské.*

Methiin, vyskytující se pravděpodobně ve všech rostlinách rodu *Allium*, byl poprvé izolován v roce 1959 Virtanenem a Matikkalou.⁴⁵ Carson a Wong⁴⁶ posléze určili

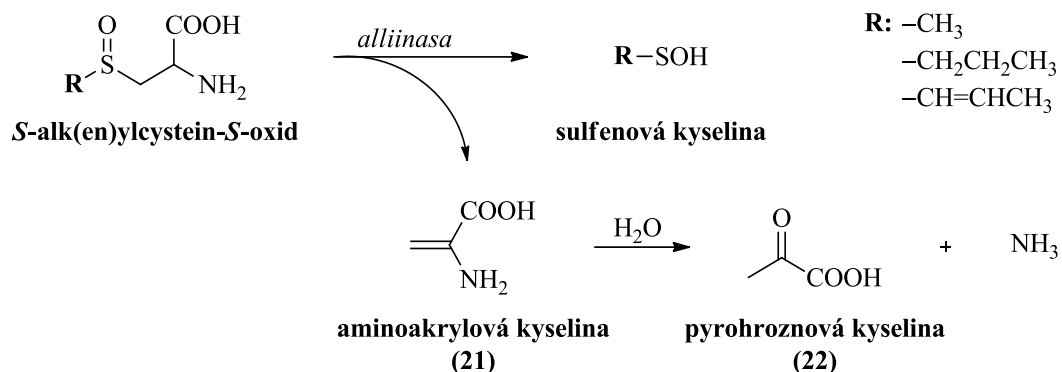
* http://www.vanderlans.com/wp-content/uploads/2016/08/van_der_lans_uien_groep2.jpg; staženo 18. 5. 2018

absolutní konfiguraci na obou chirálních centrech methiinu jako S_S, R_C . Methiin je ve většině druhůch prekurzorem s druhým nejvyšším relativním zastoupením (přibližně 15 %).

Propiin, jehož výskyt v cibuli je velmi variabilní, byl poprvé izolován společně s methiinem v roce 1959.⁴⁵ Absolutní konfigurace propiinu publikovaná Carsonem a Wongem⁴⁶ je taktéž S_S, R_C . Některé studie přítomnost propiinu v cibuli i dalších druhůch česnekovitých rostlin potvrzují,^{41,44,47} jiné ji naopak vyvrací, případně uvádí detekci pouze stopového množství této sloučeniny.^{42,43,48} Toto zjištění je však v rozporu s nezanedbatelným obsahem organosirných sloučenin obsahující propylový řetězec, které byly opakovaně nalezeny v extraktech cibule. Block a kol.⁴⁹ ve své studii stanovili relativní zastoupení thiosulfínátů v cibulovém extraktu, přičemž množství těchto látek obsahujících propylový řetězec se pohybovalo mezi 19–27 %. Wang a kol.⁴⁸ předpokládají, že přítomnost organosirných látek s propylovými skupinami, navzdory stopovému obsahu propiinu, lze vysvětlit redukcí LF (**1**) nebo sloučenin obsahujících 1-propenylový řetězec.

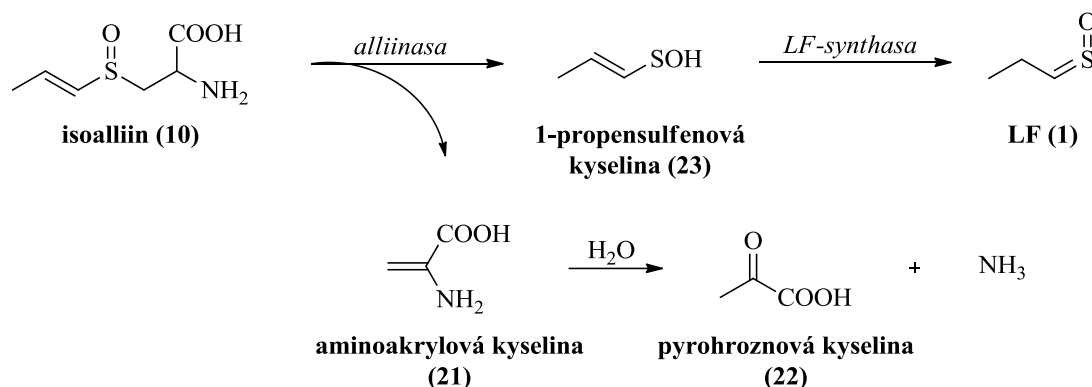
Hlavní a zdaleka nejdůležitější prekurzor senzorycky aktivních sirných sloučenin v cibuli je ovšem isoalliin. Jeho relativní množství se zpravidla pohybuje okolo 85 % všech *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů přítomných v cibuli. Objevení isoalliinu je připisováno finským chemikům Virtanenovi a Spåremu,² kteří potvrdili, že tato sloučenina je prekurzorem látky způsobující slzení očí, tj. LF (**1**). Geometrická konfigurace 1-propenylové skupiny isoalliinu byla stanovena až Carsonem a kol. v roce 1966,⁵⁰ kteří určili strukturu této látky jako (+)-(R_S, R_C)-(E)-*S*-(1-propenyl)-cystein-*S*-oxid.

Enzymově katalyzovaný rozklad *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů probíhá dle obecného schématu uvedeného na **Obrázku 9**. Enzym alliinasa katalyzuje přeměnu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů na velmi reaktivní sulfenové kyseliny, které jsou základními stavebními kameny naprosté většiny organosirných sloučenin rostlin rodu *Allium*. Při této reakci dochází k odštěpení aminoakrylové (**21**) a pyrohroznové kyseliny (**22**).



Obrázek 9: Obecné schéma enzymově katalyzovaného rozkladu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů.

V cibuli je však rozklad isoalliinu ještě výrazně komplexnější. Důvodem tohoto specifického rozkladu je přítomnost dvou odlišných enzymových systémů. V cibuli (a v menší míře i v póru) je totiž kromě alliinasy přítomen ještě další enzym, a sice LF-synthasa (LFS).¹⁰ Zatímco alliinasa katalyzuje rozklad isoalliinu (**10**) za tvorby 1-propensulfenové kyseliny (**23**), druhý z enzymů, LFS, katalyzuje přeměnu části vznikající 1-propensulfenové kyseliny na LF (**1**), sloučeninu s výraznými slzotvornými účinky (**Obrázek 10**).



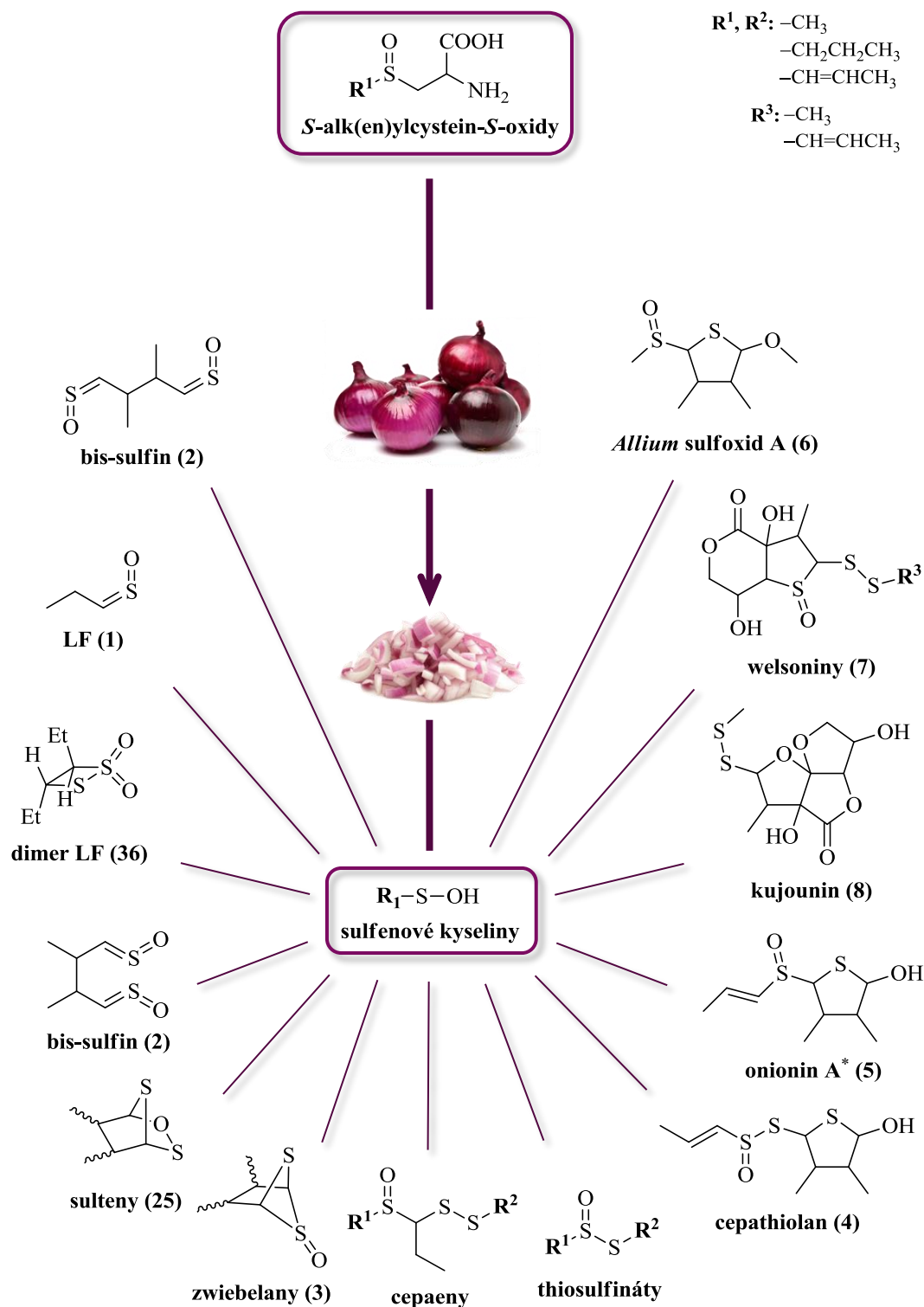
Obrázek 10: Schéma enzymově katalyzovaného rozkladu isoalliinu (**10**).

2.4 Tvorba organosírných sloučenin cibule kuchyňské

Využití cibule v lidovém léčitelství a všeobecné povědomí o jejích pozitivních účincích na lidské zdraví (např. úleva od bolesti, pozitivní vliv na kardiovaskulární systém, mírnění zánětů a symptomů astmatu a jiných dýchacích onemocnění) stály na počátku zájmu vědecké komunity o identifikaci sloučenin, které nesou za tyto biologické účinky zodpovědnost. Organosírné sloučeniny cibule se tak staly hlavními tématy velkého počtu studií, jejichž výsledkem byla identifikace široké skupiny sloučenin s mnohdy významnými biologickými účinky (např. antiastmatickými, protizánětlivými, antitrombotickými a antimikrobiálními). Tyto organosírné sloučeniny v cibuli vznikají enzymovým rozkladem svých prekurzorů, *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, v cibuli se těchto reakcí účastní dva odlišné enzymy – alliinasa a LFS. **Obrázek 11** ukazuje velmi pestrou paletu dosud známých organosírných sloučenin, které enzymově katalyzovaným rozkladem isoalliinu (**10**) a dalších přítomných prekurzorů vznikají.

Základní reakce, které probíhají v cibuli po narušení jejího pletiva, uvádí **Obrázek 12**. Isoalliin (**10**) podléhá enzymově katalyzovanému rozkladu za účasti enzymu alliinasy vedoucímu ke vzniku 1-propensulfenové kyseliny (**23**) za současného odštěpení aminoakrylové kyseliny (**21**). Další enzym, LFS,^{10,16} katalyzuje přeměnu 1-propensulfenové kyseliny (**23**) na LF (**1**). Následnou reakcí LF a 1-propensulfenové kyseliny vzniká bis-sulfín (**2**). Výrazně nižší množství vzniklé 1-propensulfenové kyseliny, která není přeměněna LFS na LF, podléhá kondenzaci vedoucí ke vzniku příslušného thiosulfínátu. Tento symetrický thiosulfínát, *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfínát (**24**), je ovšem mimořádně reaktivní a okamžitě izomeruje za vzniku bicyklických zwiebelanů (**3**), sultenů (**25**), popř. 2,3-dimethylbutandithial-*S*-oxidu (**26**). Methansulfenová (**27**) a propansulfenová kyselina (**28**), vznikající enzymovým rozkladem methiinu (**14**) a propiinu (**15**), mohou podobně jako 1-propensulfenová kyselina (**23**) také podléhat kondenzaci, čímž dochází ke vzniku rozsáhlé skupiny látek, tzv. thiosulfínátů (**24, 29–33**).^{26,30,31,51}

Jednotlivé skupiny organosírných látek vznikajících v cibuli budou detailněji probrány v následujících kapitolách.

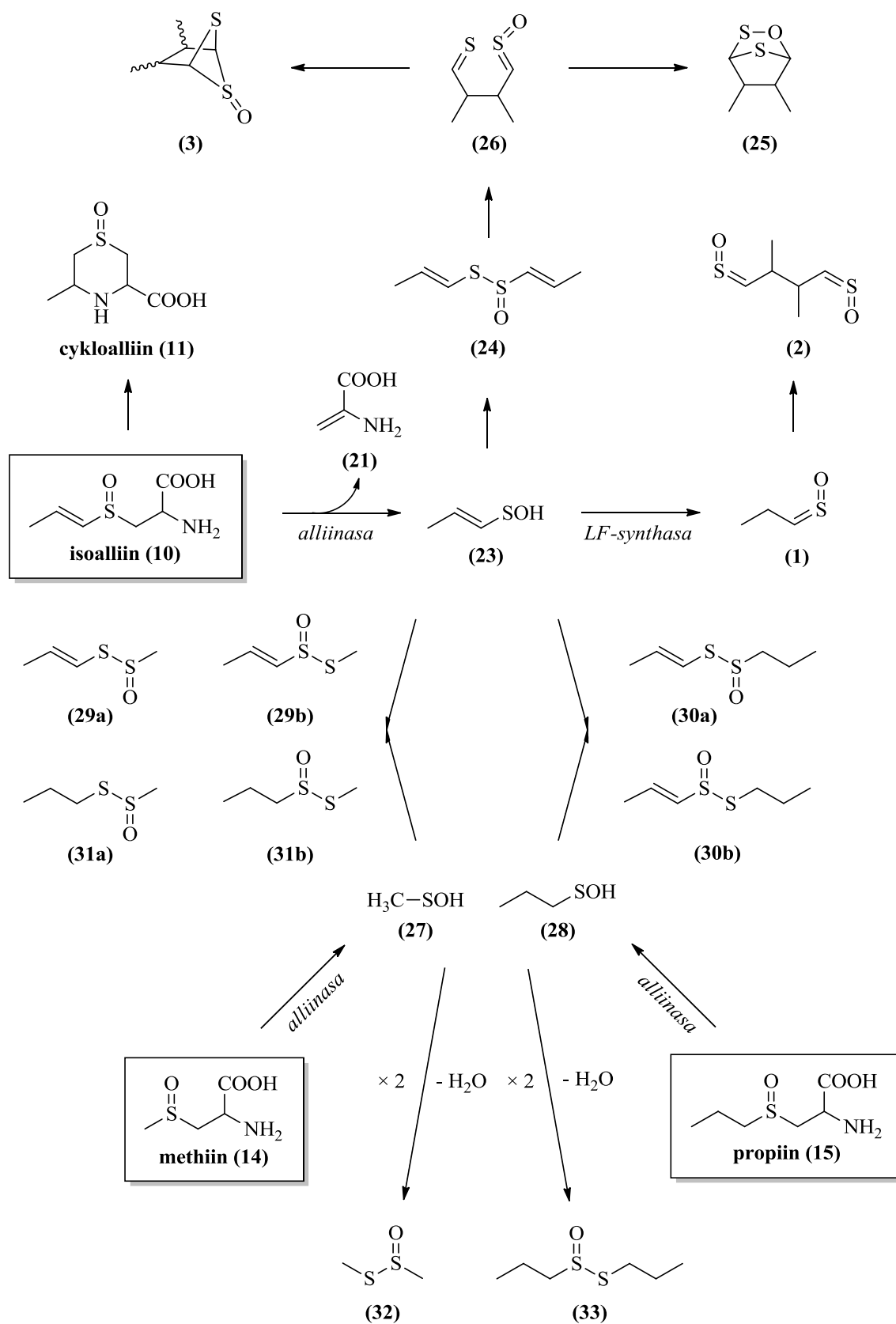


Obrázek 11: Dosud známé organosírné sloučeniny cibule kuchyňské.^{†,‡}

* opravená struktura onioninu A (viz **kap. 4.3.1**)

[†] <http://www.maahirfoods.com/images/onion.png>; staženo 17. 11. 2017

[‡] <https://www.readypac.com/wp-content/uploads/2016/04/Diced-Red-Onion-550x313.png>; staženo 17. 11. 2017



Obrázek 12: Schéma tvorby některých organických sloučenin v cibuli.^{30,31}

2.4.1 Thiosulfináty

Thiosulfináty jsou pravděpodobně nejvíce prostudovanou skupinou sloučenin vznikajících v rostlinách rodu *Allium* a bezesporu náleží do skupiny biologicky aktivních sloučenin zejména pro své antimikrobiální, antiastmatické a protizánětlivé účinky (inhibují 5-lipoxygenasu a cyklooxygenasu).^{5,52} Ve čtyřicátých letech dvacátého století začalo být jasné, že tyto sloučeniny nejsou přítomny v mechanicky nenarušených rostlinách, ale že vznikají enzymaticky katalyzovaným rozkladem jejich prekurzorů.^{53,54} Typické organoleptické vlastnosti čerstvě zhomogenizovaných česnekovitých rostlin, především jejich aroma a ostrá chuť, jsou připisovány právě thiosulfinátům.

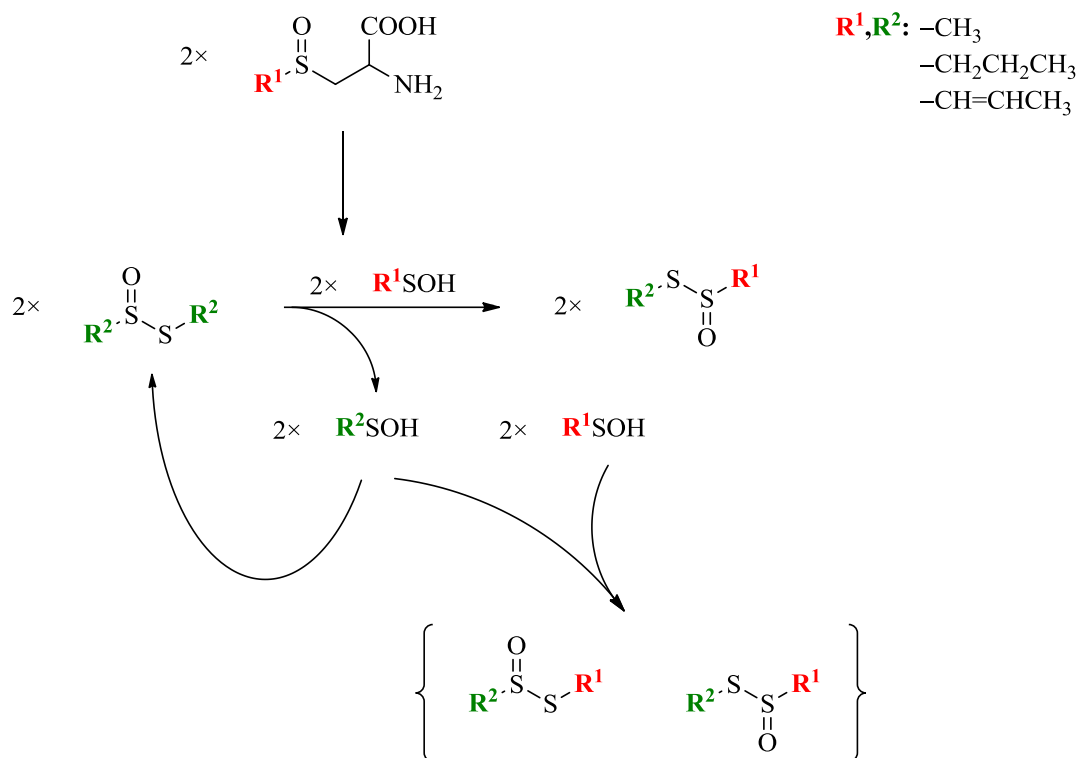
Thiosulfináty lze rozdělit do dvou skupin: *i*) symetrické thiosulfináty, které vznikly kondenzací dvou molekul stejné sulfenové kyseliny, a *ii*) asymetrické thiosulfináty, které jsou tvořeny kondenzací dvou rozdílných molekul sulfenových kyselin (**Obrázek 13**).



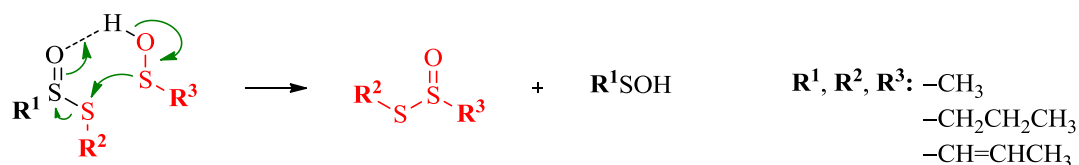
Obrázek 13: Obecná struktura thiosulfinátů vyskytujících se v cibuli.

Biosyntéza thiosulfinátů začíná enzymově katalyzovaným rozkladem jejich prekurzorů, *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, při kterém dochází k tvorbě velmi reaktivních sulfenových kyselin, jejichž spontánní kondenzace vede k produkci značně pestré škály thiosulfinátů (**Obrázek 14**).

Alliinasa vykazuje při enzymovém rozkladu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů substrátovou selektivitu. Rychlost rozkladné reakce je následující: isoalliin > propiin > methiin. Z důvodu odlišné reaktivity *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů může být podstatná část některých sulfenových kyselin (pocházejících zejména z methiinu) tvořena v přítomnosti thiosulfinátů pocházejících z *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, které jsou alliinaseou rozkládány rychleji. Výsledkem je vznik nových („smíšených“) thiosulfinátů i sulfenové kyseliny (**Obrázek 14 a Obrázek 15**).^{55,56}

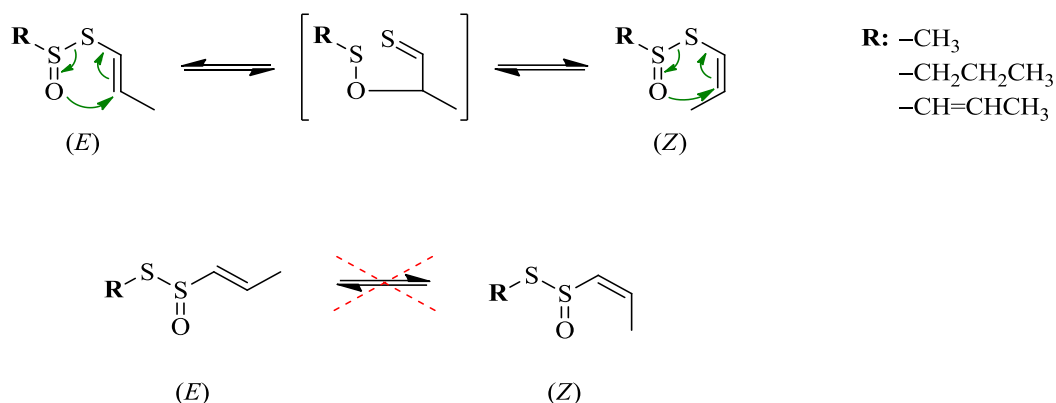


Obrázek 14: Obecné schéma reakcí sulfenových kyselin a thiosulfinátů.



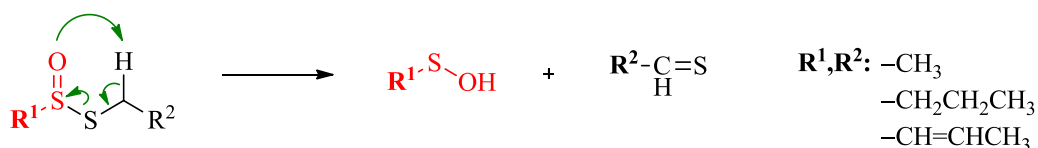
Obrázek 15: Mechanismus reakce thiosulfinátu se sulfenovou kyselinou.⁴⁷

Asymetrické thiosulfináty vždy tvoří dvojici polohových izomerů lišících se pozicí atomu kyslíku. U thiosulfinátů, které ve své molekule obsahují 1-propenylový řetězec navázaný na thiolovou část, tj. $\text{RS(O)SCH}=\text{CHCH}_3$, lze navíc pozorovat tvorbu (*E/Z*)-izomerů navzdory tomu, že v cibuli se přirozeně vyskytuje pouze (*E*)-izomer isoalliinu (**10**). Předpokládá se, že (*Z*)-izomery vznikají sigmatropním přesmykem příslušných (*E*)-izomerů, jak je uvedeno na **Obrázku 16**. Thiosulfináty typu $\text{RSS(O)CH}=\text{CHCH}_3$ této izomerizaci nepodléhají.



Obrázek 16: Předpokládaný mechanismus (*E/Z*)-izomerizace $\text{RS(O)SCH}=\text{CHCH}_3$.³⁰

K rozkladu thiosulfinátů dochází z důvodu velmi labilní vazby mezi atomy síry již za poměrně mírných podmínek. Vznikají tak příslušné značně reaktivní sulfenové kyseliny a thioaldehydy (**Obrázek 17**).

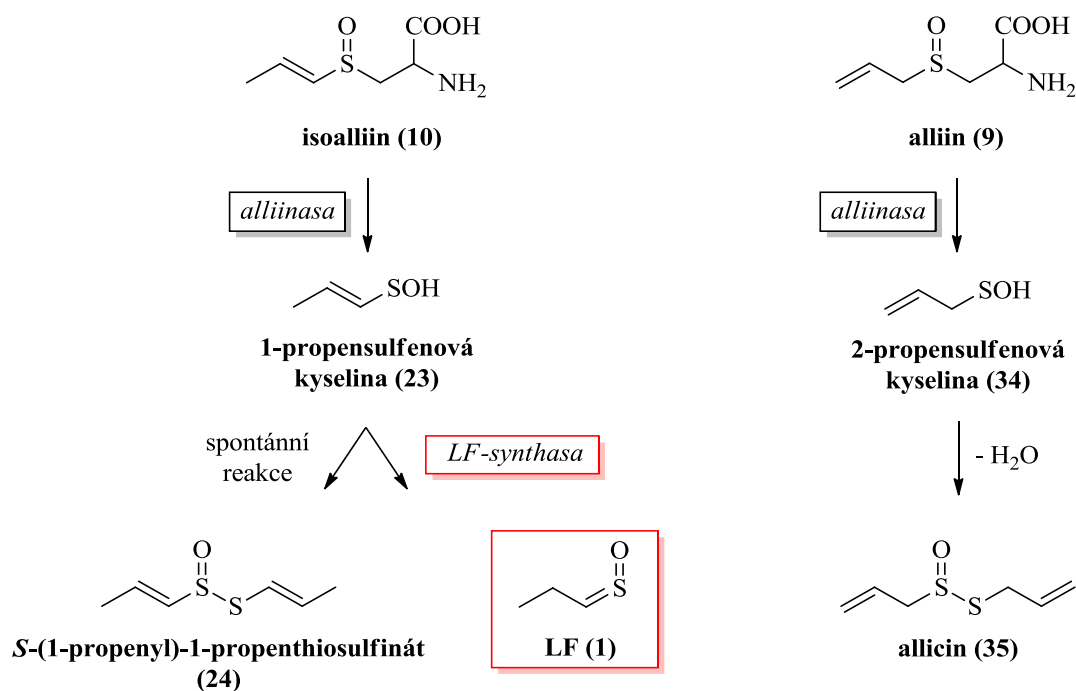


Obrázek 17: Rozklad thiosulfinátů.

2.4.2 Slzotvorné látky

Sulfiny

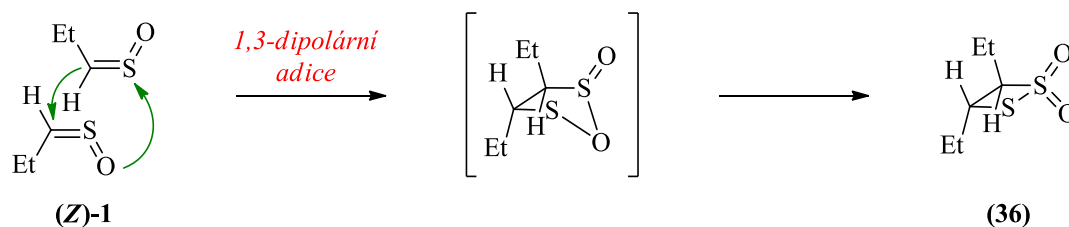
Pozoruhodnou vlastností cibule, nikoli však česneku, je přítomnost dvou odlišných enzymů – alliinasy a LFS, které jsou nezbytné k tvorbě sloučeniny se specifickou funkční skupinou $-\text{CH}=\text{S}=\text{O}$ (thial-*S*-oxid neboli sulfin) vykazující slzotvorné účinky (**Obrázek 18**). K objevení enzymu LFS, zodpovědného za přeměnu 1-propensulfenové kyseliny (**23**) na LF (**1**), došlo až v roce 2002.¹⁰ Předchozí studie předpokládaly, že k tvorbě této látky dochází spontánní izomerizací 1-propensulfenové kyseliny vznikající z isoalliinu. V nedávné studii Silvaroli a kol.¹⁶ publikovali krystalovou strukturu a detailní mechanismus katalytického účinku tohoto enzymu na 1-propensulfenovou kyselinu.



Obrázek 18: Porovnání enzymově katalyzovaného rozkladu isoallinu (**10**) a alliinu (**9**) při zpracování česneku* a cibule.†

Elementární složení LF (C_3H_6SO) bylo určeno již v roce 1956.¹ Prekurzorem LF byl zanedlouho poté identifikován isoalliin,² ovšem původně se předpokládalo, že touto slzotvornou sloučeninou je 1-propensulfenová kyselina (**23**). Správná struktura LF, tj. propanthial-*S*-oxid (**1**, $CH_3CH_2CH=S=O$), byla určena až Brodnitzem a Pascalem (1971),³ kterým se podařilo tuto látku připravit také synteticky.

Dimerizace LF byla studována Blockem a kol. v roce 1980.⁴ Dimer LF (*trans*-3,4-diethyl-1,2-dithietan-1,1-dioxid, **36**) je bezbarvá kapalina s výrazným cibulovým aroma postrádající slzotvorné účinky. Tato sloučenina je prvním izolovaným nasyceným derivátem 1,2-dithietanu. Předpokládaný mechanismus dimerizace LF uvádí **Obrázek 19**.⁴



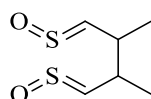
Obrázek 19: Tvorba a struktura dimeru LF (**36**).

* <http://stylesatlife.com/wp-content/uploads/2014/04/Onion2.jpg>; staženo 2. 12. 2017

† <https://www.bbcgoodfood.com/sites/default/files/glossary/garlic.jpg>; staženo 2. 12. 2017

Bis-sulfin

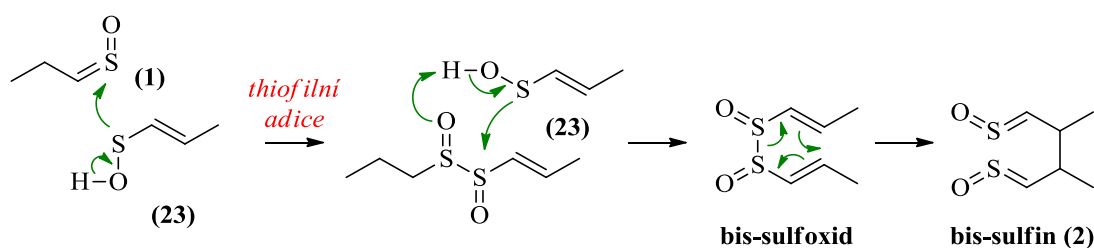
Objevení první přirozeně se vyskytující sloučeniny ze skupiny bis(thial-*S*-oxidů) je připisováno spolupráci Blocka a Bayera.⁹ Bezbarvá sloučenina elementárního složení C₆H₁₀S₂O₂ byla identifikována jako (*Z,Z*)-2,3-dimethylbutandithial-*S,S'*-dioxid (triviálně bis-sulfin, **2**), **Obrázek 20**.



bis-sulfin (**2**)

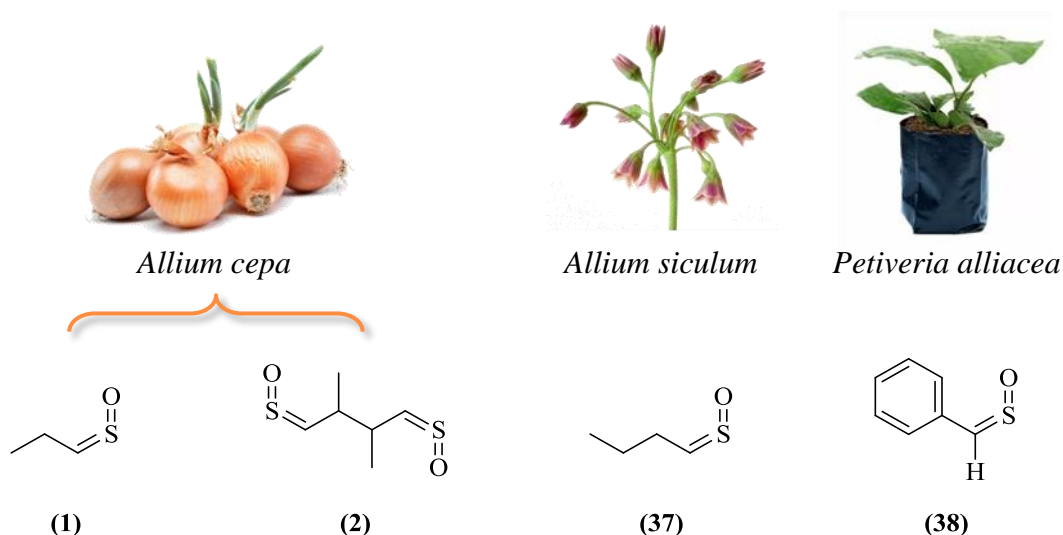
Obrázek 20: Struktura bis-sulfinu (**2**).

Předpokládaným mechanismem vzniku bis-sulfinu (**2**) v cibuli je thiofilní adice 1-propensulfenové kyseliny (**23**) na LF (**1**) následovaná nukleofilním atakem druhé molekuly 1-propensulfenové kyseliny (**23**), **Obrázek 21**.⁹



Obrázek 21: Předpokládaná tvorba bis-sulfinu (**2**).

Thioaldehyd-*S*-oxydy (sulfiny) se v přírodě vyskytují velmi vzácně. Do současné doby jsou známy pouze čtyři přirozeně se vyskytující sloučeniny tohoto typu produkované rostlinami – (*Z*)-propanthial-*S*-oxid (LF, **1**) a (*Z,Z*)-2,3-dimethyl-1,4-butandithial-*S,S'*-dioxid (bis-sulfin, **2**) (oba z cibule kuchyňské – *A. cepa*), (*Z*)-butanthial-*S*-oxid (**37**) (z česneku sicilského – *A. sicutum*) a (*Z*)-fenylmethanthial-*S*-oxid (**38**) (z rostliny *Petiveria alliacea*), **Obrázek 22**.^{3,9,31,57}



Obrázek 22: Struktura dosud známých přirozeně se vyskytujících thioaldehyd-S-oxidů (sulfínů).^{*,†,‡}

2.4.3 Cepaeny

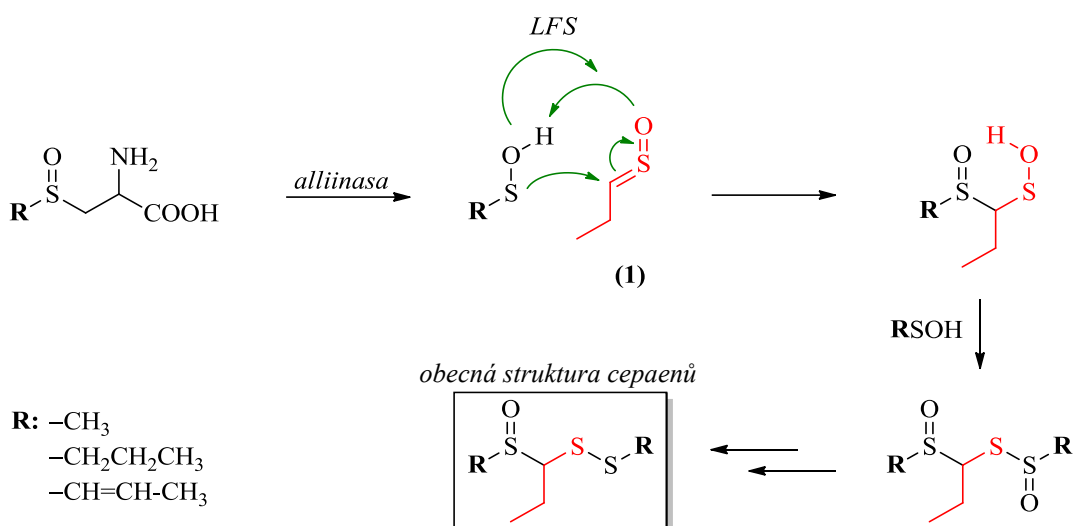
Výzkumy, které předcházely objevení této početné skupiny organosírných sloučenin, byly zaměřeny na studium antialergenních a antiastmatických účinků cibulových extraktů⁵ a inhibičních účinků cibule na srážlivost krve^{6,58} s cílem izolovat sloučeniny zodpovědné za tyto účinky. Z důvodu značně nepřehledných systematických názvů získaly tyto sloučeniny triviální označení cepaeny, vycházející z botanického názvu cibule (*A. cepa*).⁵

Předpokládá se, že cepaeny pravděpodobně vznikají interakcí LF **(1)** a sulfenových kyselin.⁶ Strukturu a mechanismus tvorby cepaenů uvádí **Obrázek 23**.

* <https://www.organicfacts.net/wp-content/uploads/2013/05/Onion2.jpg>; staženo 2. 2. 2018

† <https://images.fineartamerica.com/images/artworkimages/mediumlarge/1/allium-siculum-or-sicilian-honey-garlic-janet-burdon.jpg>; staženo 2. 2. 2018; upraveno

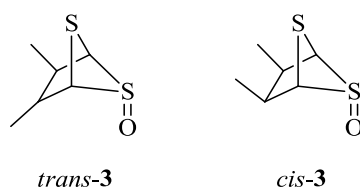
‡ https://http2.mlstatic.com/mudas-de-guine-cientifico-petiveria-alliacea-kit-2-mudas-D_NQ_NP_172011-MLB20470812700_112015-F.webp; staženo 2. 2. 2018



Obrázek 23: Mechanismus tvorby cepaenů.^{26,58}

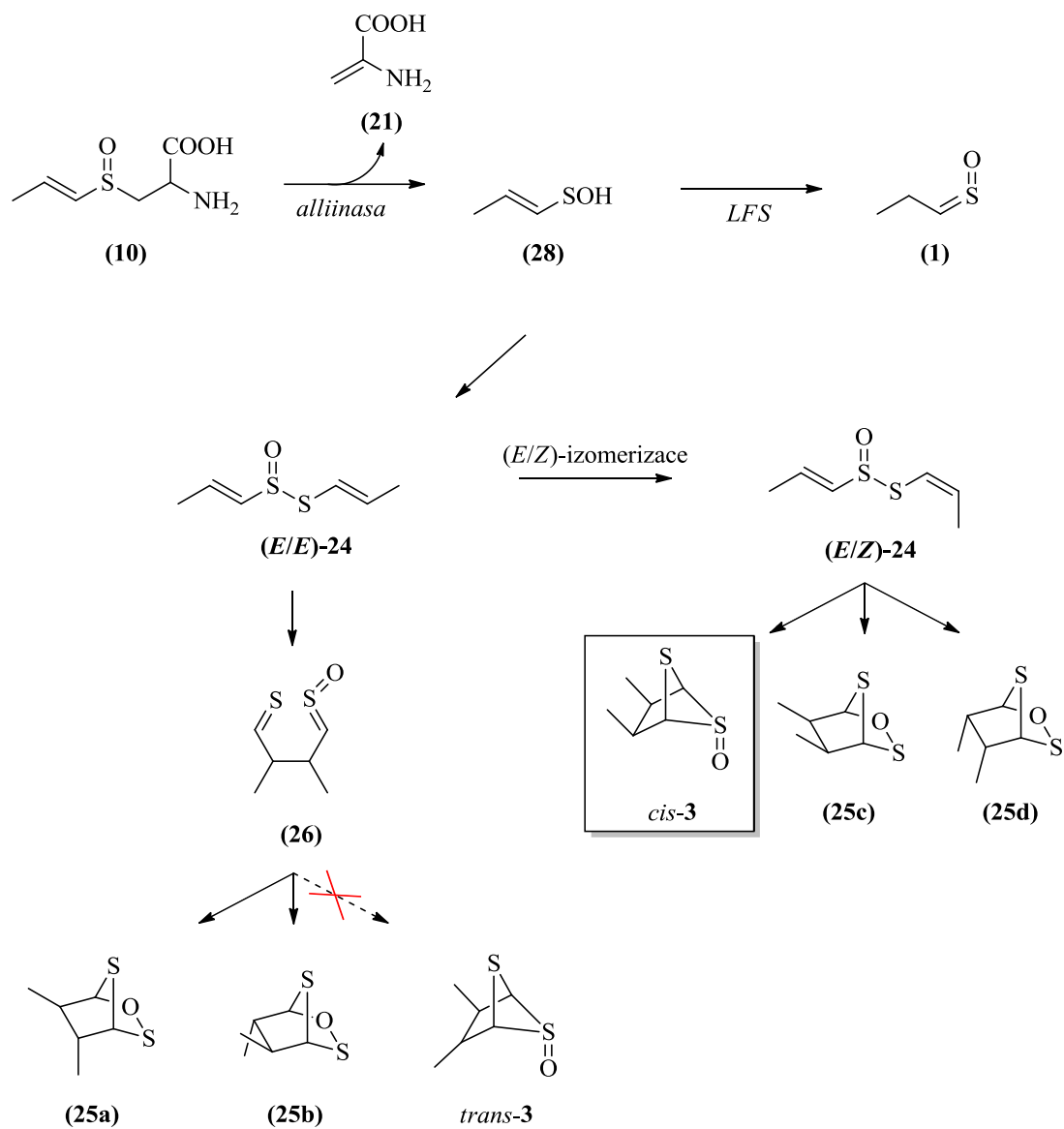
2.4.4 Zwiebelany

Zwiebelany (německy die Zwiebel = cibule) jsou zástupci strukturně neobvyklé skupiny organosírných látek s bicycklým řetězcem, které podobně jako thiosulfináty a cepaeny patří mezi biologicky aktivní sloučeniny cibule díky svým antiastmatickým účinkům.^{5,7} Jedná se o dvě izomerní sloučeniny elementárního složení $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$, jejichž struktura byla určena jako *cis* a *trans*-2,3-dimethyl-5,6-dithia-bicyklo[2.1.1]hexan-5-oxid (*cis*-**3** a *trans*-**3**) (Obrázek 24). Z hlediska koncentrace je zastoupení *cis*-zwiebelanu (*cis*-**3**) v cibuli zhruba třikrát vyšší než *trans*-izomeru (*trans*-**3**).⁵⁹



Obrázek 24: Struktura zwiebelanů (3).

Předpoklad, že se zwiebelany (3) tvoří z *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinátu (24), byl potvrzen oxidací di(1-propenyl)disulfidu.⁷ Bylo zjištěno, že *cis*-zwiebelan (*cis*-**3**) se tvoří ze (*Z,E*)-**24**, popř. (*E,Z*)-**24**, zatímco *trans*-zwiebelan (*trans*-**3**) vzniká ze (*Z,Z*)-**24**, nikoli však z (*E,E*)-**24**.^{7,59} Sloučeniny **25a–d** jsou bicycklé sulteny, které se s největší pravděpodobností také podílí na tvorbě zwiebelanů (Obrázek 25).⁷

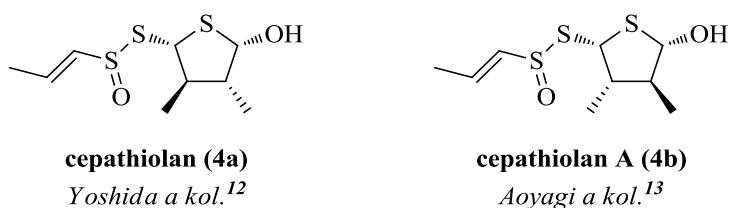


Obrázek 25: Tvorba 25a–d a *cis*-3 enzymatickým rozkladem isoalliinu (10).

2.4.5 Nedávno objevené organosírné sloučeniny cibule

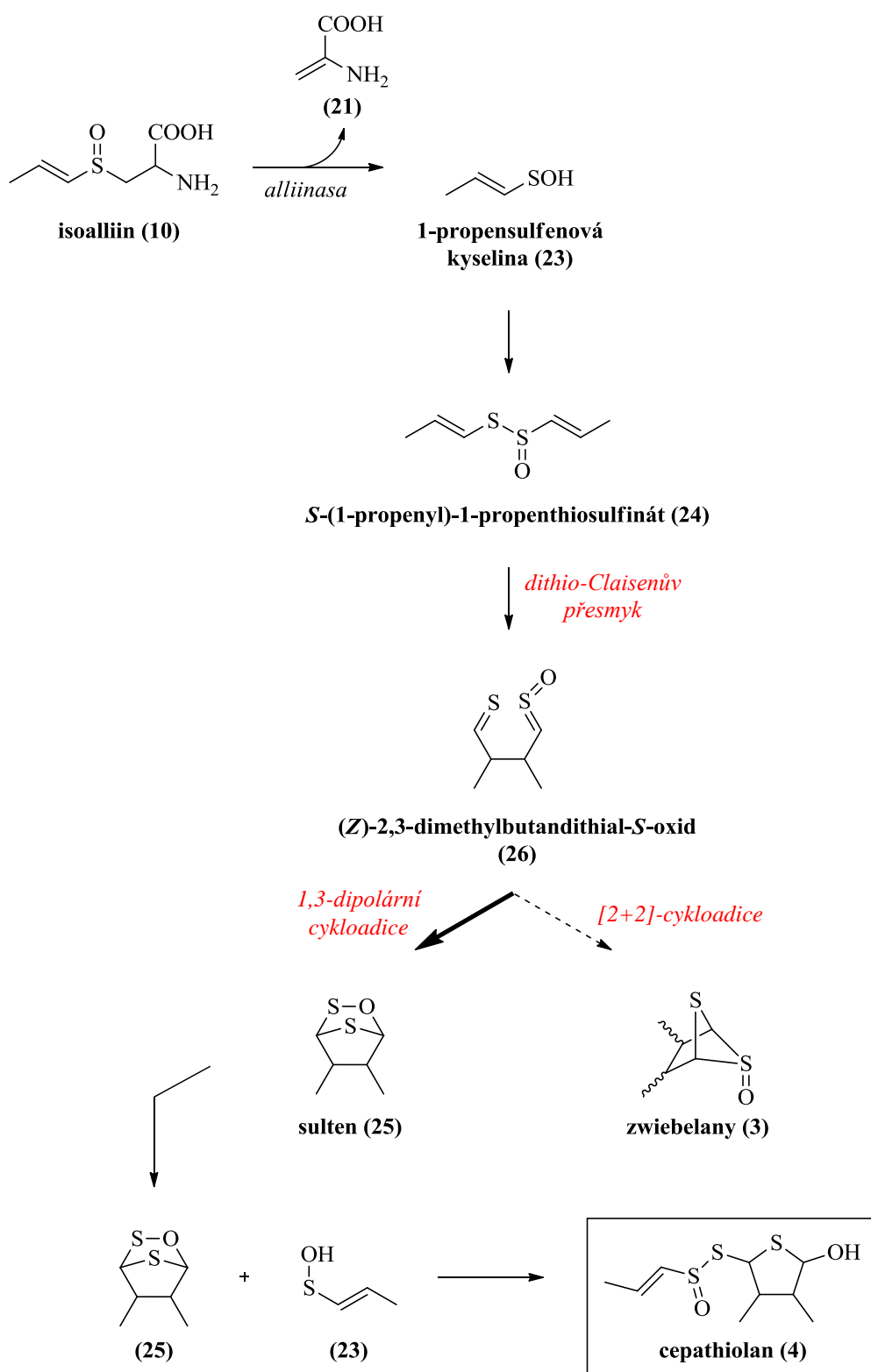
Cepathiolany

První sloučeninu obsahující thiolanové (tetrahydrothiofenové) jádro izolovali z homogenizované cibule Yoshida a kol.¹² a pojmenovali ji cepathiolan (**4a**, **Obrázek 26**). V tomto triviálním názvu je zohledněn nejen botanický název cibule (*A. cepa*), ale i přítomnost thiolanového jádra. Následně byl popsán i další stereoisomer této látky, pojmenovaný cepathiolan A (**4b**).¹³



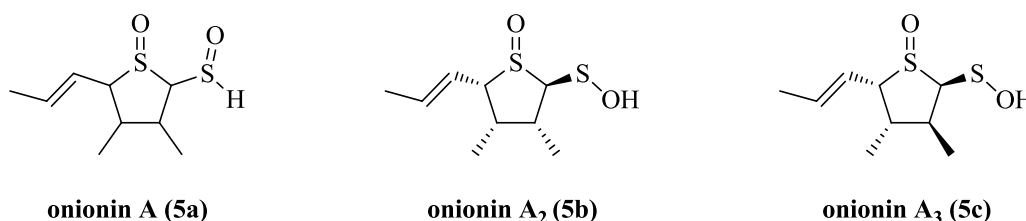
Obrázek 26: Struktura dosud známých cepathiolanů (**4**).

Navržený mechanismus tvorby cepathiolanů uvádí **Obrázek 27**. Dvě ze tří molekul 1-propensulfenové kyseliny (**23**) se účastní tvorby thiolanového kruhu a třetí tvoří postranní řetězec thiosulfínátu. Thiolanový kruh je pravděpodobně tvořen dithio-Claisenovým přesmykem **24** na 2,3-dimethylbutandithial-S-oxid (**26**), ze kterého 1,3-dipolární cykloadicí vzniká bicyklický sulten (**25**), který dále rychle reaguje s další molekulou 1-propensulfenové kyseliny (**23**) za vzniku cepathiolanu (**4**).¹³

Obrázek 27: Pravděpodobný mechanismus tvorby cepathiolanů (4).¹³

Onioniny

El-Aasr a kol.¹¹ v roce 2010 z acetonového extraktu cibule izolovali a identifikovali cyklickou sloučeninu elementárního složení $C_9H_{16}O_2S_2$, kterou triviálně pojmenovali onionin A (**5a**) (po objevení dalších stereoizomerů bývá označován jako onionin A₁). V roce 2014 byly Noharou a kol.¹⁴ z cibule kuchyňské izolovány ještě další dva izomery onioninu A (**5a**) – onionin A₂ (**5b**) a A₃ (**5c**), **Obrázek 28**. Bylo ukázáno, že onioniny A vykazují významnou protirakovinnou aktivitu.^{11,60,61}

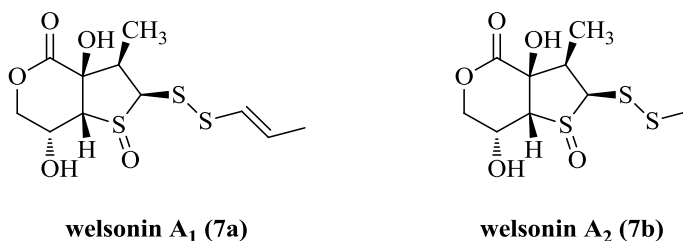


Obrázek 28: Struktury onioninu A (**5a**) a onioninů A₂–A₃ (**5b-c**).

Jak je z **Obrázku 28** zřejmé, navržené struktury onioninu A a A₂₋₃ nejsou zcela konzistentní. Zatímco navržená struktura onioninu A obsahuje funkční skupinu –SHO, struktury onioninu A₂ a A₃ obsahují skupinu –SOH. Je však třeba zmínit, že tyto navržené struktury vzbuzují vážné pochybnosti ohledně jejich správnosti, neboť obě uvedené siriné funkční skupiny jsou mimořádně reaktivní. Sulfenové kyseliny se zatím nepodařilo izolovat z přírodních zdrojů. Syntézu první stabilní sulfenové kyseliny publikovali Goto a kol.,^{62,63} přičemž zvýšená stabilita těchto laboratorně připravených kyselin byla docílena sterickým bráněním vysoce reaktivní –SOH skupiny. Mimořádnou reaktivitu těchto látek dokazuje i vědecká práce Blocka a kol.,⁵¹ kteří pomocí metody DART ve zpracovaném česneku poprvé identifikovali 2-propensulfenovou kyselinu (**34**) (vznikající enzymovým rozkladem alliinů, **9**) a poločas jejího rozpadu určili na méně než 1 s.

Welsoniny

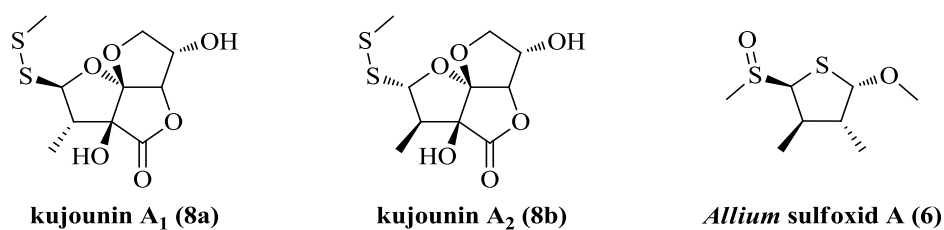
Další dvě nedávno popsané sírné sloučeniny, welsonin A₁ (**7a**) a A₂ (**7b**), byly izolovány Noharou a kol.⁶⁴ v roce 2016 z acetonového extraktu cibule zimní (*A. fistulosum*) společně s onioniny A₁₋₃ (**5a-c**), (**Obrázek 29**).



Obrázek 29: Struktura welsoninu A₁ (**7a**) a A₂ (**7b**).

Kujouniny

Objevení nové skupiny organosírných látek, nesoucích název podle japonského výrazu pro cibuli zimní (*A. fistulosum*) – „Kujou“, ze které byly izolovány, bylo výsledkem studie Fukayaho a kol.¹⁵ Tato vědecká skupina izolovala celkem tři nové sloučeniny: kujounin A₁ (**8a**), A₂ (**8b**) a *Allium* sulfoxid A (**6**) (**Obrázek 30**).



Obrázek 30: Struktura kujouninu A₁ (**8a**), A₂ (**8b**) a *Allium* sulfoxidu A (**6**).

Mechanismy tvorby welsoninů, kujouninů či *Allium* sulfoxidu A jsou zatím poněkud nejasné. Doposud nebyly publikovány ani žádné práce popisující případnou biologickou aktivitu těchto sloučenin.

2.5 Změny organoleptických vlastností při zpracování česnekovitých rostlin

2.5.1 Barevné změny

Tvorba intenzivně barevných sloučenin je často pozorovaným jevem u mnoha rostlin rodu *Allium*, včetně česneku, cibule a póru. V případě česneku dochází ke vzniku výrazně modrého či zeleného zbarvení. Růžové zbarvení lze pozorovat u cibule, póru a česneku sicilského. Navzdory vizuálnímu rozdílu barevných látek vznikajících v česneku a cibuli je mechanismus jejich tvorby velmi podobný. V obou případech se jedná o naprosto spontánní jev, který je výsledkem komplexních, vícekrokových reakcí, zahrnujících enzymové i neenzymové fáze. Barevné změny během procesu zelenání česneku a růžovění cibule uvádí **Obrázek 31**.

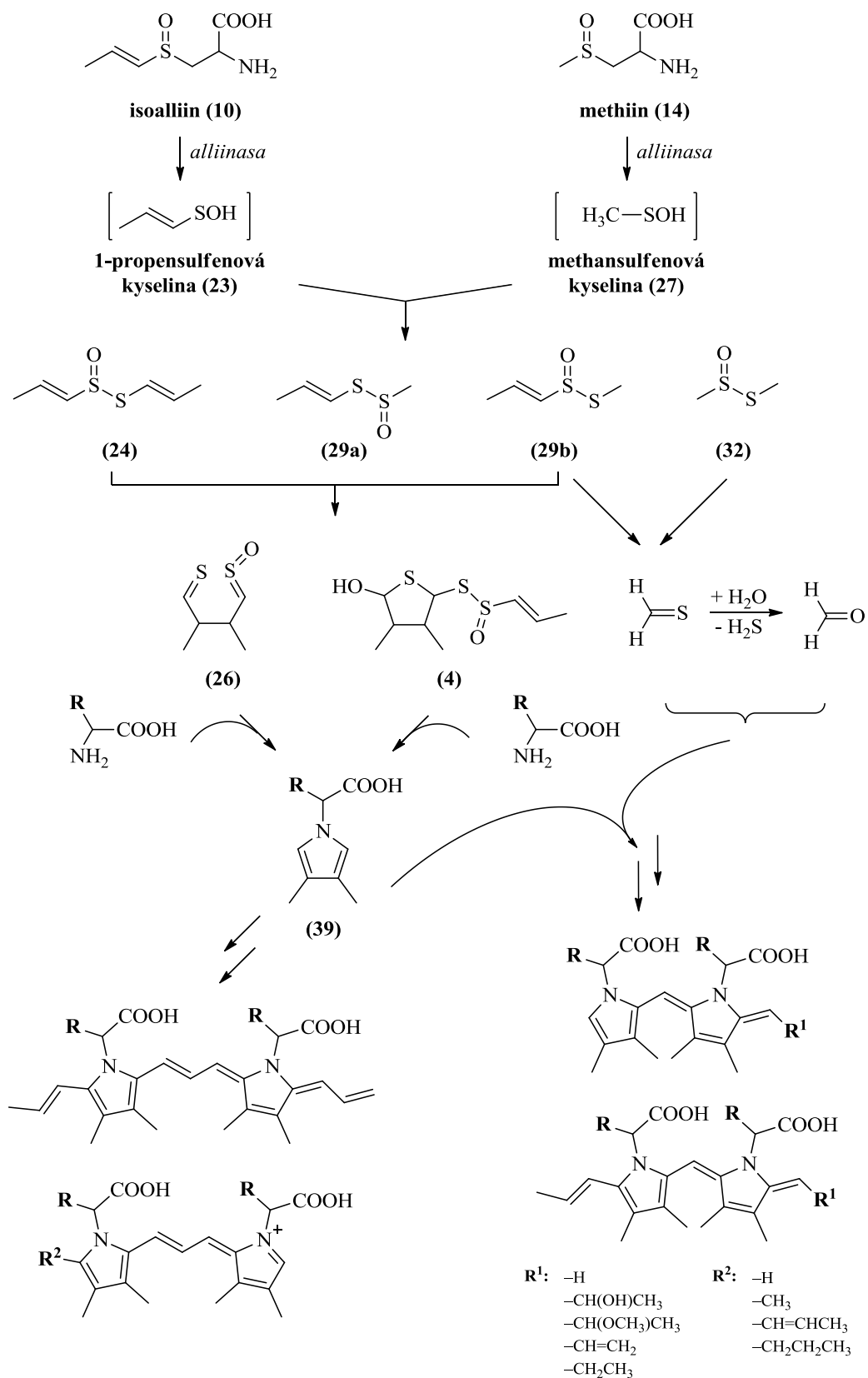


Obrázek 31: Průběh zelenání česneku (horní obrázek) a růžovění cibule (spodní obrázek).*

Zatímco barevné změny probíhající v česneku byly důkladně studovány řadou autorů,^{17,18,20,65-68} obdobným procesům v cibuli či póru byla věnována výrazně nižší pozornost.^{17,20,69-73} Důvodem může být mnohem pomalejší tvorba a nižší intenzita zbarvení sloučenin odpovědných za barevné změny v cibuli a póru. Tyto přirozené, avšak technologicky velmi nežádoucí procesy výrazně snižují kvalitu produktů, a způsobují tak producentům vysoké ekonomické ztráty.

* foto autorky

Shannon a kol.⁷² za hlavní prekurzor v procesu růžovění označili isoalliin (**10**). Kubeč a kol.²⁰ v roce 2015 identifikovali několika barevných sloučenin zodpovědných za růžovění cibule a póru. Pravděpodobný mechanismus tvorby těchto barevných sloučenin v cibuli uvádí **Obrázek 32**. Podobně jako v procesu zelenání česneku jsou i v případě růžovění cibule (popř. póru) klíčovými meziprodukty *N*-substituované 3,4-dimethylpyrroly (**39**),¹⁸ které jsou v cibulovém homogenátu tvořeny reakcí aminokyselin s thiosulfináty obsahující ve své molekule 1-propenylový řetězec (tj. **24**, **29a/b–30a/b**).^{17,19,73} Tyto pyrrolové sloučeniny (**39**) dále reagují s (thio)aldehydy, které se tvoří rozkladem thiosulfinátů (viz **Obrázek 17**). Řadou několika následných reakcí dochází ke vzniku barevných sloučenin, které způsobují růžové zbarvení zpracované cibule.²⁰

Obrázek 32: Mechanismus vzniku barevných sloučenin ve zpracované cibuli.²⁰

2.5.2 Změny chuti

Hořknutí cibule

Podobně jako tvorba výše popsaných barevných sloučenin v rostlinách rodu *Allium* je i produkce hořkých látek spontánním jevem, ke kterému dochází při běžném mechanickém zpracování cibule (např. krájení). Ačkoli studiu barevných změn, především v česneku a cibuli, byla věnována řada vědeckých prací, proces hořknutí cibule během jejího zpracování je v tomto ohledu zcela neprobádanou oblastí.

Hořkým látkám vznikajícím při zpracování cibule byly až do současné doby věnovány pouze dvě vědecké publikace ze šedesátých let minulého století. V první publikaci²¹ dospěl autor k závěru, že tyto hořké látky z isoalliinu (**10**), hlavního prekurzoru organosírných sloučenin cibule, nevznikají. Tento závěr ovšem zcela vyvrátil svou následující studií,²² ve které naopak tvrdí, že tvorba hořkých látek ve zpracované cibuli důsledkem enzymového rozkladu isoalliinu je (**10**). Autor se ve své druhé studii zabýval také organoleptickými vlastnostmi produktů enzymových reakcí různých *S*-substituovaných derivátů cysteinu, jakož i technologicky různě zpracované cibule. Výsledky těchto experimentů shrnuje **Tabulka II**.

Tabulka II: Organoleptické vlastnosti čerstvé cibule, modelových směsí *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů a cykloalliinu (**11**) po enzymové reakci s alliinase v závislosti na čase.²²

čas [min]	1	10	30	1	10	30	1	10	30	1	10	30
substrát	<i>slzotvorné látky</i>			<i>hořkost</i>			<i>ostrost</i>			<i>aroma</i>		
relativní intenzita hodnocených vlastností*												
čerstvá cibule	++	–	–	–	+	++	++	+	–	+	++	++
isoalliin (10)	±	±	–	–	±	++	++	+	±	±	++	++
alliin (9)	–	–	–	–	–	–	±	++	±	++	++	++
propiin (15)	–	–	–	–	–	–	+	++	±	+	++	++
methiin (14)	–	–	–	–	–	–	–	±	–	±	+	+
cykloalliin (11)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

* velmi intenzivní ++; silná +; vnímatelná ±; žádná –

V šedesátých letech minulého století, ve kterých byly obě vědecké studie S. Schwimmera publikovány, bylo ovšem rozklíčování chemických procesů probíhajících při zpracování cibule téměř ve svém počátku. V této době bylo známo pouze elementární složení LF (**1**)¹ (jeho struktura byla chybně označena jako 1-propensulfenová kyselina, **23**),² spolu se strukturou thiosulfinátů a jejich prekurzorů

(tj. isoalliinu a ostatních *S*-substituovaných derivátů). Teprve od konce 80. let minulého století (tedy zhruba 20 let po publikaci obou prací S. Schwimmera) postupně došlo k objevení dalších skupin organosírných sloučenin vznikajících rozkladem isoalliinu (**10**), např. zwiebelanů (**3**),^{5,7} cepaenů,^{5,8} bis-sulfinu (**2**),⁹ cepathiolanů (**4**),^{12,13} onioninů A (**5**)^{11,14} a kujouninů (**8**),¹⁵ jak bylo popsáno v předchozích kapitolách.

Organoleptické vlastnosti řady výše uvedených sloučenin byly studovány, ovšem u žádných z nich nebyla pozorována hořká chuť.²⁶ Struktura hořkých látek, případně mechanismy jejich vzniku tak zůstaly až do současné doby zcela neobjasněny.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie

Acros Organics (Geel, Belgie)

L-alanin (99%), α -toluensulfonylfluorid (99%)

Fluka (Buchs, Švýcarsko)

aktivní uhlí, jodmethan (99%)

Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

dihydrogenfosforečnan draselný (p. a.), kyselina chlorovodíková (25%, p. a.), kyselina mravenčí (98%), síran amonný (p. a.), síran hořečnatý (bezvodý)

Lachema (Brno, Česká republika)

kyselina ethylendiamintetraoctová (99%), formaldehyd (36–38%, p. a.), kyselina *o*-fosforečná (85%), hydroxid draselný (p. a.), peroxid vodíku (30%)

Penta (Praha, Česká republika)

absolutní ethanol, fosforečnan sodný dodekahydrát (p. a.), glycerol bezvodý (p. a.), kyselina octová (99%)

Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

acetonitril (HPLC grade), diethylether (p. a.), dichlormethan (p. a.), kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, methanol (HPLC grade), pyridoxal-5-fosfát ($\geq 97\%$), 2-sulfanylethanol, 4-sulfanylpyridin (95%), thiolan-S-oxid (96%), TRIS-HCl

Rostlinný materiál

Cibule kuchyňská (kultivar Swift, Česká republika), pór zahradní (Holandsko) a česnek kuchyňský (Čína) byly zakoupeny v místním obchodním řetězci.

Ostatní materiál

C8-SPE (1 g; 6 ml) kolony – Supelco (Bellefonte, PE, USA), C18-SPE (10 g; 60 ml) kolony – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Membránové PTFE filtry (0,2 a 0,45 μm ; \varnothing 13 a 25 mm) – Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) a dialyzační membrána (\varnothing 23 mm; 12,4 kDa MWCO) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.1 Přístroje

HPLC separace byly prováděny na přístroji Dynamax SD-210 (Varian, Palo Alto, CA, USA) s detektorem Varian PDA 335. Používané kolony: analytické Kinetex C8 nebo Biphenyl (100 \AA ; $250 \times 4,6$ mm; 5 μm ; Phenomenex). Při vývoji separačních metod byly testovány také analytické kolony Kinetex C-18 a F5 (obě 100 \AA ; $250 \times 4,6$ mm; 5 μm ; Phenomenex). K izolacím byly použity preparativní kolony Kinetex C-8 nebo Biphenyl (100 \AA ; $250 \times 21,2$ mm; 5 μm ; Phenomenex), C-8 Rainin Dynamax (100 \AA ; $250 \times 21,4$ mm; 8 μm ; Varian). Nastříkovaný objem vzorků byl 20 μl (analytické kolony) nebo 1 ml (preparativní kolony).

(+)ESI-HRMS data byla získána využitím systému UltiMate 3000 RS (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) vybaveného detektorem AB SCIEX TripleTOF 6600 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA). Použité parametry: napětí na jehle +5,0 kV, tlak zmlžovacího plynu 35 psi, tlak sušícího plynu 60 psi, ionizační teplota 600 $^{\circ}\text{C}$, potenciál coulombické exploze 60 V.

NMR analýzy byly prováděny na spektrometru Bruker AVANCE III (700 MHz) vybaveného kryosondou (Bruker, Billerica, MA, USA). ^1H a ^{13}C chemické posuny byly vztaženy k signálům CHCl_3 (δ 7,27 a 77,00) nebo DMSO (δ 2,50 a 39,60). IČ spektra byla získána reflektančním měřením na FTIR spektrometru Nicolet 6700 ve spojení s MCT detektorem a mikroskopem Continuum (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA). Parametry měření: spektrální rozsah 4000–650 cm^{-1} , rozlišení 8 cm^{-1} , počet akumulací spekter 128, apodizace Happ-Genzel.

GC/MS analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu Varian 3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA) vybaveným hmotnostním detektorem Varian 4000. Vzorky (1 μl , split 1:10) byly vstříkovány na VF-5ms křemennou kapilární kolonu

(30 m × 0,25 mm; tloušťka filmu 0,25 μm; Varian). Provozní podmínky byly následující: teplota nástřiku 180 °C, teplota detektoru 250 °C, nosný plyn helium o průtoku 1,3 ml/min. Lineární teplotní gradient od 120 °C (první 3 minuty konstantní) do 240 °C (10 °C/min).

Izolace enzymů byly prováděny s využitím chlazené centrifugy Universal 320 R (Hettich, Německo) s výkyvným rotorem o kapacitě 4 × 200 ml s maximálně 15 000 ot/min. Pro přípravu vzorků na senzorkou analýzu byly využity ultramikrováhy Mettler Toledo XPR6UD5 (Greifensee, Švýcarsko) umožňující odečitatelnost 0,5 μg.

Při thiosulfínátovém testu byl využit spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II (Biochrom, USA) vlnového rozsahu 190–1100 nm s rozlišením ±2 nm a fotometrickou přesností ±0,003 A. Pro měření byla použita kyveta z křemenného skla typu Q.

3.2 Gradienty používané v HPLC

METODA A

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
18,0 ml/min	0:00	70	30
	30:00	55	45
	42:00	5	95
	48:00	5	95
	50:00	70	30
kolona	C-8 Rainin Dynamax (250 × 21,4 mm; 8 μm; 100 Å)		

METODA B

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
0,9 ml/min	0:00	90	10
	62:00	72	28
	63:00	5	95
	69:00	5	95
	70:00	90	10
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA C

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
19,1 ml/min	0:00	88	12
	80:00	67	33
	81:00	5	95
	89:00	5	95
	90:00	88	12
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA D

průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,1% HCOOH [%]	CH ₃ CN + 0,1% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	90	10
	45:00	65	35
	46:00	5	95
	54:00	5	95
	55:00	90	10
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA E

průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,1% HCOOH [%]	CH ₃ CN + 0,1% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	85	15
	50:00	60	40
	60:00	5	95
	69:00	5	95
	70:00	85	15
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA F

průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,1% HCOOH [%]	CH ₃ CN + 0,1% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	100	0
	49:00	70	30
	50:00	5	95
	54:00	5	95
	55:00	100	0
kolona	Kinetex Biphenyl (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA G

průtok	čas [min]	H ₂ O	CH ₃ CN
		+ 0,1% HCOOH [%]	+ 0,1% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	100	0
	49:00	60	40
	50:00	5	95
	54:00	5	95
	55:00	100	0
kolona	Kinetex Biphenyl (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA H

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
19,1 ml/min	0:00	88	12
	86:00	67	33
	87:00	5	95
	94:00	5	95
	95:00	88	12
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA I

průtok	čas [min]	H ₂ O	CH ₃ CN
		+ 0,05% HCOOH [%]	+ 0,05% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	80	20
	30:00	60	40
	31:00	5	95
	39:00	5	95
	40:00	80	20
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA J

průtok	čas [min]	H ₂ O	CH ₃ CN
		+ 0,1% HCOOH [%]	+ 0,1% HCOOH [%]
0,9 ml/min	0:00	85	15
	50:00	60	40
	60:00	5	95
	69:00	5	95
	70:00	85	15
kolona	Kinetex C-8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

3.3 Izolace hořkých sloučenin z extraktu cibule kuchyňské

3.3.1 Příprava extraktu

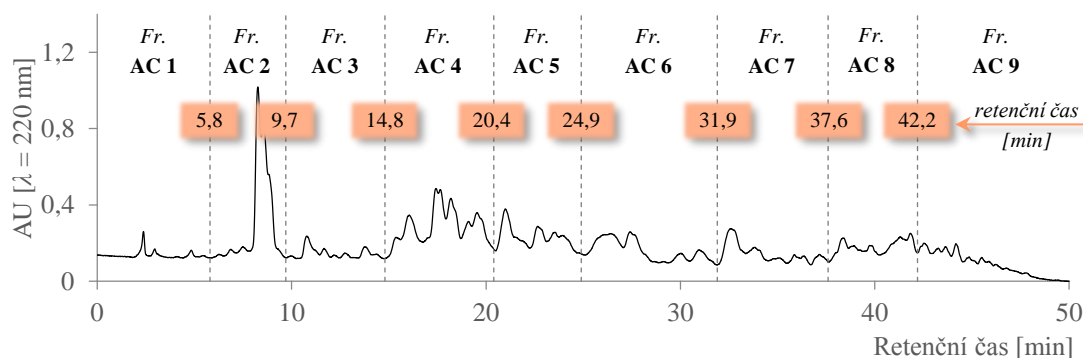
Oloupaná cibule o celkové hmotnosti 1006 g byla zpracována pomocí kuchyňského odšťavňovače (Catler JE 4010). U získané šťávy byla pozorována tvorba hořkých látek již po deseti minutách. Celkem byla získaná šťáva ponechána stát 1 hodinu při laboratorní teplotě, během které začala být výrazně hořká. K přímé extrakci hořkých látek bylo použito 2× 500 ml diethyletheru (DEE). Z důvodu tvorby emulze v dělicí nálevce bylo nutné vzorek odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla opětovně extrahována stejným postupem. Organické fáze byly spojeny, po částečném odpaření DEE byl extrakt přesušen bezvodým MgSO₄, přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,45 μm; ø 25 mm) a následně byl zbývající objem DEE zcela odpařen na rotační vakuové odparce ($t < 30\text{ °C}$; RVO). Výsledný tmavě zelený odparek byl dále rozpuštěn v 80 ml CH₃CN a protečením přes kolonku C18-SPE (10 g; 60 ml) zbaven chlorofylu. Z kolonky vytékal čirý žlutý roztok (při použití C8-SPE k zachycení chlorofylu nedocházelo). Po odpaření CH₃CN byl výsledný roztok viskózní, tmavě žlutý s výrazně hořkou chutí.

Celkem bylo výše uvedeným postupem zpracováno 7,75 kg cibule. Metodou přímé extrakce bylo získáno 4,56 g tmavě zeleného extraktu. Po odstranění chlorofylu pomocí kolonky C18-SPE (10 g; 60 ml) bylo získáno 2,44 g tmavě žlutého viskózního extraktu, který byl před dalšími analýzami uchován při teplotě -28 °C .

3.3.2 Frakcionace extraktu

Cílem preparativní separace pomocí C8-HPLC/PDA bylo připravený extrakt frakcionovat a u jednotlivých frakcí následně stanovit intenzitu hořké chuti. Extrakt z cibule (181 mg) byl rozpuštěn v 10 ml CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a zfiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 25 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 33**, Metoda A, nastříkovaný objem 1 ml) byl extrakt během 10 analýz rozdělen na 9 frakcí (AC 1–9). Každá frakce byla pomocí RVO ($t < 30\text{ °C}$) zbavena

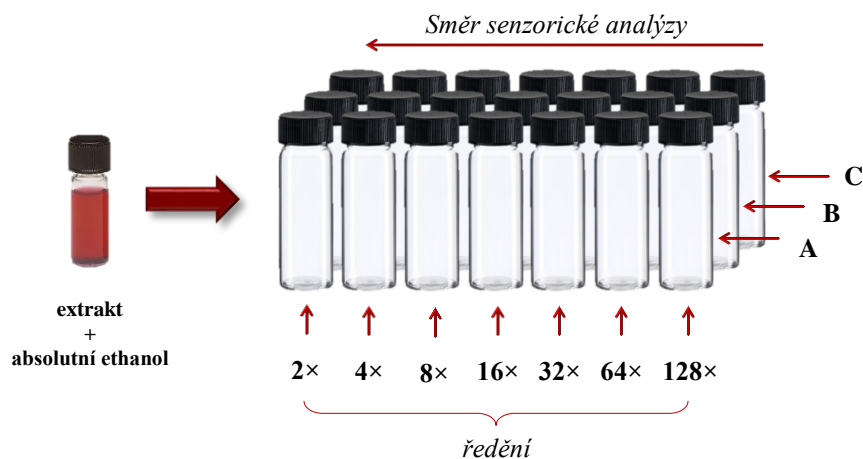
CH₃CN a poté lyofilizována. Výsledné extrakty získaných frakcí byly před dalšími analýzami uchovány při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 33: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu cibule kuchyňské – frakcionace (Metoda A).

3.3.3 Senzorická analýza frakcí AC 1–9 metodou TDA

Záměrem sensorické analýzy jednotlivých frakcí extraktu z cibule metodou TDA (z angl. *taste dilution analysis*) bylo stanovení tzv. TD-faktoru, který se dá charakterizovat jako nejvyšší ředění dané frakce, při kterém lze ještě rozpoznat hodnocenou chuť. Sensorická analýza frakcí byla prováděna dle postupu Franka a kol.⁷⁴



Obrázek 34: Příprava vzorků pro sensorickou analýzu metodou TDA.*[†]

Extrakty jednotlivých frakcí byly rozpuštěny v 1 ml absolutního ethanolu. Takto připravený roztok byl dále postupně ředěn pitnou vodou v poměru 1:1 (v/v)

* <https://www.sks-science.com/images/225142LRGt.jpg>; staženo dne 13. 9. 2018; upraveno

† <https://www.nudenicotine.com/wp-content/uploads/2014/07/GLASS-VIAL.jpg>; staženo dne 13. 9. 2018; upraveno

až do ředění 128×. Od každého ředění byly připraveny tři vzorky (označeny A, B, C), přičemž dva z nich byly slepé (obsahovaly pouze absolutní ethanol a pitnou vodu v daném poměru), jeden vzorek (náhodně označen A, B nebo C) obsahoval extrakt dané frakce. Úkolem hodnotitelů bylo sensoricky otestovat připravené vzorky vždy ve směru od nejvyššího ředění a označit vzorek, u kterého lze při daném ředění detekovat hořkou chuť (**Obrázek 34**).

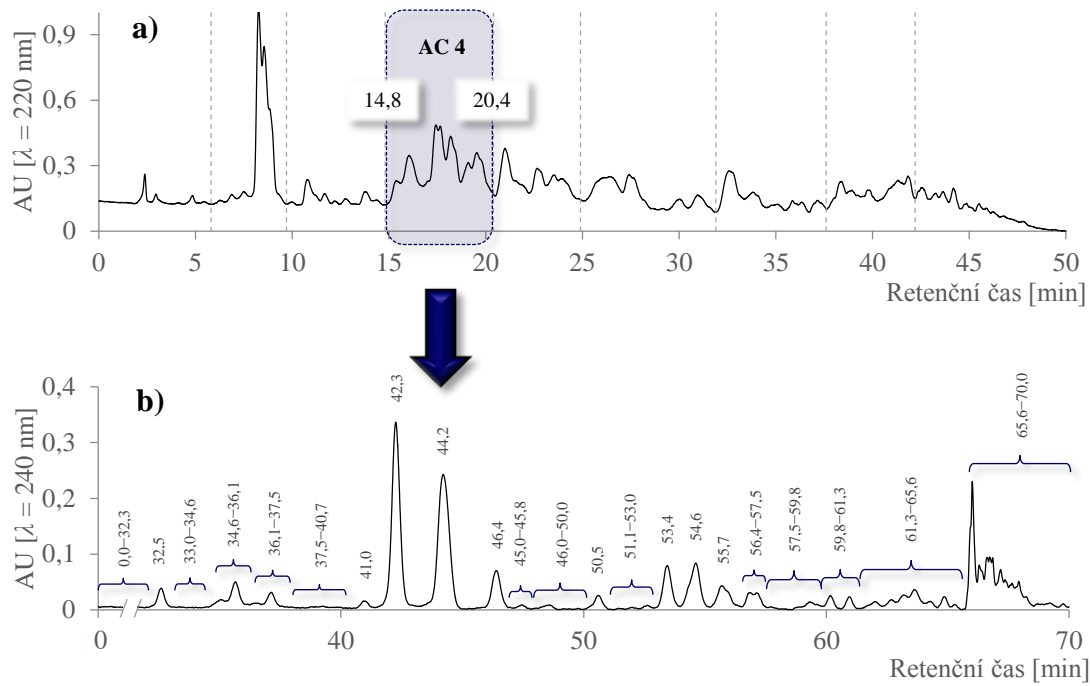
Senzorického hodnocení frakcí, které bylo provedeno ve dvou nezávislých opakováních, se účastnili celkem čtyři hodnotitelé (dvě ženy, dva muži; věk 29–51 let). Výsledky všech hodnotitelů byly aritmeticky zprůměrovány a pro každou frakci extraktu stanoven TD-faktor, jehož hodnota je přímo úměrná intenzitě hořké chuti hodnocené frakce.

3.3.4 Optimalizované HPLC metody

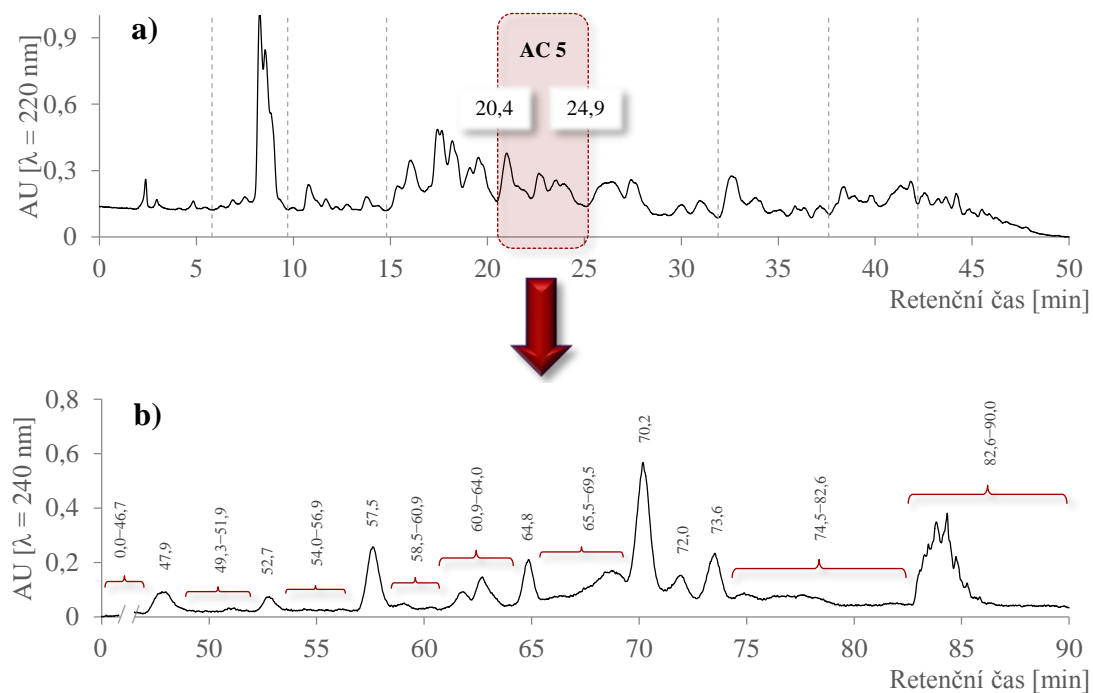
Frakce AC 4

Pro frakci AC 4 byla vytvořena optimalizovaná metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 35**, Metoda B, nastříkovaný objem 1 ml). Frakce AC 4 (26 mg) byla rozpuštěna v 10 ml roztoku CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a zfiltrována přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Z důvodu dosud neznámé struktury sloučenin odpovědných za hořkou chuť cibulového homogenátu byly jímány i části bez pozitivního signálu PDA detektoru (**Obrázek 35**).

Jednotlivé frakce byly po odpaření CH₃CN (RVO, $t < 30$ °C) extrahovány 2× 100 ml DEE, spojené organické fáze přesušeny bezvodým MgSO₄ a zcela odpařeny (RVO, $t < 30$ °C). Jednotlivé izolované sloučeniny byly po extrakci podrobeny orientační sensorické analýze a před dalšími analýzami uchovány při teplotě –28 °C.



Obrázek 35: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
a) cibule kuchyňské (Metoda A),
b) frakce AC 4 (Metoda B).



Obrázek 36: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
a) cibule kuchyňské (Metoda A),
b) frakce AC 5 (Metoda C).

Frakce AC 5

Pro frakci AC 5 byla vytvořena optimalizovaná metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 36**, Metoda C, nastříkovaný objem 1 ml). Frakce AC 5 (70 mg) byla rozpuštěna v 15 ml roztoku CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a zfiltrována přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Z důvodu dosud neznámé struktury sloučenin odpovědných za hořkou chuť cibulového homogenátu byla jímána celá část chromatogramu, včetně částí bez pozitivního signálu PDA detektoru (**Obrázek 36b**).

Separace byla provedena celkem v 15 opakováních. Odpovídající izolované frakce byly spojeny a po odpaření CH₃CN (RVO, $t < 30$ °C) extrahovány 2× 100 ml dichlormethanu (DCM), spojené organické fáze přesušeny bezvodým MgSO₄ a zcela odpařeny (RVO, $t < 30$ °C). Získané extrakty jednotlivých frakcí byly podrobeny orientační sensorické analýze a před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

3.4 Izolace hořkých sloučenin z modelových reakčních systémů

Modelové reakce byly použity pro izolaci sloučenin, které s procesem hořknutí přímo souvisí, ale při snaze o jejich izolaci z cibulového extraktu nebylo možné dosáhnout uspokojivé HPLC separace zejména z důvodu jejich koeluce s jinými látkami přítomnými v extraktu.

Pro modelové reakce byly použity isoalliin, methiin a alliinasa získaná z česneku kuchyňského. Některé experimenty byly prováděny také s využitím cibulového enzymového systému alliinasy/LFS, jak bude uvedeno dále.

3.4.1 Izolace alliinasy

Izolace byla prováděna dle postupu Shena a Parkina.⁵⁵ Jednotlivé kroky probíhaly za snížené teploty (0–4 °C). Oloupané stroužky česneku (500 g) byly vloženy do odšťavňovače, získaná šťáva smíchána s 250 ml vychlazeného roztoku 0,1M KH₂PO₄ (pH = 7,5; 10% glycerol; 5mM EDTA; 0,5mM α -toluensulfonylfluorid; 0,05% cystein a 10 μM pyridoxal-5-fosfát). Česnekový homogenát byl za sníženého

tlaku zfiltrován přes Büchnerovu nálevku s plátnem a filtrát odstředěn (9000 rpm; 15 min; 4 °C). Získaný precipitát byl ze systému odstraněn, k supernatantu byl postupně přidáván $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na úroveň 65% nasycení a poté byla směs míchána po dobu 60 minut v ledové lázni. Po následném odstředění (9000 rpm; 20 min; 4 °C) byl supernatant slit a precipitát rozpuštěn v minimálním objemu extrakčního pufru (přibližně 25 ml). Takto připravený roztok obsahující alliinasu byl dialyzován proti destilované vodě (4 °C), která byla během prvních 8 hodin dialýzy pravidelně měněna po 2 hodinách, v další fázi dialýzy po 4–5 hodinách. Dialýza probíhala celkem 48 hodin. Poté byl obsah dialyzační membrány rozdělen do vialek a lyofilizován. Aktivita získané alliinasy byla testována na roztoku *S*-(2-pyrrolyl)cystein-*S*-oxidu, který v přítomnosti alliinasy zoranžověl.⁷⁵

Analogickým postupem byl izolován enzymový systém alliinasa/LFS z cibule kuchyňské.

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

Isoalliin byl izolován Ing. Petrou Kučerovou dle postupu Carsona a kol.⁵⁰ Syntetická příprava methiinu byla provedena alkylací *L*-cysteinu jodmethanem a následnou oxidací H_2O_2 .⁷⁶

3.4.3 Modelová reakce A

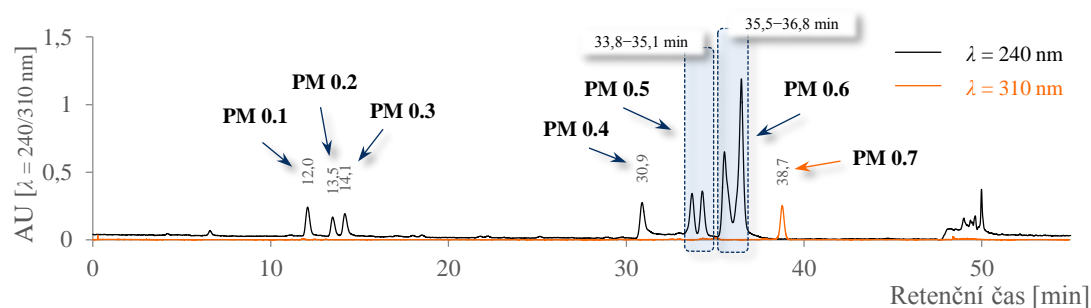
Příprava extraktu

K modelové reakci A bylo použito 209 mg isoalliinu a 250 mg methiinu rozpuštěných ve 40 ml 0,5M KH_2PO_4 (pH = 7,0). K tomuto roztoku bylo přidáno 243 mg česnekové alliinasy rozpuštěné ve 20 ml 0,5M KH_2PO_4 (pH = 7,00; 25 μM pyridoxal-5-fosfát; 10 % glycerol). Reakce probíhala při mírném míchání po dobu 1 min. Modelová reakce byla extrahována 2 × 30 ml DCM. Z důvodu nedostatečného rozdělení organické a vodné fáze bylo nutné směs odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná opětovně extrahována stejným postupem. Organické fáze byly

spojeny, po částečném odpaření DCM (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl roztok přesušen bezvodým MgSO_4 , přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE, $0,2\text{ }\mu\text{m}$, $\varnothing 13\text{ mm}$) a zbývající objem DCM následně zcela odpařen (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tímto postupem byl získán mírně viskózní, světle žlutý extrakt (40 mg), který byl před dalšími analýzami uchován při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

HPLC izolace sloučenin

Extrakt modelové reakce (40 mg) byl rozpuštěn v 10 ml okyseleného (0,1% HCOOH) roztoku $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 20/80) a zfiltrován přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 13\text{ mm}$). Pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 37**, Metoda D, nastřikovaný objem 1 ml) bylo jímáno celkem sedm frakcí (v chromatogramu označeny PM 0.1–0.7), které byly po odpaření CH_3CN (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) lyofilizovány. Po lyofilizaci byly frakce rozpuštěny v CH_3CN , zfiltrovány přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 13\text{ mm}$) a pomocí proudu dusíku zcela odpařeny. Takto zpracované frakce byly před dalšími analýzami uchovány při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 37: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce A: isoalliin, methiin a alliinasa, reakce 1 min – izolace PM 0.1–0.7 (Metoda D).

3.4.4 Modelová reakce B

Příprava extraktu

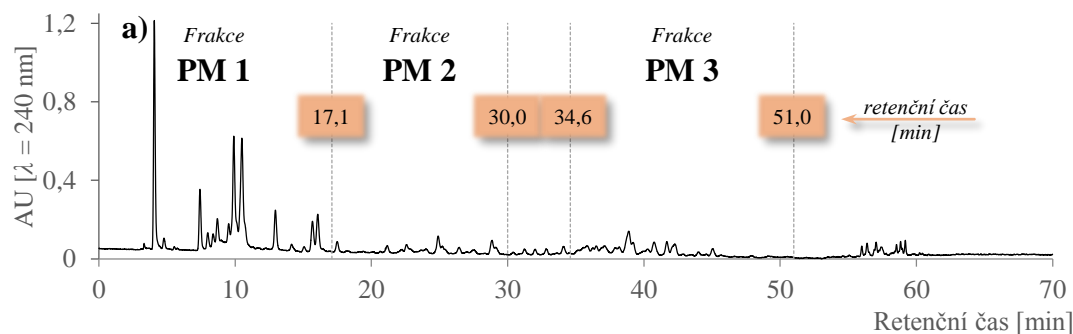
K modelové reakci B bylo použito 1,02 g isoalliinu a 1,23 g methiinu rozpuštěných ve 200 ml 0,5M KH_2PO_4 (pH = 7,0). K tomuto roztoku bylo přidáno 1,02 g česnekové alliinasy rozpuštěné ve 100 ml 500mM KH_2PO_4 (pH = 7,00; $25\text{ }\mu\text{M}$ pyridoxal-5-fosfát;

10 % glycerol). Reakce probíhala při mírném míchání v 500ml reakční baňce po dobu 3 hodin, během kterých směs výrazně zhořkla. Modelová reakce byla extrahována 2× 200 ml DCM. Z důvodu nedostatečného rozdělení organické a vodné fáze v dělicí nálevce bylo nutné směs odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná opětovně extrahována stejným postupem. Organické fáze byly spojeny, po částečném odpaření DCM (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl roztok přesušen bezvodým MgSO_4 , přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing\text{ }13\text{ mm}$) a zbývající objem DCM následně zcela odpařen (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tímto postupem byl získán mírně viskózní, světle žlutý extrakt (471 mg) velmi hořké chuti, který byl před dalšími analýzami uchován při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Celkem bylo tímto způsobem v několika várkách použito 4,5 g isoalliinu, 5,8 g methiinu, 4,9 g alliinasy a získáno 1,95 g extraktu.

Frakcionace extraktu metodou HPLC

Záměrem následující preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 38**, Metoda E, nastříkovaný objem vzorku 1 ml) bylo frakcionovat extrakt modelové reakce B. Extrakt modelové reakce B (471 mg) byl naředěn 4 ml okyseleného CH_3CN (0,1% HCOOH) a protečením přes kolonku C8-SPE (1 g; 6 ml) zbaven látek, které by se nevratně zachycovaly v HPLC koloně. Kolonka byla vypláchnuta 4 ml okyseleného CH_3CN (0,1% HCOOH). Vzorek, ke kterému bylo přidáno 8 ml okyselené destilované vody (0,1% HCOOH), byl zfiltrován přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing\text{ }13\text{ mm}$). Původní extrakt (471 mg) byl tedy rozpuštěn celkem ve 24 ml okyseleného (0,1% HCOOH) roztoku $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 50/50). Celkem byly pomocí preparativní C8-HPLC izolovány tři frakce (PM 1, PM 2 a PM 3) v intervalech retenčních časů uvedených na **Obrázku 38**. Výše popsáním způsobem bylo postupně zpracováno celkem 1953 mg extraktu modelové reakce.



Obrázek 38: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B: isoalliin, methiin a alliinasa, reakce 3 hod (Metoda E).

Najímané frakce byly po odpaření CH_3CN (RVO, $t < 30\text{ }^\circ\text{C}$) extrahovány $3\times$ DCM v poměru 9/1 (vzorek/DCM; v/v), spojené organické fáze byly přesušeny bezvodým MgSO_4 a přefiltrovány přes mikrofiltr (PTFE; $0,45\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 25\text{ mm}$). Zbývající objem DCM byl nakonec zcela odpařen (RVO, $t < 30\text{ }^\circ\text{C}$). Výsledné extrakty jednotlivých frakcí byly před dalšími analýzami uchovány při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Optimalizované HPLC metody pro jednotlivé frakce modelové reakce B

Frakce PM 1

Část frakce PM 1 (215 mg) byla naředěna 20 ml okyseleného (0,1% HCOOH) roztoku $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 20/80) a přefiltrována přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 13\text{ mm}$). Pomocí preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Obrázek 39**, Metoda F, nastříkovaný objem 1 ml) bylo ze vzorku izolováno celkem 14 frakcí (v chromatogramu označeny retenčními časy). Najímané frakce byly po odpaření CH_3CN (RVO, $t < 30\text{ }^\circ\text{C}$) lyofilizovány, poté rozpuštěny v CH_3CN a po filtraci přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 13\text{ mm}$) kvantitativně převedeny do vialek (8ml). Po odfoukání veškerého CH_3CN dusíkem byly vzorky před dalšími analýzami uchovány při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Touto metodou bylo zpracováno celkem 215 mg frakce PM 1, který byl získán reakcí 4,5 g isoalliinu, 5,8 g methiinu a 4,9 g česnekové alliinasy.

Frakce PM 2

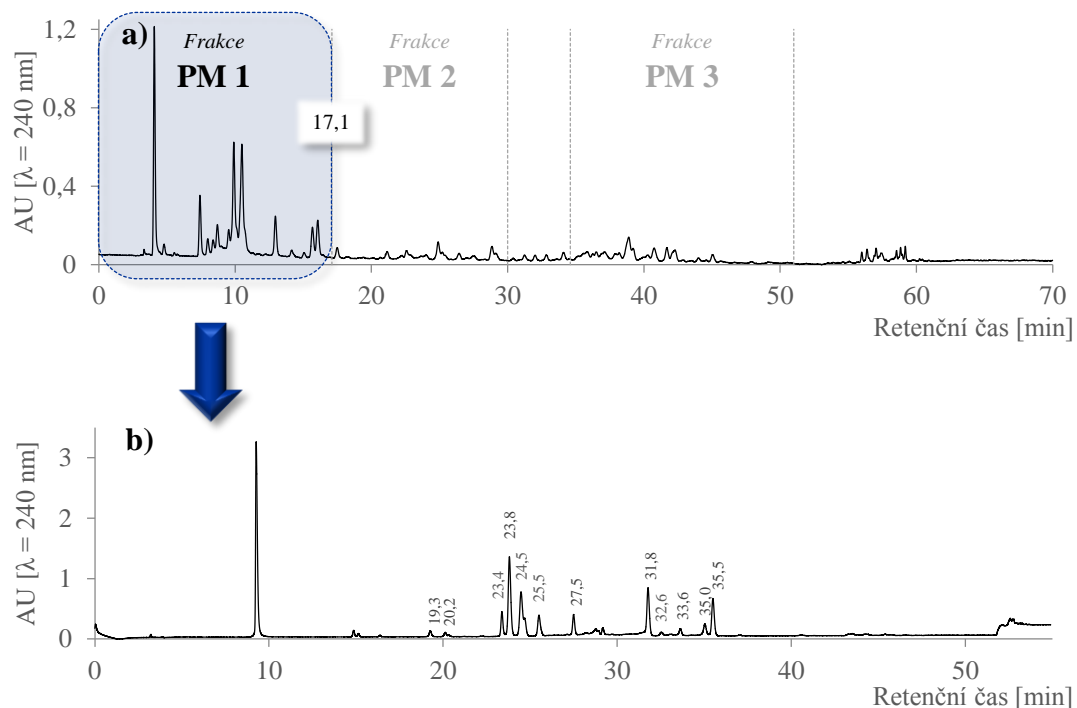
Vzorek frakce PM 2 (32 mg) byl naředěn 11 ml okyseleného (0,1% HCOOH) roztoku CH₃CN/H₂O (v/v; 20/80) a přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Pomocí preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Obrázek 40**, Metoda G, nastříkovaný objem 1 ml) bylo ze vzorku izolováno celkem 7 frakcí (v chromatogramu označeny retenčními časy). Najímané frakce byly po odpaření CH₃CN (RVO, $t < 30$ °C) lyofilizovány, poté rozpuštěny v CH₃CN a po filtraci přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm) kvantitativně převedeny do vialek (8ml). Po odfoukání veškerého CH₃CN dusíkem byly vzorky před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

Touto metodou bylo zpracováno celkem 109 mg frakce PM 2, která byla získána reakcí 3,5 g isoalliinu, 4,5 g methiinu a 4 g česnekové alliinasy.

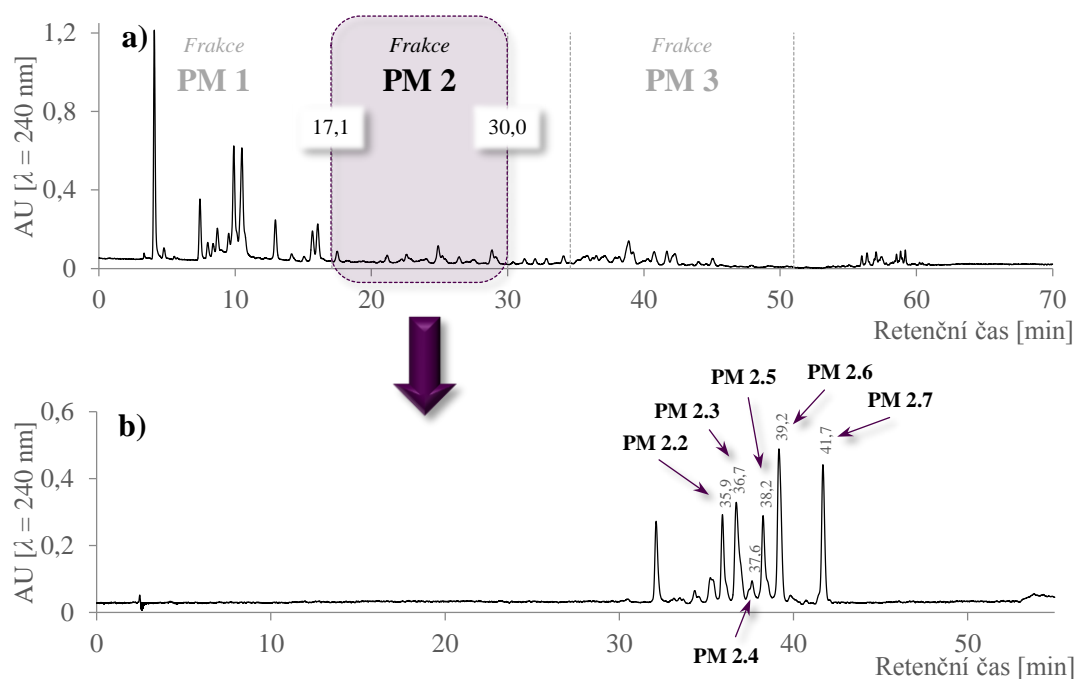
Frakce PM 3

Vzorek frakce PM 3 (162 mg) byl naředěn 14 ml roztoku CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC (**Obrázek 41**, Metoda H, nastříkovaný objem 1 ml) byly ze vzorku izolovány frakce PM 3.1 (retenční čas 70,6–72,2 min) a PM 3.2 (retenční čas 75,9–77,9 min). Najímané frakce byly po odpaření CH₃CN (RVO, $t < 30$ °C) lyofilizovány, poté rozpuštěny v CH₃CN a po filtraci přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm) kvantitativně převedeny do vialek (8ml). Po odfoukání veškerého CH₃CN dusíkem byly vzorky před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

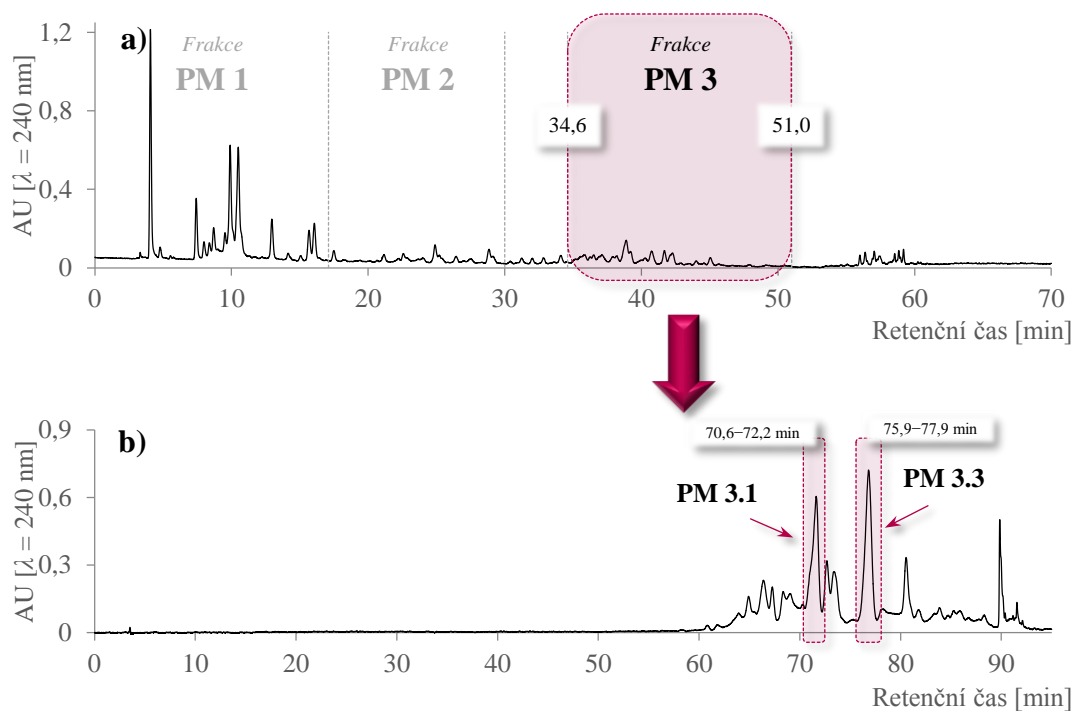
Celkové zpracované množství vzorku frakce PM 3 (162 mg) bylo získáno reakcí 2,6 g isoalliinu, 3 g methiinu a 2,9 g česnekové alliinasy. Výtěžky: PM 3.1 (7 mg) a PM 3.3 (12 mg).



Obrázek 39: a) C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B (3 hod) (Metoda E).
 b) Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu frakce PM 1 (Metoda F).



Obrázek 40: a) C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B (3 hod) (Metoda E).
 b) Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu frakce PM 2 (Metoda G).



Obrázek 41: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
 a) modelové reakce B (3 hod) (Metoda E).
 b) frakce PM 3 (Metoda H).

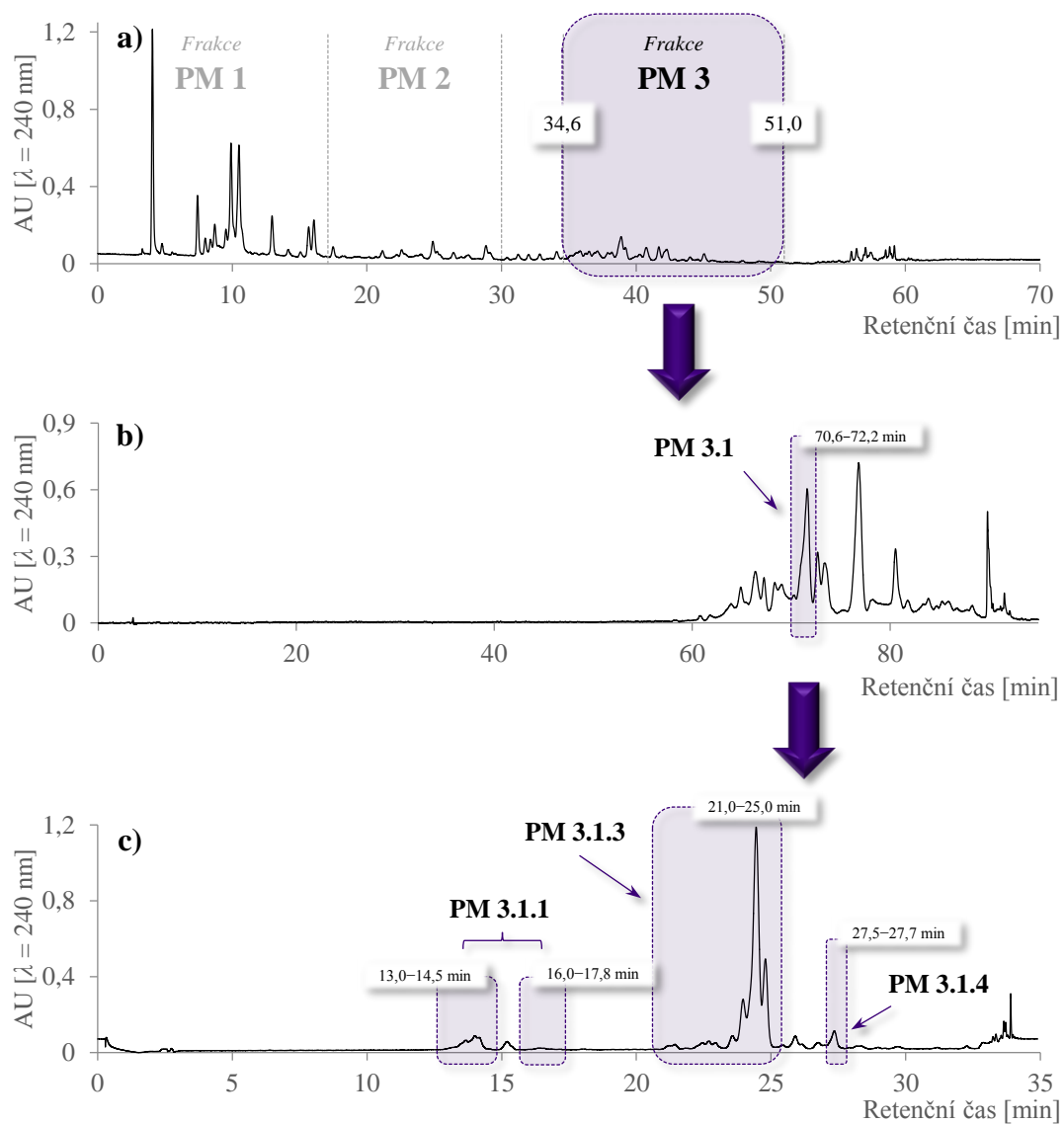
Frakce PM 3.1

Frakce PM 3.1 (7 mg) byla naředěna 2 ml okyselené (0,05% HCOOH) směsí CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a přefiltrována přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC (**Obrázek 42**, Metoda I, nastříkovaný objem 1 ml) byly ze vzorku izolovány celkem 4 frakce (v chromatogramu označeny retenčními časy). Najímané frakce byly po odpaření CH₃CN (RVO, $t < 30$ °C) lyofilizovány, poté rozpuštěny v CH₃CN a po filtraci přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm) kvantitativně převedeny do vialek (8ml). Po odfoukání veškerého CH₃CN dusíkem byly vzorky před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

Frakce PM 3.3

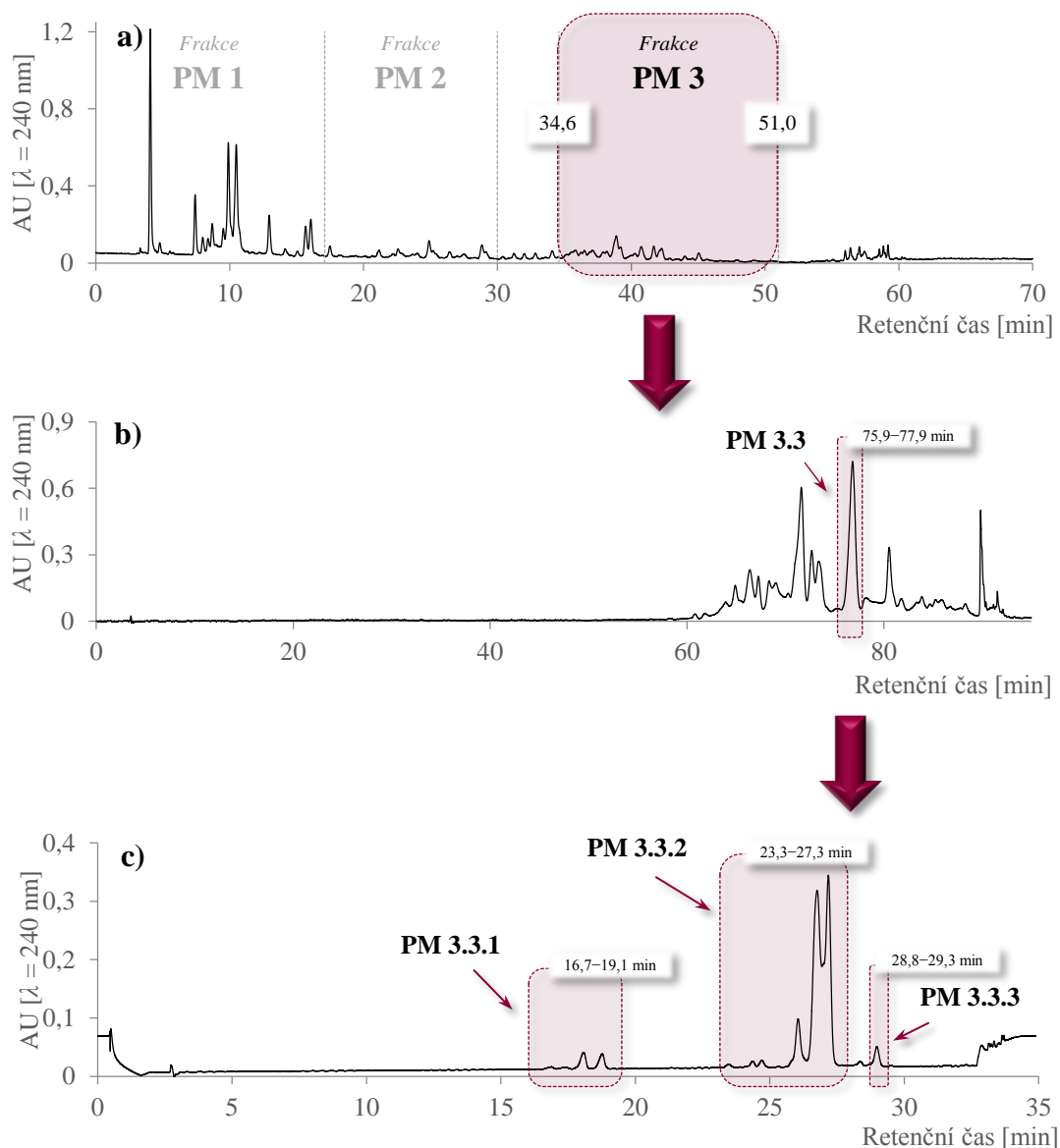
Frakce PM 3.3 (12 mg) byla naředěna 3 ml okyselené (0,05% HCOOH) směsí CH₃CN:H₂O (v/v; 50/50) a přefiltrována přes mikrofiltr (PTFE; 0,2 μm; ø 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC (**Obrázek 43**, Metoda I, nastříkovaný objem 1 ml)

byly ze vzorku izolovány celkem 3 frakce (v chromatogramu označeny retenčními časy). Najímané frakce byly po odpaření CH_3CN (RVO, $t < 30^\circ\text{C}$) lyofilizovány, poté rozpuštěny v CH_3CN a po filtraci přes mikrofiltr (PTFE; $0,2\ \mu\text{m}$; $\varnothing\ 13\ \text{mm}$) kvantitativně převedeny do vialek (8ml). Po odfoukání veškerého CH_3CN dusíkem byly vzorky před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28°C .



Obrázek 42: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

- a) modelové reakce B (3 hod) (Metoda E),
- b) frakce PM 3 (Metoda H),
- c) frakce PM 3.1 (Metoda I).



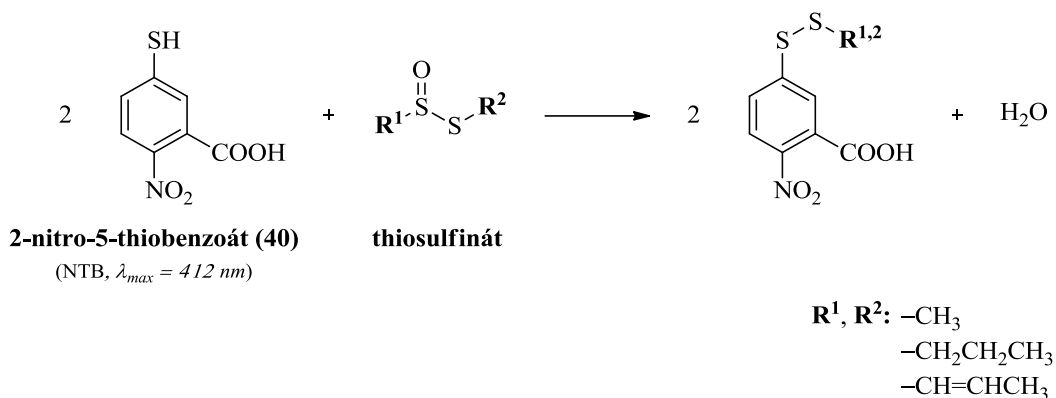
Obrázek 43: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
 a) modelové reakce B (3 hod) (Metoda E),
 b) frakce PM 3 (Metoda H),
 c) frakce PM 3.3 (Metoda I).

3.5 Thiosulfinátový test

Účelem provedených spektrofotometrických analýz izolovaných sloučenin bylo potvrdit/vyvrátit přítomnost aktivované disulfidické vazby $-S(O)-S-$, která je charakteristická pro thiosulfináty. Analýza byla provedena dvěma odlišnými postupy:

a) reakce s 2-nitro-5-thiobenzoátem (NTB):

NTB (**40**) byl syntetizován dle postupu Patchornika a Deganiho.⁷⁷ V přítomnosti thiosulfínátů reaguje NTB s aktivovanou disulfidickou vazbou $-S(O)-S-$ (**Obrázek 44**). Spektrofotometricky lze tuto reakci potvrdit úbytkem absorpance při vlnové délce 412 nm již během několika minut.

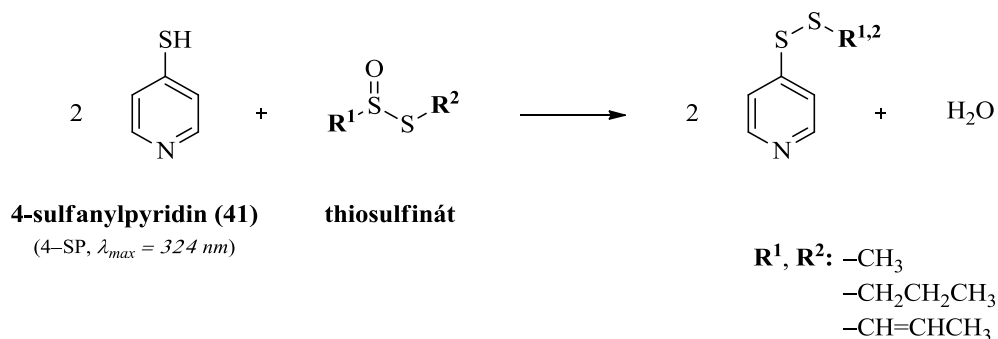


Obrázek 44: Reakce 2-nitro-5-thiobenzoátu (**40**) s thiosulfínáty.

Spektrofotometrická analýza reakce izolovaných sloučenin s NTB (**40**) byla provedena dle postupu Mirona a kol.⁷⁸ Absorbance byla měřena v časech 0; 1,5; 3; 6; 12 a 30 min v intervalu vlnových délek 200–600 nm.

b) reakce s 4-sulfanylpyridinem (4-SP):

4-SP ($\lambda_{\text{max}} = 324 \text{ nm}$, **41**) je komerčně dostupná sloučenina, jejíž sulfanylová skupina reaguje s thiosulfínáty (**Obrázek 45**). Spektrofotometricky lze průběh reakce pozorovat úbytkem absorpance při vlnové délce 324 nm.



Obrázek 45: Reakce 4-sulfanylpyridinu (**41**) s thiosulfínáty.

Spektrofotometrická analýza reakce izolovaných sloučenin s 4-SP (**41**) byla provedena dle postupu Mirona a kol.⁷⁹ Absorbance byla měřena v časech 0; 3; 5; 10; 20; 30 a 60 min při fixní vlnové délce 324 nm.

3.6 Senzorické hodnocení izolovaných sloučenin

Senzorické hodnocení izolovaných látek, které po orientační senzorické analýze vykazovaly hořkou chuť, probíhalo pomocí trojúhelníkového testu obdobným postupem jako v případě hodnocení frakcí AC 1–9 cibulového extraktu.

Senzoricky hodnocené vzorky byly naředěny 50% roztokem absolutního ethanolu ve vodě na koncentraci 1,5 mg/ml. Takto připravené roztoky byly dále ředěny pitnou vodou v poměru 1:1 (v/v) až do ředění 1024×. Od každého ředění byly připraveny tři vzorky (náhodně označeny A, B, C), přičemž dva z nich byly slepé (obsahovaly pouze absolutní ethanol a pitnou vodu v daném poměru), jeden vzorek (náhodně označen A, B nebo C) obsahoval extrakt daného vzorku. Úkolem hodnotitele bylo senzoricky hodnotit připravené vzorky (objem 100 μ l) vždy ve směru od nejvyššího ředění a označit, u kterého lze při daném ředění identifikovat přítomnost vzorku. Senzorického hodnocení, které bylo opakováno dvakrát, se účastnilo celkem pět hodnotitelů (tři ženy, dva muži, věk 29–51 let). Výsledky všech hodnotitelů byly aritmeticky zprůměrovány a pro každý vzorek byl stanoven práh vnímání.

3.7 Proces růžování

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda se některé z izolovaných sloučenin přímo účastní procesu růžování cibule. Testovaná látka (0,5 μmol) byla rozpuštěna v 0,5 ml pufru (0,1M alanin v 0,1M KH_2PO_4 , pH = 5,5). K takto připravenému roztoku byl po 1 hodině reakce při teplotě 40 °C přidán 1 μmol formaldehydu a roztok byl ponechán při této teplotě reagovat přes noc. Následující den bylo v případě pozitivní reakce pozorováno růžové zbarvení, které bylo potvrzeno spektrofotometrickou analýzou nárustem absorpance v intervalu $\lambda = 510\text{--}520\text{ nm}$.

3.8 Tvorba hořkých látek v póru a česneku

3.8.1 Izolace hořkých látek z póru zahradního

Čerstvý pór zahradní o celkové hmotnosti 758 g byl opakovaně zpracován pomocí kuchyňského odšťavňovače. Vzniklá šťáva byla ponechána stát 1 hodinu při laboratorní teplotě, během které začala být výrazně hořká. K přímé extrakci hořkých látek bylo použito 2 \times 500 ml DCM. Z důvodu tvorby emulze v dělicí nálevce bylo nutné vzorek odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla opětovně extrahována stejným postupem. Organické fáze byly spojeny, po částečném odpaření DCM byl roztok přesušen bezvodým MgSO_4 , přefiltrován (PTFE; 0,45 μm ; \varnothing 25 mm) a následně byl zbývající objem DCM zcela odpařen (RVO, $t < 30\text{ }^\circ\text{C}$). Výsledný tmavě zelený extrakt byl před dalšími analýzami uchován při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Po rozpuštění vzorku extraktu v okyselené (0,05% HCOOH) směsi $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 50/50) a zfiltrování (PTFE; 0,45 μm ; \varnothing 13 mm) byl vzorek analyzován pomocí HPLC-MS (Metoda J, nastříkovaný objem 10 μl).

3.8.2 Izolace hořkých látek z česneku kuchyňského

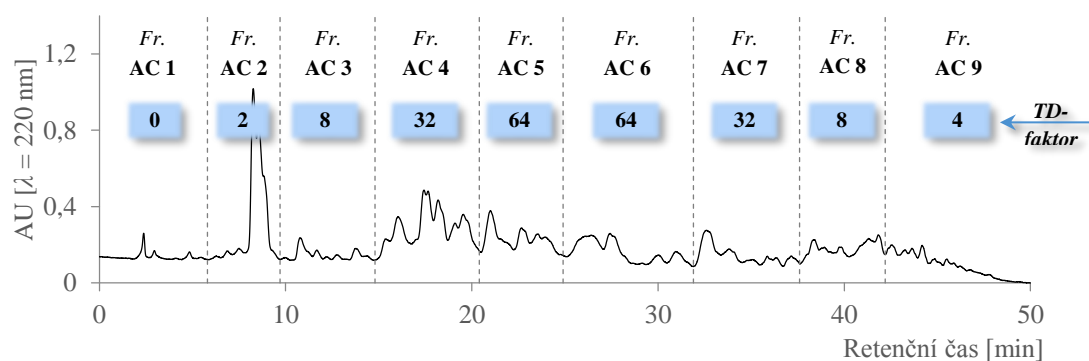
Oloupané stroužky česneku kuchyňského o celkové hmotnosti 263 g byly zhomogenizovány spolu s přídatkem 200 ml destilované vody kuchyňským mixérem a ponechány 1 hodinu stát při laboratorní teplotě. Před extrakcí byl homogenát zfiltrován přes Büchnerovu nálevku s plátnem. K přímé extrakci hořkých látek bylo použito 2× 100 ml DEE. Z důvodu tvorby emulze v dělicí nálevce bylo nutné vzorek odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná opětovně extrahována stejným postupem. Organické fáze byly spojeny, po částečném odpaření DEE byl roztok přesušen bezvodým MgSO₄, přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,45 μm; ø 25 mm) a následně byl zbývající objem DEE zcela odpařen (RVO, $t < 30$ °C). Výsledný žlutý extrakt byl před dalšími analýzami uchován při teplotě -28 °C.

Po rozpuštění vzorku extraktu v okyselené (0,05% HCOOH) směsi CH₃CN/H₂O (v/v; 50/50) a zfiltrování (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm) byl vzorek analyzován pomocí HPLC-MS (Metoda J, nastříkovaný objem 10 μl).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Senzorická analýza – metoda TDA

Prvotním krokem pro identifikaci sloučenin zodpovědných za hořkou chuť cibule byla HPLC frakcionace extraktu homogenizované cibule a následné sensorické hodnocení získaných frakcí metodou TDA (z angl. *taste-dilution analysis*). Oloupaná cibule byla zhomogenizována pomocí kuchyňského odšťavňovače. Čerstvě získaná šťáva vykazovala zpočátku typicky ostré cibulové aroma a chuť bez náznaků hořkosti. Již po 10 minutách, během kterých byla šťáva ponechána při laboratorní teplotě, bylo možné detekovat mírně hořkou chuť, která se do 30 minut od počátku reakce měnila na velmi nepříjemnou, intenzivně hořkou. Po 60 minutách byla cibulová šťáva extrahována DEE a získaný extrakt byl rozdělen preparativní C8-HPLC/PDA celkem na 9 frakcí, které byly sensoricky hodnoceny s cílem stanovit intenzitu hořké chuti, tzv. TD-faktor (z angl. *taste-dilution factor*), přičemž intenzita hořkosti jednotlivých frakcí byla přímo úměrná hodnotám jejich TD-faktorů (Obrázek 46).



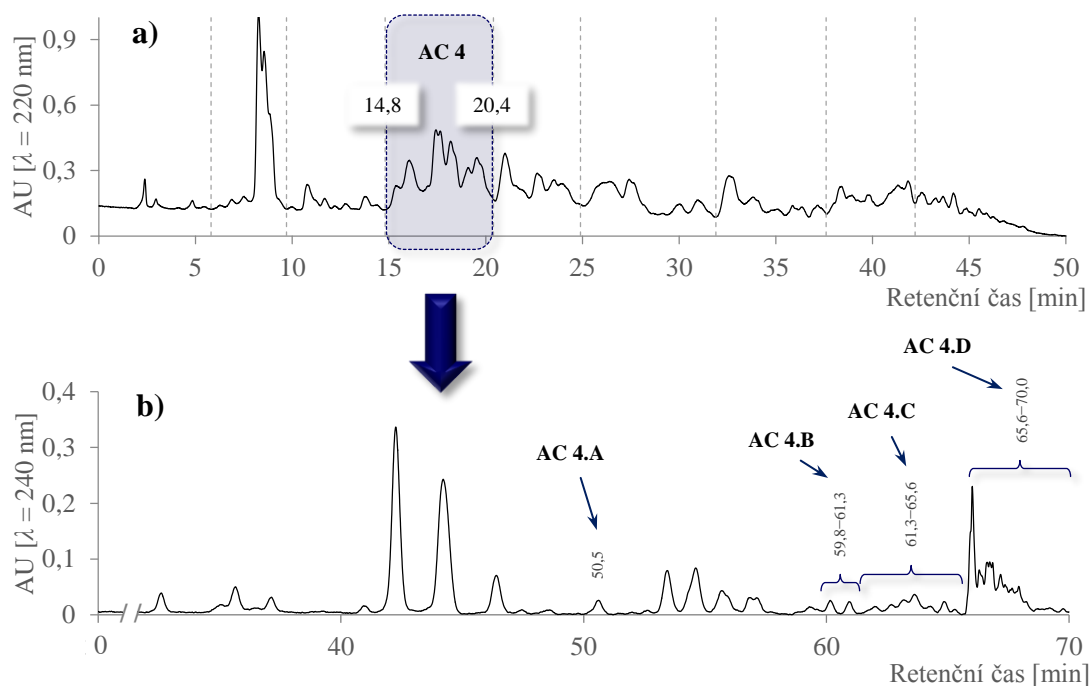
Obrázek 46: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu cibule kuchyňské s uvedenými hodnotami TD-faktorů pro jednotlivé frakce (Metoda A).

Touto analýzou bylo zjištěno, že hořkou chuť o různé intenzitě bylo možné detekovat v 8 z celkových 9 frakcí, což naznačovalo, že hořkost zpracované cibule patrně nebude způsobovat pouze jediná sloučenina.

4.2 Izolace a identifikace hořkých sloučenin

V další fázi identifikace sloučenin zodpovědných za hořkou chuť homogenizované cibule byla pozornost primárně zaměřena na frakce, které vykazovaly nejvyšší intenzitu hořkosti (tzn. nejvyšší hodnoty TD-faktorů), a sice na frakce AC 4–7. Pro tyto frakce byly vyvinuty optimalizované HPLC metody, které díky lepší separaci přítomných sloučenin umožnily jejich izolaci. Jednotlivé podfrakce izolované preparativní C8-HPLC z frakcí AC 4 a 5 (viz **Obrázek 35b** a **36b**) byly podrobeny sensorické analýze a v případě, že vykazovaly hořkou chuť, byly dále analyzovány spektroskopickými metodami (MS, NMR, IČ). Výsledky sensorické analýzy odhalily, že ve frakci AC 4 vykazovaly hořkou chuť pouze podfrakce AC 4.A–D (**Obrázek 47b**), zatímco ve frakci AC 5 byla zjištěna přítomnost hořkých sloučenin v podfrakcích AC 5.A–F (**Obrázek 48b**).

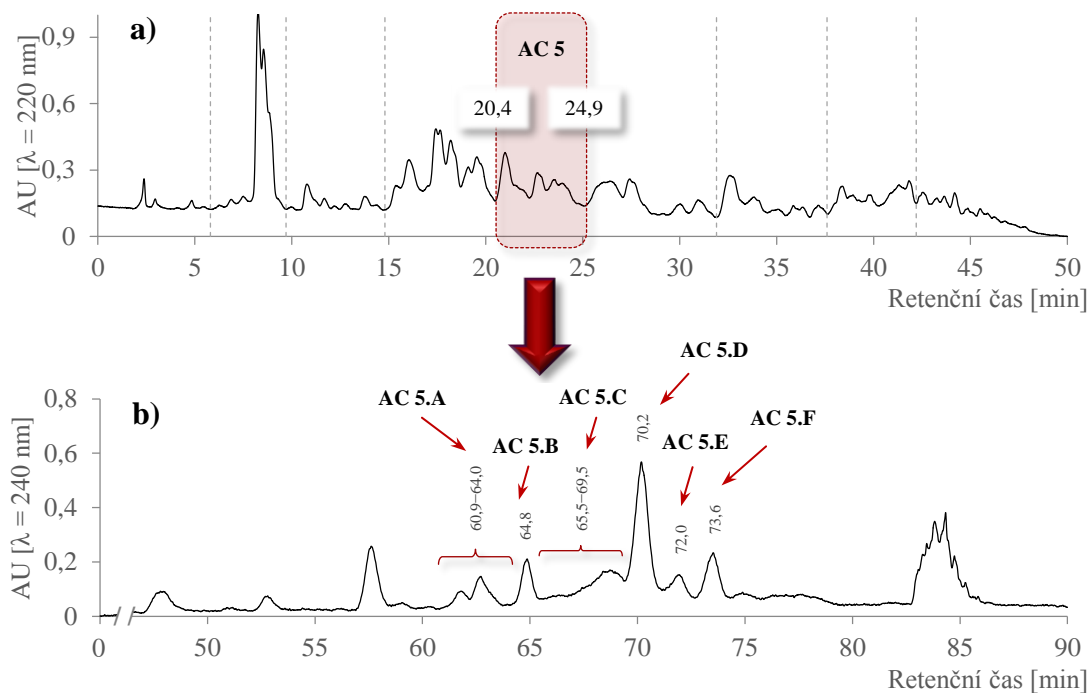
Pro frakce AC 6 a 7 nebylo i přes využití řady různých stacionárních fází (C8, C18, F5, bifenyl) dosaženo uspokojivé separace přítomných sloučenin. Identita hořkých látek byla v těchto frakcích zjištěna analýzou MS dat a následným využitím modelových reakčních systémů, jak bude uvedeno v dalších částech této práce.



Obrázek 47: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

a) cibule kuchyňské (Metoda A),

b) frakce AC 4 (podfrakce AC 4A–D vykazovaly hořkou chuť) (Metoda C).



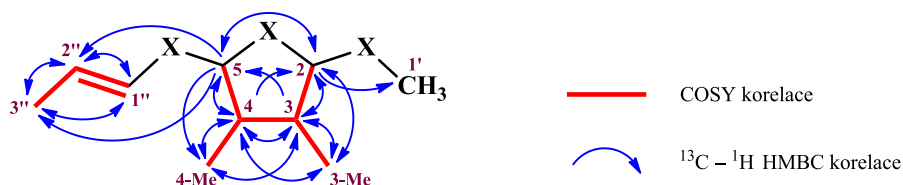
Obrázek 48: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
 a) cibule kuchyňské (Metoda A),
 b) frakce AC 5 (podfrakce AC 5A–F vykazovaly hořkou chuť) (Metoda B).

Allithiolany A

(+)ESI-HRMS data sloučeniny AC 4.A izolované z frakce AC 4 ($t_r = 50,5$ min; **Obrázek 47b**) odpovídala elementárnímu složení $C_{10}H_{18}O_2S_4$ ($[M + H]^+$ experimentální 299,0261 Da, teoretická 299,0262 Da; **Tabulka VII**).

^{13}C NMR spektrum této látky obsahovalo celkem 10 signálů, které odpovídaly 8 sp^3 (4 CH_3 a 4 CH) a 2 sp^2 ($-CH=$) hybridizovaným atomům uhlíku. Další NMR experimenty (COSY, HSQC a HMBC) následně odhalily přítomnost třech vzájemně izolovaných strukturních podjednotek, a sice pětičlenného 3,4-dimethyl heterocyklu substituovaného v pozicích 2 a 5 spolu s jednou methylovou (CH_3-) a jednou 1-propenylovou ($CH_3CH=CH-$) skupinou. Methylová skupina v postranním řetězci vykazovala HMBC korelaci s uhlíkem C-2, zatímco 1-propenylová skupina poskytovala HMBC signál s uhlíkem C-5 (**Obrázek 49**). S přihlédnutím k molekulovému vzorci zjištěnému pomocí HRMS (tj. $C_{10}H_{18}O_2S_4$) bylo zřejmé, že sloučenina AC 4.A ve své molekule obsahuje 3,4-dimethylthiolanový kruh substituovaný v pozicích 2 a 5. Struktura postranních řetězců a pozice obou atomů

kyslíku v molekule byla vyvozena na základě ^{13}C NMR, MS/MS a IČ dat (**Přílohy 3–6**), jak je popsáno níže.



Obrázek 49: COSY a HMBC korelace pozorované u AC 4.A.

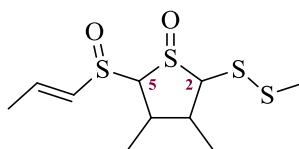
Hodnota ^{13}C NMR posunu methylové skupiny postranního řetězce (δ 24,9) byla ve velmi dobré shodě s literárními daty publikovanými pro uskupení $\text{CH}_3\text{SS}-$, zatímco ^{13}C NMR posuny uhlíků $\text{CH}=\text{CH}$ (δ 130,7 a 138,7) a velikost interakční konstanty $J_{\text{CH}=\text{CH}}$ (15,0 Hz) poukazovaly na přítomnost (*E*)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})-$ skupiny (**Tabulka III**). Tento předpoklad potvrzovala i MS/MS data naznačující postupné odštěpení fragmentů $[\text{C}_3\text{H}_5\text{S}(\text{O})-]$ a $[\text{CH}_3\text{S}-]/[\text{CH}_3\text{SS}-]$ (tj. $299 \rightarrow 209 \rightarrow 161/129$ Da). Naopak žádné fragmenty, které by naznačovaly přítomnost $\text{C}_3\text{H}_5\text{S}(\text{O})\text{S}-$ nebo $\text{C}_3\text{H}_5\text{SS}(\text{O})-$ řetězců v molekule AC 4.A, získaná MS/MS spektra neobsahovala. Dominantní fragment $m/z = 129$ Da (odpovídající $[\text{C}_6\text{H}_9\text{OS}]^+$) poskytl významný důkaz o přítomnosti 3,4-dimethylthiolan-S-oxidu ve struktuře AC 4.A (podrobná MS fragmentace této látky je uvedena v **Příloze 4**).

Tabulka III: Literární přehled ^{13}C NMR posunů skupin $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-$ a CH_3- a IČ signály sloučenin obsahující různé sírné funkční skupiny.^{8,13,17,38,39, 58, 80, 81}

		^{13}C NMR posuny (ppm, měřeno v CDCl_3)			IČ (cm^{-1})
		$\text{CH}_3-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-$	$\text{CH}_3-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-$	CH_3-	
sulfidy	R-S-	125,6 (<i>E</i>)	123,7 (<i>E</i>)	14,2–14,6	
		125,9 (<i>Z</i>)	123,4 (<i>Z</i>)		
disulfidy	R-SS-	129,7–133,8 (<i>E</i>)	124,3–126,1 (<i>E</i>)	24,3–24,9	
		128,5–130,2 (<i>Z</i>)	127,1–128,5 (<i>Z</i>)		
S-oxidy	R-S(O)-	138,3–138,4 (<i>E</i>)	131,7–131,8 (<i>E</i>)	32,4–37,9	1035–1055
thiosulfináty	R-S(O)S-	135,7–137,7 (<i>E</i>)	129,2–133,1 (<i>E</i>)	42,1–42,8	1073–1095
	R-SS(O)-	143,3–144,3 (<i>E</i>)	115,5–115,9 (<i>E</i>)	13,7–14,2	
		136,5–137,5 (<i>Z</i>)	116,7–117,2 (<i>Z</i>)		
thiosulfonáty	R-S(O) ₂ -S-	142,9 (<i>E</i>)	133,4 (<i>E</i>)	47,9–48,6	1127–1131
	R-SS(O) ₂ -	145,1 (<i>E</i>)	116,6 (<i>E</i>)	29,8	
		139,4 (<i>Z</i>)	116,9 (<i>Z</i>)		

Navrženou strukturu AC 4.A bylo možné podpořit také IČ spektrem této látky, které obsahovalo výrazný signál při vlnočtu 1045 cm^{-1} charakteristickém pro sulfoxidovou skupinu ($-\text{S}=\text{O}$), zatímco typická IČ absorpce thiosulfínátů (tj. látek obsahující $-\text{S}(\text{O})\text{S}-$ nebo $-\text{SS}(\text{O})-$ skupiny) se nachází v intervalu vlnočtů $1073\text{--}1095\text{ cm}^{-1}$ (**Tabulka III**). Dalším důkazem potvrzujícím správnost navržené struktury byl i negativní výsledek tzv. thiosulfínátového testu (viz **kap. 3.5**).^{78,79} Negativní reakce AC 4.A s NTB (**40**) i 4-SP (**41**) potvrdila absenci thiosulfínátové skupiny (tj. $-\text{S}(\text{O})\text{S}-$ a $-\text{SS}(\text{O})-$) v molekule této sloučeniny.

Na základě všech výše uvedených dat bylo možné jednoznačně určit strukturu sloučeniny AC 4.A, která je uvedena na **Obrázku 50**. Systematický název této látky je 3,4-dimethyl-2-(methyldisulfanyl)-5-[(*E*)-1-propenylsulfinyl]thiolan-1-oxid.



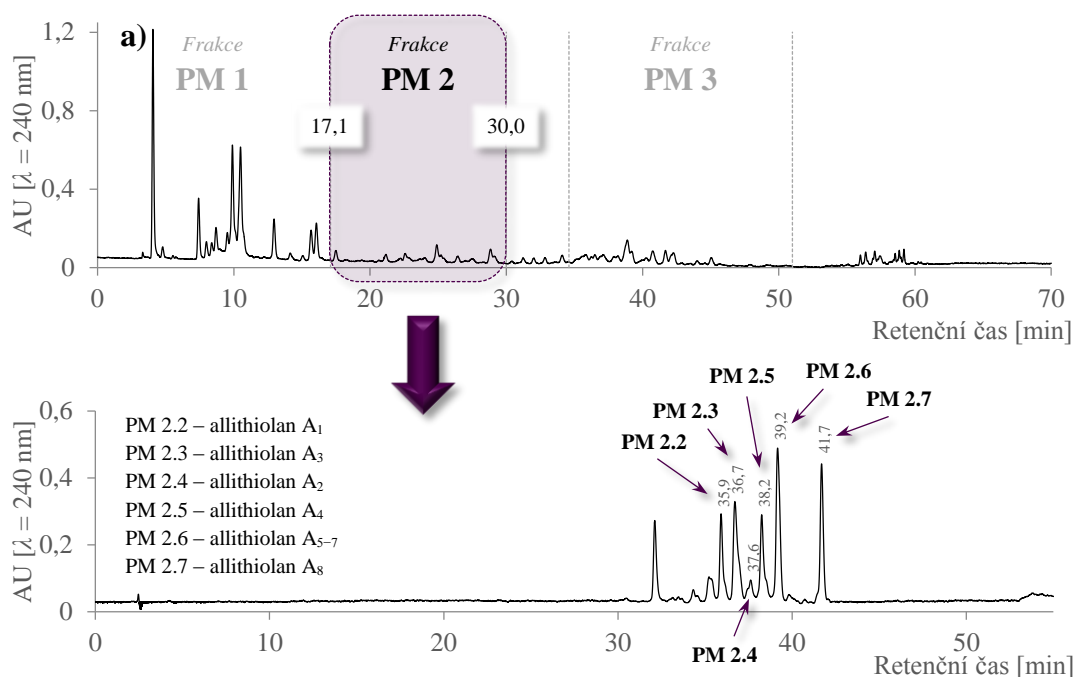
AC 4.A

Obrázek 50: Struktura sloučeniny AC 4.A.

Detailní analýza HPLC-MS dat odhalila přítomnost ještě několika dalších sloučenin shodného elementárního složení jako AC 4.A, tj. $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}_4$, které se vyskytovaly ve frakci AC 3. MS/MS spektra těchto látek byla velmi podobná, lišící se pouze nepatrně v relativních intenzitách majoritních fragmentů, což naznačovalo, že tyto sloučeniny budou patrně stereoizomery spíše než konstituční izomery AC 4.A (sloučenina obsahuje celkem 6 chirálních center umožňujících existenci 64 stereoizomerů) (**Příloha 3**).

S cílem izolovat výše zmíněné izomery AC 4.A z frakce AC 3 pomocí preparativní HPLC bylo testováno několik různých stacionárních fází (C8, C18, F5 a biphenyl). Zejména kvůli koeluci dalších sloučenin přítomných v extraktu se však nepodařilo dosáhnout uspokojivé separace těchto látek. Další možností bylo izolovat tyto sloučeniny z modelového reakčního systému (modelová reakce B, viz **kap. 3.4.4**) obsahujícího isoalliin, methiin a alliinasu. V extraktu této modelové reakce, analyzovaném pomocí C8-HPLC-PDA-MS/MS, byly nalezeny sloučeniny s plně identickými retenčními časy i MS/MS spektra jako ve frakci AC 3 extraktu cibule. Preparativní C8-HPLC pak bylo z této modelové směsi (spolu s AC 4.A = PM 2.7)

izolováno celkem 7 dalších izomerů (PM 2.2–2.6, **Obrázek 51**), které byly následně charakterizovány pomocí MS, NMR a IČ (**Přílohy 3–6**).



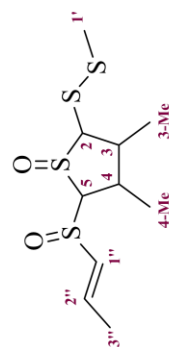
Obrázek 51: a) C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B (isoalliin, methiin a alliinasa, reakce 3 hod) (Metoda F).
b) Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu frakce PM 2 – izolace PM 2.2–2.7, tj. allithiolanů A₁–A₈ (Metoda G).

NMR data (**Tabulka IV**) potvrdila původní předpoklad, že všech 7 sloučenin izolovaných z modelového systému (píky PM 2.2–2.6, **Obrázek 51b**) jsou stereoizomery AC 4.A (= PM 2.7). ¹³C NMR posuny uhlíků přítomných v obou postranních řetězcích (tj. v CH₃– a CH₃CH=CH– skupinách) se mezi jednotlivými stereoizomery lišily pouze nepatrně a byly ve výborné shodě s daty pro CH₃SS– a CH₃CH=CH(O)– skupiny uvedenými v odborné literatuře (**Tabulka III**). ¹H NMR analýza potvrdila ve všech stereoizomerech geometrickou konfiguraci 1-propenylové skupiny výhradně *E* ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 14,9\text{--}15,1$ Hz).

Tyto sloučeniny představují zcela nové, v odborné literatuře dosud nepopsané látky. S ohledem na jejich značně nepřehledný systematický název byly tyto sloučeniny pojmenovány triviálním názvem allithiolany A. Tento triviální název v sobě zahrnuje původ těchto látek (rod *Allium*) i jejich typický strukturální znak (přítomnost thiolanového jádra).

Tabulka IV: ^1H a ^{13}C NMR data allithiolanů A_1 – A_8 .^a

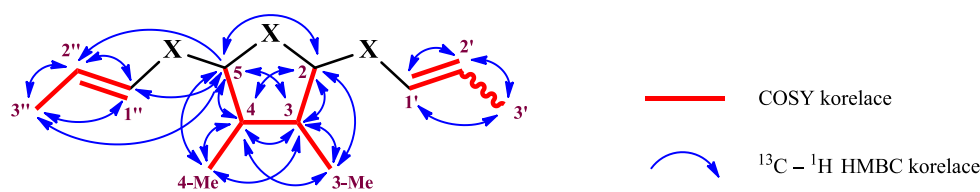
	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})^-$					thiolanový kruh					-SSR
	3"	2"	1"	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	1'	
A₁	2,05 (dd; 6,6; 1,4)	6,69 (dq; 15,0; 6,6)	6,63 (dq; 15,0; 1,4)	3,40 (d; 9,7)	2,33 (ddq; 10,7; 9,7; 6,6)	1,37 (d; 6,6)	1,29 (d; 6,5)	2,52 (ddq; 12,5; 10,7; 6,5)	3,57 (d; 12,5)	2,53 (s)	
A₂	2,04 (dd; 6,8; 1,6)	6,65 (dq; 15,0; 6,8)	6,52 (dq; 15,0; 1,6)	3,66 (d; 7,6)	3,00 (ddq; 12,1; 7,6; 6,9)	1,50 (d; 6,9)	1,22 (d; 6,6)	2,43 (ddq; 12,1; 11,3; 6,6)	3,70 (d; 11,3)	2,56 (s)	
A₃	18,08	139,77	130,10	87,36	43,16	14,21	16,39	44,69	88,12	24,10	
	2,04 (dd; 6,7; 1,5)	6,81 (dq; 15,1; 6,7)	6,73 (dq; 15,1; 1,5)	3,69 (d; 5,7)	3,13 (ddq; 7,4; 5,5; 5,7)	1,63 (d; 7,4)	1,33 (d; 6,8)	2,30 (ddq; 11,6; 5,5; 6,8)	4,11 (d; 11,6)	2,52 (s)	
A₄	18,24	140,56	131,37	84,72	42,83	11,22	14,31	44,26	86,35	24,20	
	2,02 (dd; 6,5; 1,2)	6,63 (dq; 15,1; 6,5)	6,58 (dq; 15,1; 1,2)	3,69 (d; 11,3)	2,85 (ddq; 11,3; 10,4; 6,5)	1,26 (d; 6,5)	1,30 (d; 6,6)	1,76 (ddq; 10,4; 9,0; 6,6)	3,75 (d; 9,0)	2,53 (s)	
A₅	17,93	138,34	130,57	81,92	41,68	16,78	16,80	46,82	83,93	24,51	
	2,00 (dd; 6,9; 1,6)	6,53 (dq; 15,0; 6,9)	6,22 (dq; 15,0; 1,6)	3,65 (d; 6,9)	2,29 (ddq; 10,1; 6,9; 6,8)	1,30 (d; 6,8)	1,27 (d; 6,5)	2,56 (ddq; 12,6; 10,1; 6,5)	3,58 (d; 12,6)	2,54 (s)	
A₆	17,85	138,32	129,76	89,39	38,12	20,64	15,44	44,23	80,09	24,11	
	2,00 (dd; 6,8; 1,5)	6,65 (dq; 15,1; 6,8)	6,55 (dq; 15,1; 1,5)	4,07 (dd; 6,4; 1,1)	3,06 (ddq; 10,8; 6,4; 7,1)	1,43 (d; 7,1)	1,31 (d; 6,6)	2,08 (ddq; 10,8; 9,4; 6,6)	3,72 (dd; 9,4; 1,1)	2,54 (s)	
A₇	18,14	140,55	131,59	90,17	43,28	14,74	17,14	45,75	85,16	23,87	
	2,00 (dd; 6,7; 1,5)	6,63 (dq; 15,0; 6,7)	6,47 (dq; 15,0; 1,5)	3,79 (d; 5,1)	2,91 (ddq; 7,2; 5,1; 6,2)	1,34 (d; 7,2)	1,28 (d; 7,1)	2,61 (ddq; 6,2; 8,5; 7,1)	4,10 (d; 8,5)	2,54 (s)	
A₈	18,10	140,32	131,43	92,04	39,15	16,05	14,32	43,20	82,38	24,14	
	1,99 (dd; 5,9; 0,7)	6,60 (dq; 15,0; 5,9)	6,56 (dq; 15,0; 0,7)	3,66 (d; 8,3)	2,78 (ddq; 10,2; 8,3; 6,8)	1,26 (d; 6,8)	1,28 (d; 6,5)	1,78 (ddq; 10,7; 10,2; 6,5)	3,97 (d; 10,7)	2,54 (s)	
	18,00	138,74	130,66	80,83	38,70	18,55	16,01	42,77	81,20	24,85	

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz (měřeno v CDCl_3)

Allithiolany B

Další látkou, která při sensorickém hodnocení vykazovala intenzivní hořkou chuť, byla sloučenina AC 5.D izolovaná z frakce AC 5 ($t_r = 70,2$ min; **Obrázek 48b**). (+)ESI-HRMS data AC 5.D odpovídala elementárnímu složení $C_{12}H_{20}O_2S_4$ (**Tabulka VII**).

Ačkoli se izolovaný vzorek jevil jako jeden HPLC pík, NMR analýza ukázala, že se ve skutečnosti jednalo o směs 3 majoritních a 3 minoritních izomerních látek s nepatrně odlišnými NMR posuny (**Tabulka VIII**). NMR analýza také jasně prokázala přítomnost shodného 3,4-dimethylthiolanového jádra pozorovaného u allithiolanů A, spolu s přítomností dvou různých $CH_3CH=CH-$ skupin. Jedna z těchto dvou skupin vykazovala HMBC korelaci s uhlíkem C-2, zatímco druhá poskytovala HMBC signál s uhlíkem C-5 (**Obrázek 52**).

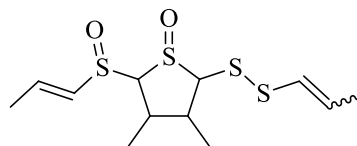


Obrázek 52: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u AC 5.D.

^{13}C NMR posuny $CH=CH$ uhlíků přítomných 1-propenylových skupin byly ve výborné shodě s literárními daty uváděnými pro $CH_3CH=CHSS-$ resp. $CH_3CH=CHS(O)-$ skupiny (**Tabulka III**). Geometrická konfigurace $CH_3CH=CHS(O)-$ skupiny byla u všech šesti izomerů výhradně *E* ($J_{CH=CH} = 15,0$ Hz), zatímco $CH_3CH=CHSS-$ skupina byla přítomna jak v *E* (majoritně), tak i *Z* (minoritně) uspořádání ($J_{CH=CH} = 14,7$ a $9,2$ Hz).

IČ spektrum AC 5.D obsahovalo (podobně jako allithiolany A) intenzivní absorpční pás při vlnočetě 1034 cm^{-1} ($-S=O$ skupina, **Příloha 6**). Také MS/MS data naznačovala velmi blízkou strukturní podobnost této sloučeniny s allithiolany A. Fragmentační dráha byla tvořena postupným odštěpováním fragmentů $[C_3H_5S(O)-]$ a $[C_3H_5S-]/[C_3H_5SS-]$ (tj. $325 \rightarrow 235 \rightarrow 161/129$ Da), kdežto fragmenty $[C_3H_5S(O)S-]/[C_3H_5SS(O)-]$, které by poukazovaly na přítomnost thiosulfínátové skupiny, pozorovány nebyly (podrobnější fragmentace viz **Přílohu 4**). S přihlédnutím k výše uvedeným spektrálním datům mohla být struktura AC 5.D jednoznačně určena jako 3,4-dimethyl-2-(1-propenyldisulfanyl)-5-[(*E*)-1-propenylsulfanyl]thiolan-1-oxid

(**Obrázek 53**). Také tato látka nebyla v odborné literatuře doposud popsána. Analogicky s triviálním označením allithiolanů A byly tyto sloučeniny označeny triviálním názvem allithiolany B.



allithiolan B

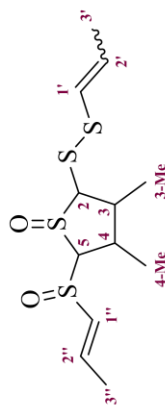
Obrázek 53: Struktura sloučeniny AC 5.D (allithiolan B).

Celkem 6 chirálních center a jedna 1-propenylová skupina podléhající (*E/Z*)-izomerizaci umožňuje existenci 128 stereoizomerů allithiolanu B. Velmi podobné hodnoty ¹³C NMR posunů odpovídajících uhlíků poukazovaly na identickou absolutní konfiguraci na chirálních centrech izolovaných allithiolanů B (AC 5.D) s allithiolany A₄, A₅ a A₆ (**Tabulky IV a V**). Celkem šest izolovaných izomerů allithiolanu B tak bylo označeno (*E/Z*)-B₄, (*E/Z*)-B₅ a (*E/Z*)-B₆.

HPLC-MS analýzou extraktu cibulového homogenátu byla ve frakcích AC 5 a AC 6 zjištěna přítomnost ještě mnoha dalších stereoizomerů allithiolanu B. Jednalo se např. o píky AC 5.A–C a AC 5.E–F (**Obrázek 48**), které byly při sensorickém hodnocení označeny jako hořké. Vlivem přítomnosti velkého počtu stereoizomerů společně s dalšími koelujícími sloučeninami však nebyly tyto vzorky získané preparativní C8-HPLC vhodné pro NMR analýzu.

Tabulka V: ^1H a ^{13}C NMR data allithiolanů B_{4-6} .^a

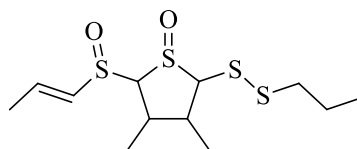
	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS(O)}-$					thiolanový kruh					-SSR		
	3"	2"	1"	5	4	4- CH_3	3- CH_3	3	2	1'	2'	3'	
(E)-B₄	18,00	138,74	130,66	80,83	38,70	18,55	16,01	42,77	81,20	24,85			
	(dd; 6,7; 1,4)	(dq; 15,0; 6,7)	(dq; 15,0; 1,4)	(d; 11,5)	(ddq; 11,5; 10,4; 6,5)	(d; 6,5)	(d; 6,7)	(m)	(d; 8,9)	(m)	6,09	6,09	1,82
(Z)-B₄	17,93	138,13	130,56	82,06	41,80	16,63	16,90	46,97	83,27	124,00	134,07	18,25	
	(dd; 6,7; 1,4)	(dq; 15,0; 6,7)	(dq; 15,0; 1,4)	(d; 11,5)	(d; 11,5; 10,4; 6,5)	(d; 6,5)	(d; 6,7)	(m)	(d; 9,0)	(dq; 9,2; 1,6)	(dq; 9,2; 6,9)	(dd; 6,9; 1,6)	
(E)-B₅	17,93	138,14	130,54	82,11	41,77	16,68	16,74	46,71	83,58	127,37	130,30	14,56	
	(dd; 6,9; 1,6)	(dq; 15,0; 6,9)	(dq; 15,0; 1,6)	(d; 6,9)	(m)	(d; 6,8)	(d; 6,5)	(ddq; 12,7; 10,0; 6,5)	(d; 12,7)	(dq; 14,7; 1,5)	(dq; 14,7; 6,7)	(dd; 6,7; 1,5)	
(Z)-B₅	17,84	138,23	129,85	89,39	38,31	20,59	15,47	44,49	80,34	124,29	133,50	18,25	
	(dd; 6,9; 1,6)	(dq; 15,0; 6,9)	(dq; 15,0; 1,6)	(d; 6,9)	(m)	(d; 6,8)	(d; 6,6)	(ddq; 12,7; 10,0; 6,6)	(d; 12,7)	(dq; 9,2; 1,6)	(dq; 9,2; 7,0)	(dd; 7,0; 1,6)	
(E)-B₆	17,84	138,25	129,83	89,32	38,43	20,58	15,46	44,42	80,55	127,50	130,05	14,45	
	(dd; 6,7; 1,5)	(dq; 15,0; 6,7)	(dq; 15,0; 1,5)	(dd; 6,1; 1,2)	(ddq; 10,7; 7,1; 6,1)	(d; 7,1)	(d; 6,6)	(ddq; 10,7; 9,2; 6,6)	(d; 3,69)	(m)	6,11	6,11	1,83
(Z)-B₆	18,16	140,37	131,59	90,55	43,44	14,74	17,22	45,93	84,34	123,38	134,57	18,29	
	(dd; 6,7; 1,6)	(dq; 15,0; 6,7)	(dq; 15,0; 1,6)	(dd; 6,1; 1,1)	(m)	(d; 7,2)	(d; 6,5)	(m)	(dd; 9,3; 1,1)	(dq; 9,1; 1,6)	(dq; 9,1; 6,9)	(dd; 6,9; 1,6)	
	18,16	140,46	131,57	90,41	43,31	14,77	17,08	45,67	84,69	126,87	130,74	14,56	

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz (měřeno v CDCl_3)

Allithiolany C

HPLC-MS analýza extraktu cibule prokázala také přítomnost mnoha izomerních sloučenin elementárního složení $C_{12}H_{22}O_2S_4$ (**Tabulka VII**), které v minoritním množství doprovázely allithiolany A a B. Z důvodu velmi nízké koncentrace nebyly provedeny pokusy o izolaci těchto sloučenin z cibulového homogenátu a jejich struktura byla určena na základě získaných MS dat. MS/MS fragmentace těchto látek byla zcela analogická s fragmentací allithiolanů A a B (viz **Přílohu 4**), díky čemuž bylo zřejmé, že tyto sloučeniny, triviálně pojmenované allithiolany C, jsou propylovými homology allithiolanů A a B.

Hmotnostní spektra všech allithiolanů C obsahovala fragment $m/z = 237$ Da odpovídající odštěpení $CH_3CH=CHS(O)-$ skupiny z kvasimolekulárního iontu, které bylo následováno odštěpením $CH_3CH_2CH_2S-/CH_3CH_2CH_2SS-$ skupin (tj. $327 \rightarrow 237 \rightarrow 161/129$ Da). Hmotnostní spektra naopak neobsahovala žádný fragment, který by naznačoval přítomnost $CH_3CH_2CH_2S(O)-$ skupiny (**Příloha 4**). Z těchto pozorování bylo možné usoudit, že struktura allithiolanu C odpovídá vzorci uvedenému na **Obrázku 54**.



allithiolan C

Obrázek 54: Struktura allithiolanu C.

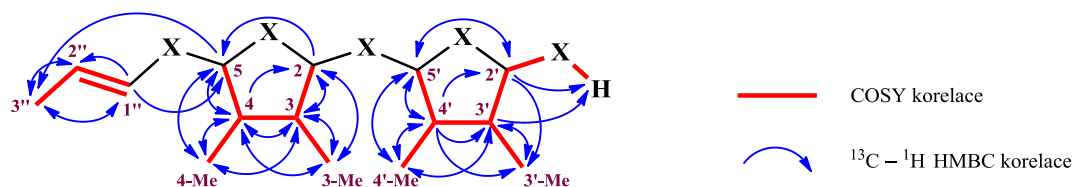
Allithiolany D

HPLC-MS analýza izolovaných hořkých podfrakcí AC 5.A–5.F (**Obrázek 48**) odhalila také přítomnost skupiny sloučenin elementárního složení $C_{15}H_{26}O_3S_5$. Při pokusu o jejich izolaci pomocí preparativní HPLC však nebylo i přes testování několika různých stacionárních fází (C8, C18, F5 a bifenyl) dosaženo uspokojivé separace zejména kvůli koeluci se stereoizomery allithiolanu B a dalších sloučenin. V extraktu modelové reakce B (viz **kap. 3.4.4**) však byly nalezeny sloučeniny s plně identickými retenčními časy i MS/MS spektry. Dva zástupci těchto sloučenin

přítomných v cibulovém homogenátu byly nakonec z této modelové směsi izolovány (PM 3.1.4 a PM 3.3.3, **Obrázek 42c a 43c**) a spektrálně charakterizovány.

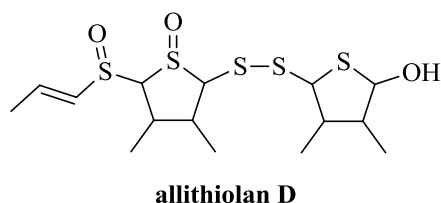
(+)ESI-HRMS analýza ukázala, že obě sloučeniny byly izomery o elementárním složení $C_{15}H_{26}O_3S_5$ (**Tabulka VII**). Intenzita kvasimolekulárního iontu $[M + H]^+ = 415$ Da byla velmi nízká, zatímco MS/MS spektra obou sloučenin obsahovala intenzivní ion $m/z = 397$ Da (tj. $[M + H]^+ - 18$) naznačující přítomnost hydroxylové skupiny v molekule. Tento předpoklad byl podpořen také velmi intenzivním IČ signálem při 3350 cm^{-1} ($-OH$), spolu s velmi výraznou absorpcí při 1049 cm^{-1} ($-S=O$) (**Příloha 4 a 6**).

NMR analýza potvrdila u obou látek (PM 3.1.4 a PM 3.3.3) přítomnost jedné (*E*)- $CH_3CH=CHS(O)-$ skupiny a dvou 3,4-dimethylthiolanových kruhů substituovaných v polohách 2 a 5 (**Tabulka VI**). ^{13}C NMR posuny jednoho thiolanového kruhu odpovídaly hodnotám pozorovaných u allithiolanů A a B (**Tabulka IV a V**), zatímco NMR posuny druhého z kruhů byly v dobrém souladu s publikovanými hodnotami pro cepathiolany (**Tabulka XIII**).^{12,13} Přítomnost vyměnitelného atomu vodíku v jejich molekule byla potvrzena NMR analýzou v DMSO- d_6 . Tento atom vodíku vykazoval COSY korelaci s H-2' a HMBC korelaci s C-2' a C-3' (**Obrázek 55**).



Obrázek 55: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u PM 3.1.4 (v DMSO- d_6).

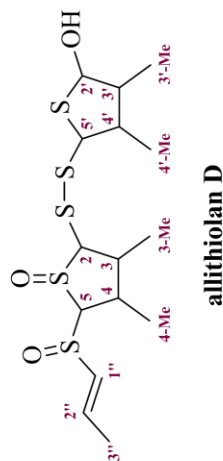
Všechna výše uvedená data (včetně MS/MS fragmentace, viz **Příloha 4 a 6**) byla v plném souladu se strukturou uvedenou na **Obrázku 56**. Pro svou blízkou příbuznost s ostatními allithiolany získaly látky PM 3.3.3, resp. PM 3.1.4 triviální označení allithiolany D₁, resp. D₂.



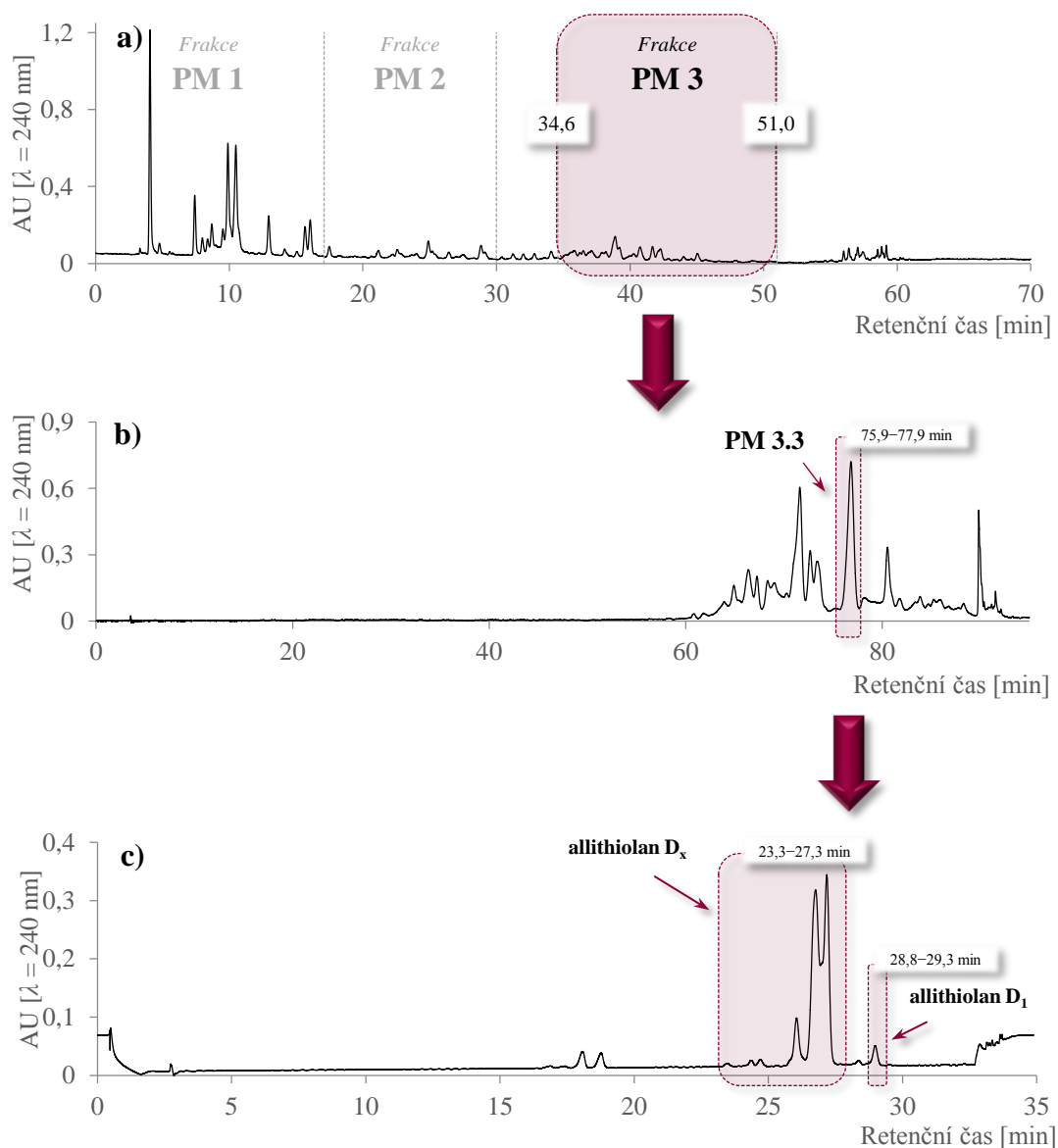
Obrázek 56: Struktura allithiolanu D.

Tabulka VI: ^1H a ^{13}C NMR data allithiolanů D_1 a D_2 .^a

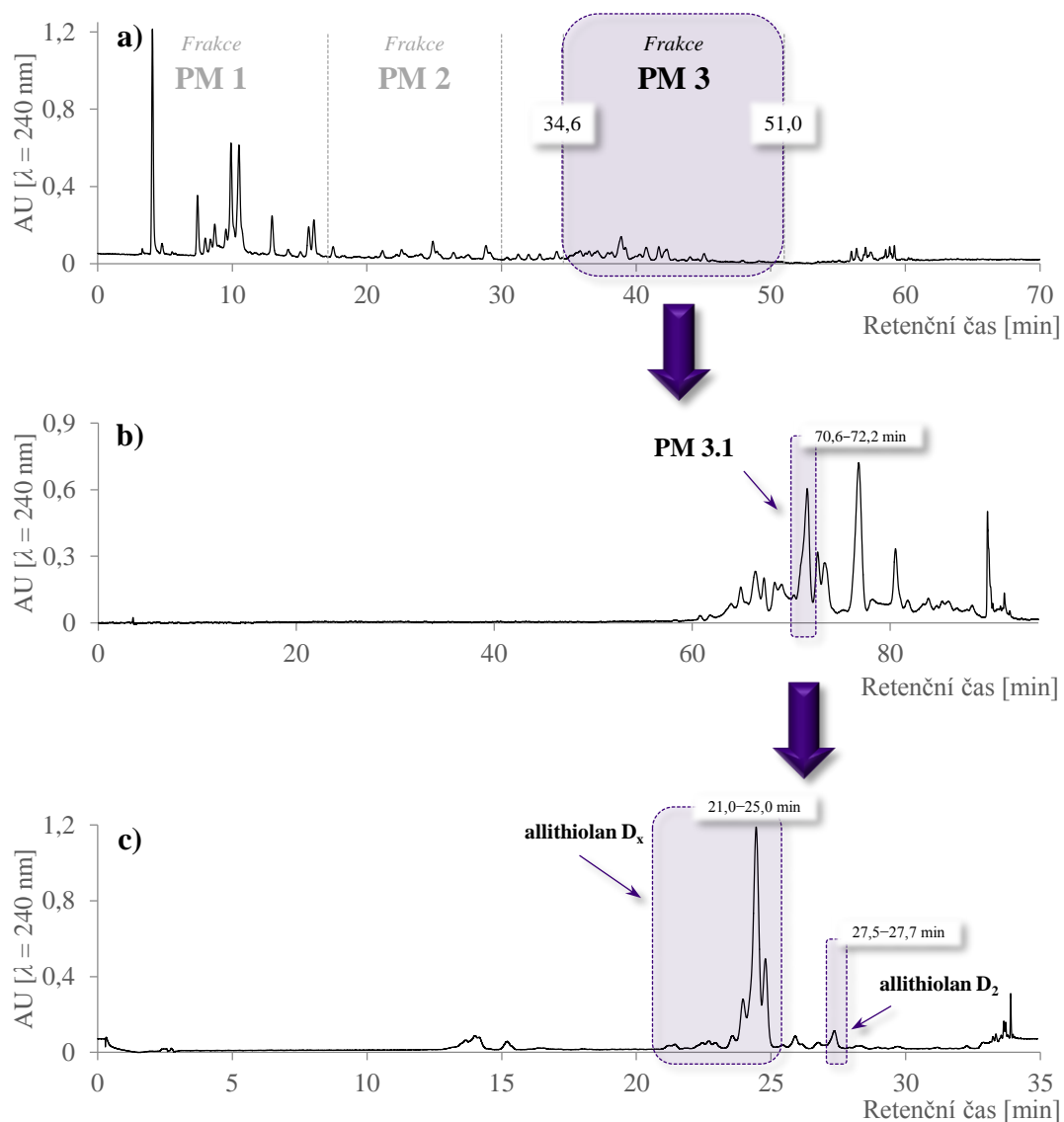
rozpouštědlo	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})^-$					thiolanový kruh 1					thiolanový kruh 2						
	3"	2"	1"	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	2	5'	4'	4-CH ₃	3-CH ₃	3'	2'	2'-OH
CDCl ₃	1,99 (dd; 6,9; 1,6)	6,57 (dq; 15,0; 6,9)	6,28 (dq; 15,0; 1,6)	3,64 (d; 7,8)	2,27 (m)	1,28 (d; 6,4)	1,32 (d; 6,2)	2,29 (m)	3,69 (d; 12,3)	3,69 (d; 12,3)	4,02 (d; 9,4)	2,24 (ddq; 12,2; 9,4; 6,6)	1,08 (d; 6,6)	1,11 (d; 6,7)	1,80 (ddq; 12,2; 6,7; 4,1)	5,17 (d; 4,1)	n. o. ^b
	D_1	17,91	138,87	130,25	89,18	39,57	19,92	15,98	46,04	81,28	62,92	45,15	14,69	13,63	51,07	82,93	
DMSO- <i>d</i> ₆	1,91 (dd; 6,9; 1,6)	6,32 (dq; 15,0; 6,9)	6,60 (dq; 15,0; 1,6)	4,20 (d; 7,3)	2,02 (ddq; 10,1; 7,3; 6,8)	1,16 (d; 6,8)	1,17 (d; 6,5)	2,29 (ddq; 12,5; 10,1; 6,5)	3,71 (d; 12,5)	3,71 (d; 12,5)	4,35 (d; 9,0)	2,11 (ddq; 11,8; 9,0; 6,7)	1,13 (d; 6,7)	0,94 (d; 6,7)	1,78 (ddq; 11,8; 6,7; 4,0)	5,17 (dd; 5,6; 4,0)	5,97 (d; 5,6)
	D_2	2,05	6,72	6,56	3,35	2,21	1,32	1,34	2,17	3,69	3,94	2,26	1,06	1,11	1,77	5,15	n. o.
CDCl ₃	18,11	139,76	130,13	91,16	40,90	16,51	16,47	46,90	82,04	62,51	44,52	14,52	13,61	50,76	82,96		

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz^b n. o. – nepozorováno

Postup izolace allithiolanů D_1 a D_2 z modelové směsi B uvádí **Obrázek 57** a **Obrázek 58**. Z obou vzorků byla také izolována směs stereoizomerů allithiolanu D (v chromatogramech označeny jako allithiolany D_x), které byly následně využity pro senzoryckou analýzu (dále **kap. 4.2.1**).



Obrázek 57: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
 a) modelové reakce B (3 hod) (Metoda F),
 b) frakce PM 3 (Metoda H),
 c) frakce PM 3.1 – izolace allithiolanů D_1 a D_x (Metoda I).

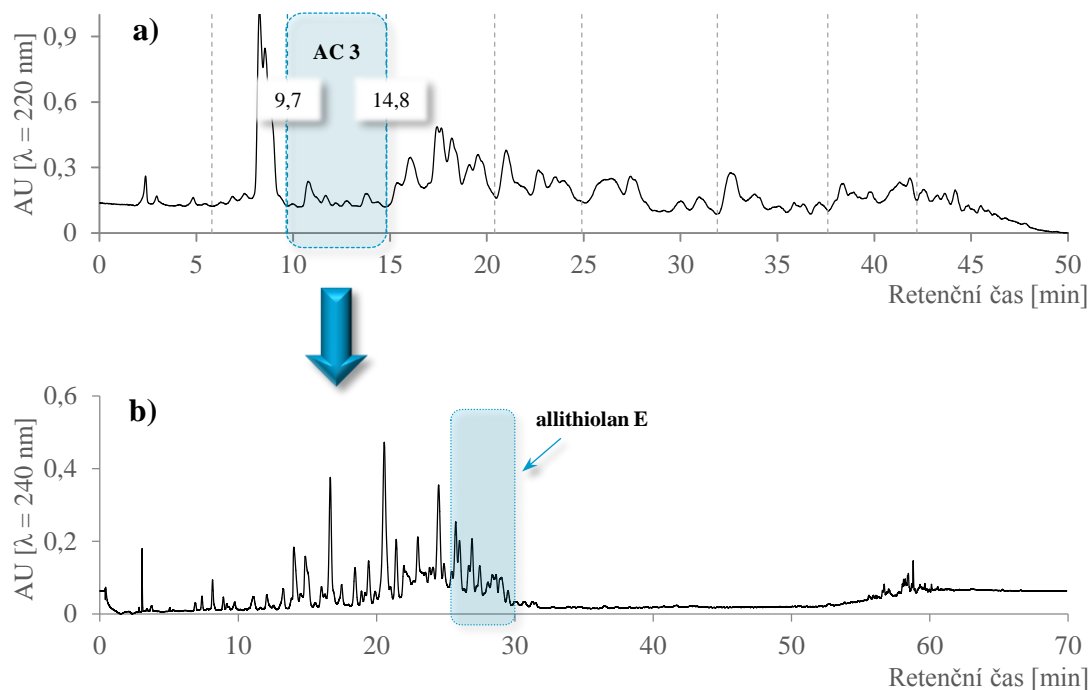


Obrázek 58: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
 a) modelové reakce B (3 hod) (Metoda F),
 b) frakce PM 3 (Metoda H),
 c) frakce PM 3.1 – izolace allithiolanů D₂ a D_x (Metoda I).

Allithiolany E

HPLC-MS analýza extraktu cibulového homogenátu prokázala ve frakcích AC 3 a AC 4 přítomnost ještě jedné skupiny sloučenin izomerních s allithiolany D, tedy se sumárním vzorcem $C_{15}H_{26}O_3S_5$ (**Tabulka VII**). MS/MS fragmentace těchto látek naznačovala velmi blízkou strukturní podobnost s dalšími zástupci allithiolanů (**Příloha 4**). Struktura těchto sloučenin, triviálně označených jako allithiolany E, byla určena na základě MS/MS fragmentace. V důsledku přítomnosti velkého množství stereoizomerů sloučenin izolovaných pomocí preparativní C8-HPLC (allithiolany E_x,

Obrázek 59b), případně vlivem přítomnosti dalších koeluujících sloučenin (vzorky AC 4.B–4.D, **Obrázek 47**), nebyla interpretace NMR spekter získaných vzorků možná.

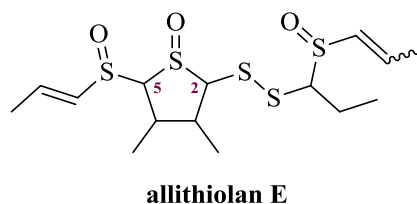


Obrázek 59: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

a) cibule kuchyňské (Metoda A),

b) frakce AC 3 – izolace skupiny stereoizomerů allithiolanu E_x (Metoda J).

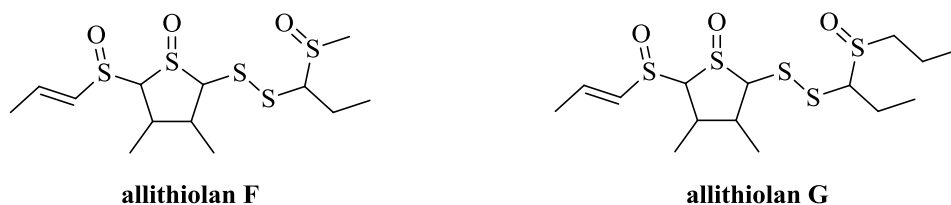
Na rozdíl od allithiolanů D byl kvasimolekulární ion allithiolanů E ($[M + H]^+ = 415$ Da) v hmotnostním spektru snadno pozorovatelný, zatímco fragment $m/z = 397$ Da (typický pro allithiolany D) zcela chyběl. MS fragmentace allithiolanů E zahrnovala po sobě následující odštěpení dvou $C_3H_5S(O)-$ skupin (tj. $415 \rightarrow 325 \rightarrow 215$ Da). Vzhledem ke zjevné strukturální příbuznosti s allithiolany A–D bylo vysoce pravděpodobné, že jedna z těchto skupin je navázána na uhlík C-5, zatímco druhá $C_3H_5S(O)-$ skupina je součástí postranního řetězce $C_6H_{11}OS_3-$ navázaného na uhlík C-2 v 3,4-dimethylthiolanovém kruhu (**Příloha 4**). Na základě detailní analýzy získaných HRMS dat (včetně MS/MS fragmentace a izotopického zastoupení) a s přihlédnutím ke strukturám a mechanismům vzniku již známých organosírných sloučenin česnekovitých rostlin, bylo ve struktuře allithiolanů E na atomu uhlíku C-2 thiolanového kruhu možné očekávat přítomnost postranního řetězce strukturálně odpovídajícího cepaenům. Navrženou strukturu allithiolanů E, která je ve výborné shodě se všemi získanými MS daty, uvádí **Obrázek 60**.



Obrázek 60: Struktura allithiolanu E.

Allithiolany F a G

Identifikace allithiolanů E byla podnětem pro potvrzení přítomnosti také jejich methylových a propylových homologů, jejichž tvorba v cibulovém homogenátu se jevila jako velmi pravděpodobná (s ohledem na známou strukturu cepaenů, viz **kap. 2.4.3**). HPLC-MS analýzou byly skutečně detekovány dvě skupiny sloučenin odpovídajícího elementárního složení, tj. $C_{13}H_{24}O_3S_5$ (allithiolany F) resp. $C_{15}H_{28}O_3S_5$ (allithiolany G), **Tabulka VII**. Z důvodu velmi nízké koncentrace těchto sloučenin v extraktu by však jejich izolace preparativní HPLC byla pouze obtížně proveditelná. Získaná MS/MS data (**Příloha 4**) však byla v přesvědčivé shodě s navrženými strukturami, které jsou uvedeny na **Obrázku 61**.



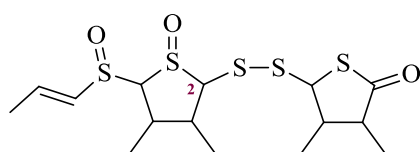
Obrázek 61: Struktury allithiolanů F a G.

Allithiolany H

Jak již bylo uvedeno v předchozím textu, v případě frakcí AC 6 a AC 7 nebylo dosaženo jejich uspokojivé HPLC separace. Zároveň s několika stereoizomery allithiolanů B–D (přítomných ve frakci AC 6) odhalila HPLC-MS analýza těchto dvou frakcí přítomnost ještě další skupiny sloučenin, jejichž MS/MS fragmentace se výrazně podobala fragmentaci allithiolanů A–G. Velmi nízké zastoupení těchto sloučenin, přítomnost mnoha stereoizomerů a koeluce s řadou dalších sloučenin přítomných v extraktu byly důvodem neúspěšné HPLC izolace vzorku pro NMR

analýzu. Struktura těchto sloučenin, které získaly triviální označení allithiolany H, tak byla určena výhradně na základě MS dat a před provedením dalších analýz je vhodné ji považovat pouze za pravděpodobnou.

(+)ESI-HRMS data allithiolanů H odpovídala elementárnímu složení $C_{15}H_{24}O_3S_5$ (**Tabulka VII**). MS/MS fragmentace poukazovala na odlišnost allithiolanů H od ostatních skupin allithiolanů pouze ve struktuře jednotky navázané prostřednictvím disulfidické vazby k uhlíku C-2 3,4-dimethylthiolanového jádra. Elementární složení této strukturní jednotky odpovídalo C_6H_9OS (RDB = 2). MS/MS fragmentace allithiolanů H byla (stejně jako u všech ostatních skupin allithiolanů) zahájena odtržením skupiny $CH_3CH=CHS(O)-$ (tj. 413 \rightarrow 323 Da) a poté následována odštěpením skupiny C_6H_9OS- (tj. 323 \rightarrow 195 Da) navázané na uhlíku C-2. Odtržená skupina C_6H_9OS- navíc dle MS/MS dat ve významné míře nepodléhala další fragmentaci, což s největší pravděpodobností poukazovalo na nepřítomnost snadno odštěpitelných funkčních skupin v této části molekuly (**Příloha 4**). Navržená struktura allithiolanů H (**Obrázek 62**) je ve výborně shodě se všemi získanými MS daty (MS/MS fragmentací i izotopovými poměry).



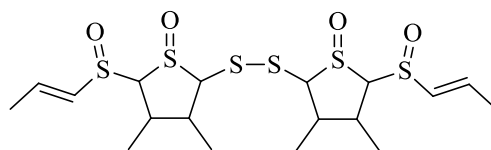
allithiolan H

Obrázek 62: Pravděpodobná struktura allithiolanu H.

Allithiolany I

Během pokusů o izolaci allithiolanů A–H byla zjištěna přítomnost ještě jedné skupiny izomerních sirných sloučenin s velmi podobnou MS/MS fragmentací s ostatními allithiolany (**Příloha 4**). Zastoupení této skupiny sloučenin bylo v čerstvě připraveném extraktu cibule velmi nízké. Výraznější množství však bylo pozorováno jako důsledek rozkladu allithiolanů A–H během jejich izolace. Elementární složení těchto sloučenin, triviálně pojmenovaných allithiolany I, dle HRMS dat odpovídalo $C_{18}H_{30}O_4S_6$ (**Tabulka VII**).

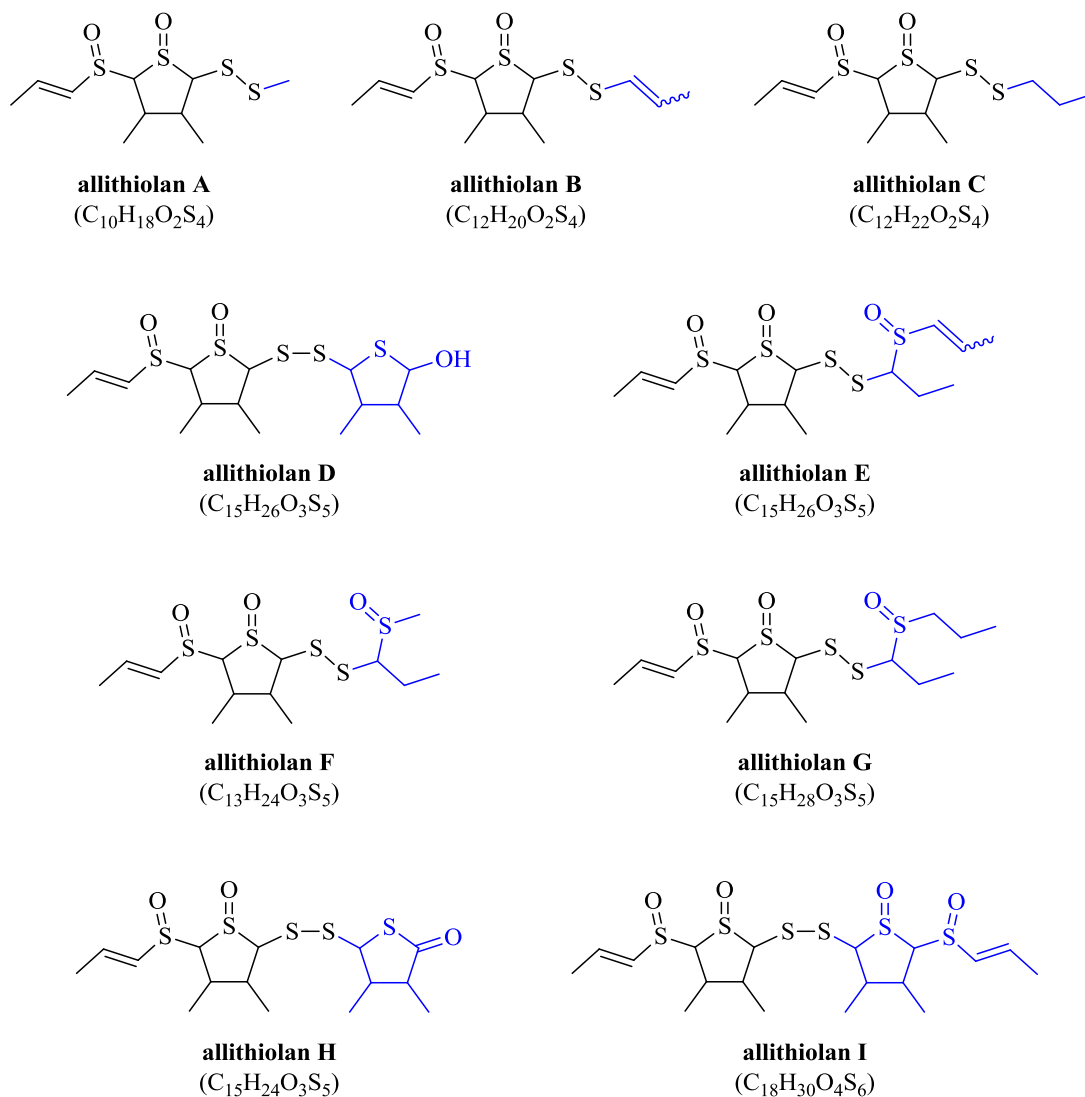
Preparativní C8-HPLC byla izolována směs řady stereoizomerů allithiolanu I (PM 3.1.1 a PM 3.3.1, **Obrázek 42c a 43c**), která však z důvodu své komplexnosti nebyla vhodná pro NMR analýzu. Nicméně MS/MS fragmentace těchto látek byla ve výborné shodě s navrženou strukturou (**Obrázek 63**). Allithiolany I tak představují organosírné sloučeniny se zdaleka nejvyšší relativní molekulovou hmotností ($M_r = 503,8$ Da) spontánně vznikající při zpracování cibule, které byly doposud v cibuli identifikovány.



allithiolan I

Obrázek 63: Struktura allithiolanu I.

Struktury celkem devíti skupin allithiolanů identifikovaných v cibulovém homogenátu jsou souhrnně uvedeny na **Obrázku 64**.



Obrázek 64: Struktura allithiolanů A–I.

Tabulka VII: (+)ESI-HRMS data allithiolanů A–I.

allithiolany	elementární složení	M_r	$[M + H]^+$		RDB ^b
			teoretická	experimentální ^a	
A	C ₁₀ H ₁₈ O ₂ S ₄	298,5	299,0262	299,0254–299,0269	2
B	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ S ₄	324,5	325,0419	325,0412–325,0421	3
C	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ S ₄	326,6	327,0575	327,0569–327,0581	2
D	C ₁₅ H ₂₆ O ₃ S ₅	414,7	415,0558	415,0551–415,0566	3
E	C ₁₅ H ₂₆ O ₃ S ₅	414,7	415,0558	415,0554–415,0567	3
F	C ₁₃ H ₂₄ O ₃ S ₅	388,7	389,0402	389,0398–389,0409	2
G	C ₁₅ H ₂₈ O ₃ S ₅	416,7	417,0715	417,0714–415,0724	2
H	C ₁₅ H ₂₄ O ₃ S ₅	412,7	413,0402	413,0397–413,0408	4
I	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ S ₆	503,8	503,0541	503,0535–503,0551	4

^a hodnoty pozorované pro různé stereoizomery^b RDB – počet kruhů a dvojných vazeb

4.2.1 Organoleptické vlastnosti allithiolanů

Senzorické hodnocení izolovaných skupin allithiolanů probíhalo pomocí trojúhelníkového testu. Hodnoceny byly allithiolany A, B, D a E (ostatní skupiny allithiolanů nebyly získány v dostatečném množství či čistotě). Chuť všech testovaných allithiolanů byla hodnotiteli charakterizována jako nepříjemná, kovově hořká, přetrvávající v ústech i několik desítek minut po hodnocení. Nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly v chuťových profilech testovaných allithiolanů. Chuť allithiolanů svým charakterem přesně odpovídala chuti pozorované u homogenizované cibule, což potvrdilo, že tyto látky jsou skutečně jejími klíčovými nositeli. Výsledky senzorické analýzy (tj. stanovení prahu detekce v jednotkách µg/ml) pro allithiolany A, B, D a E testované ve vodném roztoku uvádí **Tabulka VIII**.

Tabulka VIII: Výsledky senzorické analýzy allithiolanů A, B, D a E.

allithiolan	A	B	D	E
práh detekce [µg/ml]	30	30	15	30

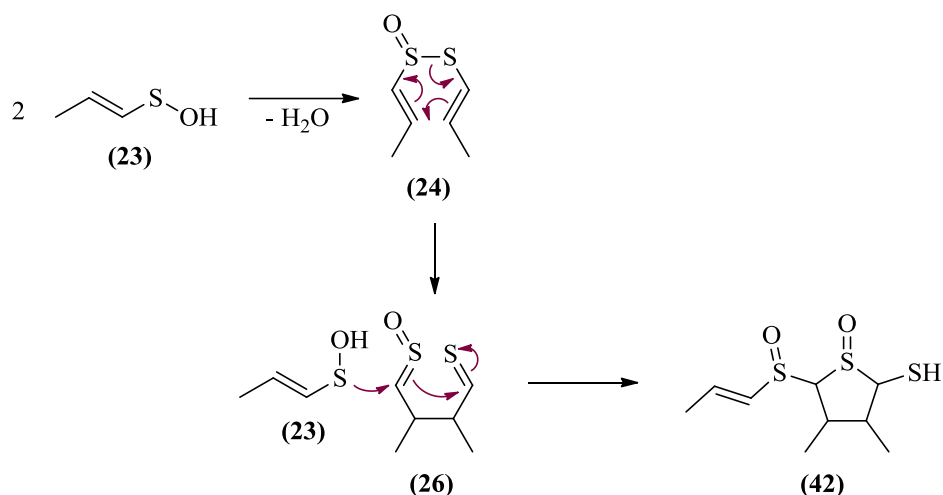
S ohledem na typický obsah hlavního prekurzoru všech allithiolanů, isoalliinu, v cibuli (okolo 0,4–0,6 mg/g čerstvé cibule)^{40,82} a stanoveným hodnotám prahu detekce

allithiolanů (tj. 15–30 µg/ml, **Tabulka VIII**) je možné odhadnout, že senzorycky detekovatelné množství allithiolanů v homogenizované cibuli vznikne již při enzymovém rozkladu přibližně 10–15 % celkového množství isoalliinu původně přítomného v nenarušené cibuli (pro tvorbu 1 molu allithiolanů A–I je vyžadováno 3–6 molů isoalliinu).

4.2.2 Mechanismus tvorby allithiolanů

Isoalliin (**10**) je zjevně hlavní prekurzor všech skupin allithiolanů popsanych v této práci. Tento předpoklad byl potvrzen pomocí modelových reakčních systémů sestávajících z isoalliinu, methiinu a alliinasy (popř. alliinasy/LFS). Bylo zjištěno, že allithiolany B–E a G–I byly tvořeny v modelovém systému obsahujícím pouze isoalliin (**10**), kdežto současná přítomnost methiinu (**14**) byla vyžadována pro tvorbu allithiolanů A a F. Značné odlišnosti v tvorbě allithiolanů v modelových experimentech byly pozorovány při použití alliinasy izolované z česneku či enzymového preparátu z cibule (obsahujícího spolu s alliinasou i LFS). Tvorba allithiolanů A–D, H a I v modelových reakčních systémech byla bez rozdílu pozorována při použití alliinasy izolované z česneku i cibule. Naopak v případě allithiolanů E–G docházelo k jejich tvorbě pouze v přítomnosti komplexu alliinasa/LFS z cibule, což potvrdilo zásadní úlohu LF v procesu tvorby těchto třech skupin allithiolanů.

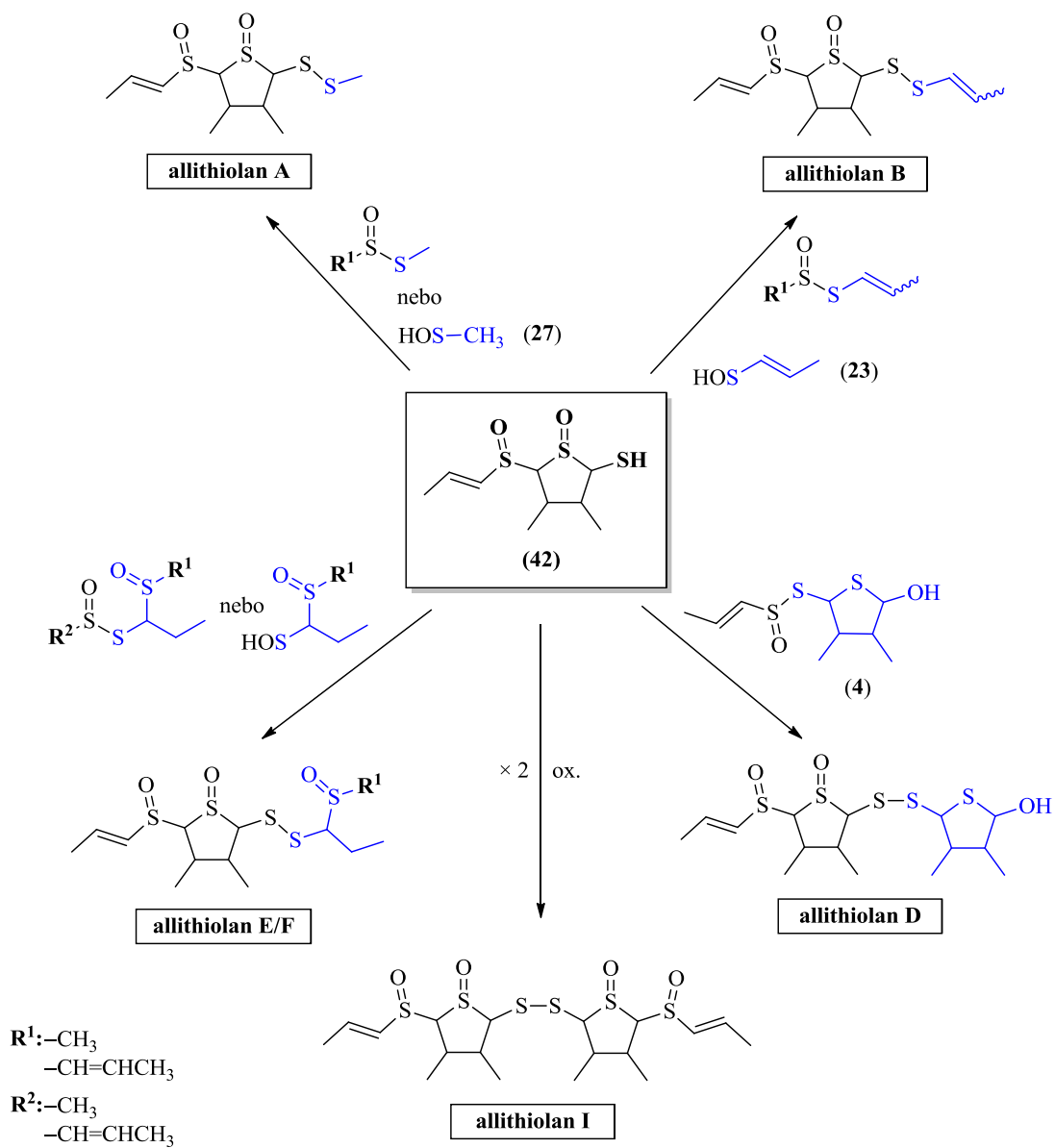
Kondenzací 1-propensulfenové kyseliny (**23**), vznikající enzymově katalyzovaným rozkladem isoalliinu (**10**), se tvoří *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfínát (**24**). Tento vysoce reaktivní thiosulfínát podléhá spontánnímu rozkladu za vzniku 2,3-dimethylbutandithial-*S*-oxidu (**26**).^{59,81,83} Lze předpokládat, že karbofilním atakem další molekuly 1-propensulfenové kyseliny (**23**) na **26** dochází k tvorbě 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfanyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (**42**), který je velmi pravděpodobně společným meziproduktem všech allithiolanů (**Obrázek 65**).



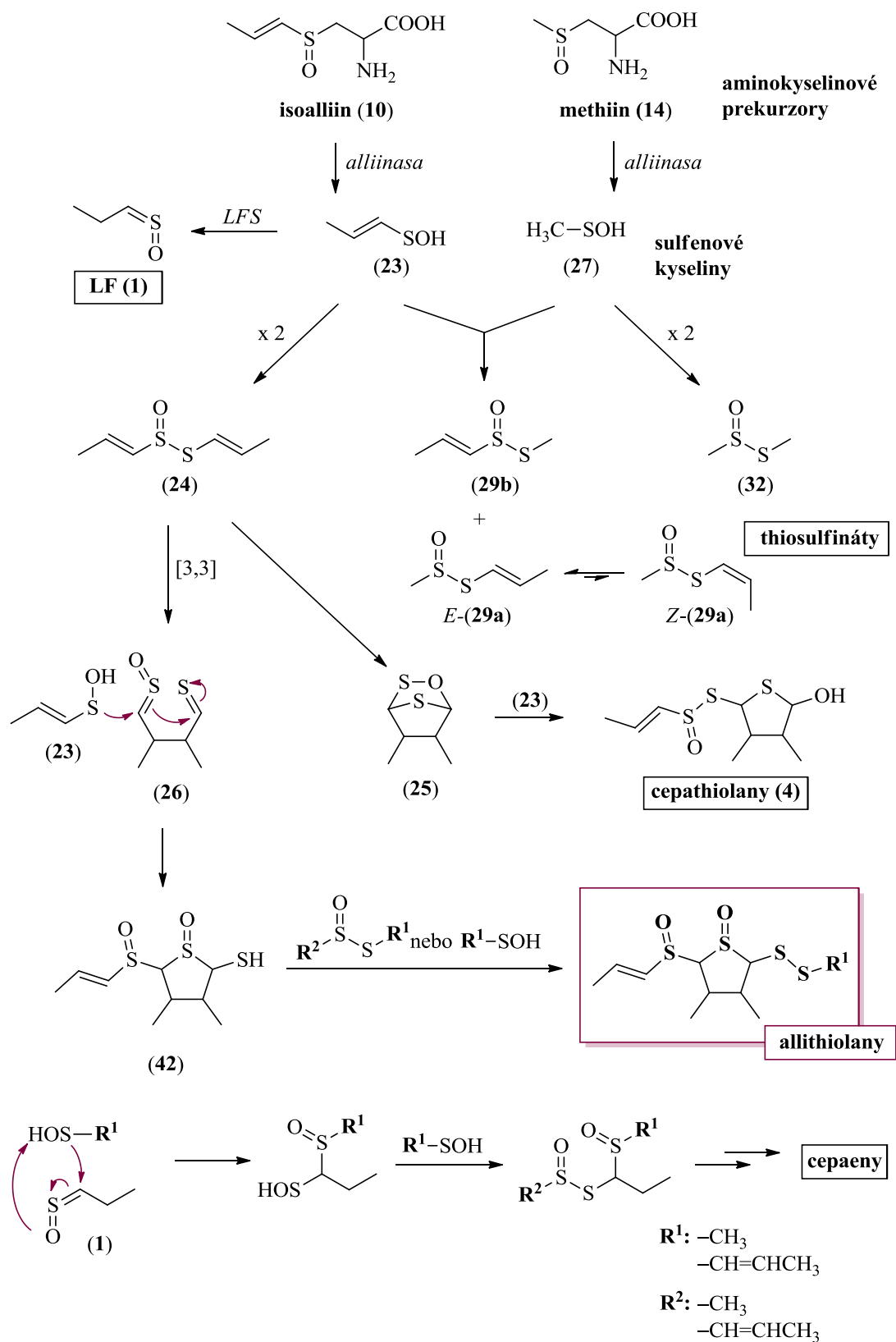
Obrázek 65: Navržený mechanismus vzniku **42**.

Sulfanylová skupina 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfinyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (**42**) následně reaguje s dalšími sloučeninami, které souběžně vznikají v cibulovém homogenátu a nesou $-\text{SS}(\text{O})-$ nebo $-\text{SOH}$ funkční skupiny. Dá se tedy předpokládat, že allithiolany A, B a D vznikají reakcí **42** s $\text{CH}_3\text{SS}(\text{O})\text{R}/\text{CH}_3\text{SOH}$, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHSS}(\text{O})\text{R}/\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHSOH}$ resp. se sultenem (**25**) či cepathiolany (**4**). Zatímco allithiolany E a F (obsahující cepaenový postranní řetězec) vznikají reakcí **42** s odpovídajícími cepaeny či meziprodukty při jejich tvorbě, allithiolany I jsou pravděpodobně tvořeny oxidací dvou molekul **42**, případně disproportionací allithiolanů A–H během jejich izolace (**Obrázek 66 a 67**).

Propylová skupina allithiolanů C a G může pocházet z propiinu (*S*-propylcystein-*S*-oxid, **15**), který je v nízkém množství přítomen v cibuli. Tento předpoklad však neposkytuje vysvětlení tvorby allithiolanů C a G také v modelových systémech obsahujících pouze isoalliin (**10**) a alliinasu, kde propylová skupina nepochybně vznikla z 1-propenylové skupiny isoalliinu (**10**). Mechanismus vzniku propylových řetězců těchto sloučenin tak zůstává stále nejasný.



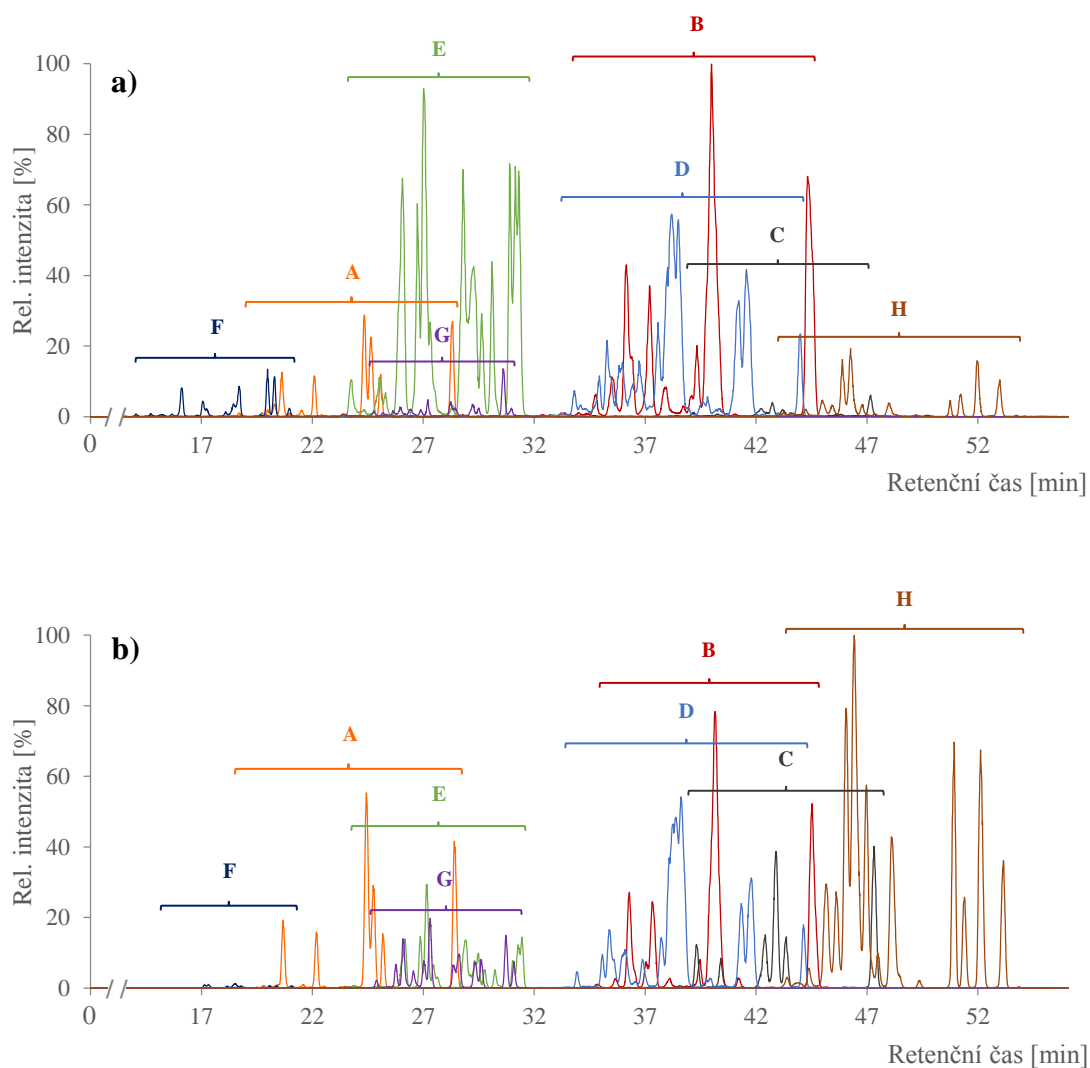
Obrázek 66: Pravděpodobný mechanismus tvorby allithiolanů A-I.



Obrázek 67: Mechanismus tvorby hlavních skupin dosud známých organosírných sloučenin ve zpracované cibuli.

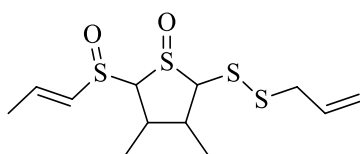
4.2.3 Tvorba allithiolanů v dalších zástupcích rodu *Allium*

Bylo zjištěno, že tvorba allithiolanů není záležitostí pouze cibule kuchyňské. HPLC-MS analýza totiž prokázala přítomnost všech devíti skupin allithiolanů také v homogenátu póru zahradního, přičemž relativní zastoupení jednotlivých skupin allithiolanů bylo v porovnání s cibulovým homogenátem poněkud odlišné. Pór obsahoval výrazně vyšší relativní množství allithiolanů C a H, naopak značně méně pak allithiolanů E a F oproti cibulovému homogenátu (**Obrázek 68**). Tyto odlišnosti v obsahu allithiolanů jsou pravděpodobně důsledkem potlačené aktivity LFS v póru. Z tohoto důvodu je tvorba allithiolanů E a F nesoucích cepaenový postranní řetězec, které pro svou tvorbu vyžadují LF, v póru výrazně snížena.



Obrázek 68: (+)ESI-HRMS analýza allithiolanů v extraktu:
a) cibule kuchyňské,
b) póru zahradního (zobrazeny jsou pouze MS signály allithiolanů, přítomnost ostatních sloučenin není zachycena).

V homogenizovaném česneku naopak významná množství allithiolanů nevznikala. Jediné sloučeniny „allithiolanového“ typu, identifikované v česnekovém homogenátu ve větším množství, měly shodné elementární složení jako allithiolany B (tj. $C_{12}H_{20}O_2S_4$). Ačkoli měly tyto sloučeniny téměř identická MS/MS spektra s allithiolany B, lišily se v HPLC retenčních časech. Lze předpokládat, že tyto sloučeniny byly patrně izomery allithiolanů B obsahujícími 2-propenylovou (allylovou) skupinu namísto 1-propenylové skupiny. Tři stereoizomery těchto sloučenin, triviálně nazvané jako garliciny C_1 , C_2 a C_3 , byly nedávno izolovány z česnekového homogenátu (**Obrázek 69**).^{84,85}



Obrázek 69: Struktura garlicinu C.^{84,85}

Absence výrazného množství allithiolanů A–I v česnekovém homogenátu však není překvapivá. Zatímco isoalliin je hlavním prekurzorem organosírných sloučenin v cibuli, jeho obsah v česneku většinou nepřesahuje 10 % celkového obsahu všech cystein-S-oxidů (viz **Tabulku I**). Jako důsledek této odlišnosti pravděpodobně v česneku nevzniká dostatečné množství 1-propensulfenové kyseliny nutné pro tvorbu allithiolanů A–I, vyžadující reakci 3 až 6 molekul této kyseliny. Navíc v česneku z důvodu nepřítomnosti LFS nedochází k tvorbě LF, který je nezbytný pro tvorbu allithiolanů E–G.

4.3 Izolace a identifikace dalších organosírných sloučenin

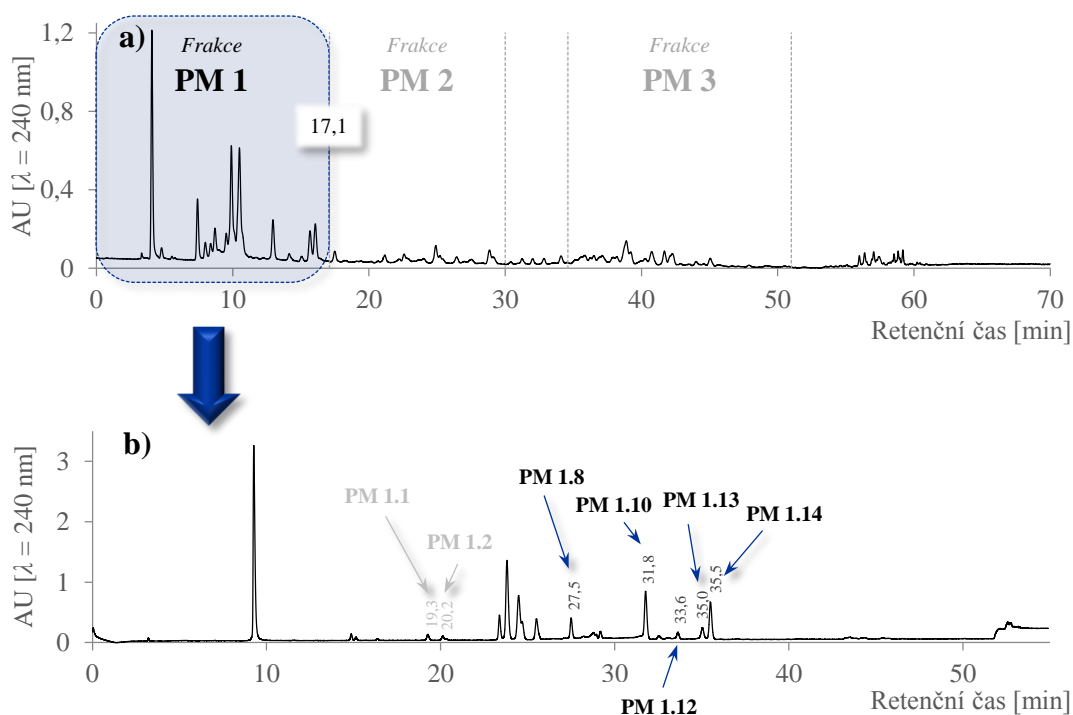
V průběhu izolace a identifikace sloučenin zodpovědných za hořkou chuť zpracované cibule byla z připravených extraktů (popř. modelových směsí) izolována i celá řada organosírných sloučenin, které hořkou chuť nevykazovaly. Často se však jednalo o látky strukturně zajímavé, v některých případech v odborné literatuře ještě nepopsané. V následujících oddílech je popsána jejich izolace a identifikace, organoleptické vlastnosti, jakož i studium jejich role při tvorbě nežádoucího růžového zbarvení cibule.

4.3.1 Onioniny

Onioniny A

Vyhodnocení dat získaných při HPLC-MS analýzách extraktů cibule odhalilo spolu s allithiolany A–I také přítomnost řady sloučenin elementárního složení $C_9H_{16}O_2S_2$ ($[M + Na]^+$ experimentální 243,0472–243,0488 Da; teoretická 243,0484). MS/MS spektra těchto látek byla velmi podobná a naznačovala, že tyto sloučeniny budou patrně stereoizomery spíše než konstituční izomery.

Několik těchto látek bylo posléze izolováno preparativní C8-HPLC z modelového reakčního systému obsahujícího isoalliin, methiin a alliinasu (modelová reakce B, viz **kap. 3.4.4**) (píky PM 1.8, PM 1.10 a PM 1.12–1.14, **Obrázek 70**).

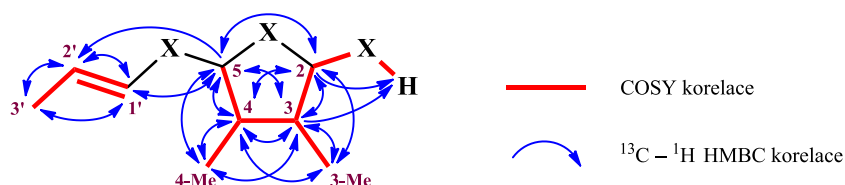


Obrázek 70: a) C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B (isoalliin, methiin a alliinasu, reakce 3 hod (Metoda F).

b) Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu frakce PM 1 modelové reakce B izolace PM 1.8, PM 1.10 a PM 1.12–1.14 (Metoda L).

Sloučeniny s označením PM 1.10 a PM 1.14 byly podrobeny detailnější analýze a jejich struktura byla určena na základě NMR, IČ a MS/MS dat. Ukázalo se, že oba vzorky byly směsí nejméně dvou stereoizomerů. ^{13}C NMR spektrum každého izomeru obsahovalo devět signálů odpovídajících 7 sp^3 (3 CH_3 - a 4 CH) a 2 sp^2 ($-CH=$) hybridizovaným atomům uhlíku. Dalšími NMR analýzami bylo potvrzeno, že tyto

uhlíky tvoří pětičlenný 3,4-dimethyl heterocyklický systém substituovaný v pozicích 2 a 5. Zbývající tři uhlíky tvořily skupinu $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-$. Mezi těmito dvěma strukturálními jednotkami nebyly v COSY NMR spektru pozorovány žádné korelace. V HMBC spektru vykazovala 1-propenylová skupina korelaci s uhlíkem C-5, což naznačovalo spojení těchto dvou jednotek prostřednictvím heteroatomového můstku (**Obrázek 71**).

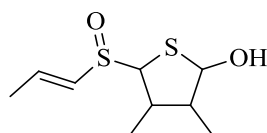


Obrázek 71: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u PM 1.10 ($\text{DMSO}-d_6$).

Hodnoty ^{13}C NMR posunů $\text{CH}=\text{CH}$ uhlíků (δ 129,4–132,8 a 137,5–139,5) odpovídaly literárním údajům pro $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})-$ skupinu (**Tabulka III**). V souladu s tímto předpokladem byla i MS/MS fragmentace obsahující snadno odštěpitelný fragment $[\text{C}_3\text{H}_5\text{S}(\text{O})-]$ (tj. 221→131 Da) a intenzivní IČ signál při 1040 cm^{-1} odpovídající sulfoxidové skupině ($-\text{S}=\text{O}$) (**Přílohy 7, 8 a 13**). Geometrická konfigurace přítomné 1-propenylové skupiny byla na základě ^1H NMR dat ($J_{\text{CH}=\text{CH}} \approx 15\text{ Hz}$) výhradně *E* ve všech izolovaných stereoisomerech.

NMR experimenty prováděné v $\text{DMSO}-d_6$ potvrdily přítomnost jednoho vyměnitelného atomu vodíku vykazujícího korelace s H-2 a C-2/C-3 v COSY resp. HMBC spektrech (**Obrázek 71**). Přítomnost tohoto atomu vodíku v hydroxylové skupině ($-\text{OH}$) spíše než sulfanylové ($-\text{SH}$) potvrdil charakteristický IČ signál při 3350 cm^{-1} a také MS fragment $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+ = 203\text{ Da}$ (**Přílohy 7, 8 a 13**).

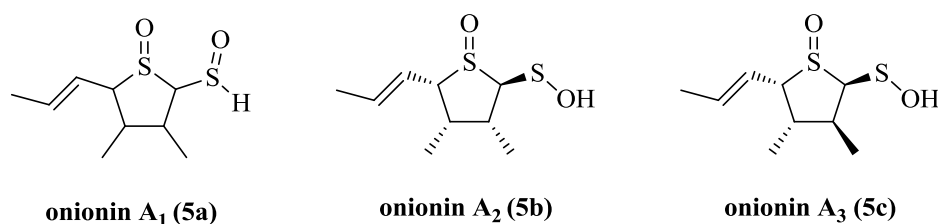
Výše uvedená data tak jasně prokázala, že sloučeniny PM 1.10 a 1.14 jsou stereoisomery (*E*)-3,4-dimethyl-5-(1-propenylsulfanyl)thiolan-2-olu (**Obrázek 72**).



PM 1.10
PM 1.14

Obrázek 72: Struktura PM 1.10 a PM 1.14.

Sloučeniny elementárního složení $C_9H_{16}O_2S_2$, nesoucí triviální označení onioniny A_1 – A_3 , byly již dříve popsány vědeckou skupinou Nohary. Pro tyto látky však byly navrženy dvě odlišné struktury (**Obrázek 73**). Struktura onioninu A (**5a**) dle El-Aasr a kol.¹¹ obsahuje ve své molekule thialovou funkční skupinu –SHO (po objevení dalších stereoizomerů bývá označován jako onionin A_1), zatímco onionin A_2 – A_3 (**5a–c**), které jsou uvedeny v publikaci Nohary a kol.,¹⁴ ve své molekule obsahují –SOH skupinu. Přítomnost obou těchto funkčních skupin je však z důvodu jejich mimořádné reaktivity vysoce nepravděpodobná.

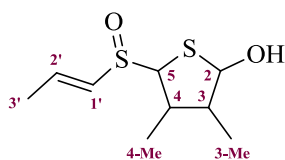
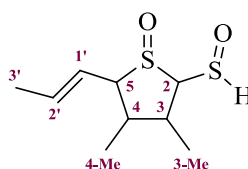
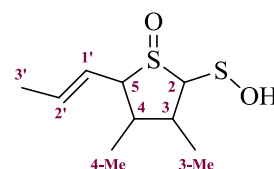


Obrázek 73: Struktury onioninu A_1 (**5a**)¹¹ a onioninů A_2 – A_3 (**5b–c**).¹⁴

Důkladné porovnanie NMR dat izolovaných sloučenin PM 1.10 a PM 1.14 (**Tabulka IX**) s daty publikovanými pro onioniny A (**Tabulka X**) prokázalo u dvou stereoizomerů (PM 1.14B a PM 1.10A) téměř identické 1H a ^{13}C NMR posuny, multiplicity signálů i interakční konstanty s hodnotami publikovanými pro onioniny A_1 a A_2 . Závěry provedených analýz tedy potvrdily předpoklad, že obě struktury onioninu A, navržené El-Aasr a kol.,¹¹ resp. Noharou a kol.,¹⁴ jsou nesprávné. **Obrázek 72** uvádí strukturu onioninů A, která je v plné shodě s výsledky všech námi provedených analýz (NMR, HRMS, IČ) (**Přílohy 7,8 a 13**). Zbylé dva izolované stereoizomery, tedy PM 1.10B a PM 1.14A, byly analogicky pojmenovány triviálními názvy onionin A_4 a A_5 .

Tabulka IX: ^1H a ^{13}C NMR data vzorků PM 1.10 a 1.14.^a

izomer	rozpouštědlo	3'	2'	1'	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	2-OH	
1-10A	CDCl ₃	1,96 (dd; 6,8; 1,6)	6,54 (dq; 15,1; 6,8)	6,17 (dq; 15,1; 1,6)	4,06 (d; 5,2)	2,26 (ddq; 10,8; 5,2, 6,8)	1,19 (d; 6,8)	1,09 (d; 6,7)	2,00 (ddq; 10,8; 3,6, 6,7)	5,11 (d; 3,6)	n. o. ^b	
		17,87	137,54	129,43	75,30	37,34	19,82	13,53	54,82	87,34		
	DMSO- <i>d</i> ₆	1,87 (dd; 6,8; 1,9)	6,38 (dq; 15,0; 6,8)	6,52 (dq; 15,0; 1,6)	4,06 (d; 7,4)	2,23 (ddq; 11,3; 7,4; 6,7)	1,15 (d; 6,7)	0,96 (d; 6,7)	1,90 (ddq; 11,3; 3,9; 6,7)	5,18 (dd; 6,6; 3,9)	5,74 (d; 6,6)	
		17,27	136,18	132,98	72,67	41,90	18,10	13,27	52,70	83,96		
1-10B	CDCl ₃	1,92 (dd; 6,8; 1,6)	6,50 (dq; 15,1; 6,8)	6,30 (dq; 15,1; 1,6)	4,00 (d; 7,1)	2,24 (m)	1,33 (d; 6,7)	1,12 (d; 6,7)	1,95 (m)	5,13 (d; 7,5)	n. o.	
		17,85	137,90	132,80	72,82	37,34	19,35	15,66	54,48	87,81		
	DMSO- <i>d</i> ₆	1,86 (dd; 6,8; 1,6)	6,35 (dq; 15,0; 6,8)	6,48 (dq; 15,0; 1,6)	4,09 (d; 7,4)	1,99 (ddq; 10,4; 7,4; 6,7)	1,66 (d; 6,7)	0,98 (d; 6,6)	1,79 (ddq; 10,4; 8,2; 6,6)	5,02 (dd; 8,2; 7,2)	6,35 (d; 7,2)	
		17,25	136,04	133,37	71,03	41,92	18,74	14,88	53,03	86,81		
1-14A	CDCl ₃	1,91 (dd; 6,8; 1,6)	6,46 (dq; 15,0; 6,8)	6,09 (dq; 15,0; 1,6)	4,03 (d; 9,2)	2,03 (m)	1,24 (d; 6,6)	1,12 (d; 6,5)	1,88 (m)	5,26 (d; 8,5)	n. o.	
		17,85	137,59	131,54	74,85	40,98	16,96	15,09	53,48	87,35		
	DMSO- <i>d</i> ₆	1,19 (dd; 6,7; 1,5)	6,29 (dq; 15,1; 6,7)	6,40 (dq; 15,1; 1,5)	4,26 (d; 7,6)	2,05 (ddq; 11,2; 7,6; 6,7)	1,16 (d; 6,7)	0,95 (d; 6,7)	1,90 (ddq; 11,2; 3,8; 6,7)	5,10 (dd; 7,0; 3,8)	5,32 (d; 7,0)	
		17,22	135,69	132,26	75,66	40,98	16,96	13,43	52,78	82,44		
1-14B	CDCl ₃	1,92 (dd; 6,8; 1,6)	6,50 (dq; 15,2; 6,8)	6,05 (dq; 15,2; 1,6)	4,04 (d; 5,9)	2,18 (m)	1,30 (d; 6,7)	1,06 (d; 6,7)	1,99 (m)	5,02 (d; 3,5)	n. o.	
		18,00	139,53	131,48	79,01	42,68	18,13	13,78	54,80	83,35		
	DMSO- <i>d</i> ₆	1,86 (dd; 6,7; 1,5)	6,26 (dq; 15,0; 6,7)	6,36 (dq; 15,0; 1,5)	4,25 (d; 8,5)	1,79 (m)	1,15 (d; 6,3)	0,99 (d; 6,2)	1,79 (m)	4,91 (dd; 8,1; 7,3)	6,23 (d; 7,3)	
		17,12	134,80	132,41	72,87	40,86	16,85	14,88	52,69	86,30		

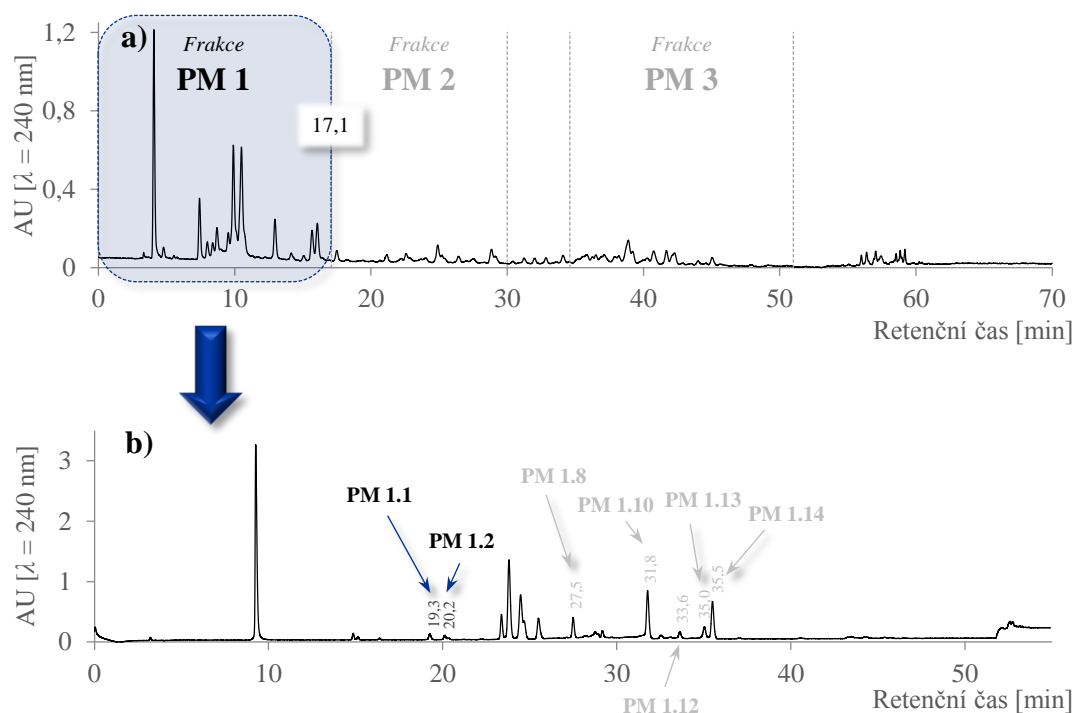
^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz^b n. o. – nepozorováno**PM 1.10**
PM 1.14**onionin A₁ (5a)****onionin A₂₋₃ (5b-c)****Tabulka X:** ^1H a ^{13}C NMR data onioninů A₁, A₂ a A₃.^a

izomer	rozpouštědlo	3'	2'	1'	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	2-SHO
A ₁ ^b	CDCl ₃	1,90 (dd; 6,9; 1,7)	6,46 (dq; 15,0; 6,8)	6,03 (dq; 13,8; 1,7)	4,01 (d; 5,8)	2,16 (m)	1,28 (d; 6,9)	1,05 (d; 6,3)	1,97 (m)	4,99 (dd; 10,9; 3,4)	4,31 (d; 10,9)
		18,3	139,6	131,7	79,2	42,9	18,1	13,9	55,0	83,5	
A ₂ ^c	CDCl ₃	1,95 (dd; 6,9; 1,7)	6,52 (dq; 13,7; 6,9)	6,15 (dq; 13,7; 1,7)	4,04 (d; 5,1)	2,24 (m)	1,17 (d; 6,9)	1,07 (d; 6,8)	2,00 (m)	5,09 (d; 3,4)	n. o. ^d
		18,0	137,7	129,6	75,5	37,4	20,0	13,7	55,0	85,8	
A ₃ ^c	CDCl ₃	1,91 (d; 6,9)	6,47 (m)	6,06 (d; 13,7)	3,97 (d; 5,7)	2,30 (m)	1,37 (d; 6,4)	1,11 (d; 7,3)	1,98 (m)	5,05 (d; 3,5)	n. o.
		17,9	139,4	130,8	77,8	50,8	18,1	15,9	53,4	89,9	

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz^b El-Aasr a kol.¹¹^c Nohara a kol.¹⁴^d n. o. – nepozorováno

Onioniny B

Nalezení onioninů A vedlo k hledání také jejich methylových homologů, jejichž přítomnost v extraktu cibule byla velmi pravděpodobná. Několik sloučenin s očekávaným elementárním složením (tj. $C_7H_{14}O_2S_2$) bylo pomocí HPLC-MS skutečně detekováno ($[M + Na]^+$ experimentální 217,0324–217,0331 Da; teoretická 217,0327), ovšem jejich obsah v extraktu byl natolik nízký, že by jejich izolace preparativní HPLC byla jen těžko proveditelná. Dvě z těchto sloučenin (PM 1.1 a PM 1.2, **Obrázek 74**) tedy byly izolovány z modelového reakčního systému obsahujícího isoalliin a methiin (modelová reakce B, viz **kap. 3.4.4**) a následně byly obě tyto látky identifikovány pomocí NMR a MS (**Příloha 8**).



Obrázek 74: a) C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce B (isoalliin, methiin a alliinasa, reakce 3 hod (Metoda F).

b) Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu frakce PM 1 modelové reakce B – izolace PM 1.1 a PM 1.2 (Metoda L).

Získaná 1H a ^{13}C NMR data (**Tabulka XI**) potvrdila v obou sloučeninách přítomnost pětičlenného 3,4-dimethyl heterocyklu nesoucího další substituenty v polohách 2 a 5, spolu s jednou izolovanou CH_3- skupinou a jednou $-OH$ skupinou. Hydroxylový vodík vykazoval COSY korelaci s vodíkem H-2, zatímco methylová skupina poskytovala HMBC signál s uhlíkem C-5 (**Obrázek 75**). ^{13}C NMR posuny uhlíku této

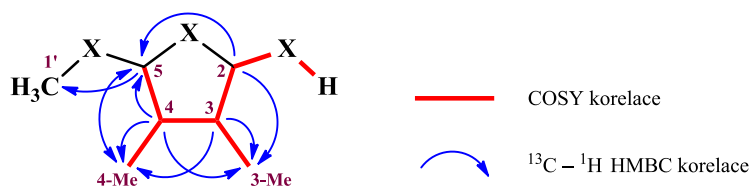
methylové skupiny (δ 35,2 resp. 37,4) byly plně v souladu s literárními údaji pro skupinu $\text{CH}_3\text{S(O)-}$ (viz **Tabulka III**).

Tabulka XI: ^1H a ^{13}C NMR data PM 1.1 a 1.2.

izomer	rozpuštědlo	1'	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	2-OH
PM 1.1 (= B ₁)	CDCl ₃	2,58	4,01	2,49	1,34	1,14	2,07	5,15	4,00
		(s)	(d; 5,3)	(m)	(d; 6,8)	(d; 6,7)	(m)	(dd; 10,3; 3,7)	(d; 10,3)
		35,16	74,50	38,34	20,15	13,47	55,21	85,54	
PM 1.2 (= B ₂)	CDCl ₃	2,46	3,86	2,85	1,25	0,99	2,49	5,01	4,44
		(s)	(d; 6,5)	(m)	(d; 7,1)	(d; 7,1)	(m)	(br m)	(br m)
		37,38	77,04	40,16	14,76	13,78	51,56	87,80	

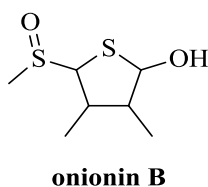
^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz

^b n. o. – nepozorováno



Obrázek 75: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u PM 1.1.

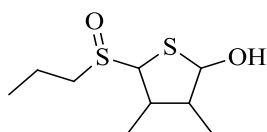
Všechna získaná spektroskopická data tak byla v naprosté shodě s předpokládanou strukturou (**Obrázek 76**). Tato sloučenina, systematickým názvem 3,4-dimethyl-5-(methylsulfinyl)thiolan-2-ol, nebyla dosud v odborné literatuře popsána. Analogicky k triviálnímu názvu jejich 1-propenylových homologů byly tyto dva stereoizomery pojmenovány onionin B₁ a B₂.



Obrázek 76: Struktura onioninu B.

Onioniny C

Spolu s onioniny A a B byly v extraktu cibule i v modelových směsích nalezeny také sloučeniny sumárního složení $C_9H_{18}O_2S_2$ ($[M + Na]^+$ experimentální 245,0635–245,0643 Da; teoretická 245,0640 Da). Z důvodu jejich koeluce s jinými složkami přítomnými v extraktu nebyly podniknuty pokusy o jejich izolaci pomocí preparativní HPLC. Nicméně získaná MS/MS spektra (**Příloha 8**) jasně naznačila, že se jedná o propylové homology onioninů A a B. Tyto látky, v odborné literatuře rovněž dosud nepopsané, byly pojmenovány onioniny C (**Obrázek 77**).

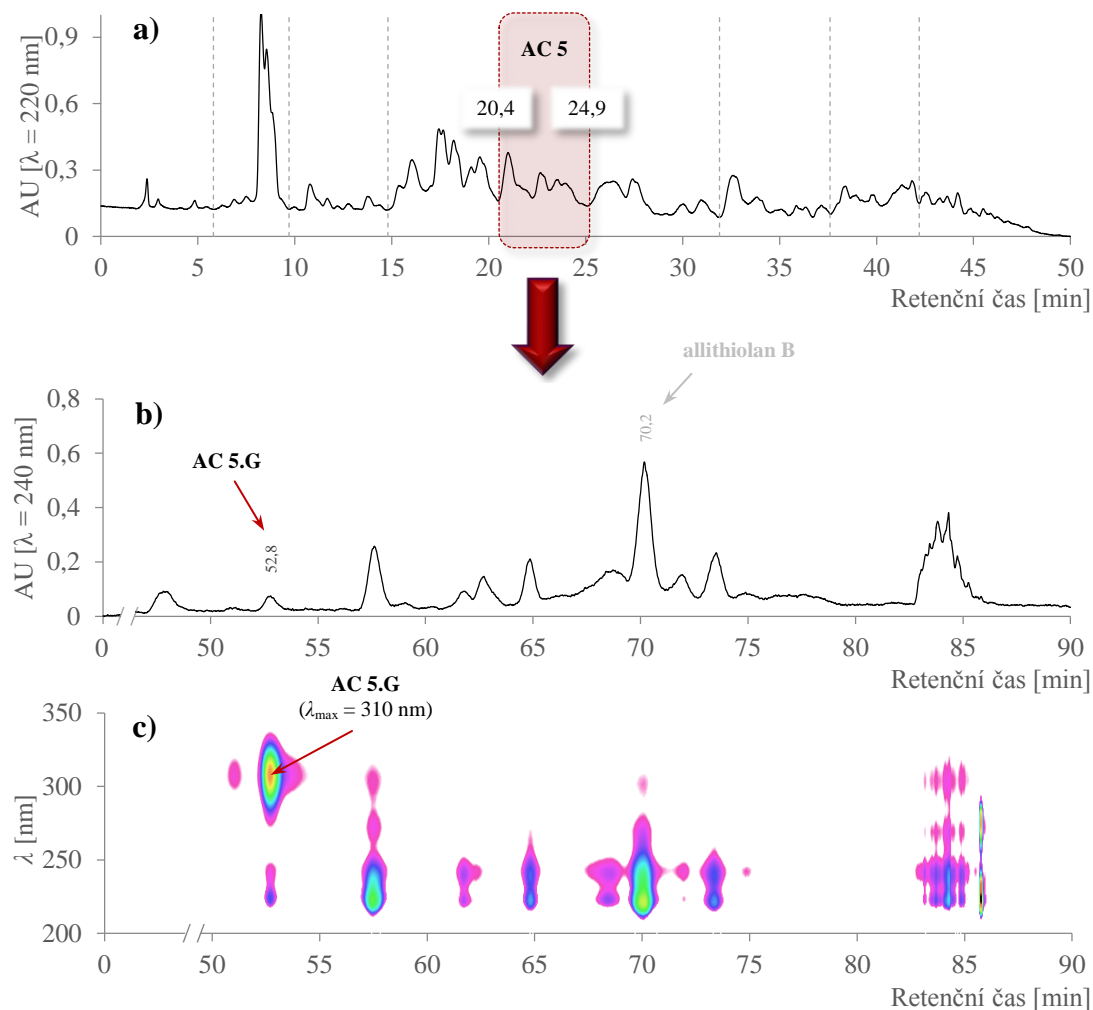


onionin C

Obrázek 77: Struktura onioninu C.

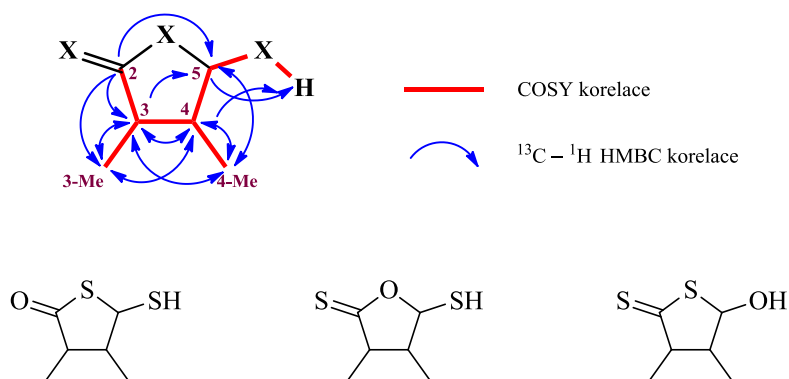
4.3.2 Cepadithiolakton A

Sloučenina AC 5.G, charakteristická svou velmi výraznou absorpcí v UV oblasti ($\lambda_{\max} = 310$ nm), byla izolována z frakce AC 5 extraktu cibule pomocí preparativní C8-HPLC ($t_r = 52,8$ min, **Obrázek 78b**). HRMS data této látky odpovídala elementárnímu složení $C_6H_{10}OS_2$ ($[M + H]^+$ experimentální 163,0248 Da; teoretická 163,0246 Da).



Obrázek 78: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:
a) cibule kuchyňské (Metoda A),
b) frakce AC 5 (Metoda B),
c) 2D chromatogram frakce AC 5 (Metoda B).

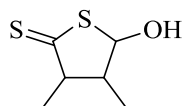
NMR analýza odhalila v izolovaném vzorku přítomnost celkem třech stereoizomerů. V souladu se zjištěným elementárním složením obsahovalo ^{13}C NMR spektrum každého izomeru celkem šest signálů odpovídajících dvěma CH_3 -skupinám (δ 12,4–17,3), třem CH atomům uhlíku (δ 50,0–89,5) a jedné $\text{C}=\text{X}$ skupině (δ 247,5–248,1). COSY, HSQC a HMBC NMR experimenty následně potvrdily, že tyto atomy uhlíku tvoří pětičlenný 3,4-dimethyl heterocyklus substituovaný v pozicích 2 a 5. Přítomnost jednoho vyměnitelného atomu vodíku v molekule byla potvrzena NMR experimenty provedenými v $\text{DMSO-}d_6$. V COSY a HMBC NMR spektrech vykazoval tento vodík korelace s H-5 resp. C-5/C-4 (**Obrázek 79**). V souladu s výše uvedenými daty byly celkem tři struktury uvedené na **Obrázku 79**.



Obrázek 79: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u AC 5.G (v DMSO- d_6 , horní obrázek). Možné struktury pro látku $C_6H_{10}OS_2$ vyhovující výše uvedeným datům (spodní obrázek).

Značně anomální ^{13}C NMR posun $C=X$ uhlíku (δ 247,5–248,1) jasně odpovídal γ -dithiolanktonové skupině $-SC(=S)CH-$,⁸⁶ naopak vyvrátil uspořádání odpovídající γ -thiolaktonu $-SC(=O)CH-$ nebo γ -thionolaktonu $-OC(=S)CH-$, neboť ^{13}C NMR posuny v těchto funkčních skupinách se pohybují kolem δ 209 resp. 222 (**Tabulka XII**).^{87,88} Přítomnost γ -dithiolanktonové části v molekule byla také v naprostém souladu s pozorovaným absorpčním maximem $\lambda_{max} = 310$ nm (λ_{max} γ -thio- a γ -thionolaktonů se pohybují kolem 235 a 250 nm).⁸⁹ IČ spektrum AC 5.G obsahovalo charakteristický signál při 3350 cm^{-1} odpovídající přítomnosti $-OH$ skupiny v molekule, což bylo podpořeno i MS/MS spektrem obsahujícím intenzivní ion $m/z = 145$ Da (tj. $[M + H]^+ - 18$) (**Příloha 9 a 13**).

Na základě výše uvedených spektrálních dat mohla být struktura izolované sloučeniny AC 5.G jednoznačně určena jako 5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-thion (**Obrázek 80**). Tato sloučenina dosud nebyla ve vědecké literatuře popsána. Dle všech dostupných informací se navíc jedná o vůbec první přirozeně se vyskytující γ -dithiolakton. Vzhledem k velmi blízké strukturální příbuznosti s cepathiolany A získala tato sloučenina triviální název cepadithiolakton A.

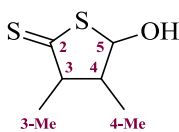


cepadithiolakton A

Obrázek 80: Struktura cepadithiolaktonu A.

Tabulka XII: ^1H a ^{13}C NMR data cepadithiolaktonů A₁, A₂ a A₃.^a

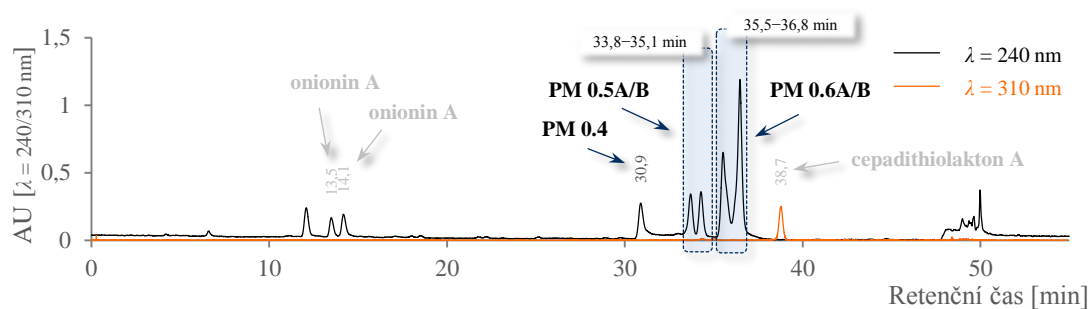
izomer	rozpuštědlo	5-OH	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2
A ₁	CDCl ₃	n. o. ^b	5,71 (d; 4,3)	2,28 (m)	1,30 (d; 7,1)	1,35 (d; 6,7)	2,72 (m)	
			85,44	50,66	14,10	16,21	59,24	248,13
	DMSO- <i>d</i> ₆	7,00 (d; 7,0)	5,75 (dd; 8,2; 7,2)	2,06 (ddq; 10,9; 8,2; 6,6)	1,18 (d; 6,6)	1,26 (d; 6,6)	2,53 (dq; 10,9; 6,6)	
			89,69	52,78	15,62	16,53	61,74	248,96
A ₂	CDCl ₃	n. o.	5,67 (d; 7,8)	2,16 (m)	1,31 (d; 6,9)	1,40 (d; 6,7)	2,46 (m)	
			89,51	54,07	16,42	17,28	62,73	246,45
	DMSO- <i>d</i> ₆	6,76 (d; 6,9)	5,77 (dd; 6,9; 4,6)	2,22 (ddq; 10,8; 4,6; 6,7)	1,15 (d; 6,7)	1,24 (d; 6,8)	2,71 (dq; 10,8; 6,8)	
			86,43	50,12	14,03	16,13	59,72	251,05
A ₃	CDCl ₃	n. o.	5,62 (d; 2,5)	2,85 (m)	1,03 (d)	1,29 (d)	3,35 (m)	
			89,47	50,04	12,42	14,26	58,49	247,52
	DMSO- <i>d</i> ₆	7,01 (d; 6,5)	5,71 (dd; 6,5; 3,2)	2,71 (m)	0,93 (d; 7,0)	1,17 (d; 7,0)	3,30 (m)	
			90,61	49,42	12,10	14,38	59,25	250,52

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz^b n. o. – nepozorováno**cepadithiolakton A**

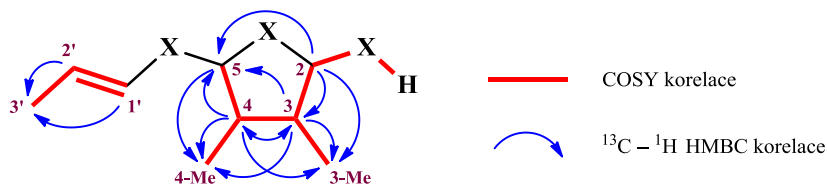
4.3.3 Cepathiolany

Cepathiolany A

Z extraktu modelové reakce A (viz **kap. 3.4.3**) byly preparativní C8-HPLC izolovány také píky PM 0.4–0.6 (**Obrázek 81**). Na základě získaných HRMS dat bylo zřejmé, že se jedná o stereoizomery elementárního složení $C_9H_{16}O_2S_3$ ($[M + Na]^+$ experimentální 275,0198–275,0206 Da; teoretická 275,0205 Da). Výsledky NMR (**Tabulka XIII**), MS/MS a IČ analýz jasně potvrdily, že izolované sloučeniny jsou (*E*)-*S*-(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl)-1-propenthiosulfináty (**Přílohy 10 a 13**). Dva stereoizomery těchto sloučenin, triviálně pojmenovaných jako cepathiolany A₁ a A₂, byly již dříve popsány Yoshidou a kol.¹² a Aoyagim a kol.¹³ Dle získaných NMR dat těmito dvěma známými stereoizomery odpovídají látky PM 0.6A a PM 0.6B, zatímco sloučeniny PM 0.4, PM 0.5A a PM 0.5B jsou dalšími, nově popsány stereoizomery, které byly analogicky pojmenovány cepathiolany A₃, A₄ a A₅.



Obrázek 81: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce A (isoalliin, methiin a alliinasa, reakce 1 min) (Metoda M).



Obrázek 82: COSY a HMBC NMR korelace pozorované u PM 0.4 (v DMSO-*d*₆).

Tabulka XIII: ^1H a ^{13}C NMR data cepathiolanů A.^a

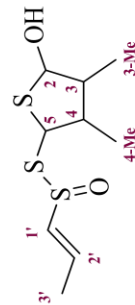
izomer	rozpuštědlo	3'	2'	1'	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	2-OH
PM 0-4	CDCl ₃	1,99	6,61	6,55	5,20	2,54	1,22	1,10	1,95	5,37	n, o, ^b
		(dd; 6,7; 1,4)	(dq; 14,8; 6,7)	(dq; 14,8; 1,4)	(d; 5,7)	(m)	(d; 6,8)	(m)	(m)	(m)	
PM 0-5A	DMSO- <i>d</i> ₆	17,59	136,01	132,23	61,45	44,33	15,10	12,34	47,14	83,33	5,90 (dt; 6,6)
		1,93	6,42	(dq; 14,7; 1,6)	5,24	2,52	1,07	0,95	1,78	5,33	
		16,88	134,51	133,22	60,62	43,90	14,96	12,35	46,22	82,92	
PM 0-5A	CDCl ₃	1,98	6,59	6,51	4,98	2,26	1,20	1,16	1,89	5,17	n, o,
		(dd; 6,8; 1,5)	(dq; 14,7; 6,8)	(dq; 14,7; 1,5)	(d; 5,0)	(ddq; 11,6; 5,0; 6,8)	(d; 6,8)	(m)	(m)	(m)	
PM 0-5A	DMSO- <i>d</i> ₆	17,55	135,85	132,28	61,93	48,25	16,14	15,10	50,82	89,05	6,21 (dt; 7,1)
		1,91	6,45	6,85	5,06	2,15	1,05	1,00	1,73	5,10	
		16,90	135,05	133,40	61,02	46,27	15,75	14,31	47,96	87,92	
PM 0-5B	CDCl ₃	1,99	6,62	6,51	4,57	2,22	1,24	1,13	1,92	5,26	n, o,
		(dd; 6,8; 1,6)	(dq; 14,8; 6,8)	(dq; 14,8; 1,6)	(d; 9,7)	(ddq; 12,1; 9,7; 6,5)	(d; 6,5)	(d; 6,7)	(ddq; 12,1; 3,6; 6,7)	(d; 3,6)	
PM 0-6A = A ₁	CDCl ₃	17,60	136,31	131,95	60,49	48,10	15,10	13,66	51,31	84,19	n, o,
		1,99	6,63	6,54	4,45	2,34	1,16	1,08	1,88	5,23	
		17,96	137,99	130,76	60,19	49,49	15,17	13,75	51,56	85,18	
PM 0-6B = A ₂	CDCl ₃	2,01	6,66	6,52	4,89	2,16	1,08	1,16	2,03	5,22	n, o,
		(dd; 6,9; 1,6)	(dq; 14,8; 6,9)	(dq; 14,8; 1,6)	(d; 4,1)	(ddq; 12,0; 4,1; 6,7)	(d; 6,7)	(d; 6,6)	(m)	(m)	
A ₁ ^c	CDCl ₃	17,95	137,66	128,97	59,82	48,82	14,57	14,50	48,70	90,76	n, o,
		2,00	6,64	6,55	4,45	2,34	1,16	1,09	1,89	5,24	
		18,02	138,10	130,62	60,22	49,54	15,19	13,80	51,57	85,23	
A ₂ ^d	CDCl ₃	2,00	6,65	6,52	4,87	2,10-2,19	1,07	1,15	1,99-2,06	5,20	n, o,
		(dd; 6,9; 1,7)	(dq; 14,9; 6,9)	(d; 14,9; 1,7)	(d; 4,0)	(ddq; 12,3; 6,4; 4,0)	(d; 6,4)	(d; 6,8)	(ddq; 12,3; 7,4; 6,8)	(d; 7,4)	
		18,02	137,72	129,19	59,93	48,95	14,60	14,67	48,83	90,87	
DMSO- <i>d</i> ₆		1,91	6,41	6,82	4,97	2,08-2,15	0,98	1,01	1,69-1,75	5,06	6,20 (dt; 7,5)
		(dd; 7,3; 1,7)	(dq; 14,7; 7,3)	(dq; 14,7; 1,7)	(d; 4,9)	(m)	(d; 6,4)	(d; 6,9)	(m)	(dd; 7,5; 7,5)	

^a chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty J v Hz

^b n. o. – nepozorováno

^c Yoshida a kol.^{1,2}

^d Aoyagi a kol.^{1,3}



cepathiolan A

Cepathiolany B a C

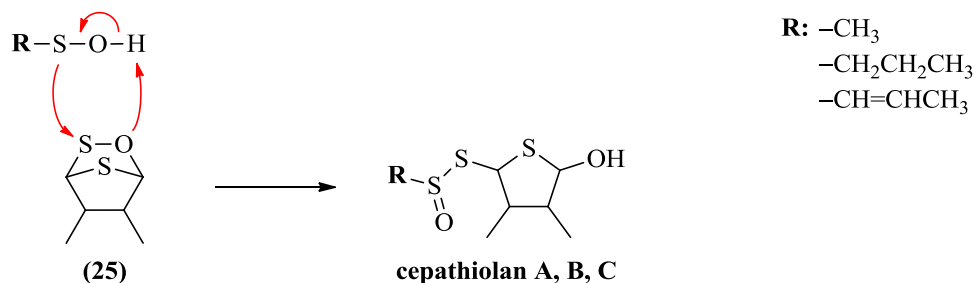
Přítomnost cepathiolanů A v cibulovém extraktu byla důvodem pro hledání také jejich methylových a propylových homologů, které dosud nebyly v odborné literatuře popsány. Skupiny sloučenin očekávaného elementárního složení ($C_7H_{14}O_2S_3$ a $C_9H_{18}O_2S_3$) byly skutečně pomocí HPLC-MS v cibulovém extraktu nalezeny, ovšem v koncentracích, které neumožňovaly jejich izolaci preparativní HPLC. Navzdory tomu získaná MS/MS spektra (**Příloha 11** a **12**) poskytla poměrně přesvědčivý důkaz o správnosti navržených struktur (**Obrázek 83**). Methylové resp. propylové homology cepathiolanu A tak získaly triviální označení cepathiolany B resp. cepathiolany C.



Obrázek 83: Struktury cepathiolanu B a C.

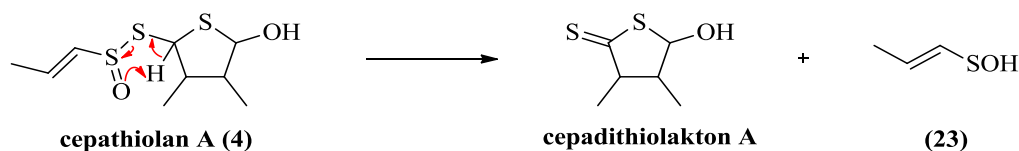
4.3.4 Mechanismy tvorby onioninů, cepadithiolaktonu a cepathiolanů

Jak již bylo uvedeno v úvodní části této práce (viz **kap. 2.4.3, Obrázek 27**), mechanismus tvorby cepathiolanů A, navržený Aoyagim a kol.¹³, sestává z reakce 1-propensulfenové kyseliny (**23**) se sultenem (**25**) vznikajícího z *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfínátu (**24**). Lze předpokládat, že i obě nově objevené skupiny cepathiolanů (cepathiolany B a C) vznikají analogickým mechanismem, tedy reakcí **25** s methansulfenovou (**27**) resp. propansulfenovou kyselinou (**28**) (**Obrázek 84**).



Obrázek 84: Mechanismus vzniku cepathiolanů A, B a C.

Cepadithiolakton A je patrně tvořen rozkladem cepathiolanů A–C dle schématu uvedeného na **Obrázku 85**. Analogickým mechanismem dochází k rozkladu thiosulfínátů na sulfenové kyseliny a thioaldehydy (viz **kap. 2.4.1, Obrázek 17**).



Obrázek 85: Mechanismus vzniku cepadithiolaktonu A rozkladem cepathiolanu (4).

Výše uvedený mechanismus vzniku cepadithiolaktonu A je v plném souladu s experimentálními pozorováními, neboť tvorba těchto látek byla zaznamenána během NMR analýz cepathiolanů A. Při těchto měřeních (v CDCl_3 i $\text{DMSO-}d_6$) docházelo k rozkladu cepathiolanů A za současného vzniku cepadithiolaktonů A.

Naopak mechanismus tvorby onioninů A–C zůstává nejasný.

4.3.5 Organoleptické vlastnosti

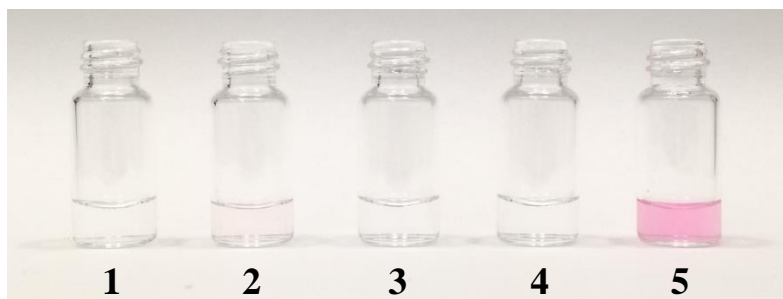
Senzorickou analýzu cepadithiolaktonu A (**Obrázek 78b**) a onioninu A (píky PM 1.10 a PM 1.14, **Obrázek 70b**) provádělo celkem 5 hodnotitelů (3 ženy, 2 muži; 29–51 let). Obě testované sloučeniny shodně vykazovaly jemné, příjemné aroma, připomínající tepelně upravenou cibuli s houbovým či mírně ořechovým nádechem. Všechny hodnocené vzorky měly velmi podobnou chuť, kterou bylo možné popsat jako příjemně cibulovou či česnekovou. Na rozdíl od allithiolanů žádný ze vzorků nevykazoval nepříjemnou, kovově hořkou chuť. Chuťový práh detekce pro cepadithiolakton A byl stanoven na 10 ppm, v případě onioninu A na 5 ppm. S přihlédnutím k relativně nízkým prahům detekce lze předpokládat, že onioniny A i cepadithiolaktony A pravděpodobně mají významný vliv na chuť i vůni zpracované cibule. Naopak příspěvek jejich methylových a propylových homologů, tedy onioninů B a C, je vzhledem k jejich množství pravděpodobně méně významný.

4.4 Proces růžovění

Tvorba růžového zbarvení je často pozorovaným jevem při zpracování cibule (viz **kap. 2.5.1**). Prekurzorem těchto sloučenin byl označen isoalliin, případně thiosulfináty obsahující 1-propenylový řetězec.^{17,19,73}

Za účelem zjištění, zdali se některé ze sloučenin popsaných v této práci mohou též podílet na procesu růžovění, byla pomocí modelového systému testována schopnost allithiolanu B a D, onioninu A, cepadithiolaktonu A a cepathiolanu A tvořit růžové zbarvení. Testovaná látka byla smíchána s vodným roztokem alaninu. Po 1 hodině byl do tohoto modelového systému přidán formaldehyd. Tvorba barevných sloučenin byla pozorována spektrofotometricky nárůstem absorpance při vlnové délce 510 nm.

Výsledky těchto experimentů jsou zachyceny na **Obrázku 86**. Intenzivní tvorbu barevných látek bylo možné pozorovat pouhým okem pouze u cepathiolanu A (vialka **5**), což je v souladu s prací Kata a kol.⁷³ Mnohem pomalejší a výrazně méně intenzivní tvorba růžového zbarvení byla zaznamenána v případě onioninu A (vialka **2**), zatímco ostatní testované látky poskytly negativní výsledek.

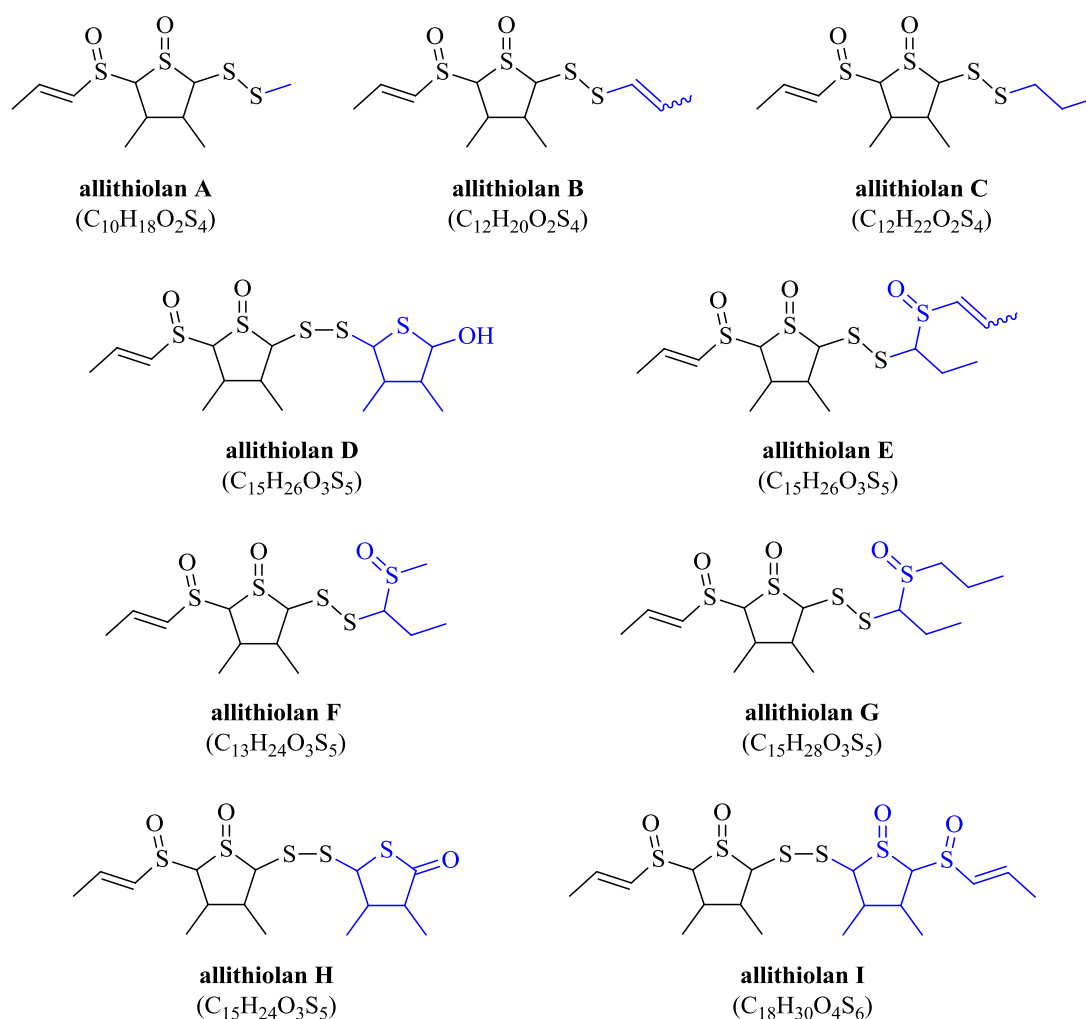


Obrázek 86: Tvorba růžového zbarvení testovaných látek: (1) allithiolan B, (2) onionin A, (3) allithiolan D, (4) cepadithiolakton A a (5) cepathiolan A.

Získané výsledky naznačují, že schopnost cepathiolanu A podílet se na tvorbě růžového zbarvení je spojena s přítomností skupiny $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})\text{S}-$ spíše než s přítomností thiolanového jádra. To odpovídá i závěrům předchozích studií, které označily za hlavní prekurzory těchto barevných látek thiosulfináty obsahující 1-propenylovou skupinu.^{17,19,73}

5 Závěr

Tato disertační práce ukázala, že kaskáda reakcí vyvolaná enzymově katalyzovaným rozkladem isoalliinu je výrazně komplexnější, než se doposud předpokládalo. V průběhu této práce se podařilo dokázat, že společně s LF, thiosulfináty, cepaeny, zwiebelany, bis-sulfiny, onioniny A a cepathiolany A při zpracování cibule spontánně vzniká ještě další, mimořádně rozsáhlá skupina dosud neznámých sloučenin triviálně pojmenovaných allithiolany A–I (**Obrázek 87**).



Obrázek 87: Struktury nově identifikovaných skupin allithiolanů A–I.

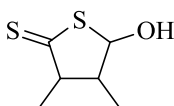
Allithiolany mohou negativně ovlivnit organoleptické vlastnosti homogenizované cibule kvůli jejich intenzivně hořké chuti. Jelikož je do tvorby allithiolanů zapojeno 3–6 molekul 1-propensulfenové kyseliny, lze odhadnout, že allithiolany náleží mezi sloučeniny, k jejichž tvorbě je využita velmi podstatná část z celkového množství

1-propensulfenové kyseliny, která je formována enzymově katalyzovaným rozkladem isoalliinu.

Přítomnost neznámých sloučenin molekulové hmotnosti 298 ($C_{10}H_{18}O_2S_4$), 324 ($C_{12}H_{20}O_2S_4$) a 326 Da ($C_{12}H_{22}O_2S_4$) v cibulových extraktech byla pozorována Blockem již před 25 lety.⁴⁷ Tento autor předpokládal, že tyto sloučeniny by mohly být skupinou izomerů se strukturou podobnou cepathiolanům A, ve které je hydroxylová skupina nahrazena skupinou $CH_3CH=CHS(O)-$. Výsledky této disertační práce však ukázaly, že těmito neznámými sloučeninami jsou s největší pravděpodobností allithiolany A, B a C.

Ačkoli je tvorba allithiolanů ve zpracované cibuli technologicky velmi nežádoucí, jedná se o zcela přirozený jev. Na základě provedených experimentů lze prohlásit, že patrně nebude možné vzniku allithiolanů zabránit bez současné ztráty charakteristických sensorických vlastností, pro které si cibule získala oblibu po celém světě. Patrně nejlepším doporučením pro běžné konzumenty, jak předejít zhořknutí cibule, je, aby cibuli zpracovávali až těsně před jejím vlastním použitím.

Z důvodu pohodlnějšího kuchyňského zpracování dává mnoho spotřebitelů přednost kultivarům cibule, které vykazují pouze mírné slzotvorné účinky (tzv. *tearless onions*). U běžných odrůd cibule je většina 1-propensulfenové kyseliny LFS okamžitě přeměněna na slzotvorný LF, zatímco u vyšlechtěných či geneticky modifikovaných odrůd cibule je aktivita LFS výrazně snížena.⁹⁰ Výsledky získané v této práci však naznačují, že potlačením aktivity LFS se cibule pravděpodobně stane během jejího zpracování mnohem náchylnější ke vzniku nepříjemné hořké chuti v důsledku zvýšené tvorby allithiolanů. Z těchto důvodů pak lze konstatovat, že cibule s potlačenou aktivitou LFS pravděpodobně nebude příliš vhodná pro průmyslové zpracování.



cepadithiolakton A

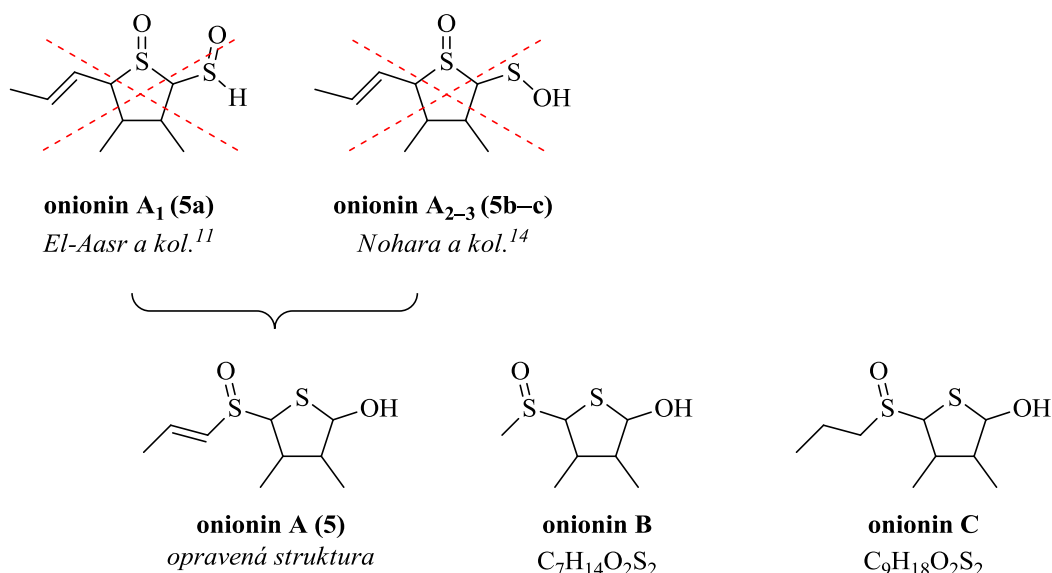


Obrázek 88: Struktura nově identifikované sloučeniny cepadithiolaktonu A.

Kromě allithiolanů A–I se v průběhu této práce podařilo izolovat a identifikovat ještě několik dalších, v odborné literatuře dosud nepopsaných sloučenin obsahujících 3,4-dimethylthiolanový skelet. Mezi tyto nově objevené látky patří tři

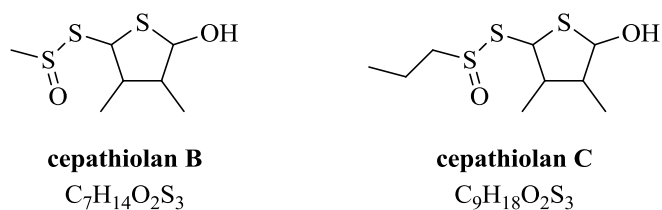
stereoizomery cepadithiolaktonu A (**Obrázek 88**), které jsou s největší pravděpodobností prvními známými zástupci přirozeně se vyskytujících γ -dithiolaktonů. Sensorické vlastnosti těchto sloučenin byly na rozdíl od allithiolanů přijímány pozitivně. Hodnotitelé přirovnávali jejich chuť a vůni k tepelně upravené cibuli nebo česneku s houbovým či ořechovým nádechem.

Během izolace a identifikace hořkých látek cibule kuchyňské byly izolovány také sloučeniny elementárního složení $C_9H_{16}O_2S_2$, které se již staly součástí dvou studií^{11,14} a pro svůj původ získaly triviální označení onioniny A. Rozporuplné závěry těchto prací byly důvodem pro ověření jejich struktury. Provedené analýzy potvrdily předpoklad, že původně navržené struktury onioninů A jsou nesprávné. Na základě průkazných spektroskopických dat byla struktura onioninů A určena jako (*E*)-3,4-dimethyl-5-(1-propenylsulfinyl)thiolan-2-ol (**Obrázek 87**).



Obrázek 89: Publikované struktury onioninu A (**5a-c**)^{11,14} a opravená struktura (**5**), struktury nově identifikovaných onioninů B a C.

Spolu s onioniny A byly v cibuli identifikovány ještě dvě další, ve vědecké literatuře dosud nepopsané skupiny jejich methylových a propylových homologů, triviálně nazvaných onioniny B a C (**Obrázek 89**). Dalšími nově nalezenými skupinami organosírných sloučenin jsou také cepathiolany B a C (**Obrázek 90**).



Obrázek 90: Nově identifikované organosírné sloučeniny cibule – cepathiolan B a C.

Podobně jako cepadithiolaktony A byly i onioniny A ze sensorického pohledu hodnotiteli přijímány kladně a jejich chuť a vůně byly přirovnávány k tepelně upravené cibuli nebo česneku s houbovým či ořechovým nádechem.

Nezodpovězenou otázkou ovšem stále zůstávají biologické vlastnosti nově objevených skupin 3,4-dimethylthiolanů popsaných v této práci. Vzhledem k celosvětové popularitě cibule se tak studium biologické aktivity těchto látek zdá být nanejvýš aktuální.

6 Literatura

- (1) Niegisch, W. D., & Stahl, W. H. (1956). The onion: gaseous emanation products. *Journal of Food Science*, *21*, 657–665.
- (2) Virtanen, A. I., & Spåre, G. G. (1961). Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*). *Suomen Kemistilehti*, *B*, *34*, 72.
- (3) Brodnitz, M. H., & Pascale, J. V. (1971). Thiopropanal *S*-oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *19*, 269–272.
- (4) Block, E., Bazzi, A. A., & Revelle, L. K. (1980). Dimer of the onion lachrymatory factor: the first stable 1,2-dithietane derivative. *Journal of the American Chemical Society*, *102*, 2490–2491.
- (5) Bayer, T., Wagner, H., Wray, V., & Dorsch, W. (1988). Inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase in onions. *Lancet*, *332*, 906.
- (6) Kawakishi, S., & Morimitsu, Y. (1988). New inhibitor of platelet aggregation in onion oil. *Lancet*, *332*, 330.
- (7) Bayer, T., Wagner, H., Block, E., Grisoni, S., Zhao, S. H., & Neszmélyi, A. (1989). Zwiebelanes: novel biologically active 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo-[2.1.1]hexane 5-oxides from onion. *Journal of the American Chemical Society*, *111*, 3085–3086.
- (8) Bayer, T., Breu, W., Seligmann, O., Wray, V., & Wagner, H. (1989). Biological active thiosulfinates and α -sulfinyldisulfides from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, *28*, 2313–2371.
- (9) Block, E., & Bayer, T. (1990). (*Z,Z*)-*d,l*-2,3-Dimethyl-1,4-butanedithial *S,S'*-dioxide: a novel biologically active organosulfur compound from onion. Formation of *vic*-disulfoxides in onion extracts. *Journal of the American Chemical Society*, *112*, 4584–4585.
- (10) Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T., & Kumagai, H. (2002). An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, *419*, 685.
- (11) El-Aasr, M., Fujiwara, Y., Takeya, M., Ikeda, T., Tsukamoto, S., Ono, M., ... & Nohara, T. (2010). Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products*, *73*, 1306–1308.

-
- (12) Yoshida, M.; Kameyama, M.; Hosoda, H.; Shimizu, Y.; Sakaue, K.; Washino, ... & Omoto, M. (2010). New thiolane compound and use thereof. Patent JP2010143866A.
- (13) Aoyagi, M., Kamoi, T., Kato, M., Sasako, H., Tsuge, N., & Imai, S. (2011). Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 10893–10900.
- (14) Nohara, T., Fujiwara, Y., Kudo, R., Yamaguchi, K., Ikeda, T., Murakami, K., ... & Takeya, M. (2014). Isolation and characterization of new onionins A₂ and A₃ from *Allium cepa*, and of onionins A₁, A₂, and A₃ from *Allium fistulosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *62*, 1141–1145.
- (15) Fukaya, M., Nakamura, S., Nakagawa, R., Nakashima, S., Yamashita, M., & Matsuda, H. (2017). Rare sulfur-containing compounds, kujounins A₁ and A₂ and *Allium* sulfoxide A₁, from *Allium fistulosum* ‘kujou’. *Organic Letters*, *20*, 28–31.
- (16) Silvaroli, J. A., Pleshinger, M. J., Banerjee, S., Kiser, P. D., & Golczak, M. (2017). Enzyme that makes you cry—crystal structure of lachrymatory factor synthase from *Allium cepa*. *ACS Chemical Biology*, *12*, 2296–2304.
- (17) Kubec, R., Hrbáčová, M., Musah, R. A., & Velíšek, J. (2004). *Allium* discoloration: precursors involved in onion pinking and garlic greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5089–5094.
- (18) Imai, S., Akita, K., Tomotake, M., & Sawada, H. (2006). Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in the blue-green discoloration of onion and garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 843–847.
- (19) Kubec, R., & Velíšek, J. (2007). *Allium* discoloration: The color-forming potential of individual thiosulfinates and amino acids: Structural requirements for the color-developing precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 3491–3497.
- (20) Kubec, R., Urajová, P., Lacina, O., Hajšlová, J., Kuzma, M., & Zápál, J. (2015). *Allium* discoloration: color compounds formed during pinking of onion and leek. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 10192–10199.
- (21) Schwimmer, S. (1967). Development of a bitter substance in onion juice. *Food Technology*, *21*, 292.

- (22) Schwimmer, S. (1968). Enzymatic conversion of *trans*-(+)-*S*-1-propenyl-L-cysteine *S*-oxide to the bitter and odor-bearing components of onion. *Phytochemistry*, 7, 401–404.
- (23) Kubec, R., Krejčová, P., Mansur, L., & García, N. (2013). Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in alliaceae species native to South Africa and South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1335–1342.
- (24) Fay, M. F., Rudall, P. J., & Chase, M. W. (2006). Molecular studies of subfamily Gilliesioideae (Alliaceae). *Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22, 367–371.
- (25) Friesen, N., Fritsch, R. M., & Blattner, F. R. (2006). Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22, 372–395.
- (26) Block E., Calvey E. M., Gillies C. W., Gillies J. Z., Uden P. (1997). Peeling the onion. In Johns T., Romeo J. T. (Eds.), *Functionality of Food Phytochemicals* (pp. 1–30). New York, NY: Plenum Press.
- (27) Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112, 3–22.
- (28) Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). *Faostat* [online]. [cit. 2018-07-31]. K dispozici: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- (29) Brewster, J. L. (2008). The classification, origins, distribution and economic importance of the major vegetable crops. In *Onions and Other Vegetable Alliums 2nd Edition* (pp. 1–30). UK: CABI.
- (30) Block, E. (2010). *Garlic and other Alliums: the lore and the science*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- (31) Kubec, R., Cody, R. B., Dane, A. J., Musah, R. A., Schraml, J., Vattekkatte, A., & Block, E. (2010). 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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1121–1128.

- (32) Alexieva, I., Mihaylova, D., & Popova, A. (2013). Evaluation of the antioxidant capacity of aqueous extracts of fresh *Chrysanthemum balsamita* L. leaves growing in Bulgaria. *University of Ruse Proceedings*, 52, 89–91.
- (33) Popova, A., Mihaylova, D., & Alexieva, I. (2014). Comparative study on the antioxidant activity of selected culinary plants growing in Bulgaria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 436–444.
- (34) Ezatpour, B., Azami, M., Motamedi, M., Rashidipour, M., Mahmoudvand, H., Alirezai, M., & Azadpour, M. (2016). Chemical composition, *in vitro* antibacterial and cytotoxicity effect of *Nectaroscordum tripedale* extract. *Herbal Medicines Journal*, 1, 29–36.
- (35) Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2008). *S*-Alkenyl cysteine sulfoxide and its antioxidant properties from *Allium cepa* var. *tropeana* (red onion) seeds. *Journal of Natural Products*, 71, 2036–2037.
- (36) Lancaster, J. E., & Collin, H. A. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkylcysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*, 22, 169–176.
- (37) Ichikawa, M., Ide, N., & Ono, K. (2006). Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4849–4854.
- (38) Kubec, R., Kim, S., McKeon, D. M., & Musah, R. A. (2002). Isolation of *S*-*n*-butylcysteine sulfoxide and six *n*-butyl-containing thiosulfates from *Allium siculum*. *Journal of Natural Products*, 65, 960–964.
- (39) Kubec, R., Velíšek, J., Musah, R. A. (2002): The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *Phytochemistry*, 60, 21–25
- (40) Kubec, R., & Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives – a comparative study. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6957–6963.
- (41) Edwards, S. J., Musker, D., Collin, H. A., & Britton, G. (1994). The analysis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) from species of *Allium* by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 5, 4–9.

- (42) Thomas, D. J., & Parkin, K. L. (1994). Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 1632–1638.
- (43) Yoo, K. S., & Pike, L. M. (1998). Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Scientia Horticulturae*, *75*, 1–10.
- (44) Kubec, R., Svobodová, M., & Velíšek, J. (2000). Distribution of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: S-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 428–433.
- (45) Virtanen, A. I., & Matikkala, E. J. (1959). The isolation of S-methyl-L-cysteine sulphoxide and S-n-propyl-L-cysteine sulphoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chemica Scandinavica*, *13*, 1898–1900.
- (46) Carson, J. F., & Wong, F. F. (1961). Isolation of (+)S-methyl-L-cysteine sulfoxide and of (+)S-n-propyl-L-cysteine sulfoxide from onions as their N-2,4-dinitrophenyl derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, *26*, 4997–5000.
- (47) Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition*, *31*, 1135–1178.
- (48) Wang, H., Li, J., Wang, Z., Zhang, X., & Ni, Y. (2007). Modified method for rapid quantitation of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide in yellow onions (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5429–5435.
- (49) Block, E., Naganathan, S., Putman, D., & Zhao, S. H. (1992). *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 2418–2430.
- (50) Carson, J. F., Lundin, R. E., & Lukes, T. M. (1966). The configuration of (+)-S-(1-propenyl)-L-cysteine S-oxide from *Allium cepa*. *Journal of Organic Chemistry*, *31*, 1634–1635.
- (51) Block, E., Dane, A. J., & Cody, R. B. (2011). Crushing garlic and slicing onions: detection of sulfenic acids and other reactive organosulfur

- intermediates from garlic and other *Alliums* using direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 186, 1085–1093.
- (52) Dorsch, W., Schneider, E., Bayer, T., Breu, W., & Wagner, H. (1990). Anti-inflammatory effects of onions: inhibition of chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes by thiosulfinates and cepaenes. *International Archives of Allergy and Immunology*, 92, 39–42.
- (53) Cavallito, C. J., & Bailey, J. H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1950–1951.
- (54) Cavallito, C. J., Buck, J. S., & Suter, C. M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1952–1954.
- (55) Shen, C., & Parkin, K. L. (2000). *In vitro* biogenesis of pure thiosulfinates and propanethial-S-oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6254–6260.
- (56) Shen, C., Hong, Z., & Parkin, K. L. (2002). Fate and kinetic modeling of reactivity of alkanesulfenic acids and thiosulfinates in model systems and onion homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2652–2659.
- (57) Kubec, R., Kim, S., & Musah, R. A. (2003). The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, 63, 37–40.
- (58) Morimitsu, Y., & Kawakishi, S. (1990). Inhibitors of platelet aggregation from onion. *Phytochemistry*, 29, 3435–3439.
- (59) Block, E., Thiruvazhi, M., Toscano, P. J., Bayer, T., Grisoni, S., & Zhao, S. H. (1996). *Allium* chemistry: Structure, synthesis, natural occurrence in onion (*Allium cepa*), and reactions of 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane S-oxides. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 2790–2798.
- (60) Fujiwara, Y., Horlad, H., Shiraishi, D., Tsuboki, J., Kudo, R., Ikeda, T., ... & Komohara, Y. (2016). Onionin A, a sulfur-containing compound isolated from onions, impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the protumoral and immunosuppressive functions of myeloid cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 2467–2480.

- (61) Tsuboki, J., Fujiwara, Y., Horlad, H., Shiraishi, D., Nohara, T., Tayama, S., ... & Tashiro, H. (2016). Onionin A inhibits ovarian cancer progression by suppressing cancer cell proliferation and the protumour function of macrophages. *Scientific Reports*, *6*, 29588.
- (62) Goto, K., Holler, M., & Okazaki, R. (1997). Synthesis, structure, and reactions of a sulfenic acid bearing a novel bowl-type substituent: the first synthesis of a stable sulfenic acid by direct oxidation of a thiol. *Journal of the American Chemical Society*, *119*, 1460–1461.
- (63) Goto, K., Shimada, K., Furukawa, S., Miyasaka, S., Takahashi, Y., & Kawashima, T. (2006). Formation of a stable sulfenic acid by hydrolysis of a thionitrate and a sulfenyl bromide. *Chemistry Letters*, *35*, 862–863.
- (64) Nohara, T., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Murakami, K., Ono, M., El-Aasr, M., ... & Kinjo, J. (2016). Two new bicyclic sulfoxides from Welsh onion. *Journal of Natural Medicines*, *70*, 260–265.
- (65) Lukes, T. M. (1986). Factors governing the greening of garlic puree. *Journal of Food Science*, *51*, 1577.
- (66) Kim, D. M., & Kim, K. H. (1990). On the development of flesh greening of the stored garlic. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *22*, 50–55.
- (67) Wang, D., Yang, X., Wang, Z., Hu, X., & Zhao, G. (2009). Isolation and identification of one kind of yellow pigments from model reaction systems related to garlic greening. *Food Chemistry*, *117*, 296–301.
- (68) Kubec, R., Curko, P., Urajová, P., Rubert, J., & Hajšlová, J. (2017). *Allium* discoloration: color compounds formed during greening of processed garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 10615–10620.
- (69) Joslyn, M. A., & Peterson, R. G. (1960). Food discoloration, reddening of white onion tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *8*, 72–76.
- (70) Yamaguchi, M., Shannon, S., Howard, F. D. & Joslyn, M. A. (1965). Factors affecting the formation of a pink pigment in purees of onion. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, *86*, 475–483.
- (71) Shannon, S., Yamaguchi, M., & Howard, F. D. (1967). Reactions involved in formation of a pink pigment in onion purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *15*, 417–422.

- (72) Shannon, S., Yamaguchi, M., & Howard, F. D. (1967). Precursors involved in the formation of pink pigments in onion purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *15*, 423–426.
- (73) Kato, M., Kamoi, T., Sasaki, R., Sakurai, N., Aoki, K., Shibata, D., & Imai, S. (2013). Structures and reactions of compounds involved in pink discoloration of onion. *Food Chemistry*, *139*, 885–892.
- (74) Frank, O., Blumberg, S., Kunert, C., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2007). Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1945–1954.
- (75) Kučerová, P., Kubec, R., Šimek, P., Václavík, L., & Schraml, J. (2011). *Allium* discoloration: the precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 1821–1828.
- (76) Kubec, R., Svobodová, M., & Velišek, J. (1999). Gas chromatographic determination of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *Journal of Chromatography A*, *862*, 85–94.
- (77) Patchornik, A., & Degani, Y. (1971). Selective cyanylation of sulfhydryl groups. II. Synthesis of 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid. *Journal of Organic Chemistry*, *36*, 2727–2728.
- (78) Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Weiner, L., & Wilchek, M. (1998). A spectrophotometric assay for alliinase (alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. *Analytical Biochemistry*, *265*, 317–325.
- (79) Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., & Rabinkov, A. (2002). A spectrophotometric assay for alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Analytical Biochemistry*, *307*, 76–83.
- (80) Block, E., Bayer, T., Naganathan, S., & Zhao, S. H. (1996). *Allium* Chemistry: synthesis and sigmatropic rearrangements of alk(en)yl 1-propenyl disulfide *S*-oxides from cut onion and garlic. *Journal of the American Chemical Society*, *118*, 2799–2810.

- (81) Block, E., Gulati, H., Putman, D., Sha, D., You, N., & Zhao, S. H. (1997). *Allium* chemistry: synthesis of 1-[alk(en)ylsulfanyl]propyl alk(en)yl disulfides (cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 4414–4422.
- (82) Kato, M., Masamura, N., Shono, J., Okamoto, D., Abe, T., & Imai, S. (2016). Production and characterization of tearless and non-pungent onion. *Scientific Reports*, *6*, 1–9.
- (83) Joyce, N. I., Eady, C. C., Silcock, P., Perry, N. B., & van Klink, J. W. (2013). Fast phenotyping of LFS-silenced (tearless) onions by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 1449–1456.
- (84) Nohara, T., Kiyota, Y., Sakamoto, T., Manabe, H., Ono, M., Ikeda, T., ... & Kinjo, J. (2012). Garlicnins B₁, C₁, and D, from the fraction regulating macrophage activation of *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *60*, 747–751.
- (85) Nohara, T., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Murakami, K., Ono, M., Nakano, D., & Kinjo, J. (2013). Cyclic sulfoxides garlicnins B₂, B₃, B₄, C₂, and C₃ from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *61*, 695–699.
- (86) Beck, T., & Mosandl, A. (1999). γ -Dithiolactones – analytical and sensory characteristics. *Journal of High Resolution Chromatography*, *22*, 421–423.
- (87) Roling, I., Schmarr, H. G., Eisenreich, W., & Engel, K. H. (1998). Analytical and sensory characterization of γ - and δ -thiolactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 668–672.
- (88) Shimotori, Y., Hoshi, M., Okabe, H., Miyakoshi, T., Kanamoto, T., & Nakashima, H. (2017). Synthesis, odour characteristics and antibacterial activities of the stereoisomeric forms of whisky lactone and its thiono analogues. *Flavour and Fragrance Journal*, *32*, 29–35.
- (89) Levine, J. A., Ferrendelli, J. A., & Covey, D. F. (1986). Alkyl-substituted thio-, thiono-, and dithio- γ -butyrolactones: new classes of convulsant and anticonvulsant agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *29*, 1996–1999.
- (90) Eady, C. C., Kamoi, T., Kato, M., Porter, N. G., Davis, S., Shaw, M., ... & Imai, S. (2008). Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile. *Plant Physiology*, *147*, 2096–2106.

7 Použité zkratky

4-SP	4-sulfanylpyridin
COSY	correlation spectroscopy
DART	direct analysis in real time
DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
DMSO	dimethylsulfoxid
EI	electron impact
ESI	electrospray ionization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FTIR	Fourier transformation infrared spectroscopy
GC	gas chromatography
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
IČ	infračervený
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LF	lachrymatory factor
LFS	lachrymatory-factor synthase
MCT	mercury-cadmium-tellurite
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
MWCO	molecular weight cut-off
NMR	nuclear magnetic resonance
NTB	2-nitro-5-thiobenzoát
PDA	photodiode array
ppm	parts per million
PTFE	polytetrafluorethylen
RDB	rings and double bonds

rpm	rotations per minute
RVO	rotační vakuová odparka
SPE	solid phase extraction
TD	taste dilution
TDA	taste dilution analysis
UV-vis	ultraviolet-visible

8 Publikační výstupy

Publikační výstupy související s disertační prací

Kubec, R., Štefanová, I., Moos, M., Urajová, P., Kuzma, M., & Zápál, J. (2018). Allithiolanes: nine groups of a newly discovered family of sulfur compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 8783–8794.

Štefanová, I., Zápál, J., Kuzma, M., & Kubec, R. Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. Připravováno k odeslání (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*).

Ostatní publikační výstupy

Kupcová K., Štefanová I., Kubec R. Senzoricky aktivní sirné sloučeniny houževnatce jedlého (*Lentinula edodes*). In *Sborník příspěvků z XLIV. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin: 25.–27. 5. 2015*. Skalský Dvůr, VŠCHT Praha, 2015, s. 170–174. ISBN 978-80-7080-937-2.

Štefanová I., Kubec R. Významné sirné metabolity česneku sicilského (*Nectaroscordum siculum*). In *Sborník příspěvků z XLV. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin: 23.–25. 5. 2016*. Skalský Dvůr, VŠCHT Praha, 2016, s. 154–157. ISBN 978-80-7080-968-2.

Kupcová K.; Štefanová I.; Kubec R. *Senzoricky aktivní sirné sloučeniny houževnatce jedlého (Lentinula edodes)*. XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 25.–27. 5. 2015 (poster).

Štefanová I.; Kubec R. *Významné sirné metabolity česneku sicilského (Nectaroscordum siculum)*. XLV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 23.–25. 5. 2016 (poster).

Kupcová, K., Štefanová, I., Plavcová, Z., Hošek, J., Hrouzek, P., & Kubec, R. (2018). Antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and antioxidant activity of culinary processed shiitake medicinal mushroom (*Lentinus edodes*, Agaricomycetes) and its major sulfur sensory-active compound – lenthionine. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20, 165–175.

9 Přílohy

Příloha 1: IUPAC názvy allithiolanů A–I.

Příloha 2: IUPAC názvy onioninů A–C, cepadithiolaktonu A a cepathiolanů A–C.

Příloha 3: MS/MS spektra allithiolanů A_{1–8}.

Příloha 4: MS/MS spektra allithiolanů A–I.

Příloha 5: NMR spektra allithiolanu A₈.

Příloha 6: IČ spektra allithiolanů A_{1–8}, B_{4–6}, D a E.

Přílohy 7: MS/MS spektra onioninu A.

Přílohy 8: MS/MS spektra onioninu A, B a C.

Přílohy 9: MS/MS spektra cepadithiolaktonu A.

Přílohy 10: MS/MS spektra cepathiolanu A.

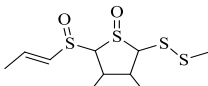
Přílohy 11: MS/MS spektra cepathiolanu B.

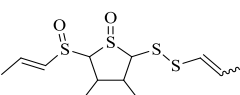
Přílohy 12: MS/MS spektra cepathiolanu C.

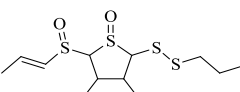
Příloha 13: IČ spektra onioninů A, cepadithiolaktonu A a cepathiolanu A.

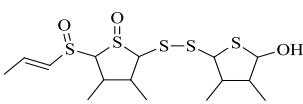
Příloha 14: EI/MS spektrum cepadiathiolaktonu A.

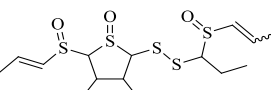
Příloha 1: IUPAC názvy allithiolanů A–I.

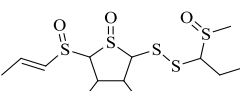
allithiolan A  (*E*)-3,4-dimethyl-2-(methylsulfanyl)-5-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)thiolan-1-oxid

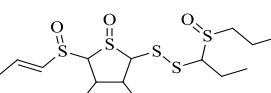
allithiolan B  3,4-dimethyl-2-(prop-1-en-1-ylsulfanyl)-5-((*E*)-prop-1-en-1-ylsulfinyl)thiolan-1-oxid

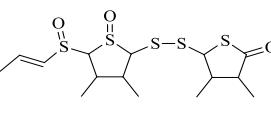
allithiolan C  (*E*)-3,4-dimethyl-2-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)-5-(propylsulfanyl)thiolan-1-oxid

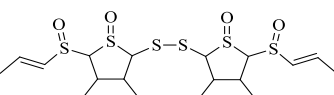
allithiolan D  (*E*)-2-((5-hydroxy-3,4-dimethyltetrahydrothiophen-2-yl)disulfanyl)-3,4-dimethyl-5-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)thiolan-1-oxid

allithiolan E  3,4-dimethyl-2-((*E*)-prop-1-en-1-ylsulfanyl)-5-((1-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)propyl)disulfanyl)thiolan-1-oxid

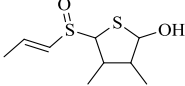
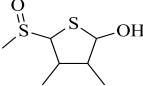
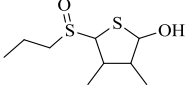
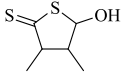
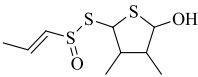
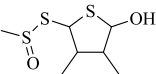
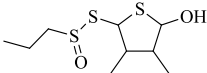
allithiolan F  (*E*)-3,4-dimethyl-2-((1-(methylsulfanyl)propyl)disulfanyl)-5-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)thiolan-1-oxid

allithiolan G  (*E*)-3,4-dimethyl-2-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)-5-((1-(propylsulfanyl)propyl)disulfanyl)thiolan-1-oxid

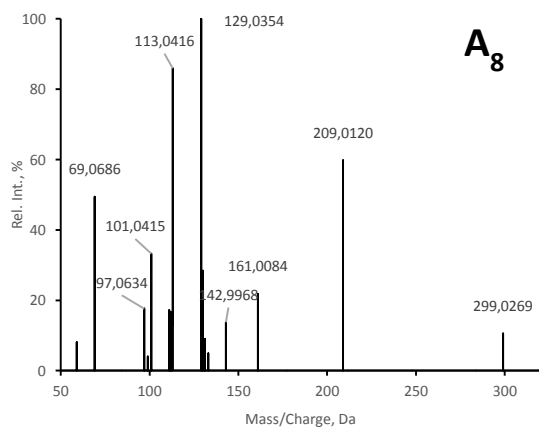
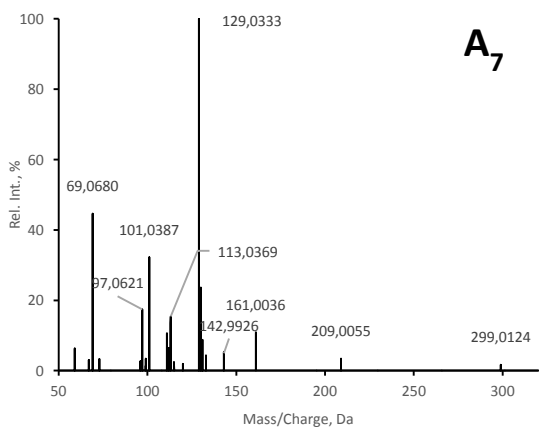
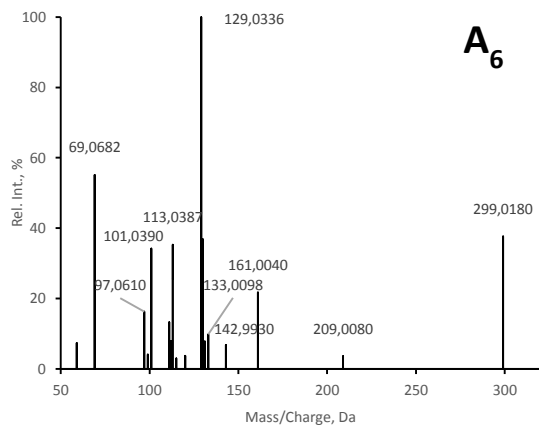
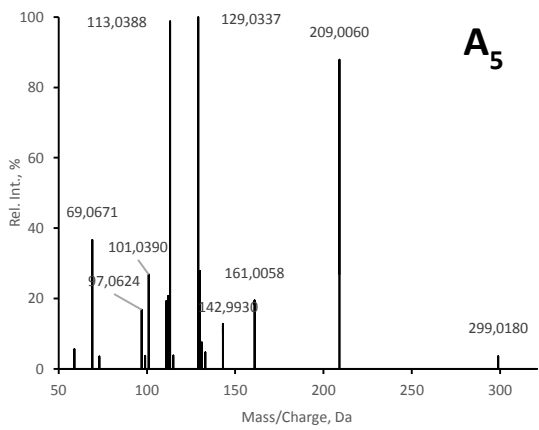
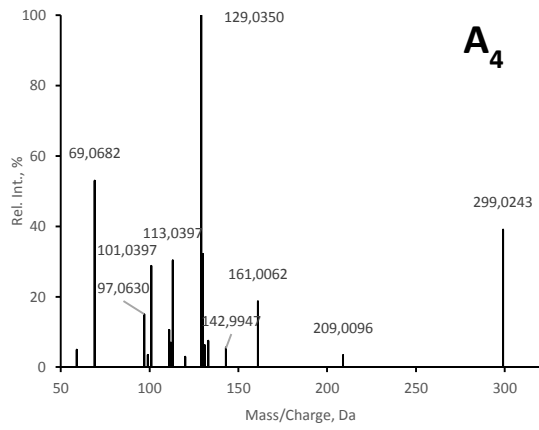
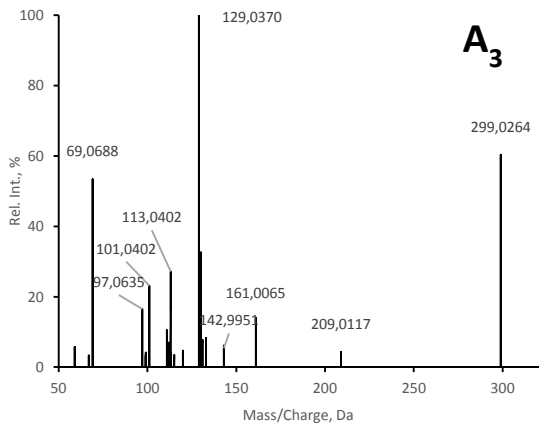
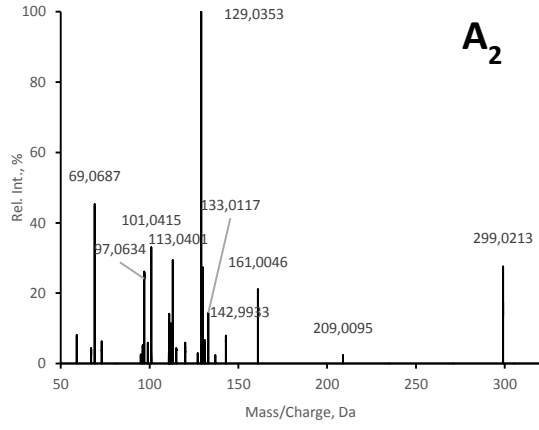
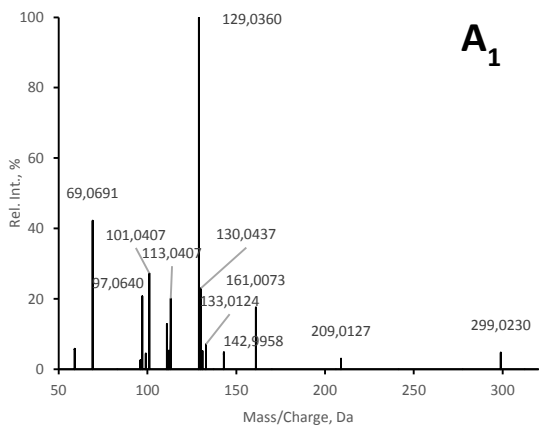
allithiolan H  (*E*)-5-((3,4-dimethyl-1-oxido-5-(prop-1-en-1-ylsulfinyl)tetrahydrothiophen-2-yl)disulfanyl)-3,4-dimethylthiolan-2(3H)-on

allithiolan I  (*E*)-5,5'-disulfanediylbis(3,4-dimethyl-2-((*E*)-prop-1-en-1-ylsulfinyl)thiolan-1-oxid)

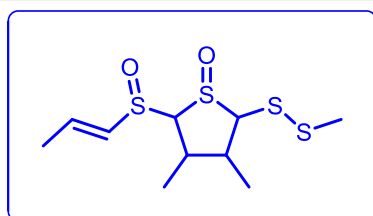
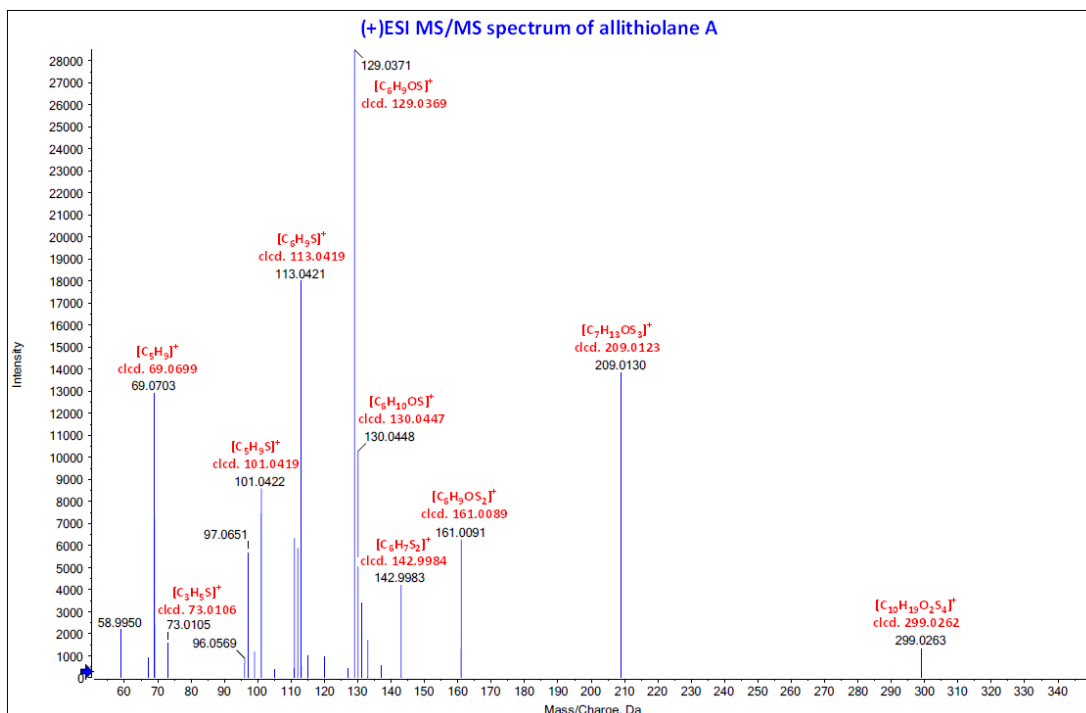
Příloha 2: IUPAC názvy onioninů A–C, cepadithiolaktonu A a cepathiolanů A–C.

onionin A		<i>(E)</i> -3,4-dimethyl-5-(prop-1-en-1-ylsulfanyl)thiolan-2-ol
onionin B		3,4-dimethyl-5-(methylsulfinyl)thiolan-2-ol
onionin C		3,4-dimethyl-5-(propylsulfinyl)thiolan-2-ol
cepathiolakton A		5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2(3H)-thion
cepathiolan A		<i>(E)</i> - <i>S</i> -(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl)prop-1-en-1-sulfinothioát
cepathiolan B		<i>S</i> -(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl)methansulfiniothioát
cepathiolan C		<i>S</i> -(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl)propan-1-sulfinothioát

Příloha 3: MS/MS spektra allithiolanů A₁₋₈.



Příloha 4: MS/MS spektra allithiolanů A–I.



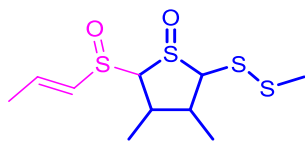
allithiolany A

$[M + H]^+$ teor. 299,0262 Da

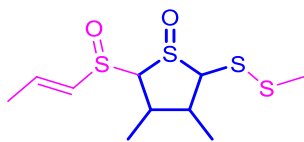
exp. 299,0254–299,0269 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

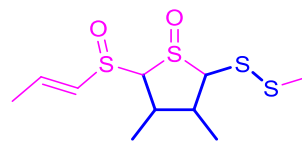
$[C_{10}H_{19}O_2S_4]^+$



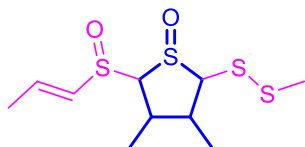
$[C_7H_{13}OS_3]^+$
209.0123 Da



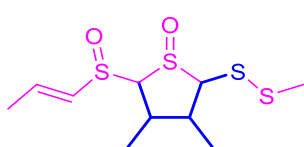
$[C_6H_9OS_2]^+$
161.0089 Da



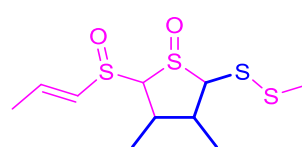
$[C_6H_7S_2]^+$
142.9984 Da



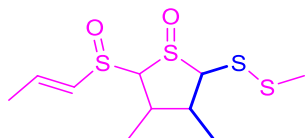
$[C_6H_{10}OS]^+$ $[C_6H_9OS]^+$
130.0447 Da 129.0369 Da



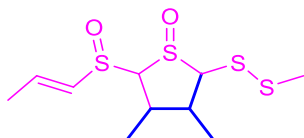
$[C_6H_9S]^+$
113.0419 Da



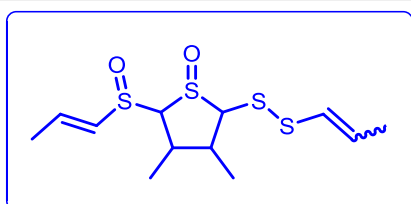
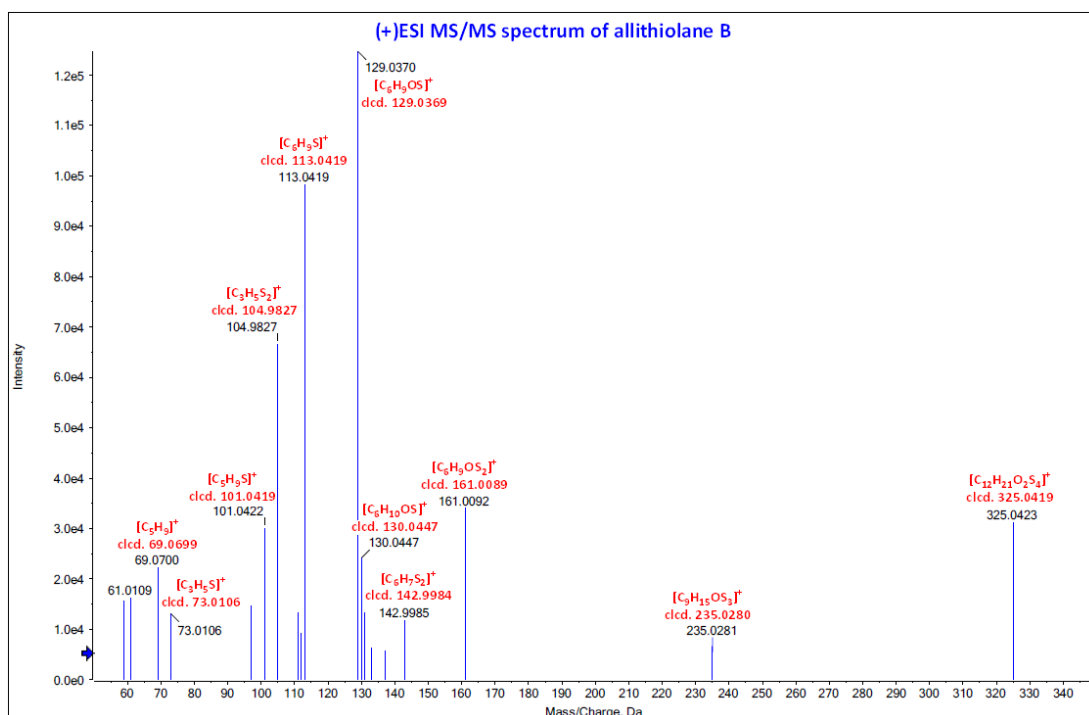
$[C_5H_9S]^+$
101.0419 Da



$[C_5H_5S]^+$
73.0106 Da



$[C_5H_9]^+$
69.0699 Da



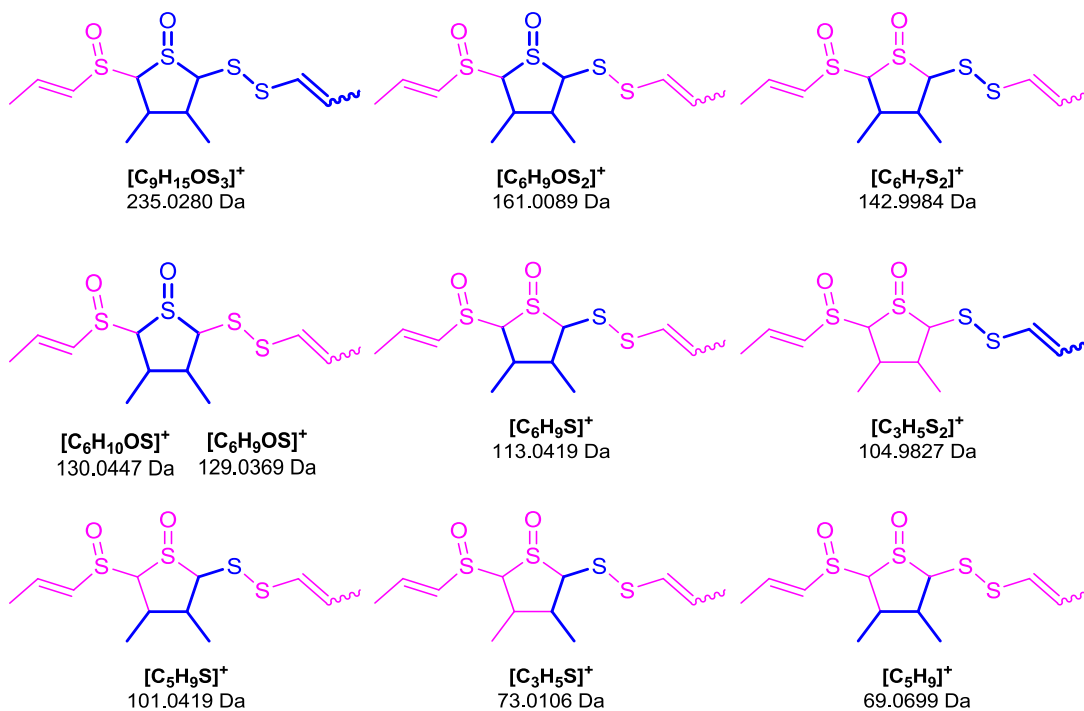
allithiolany B

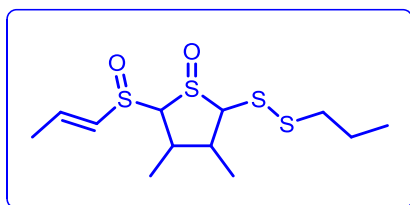
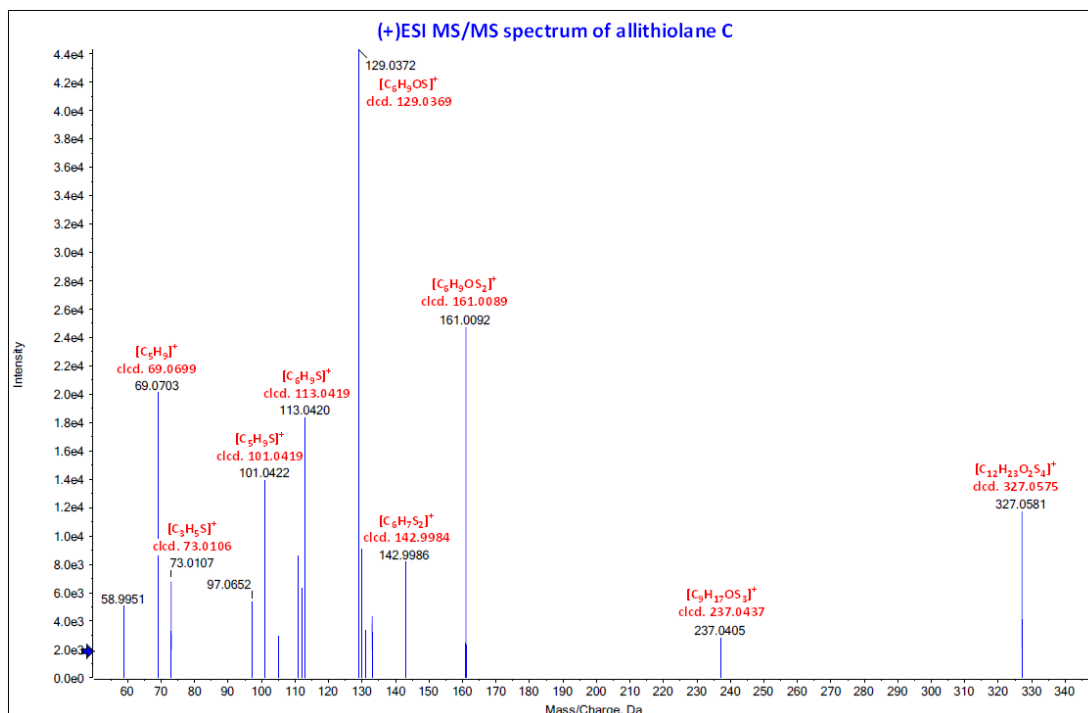
[M + H]⁺ teor. 325,0419 Da

exp. 325,0412–325,0421 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

[C₁₂H₂₁O₂S₄]⁺





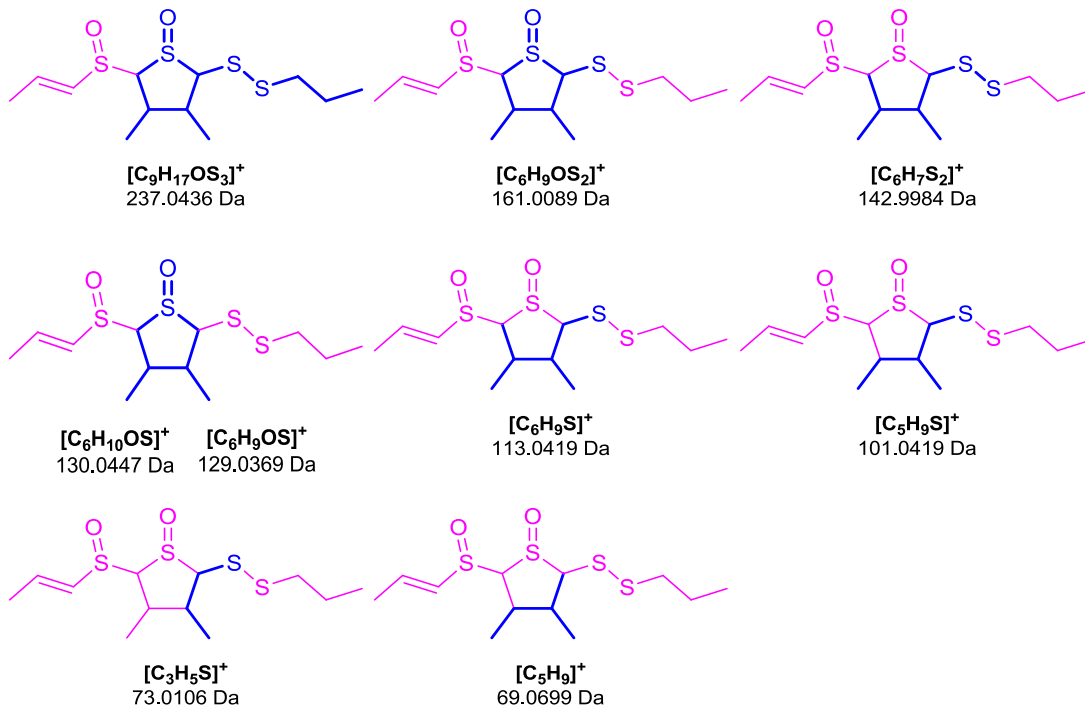
allithiolany C

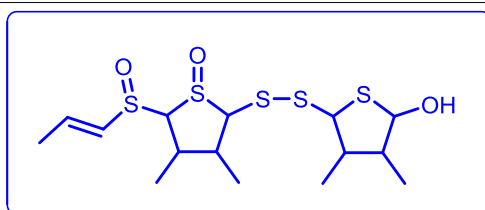
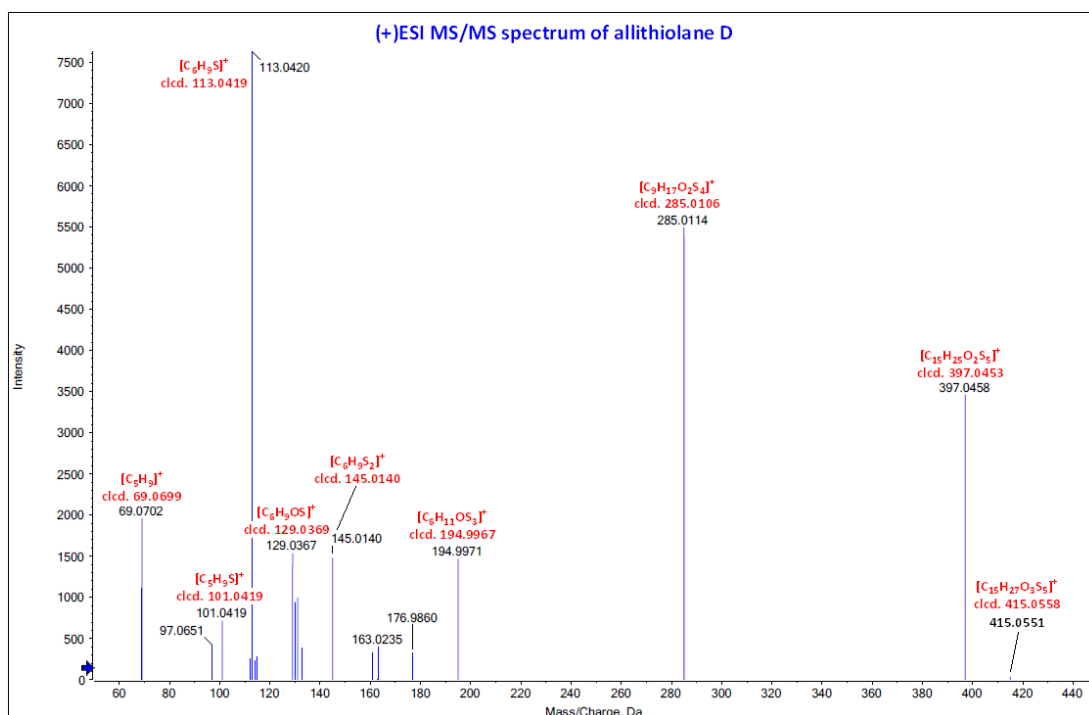
$[M + H]^+$ teor. 327,0575 Da

exp. 327,0569–327,0581 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

$[C_{12}H_{23}O_2S_4]^+$





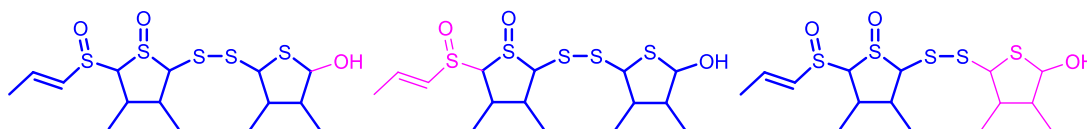
allithiolany D

[M + H]⁺ teor. 415,0558 Da

exp. 415,0551–415,0566 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

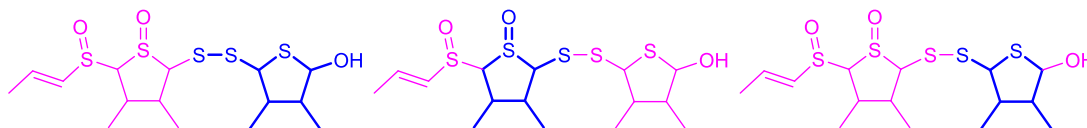
[C₁₅H₂₇O₂S₅]⁺



[C₁₅H₂₅O₂S₅]⁺
397.0453 Da

[C₁₂H₂₁O₂S₄]⁺
325.0419 Da

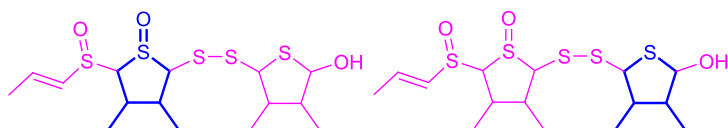
[C₉H₁₇O₂S₄]⁺
285.0106 Da



[C₆H₁₁OS₃]⁺
194.9967 Da

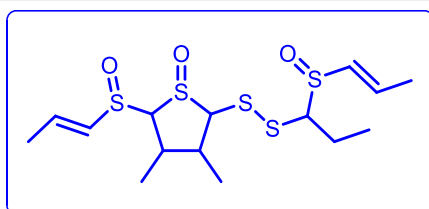
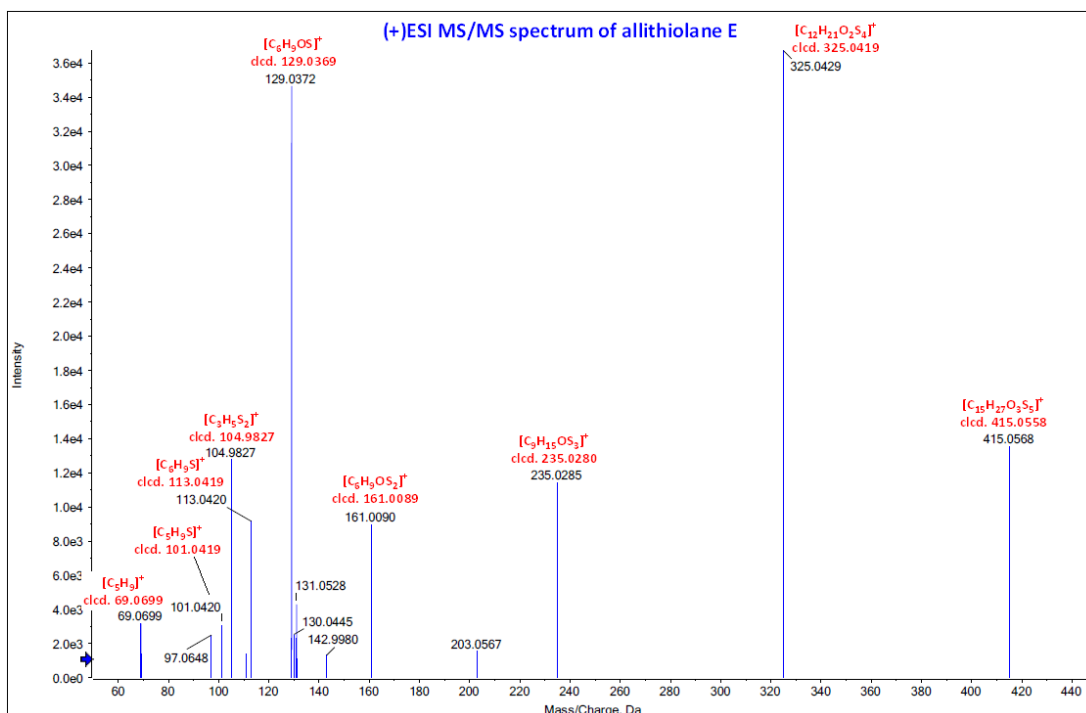
[C₆H₉OS₂]⁺
161.0089 Da

[C₆H₉S₂]⁺
145.0140 Da



[C₆H₉OS]⁺
129.0369 Da

[C₆H₉S]⁺
113.0419 Da



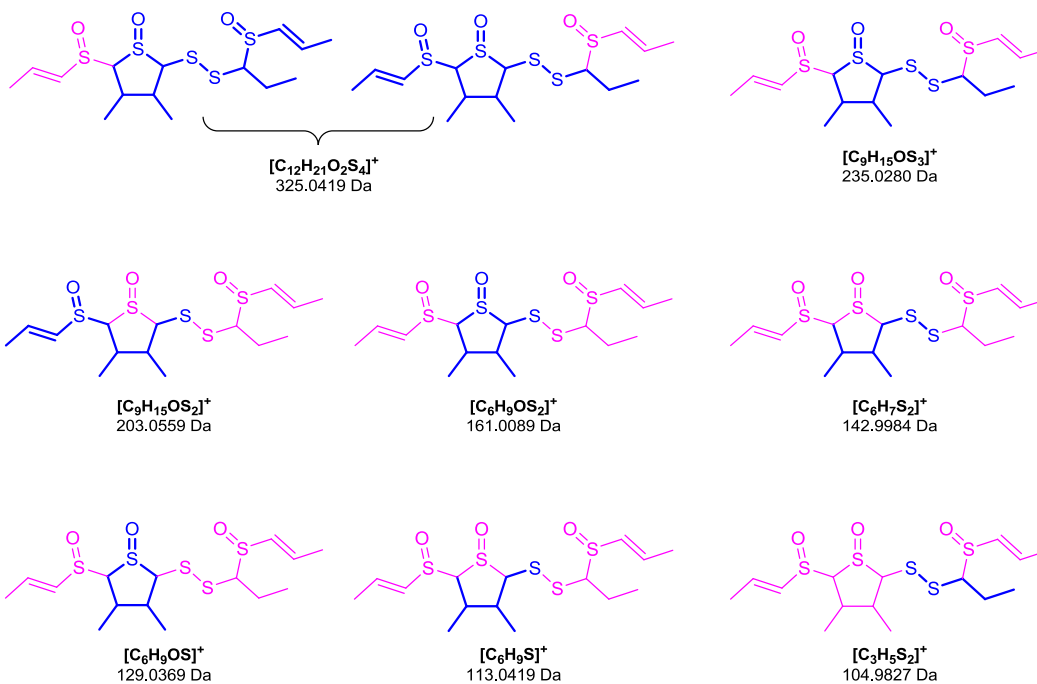
allithiolany E

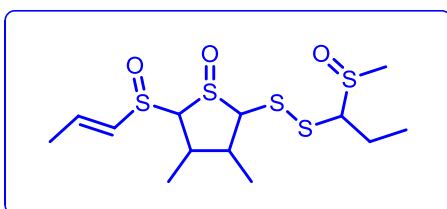
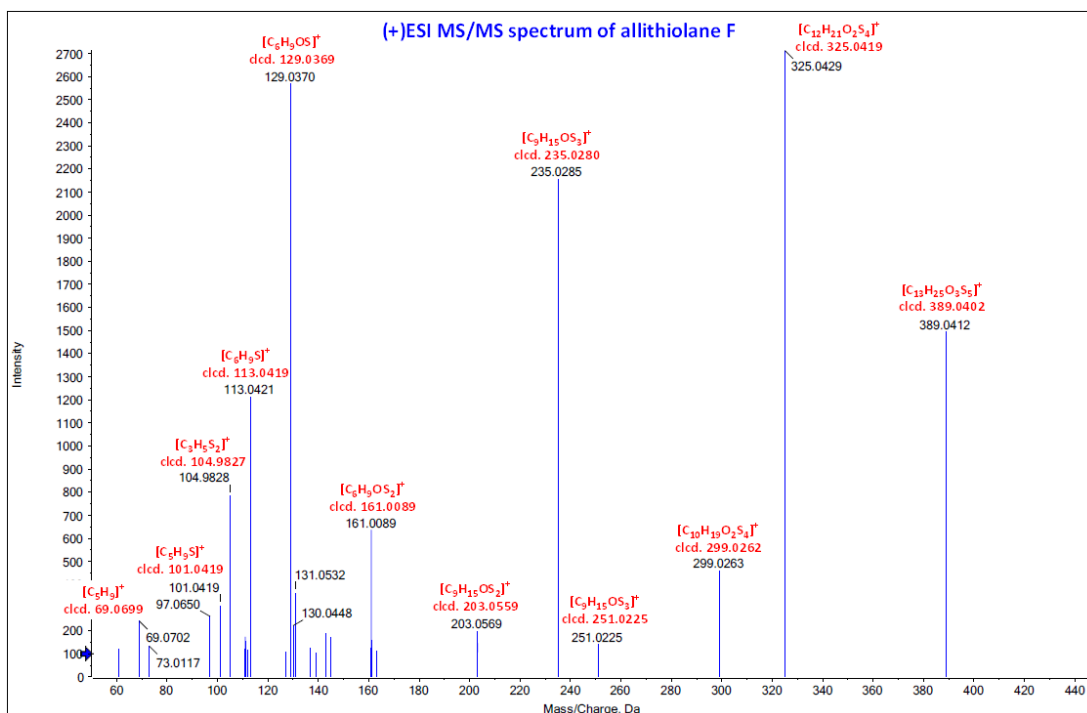
[M + H]⁺ teor. 415,0558 Da

exp. 415,0554–415,0567 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

[C₁₅H₂₇O₃S₅]⁺





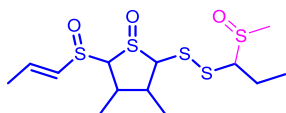
allithiolany F

$[M + H]^+$ teor. 389,0402 Da

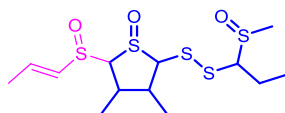
exp. 389,0398–389,0409 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

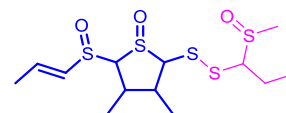
$[C_{13}H_{25}O_3S_5]^+$



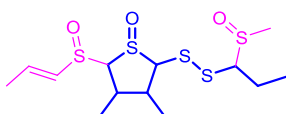
$[C_{12}H_{21}O_2S_4]^+$
325.0419 Da



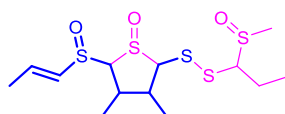
$[C_{10}H_{19}O_2S_4]^+$
299.0262 Da



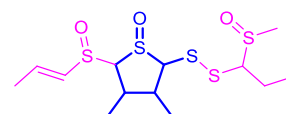
$[C_9H_{15}OS_3]^+$
251.0225 Da



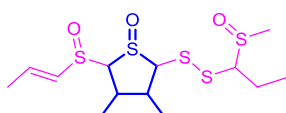
$[C_9H_{15}OS_3]^+$
235.0280 Da



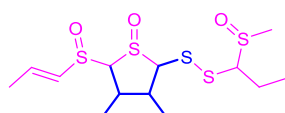
$[C_9H_{15}OS_2]^+$
203.0559 Da



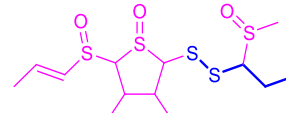
$[C_6H_9OS_2]^+$
161.0089 Da



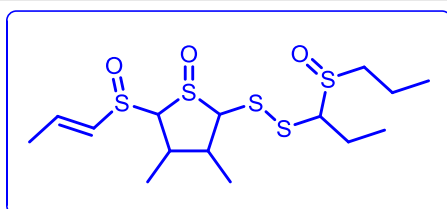
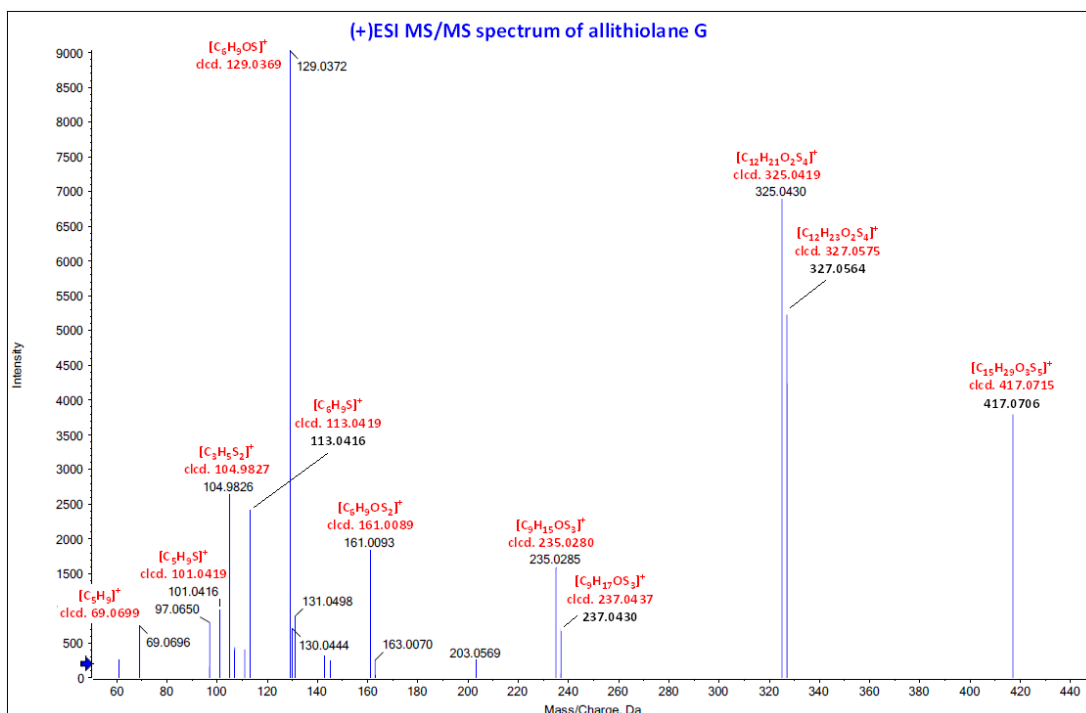
$[C_6H_9OS]^+$
129.0369 Da



$[C_6H_9S]^+$
113.0419 Da



$[C_3H_5S_2]^+$
104.9827 Da



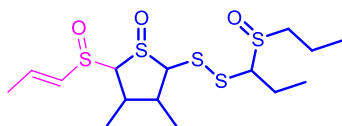
allithiolany G

[M + H]⁺ teor. 417,0715 Da

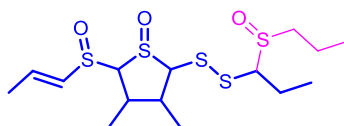
exp. 417,0714–415,0724 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

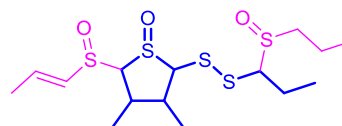
[C₁₅H₂₉O₃S₅]⁺



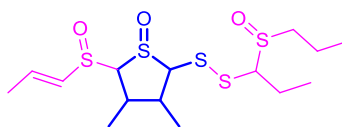
[C₁₂H₂₃O₂S₄]⁺
327.0575 Da



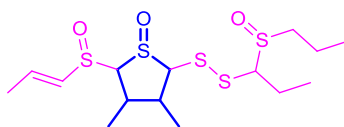
[C₁₂H₂₁O₂S₄]⁺
325.0419 Da



[C₉H₁₅OS₃]⁺
235.0280 Da



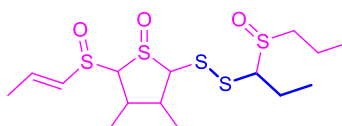
[C₆H₉OS₂]⁺
161.0089 Da



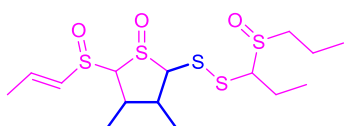
[C₆H₉OS]⁺
129.0369 Da



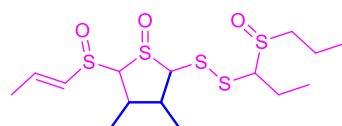
[C₆H₉S]⁺
113.0419 Da



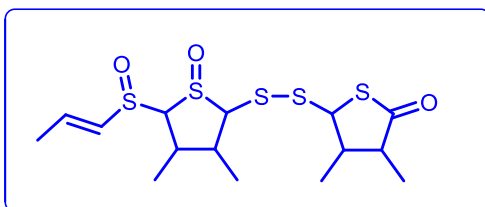
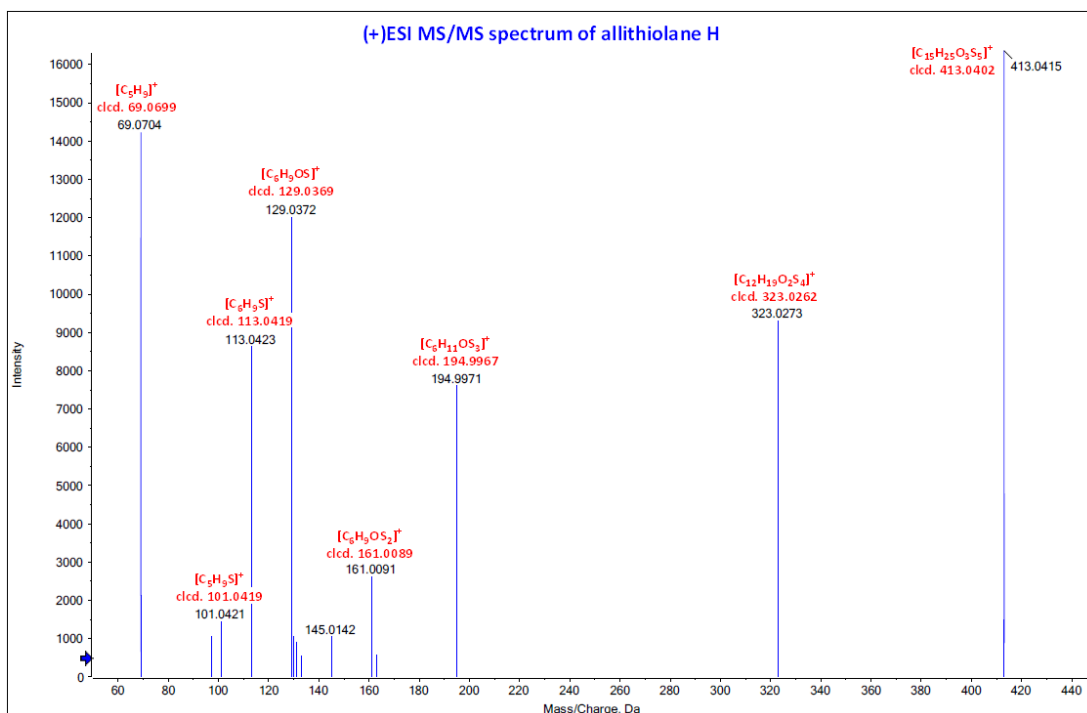
[C₃H₅S₂]⁺
104.9827 Da



[C₅H₉S]⁺
101.0419 Da



[C₅H₉]⁺
69.0699 Da



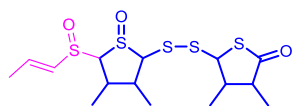
allithiolany H

$[M + H]^+$ teor. 413,0402 Da

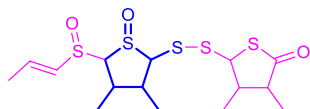
exp. 413,0397–413,0408 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

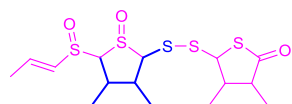
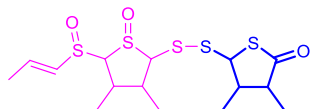
$[C_{15}H_{25}O_3S_5]^+$



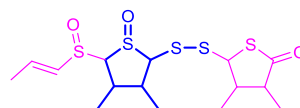
$[C_{12}H_{19}O_2S_4]^+$
323.0262 Da



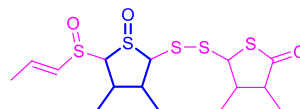
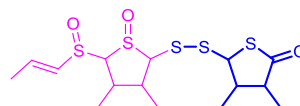
$[C_6H_9OS_2]^+$
161.0089 Da



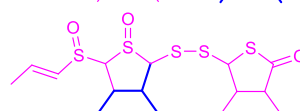
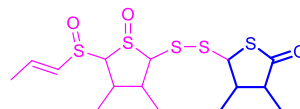
$[C_6H_9S]^+$
113.0419 Da



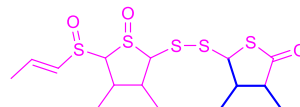
$[C_6H_{11}OS_3]^+$
194.9967 Da

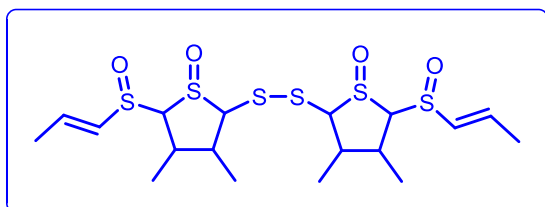
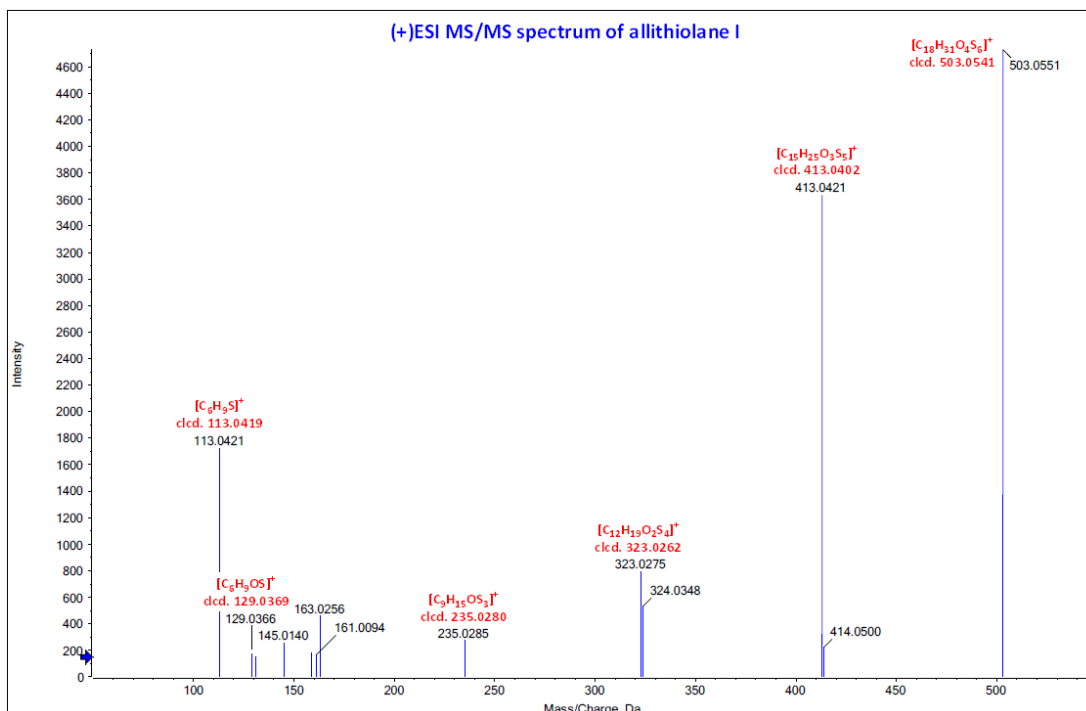


$[C_6H_9OS]^+$
129.0369 Da



$[C_5H_9]^+$
69.0699 Da





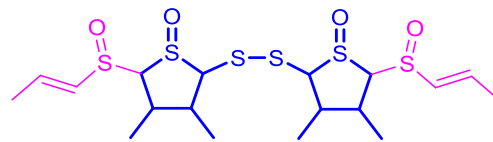
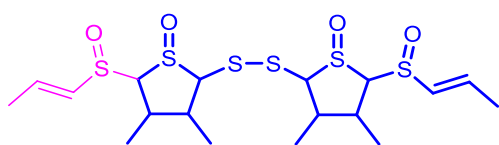
allithiolany I

$[M + H]^+$ teor. 503,0541 Da

exp. 503,0535–503,0551 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

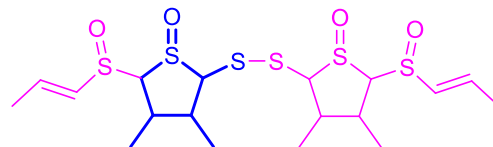
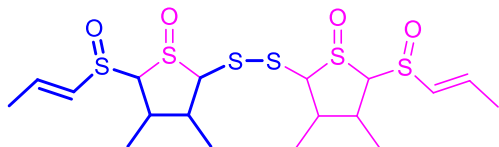
$[C_{18}H_{31}O_4S_6]^+$



$[C_{15}H_{25}O_3S_5]^+$
413.0402 Da

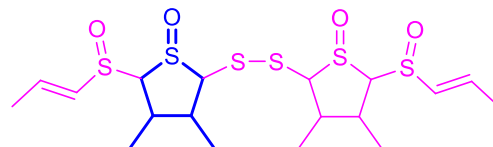
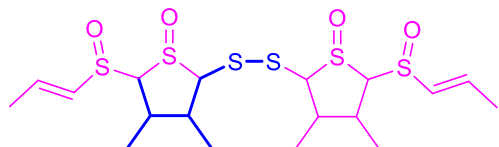
$[C_{12}H_{20}O_2S_4]^+$
324.0341 Da

$[C_{12}H_{19}O_2S_4]^+$
323.0262 Da



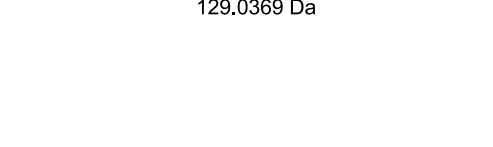
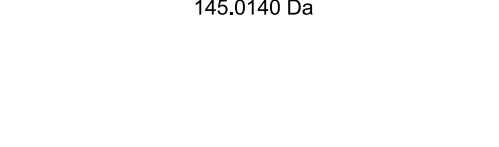
$[C_9H_{15}OS_3]^+$
235.0280 Da

$[C_6H_{11}OS_2]^+$
163.0246 Da



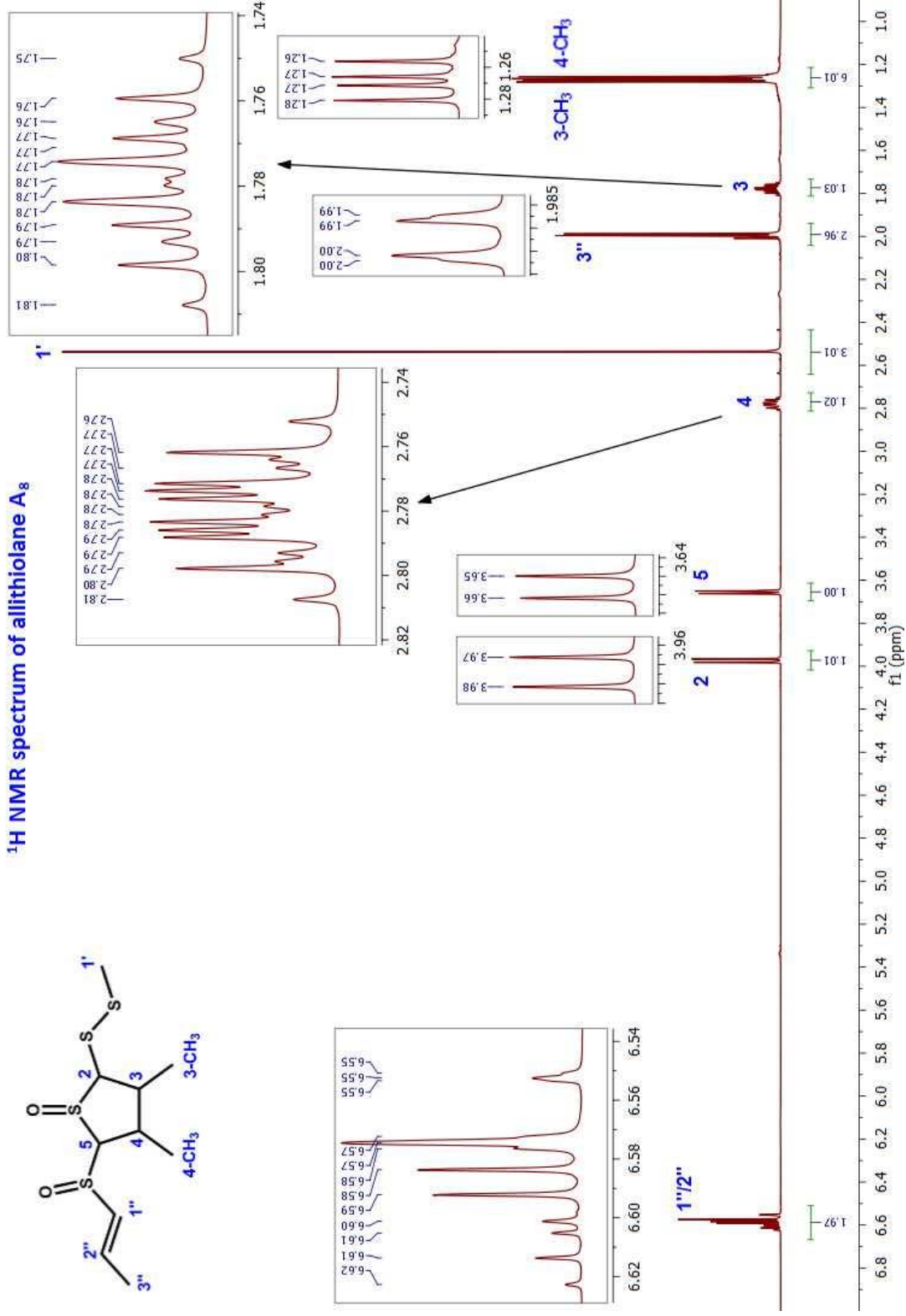
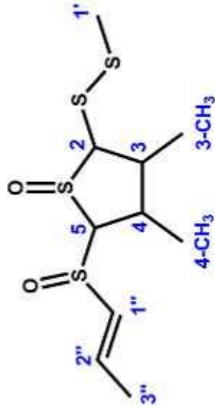
$[C_6H_9S_2]^+$
145.0140 Da

$[C_6H_9OS]^+$
129.0369 Da

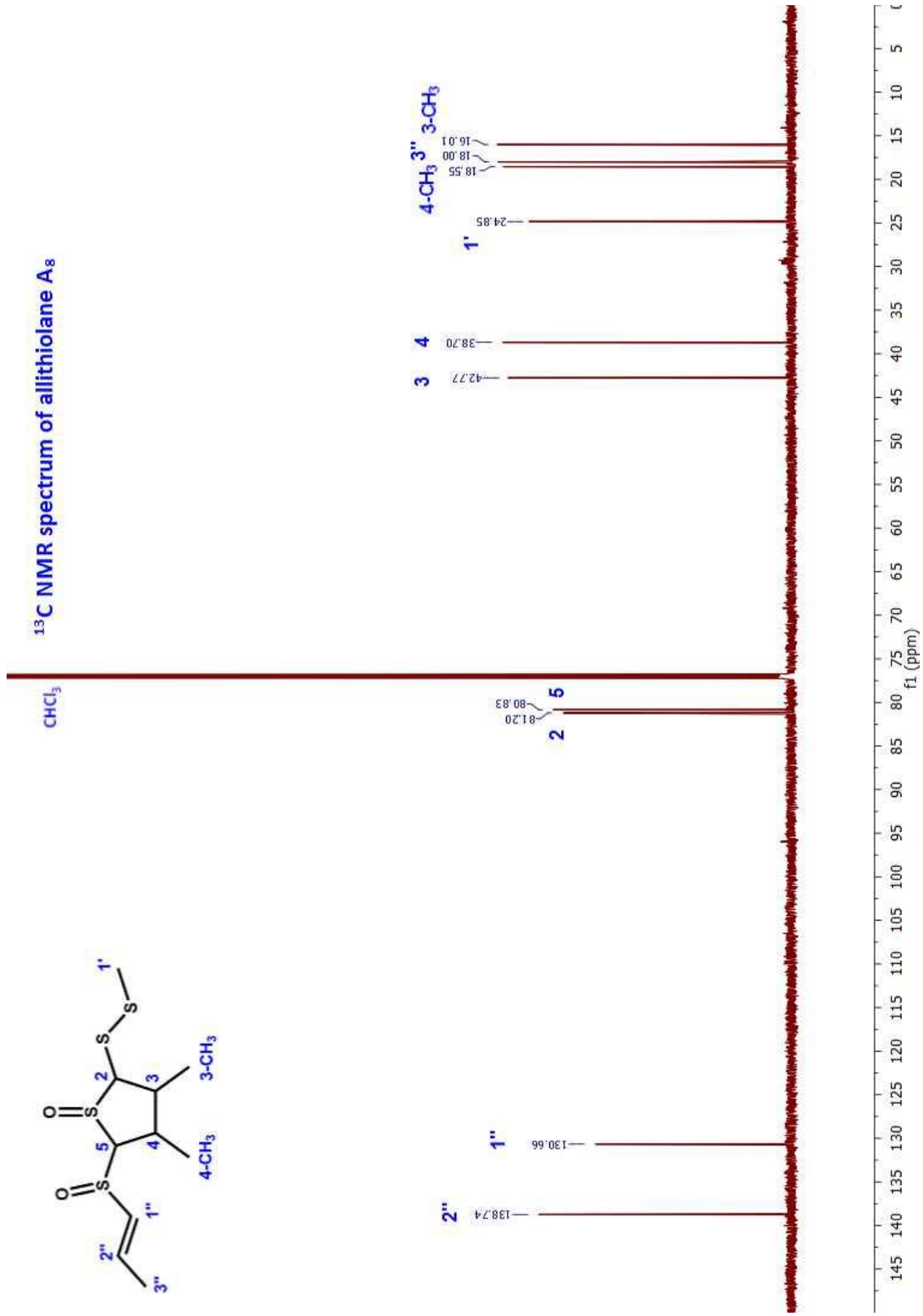
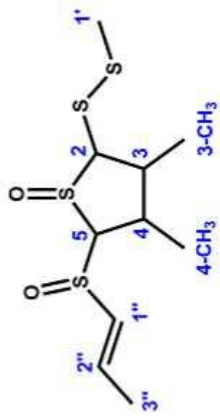


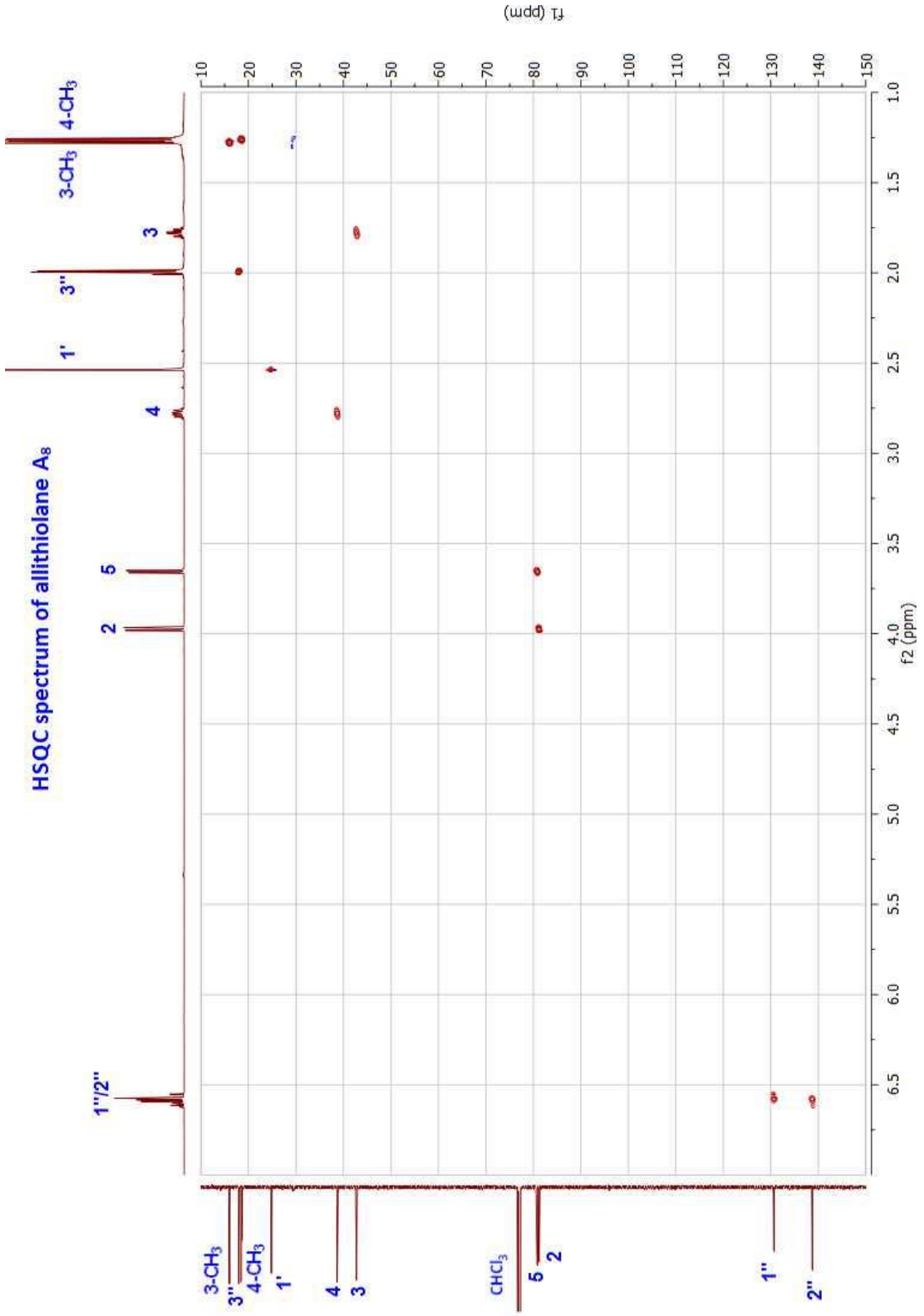
Příloha 5: NMR spektra allithiolanu A8.

¹H NMR spectrum of allithiolane A₈

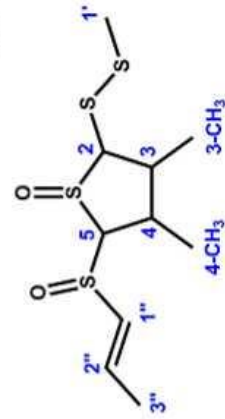
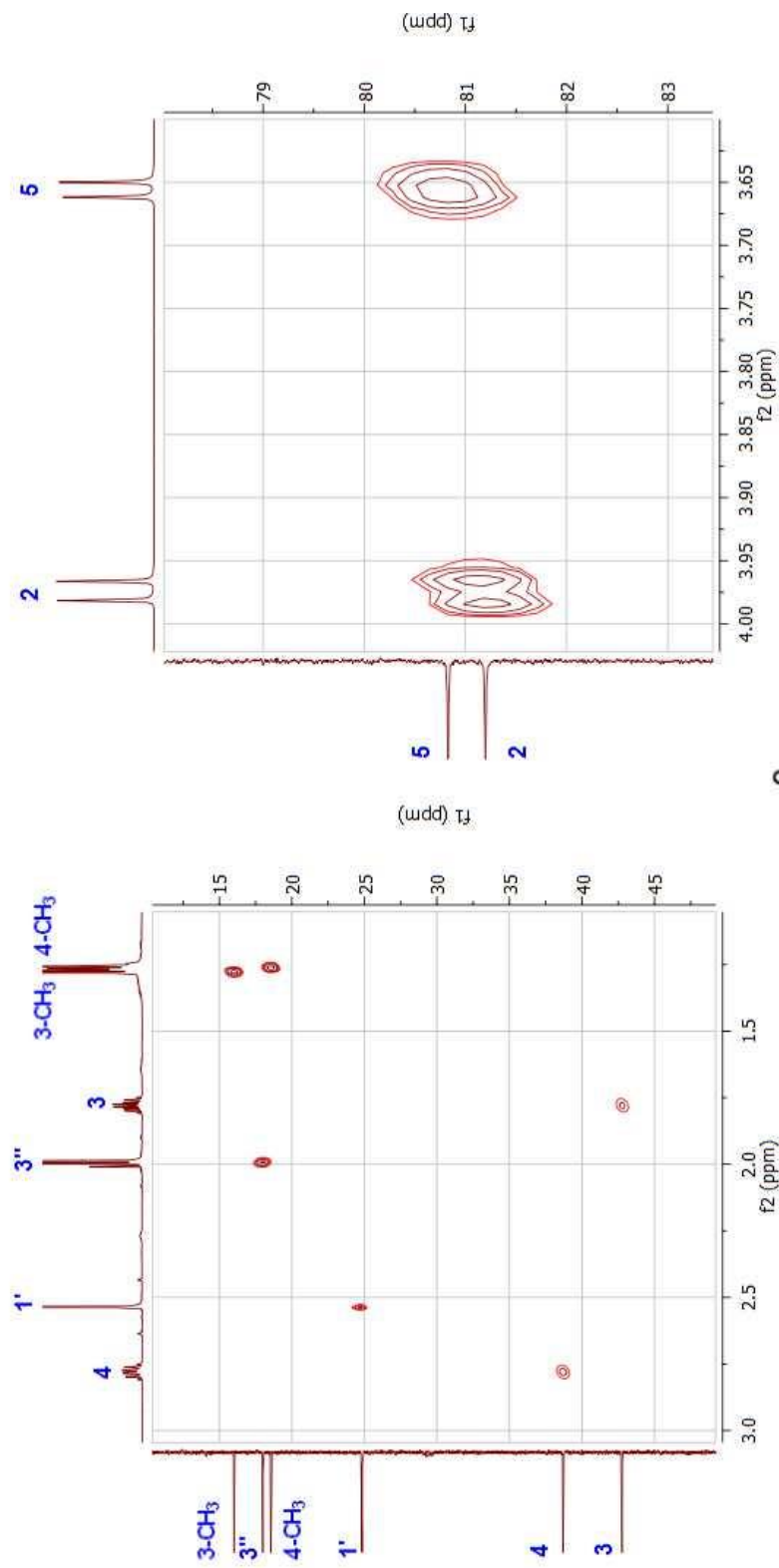


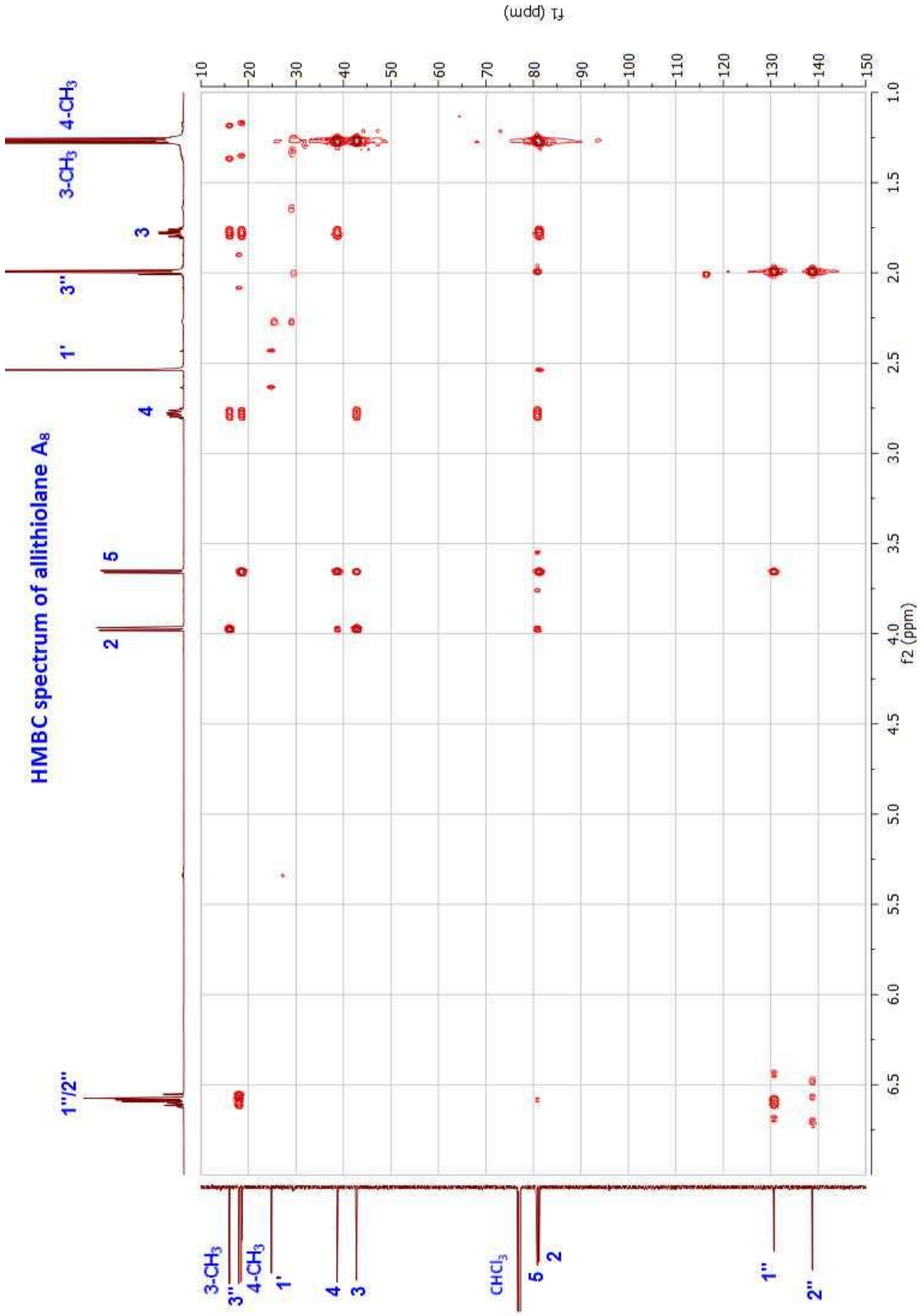
¹³C NMR spectrum of allithiolane A₈



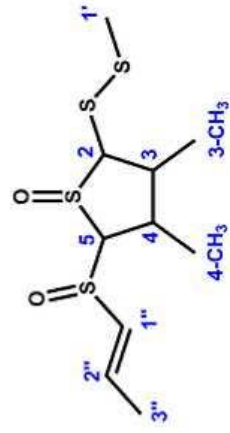
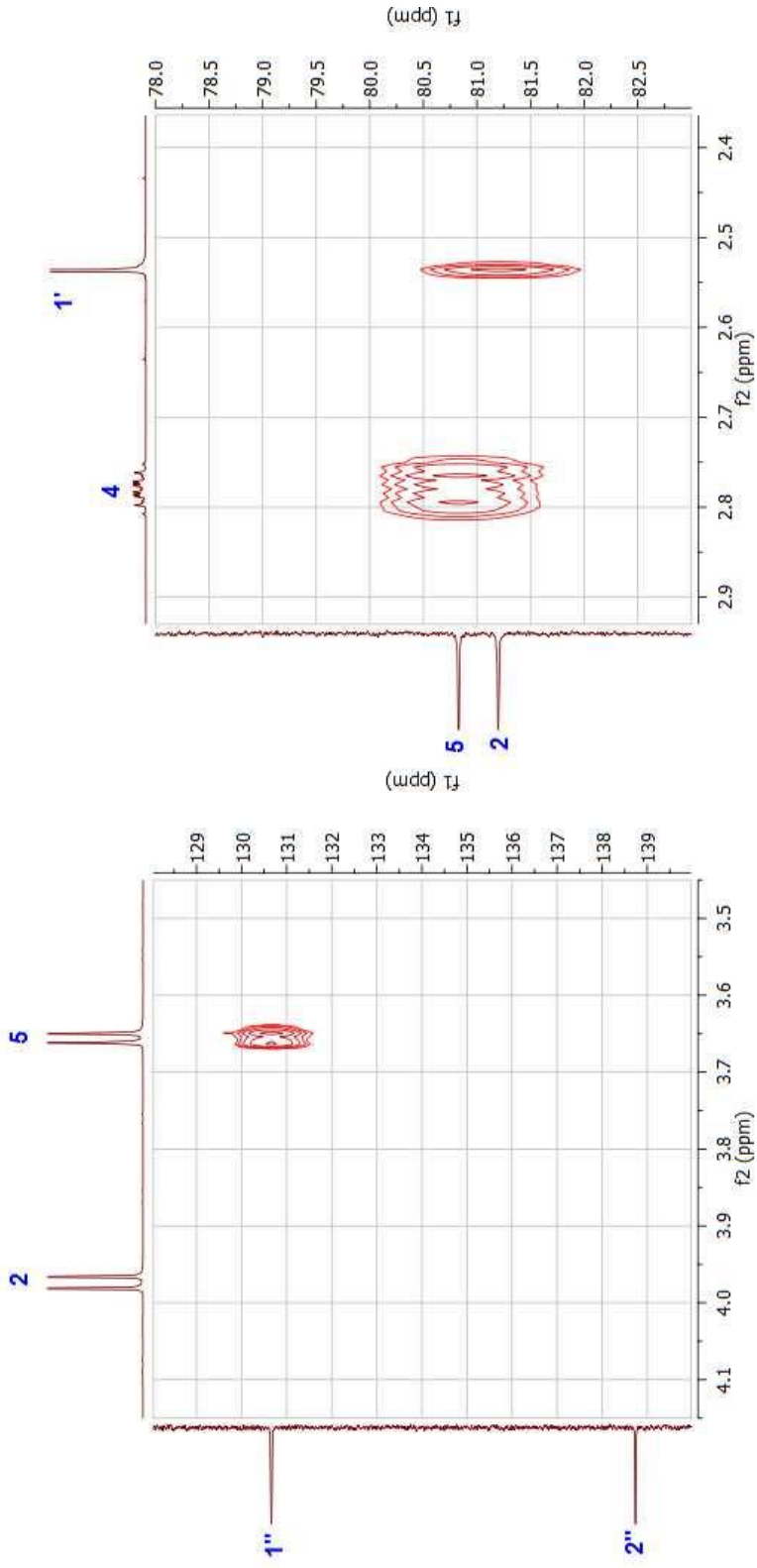


details of HSQC spectrum of allithiolane A₈

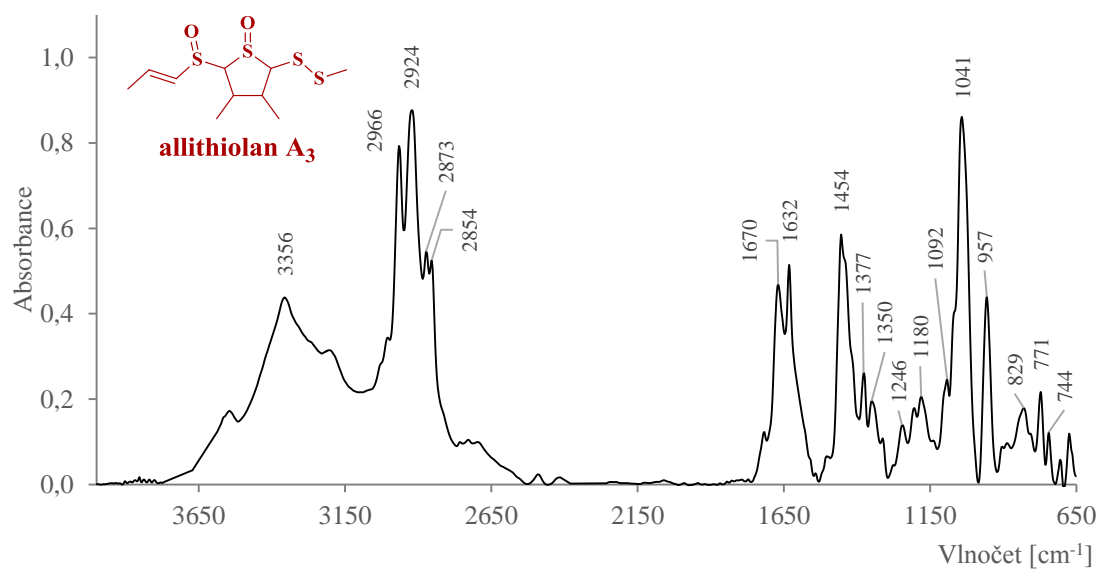
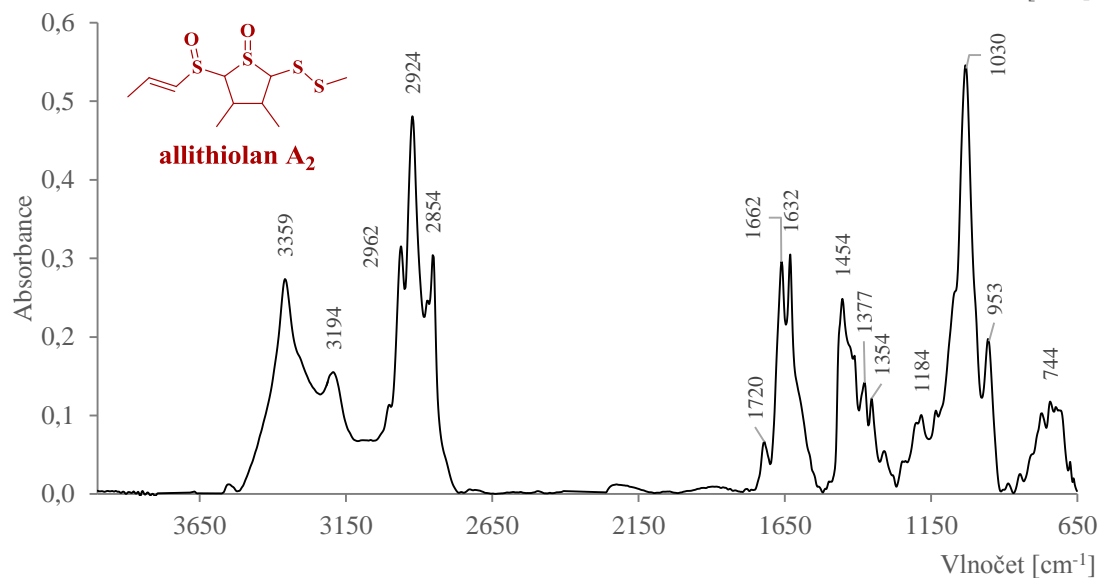
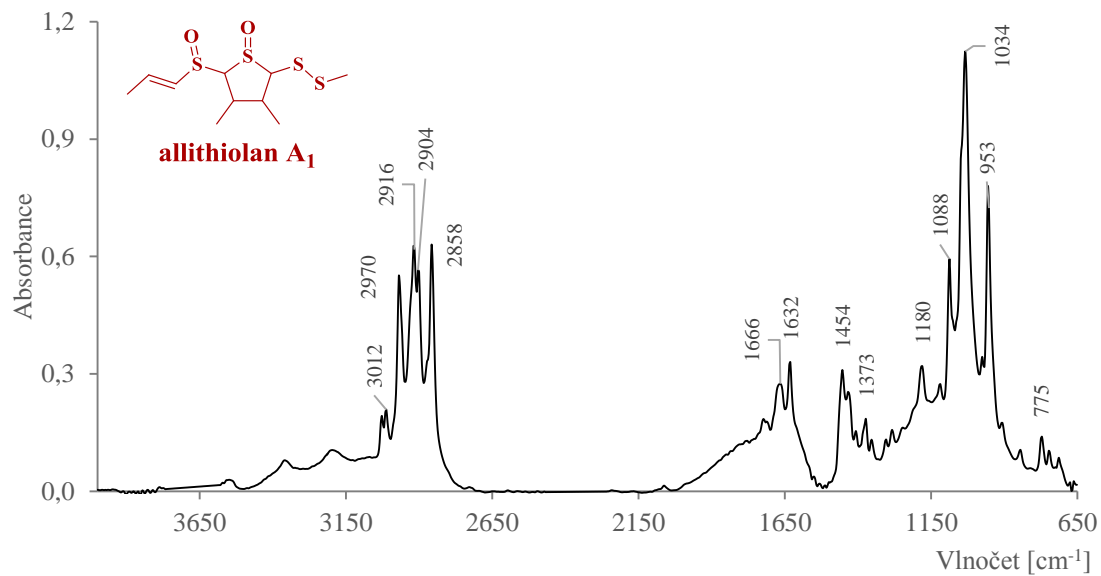


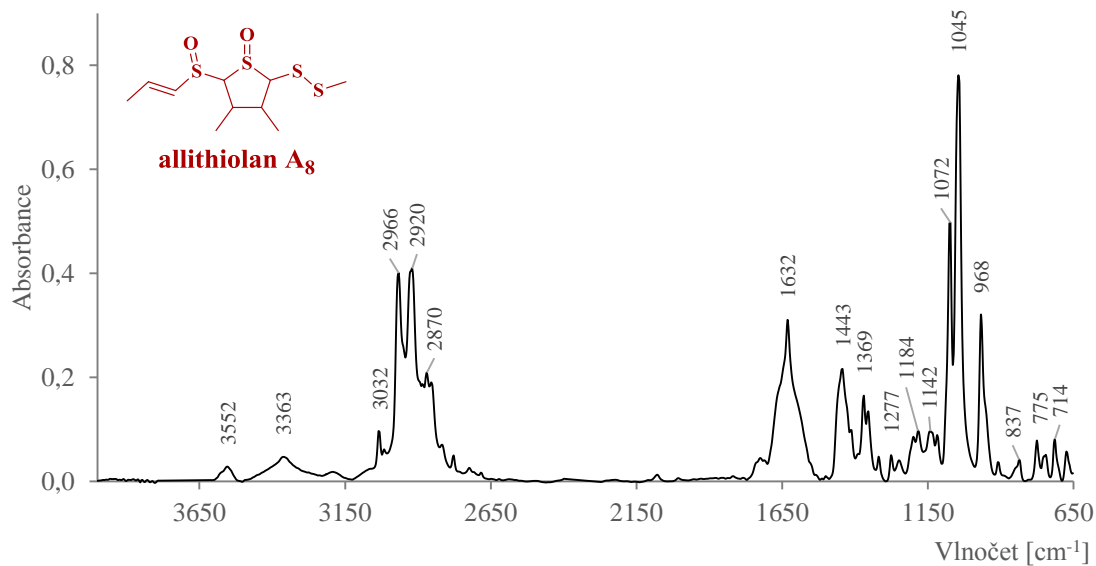
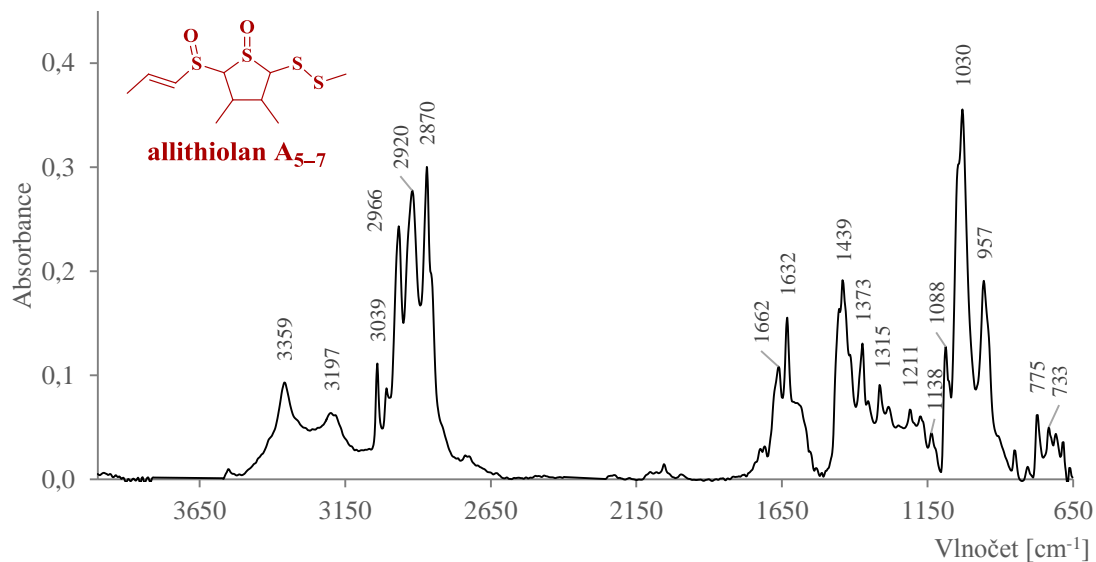
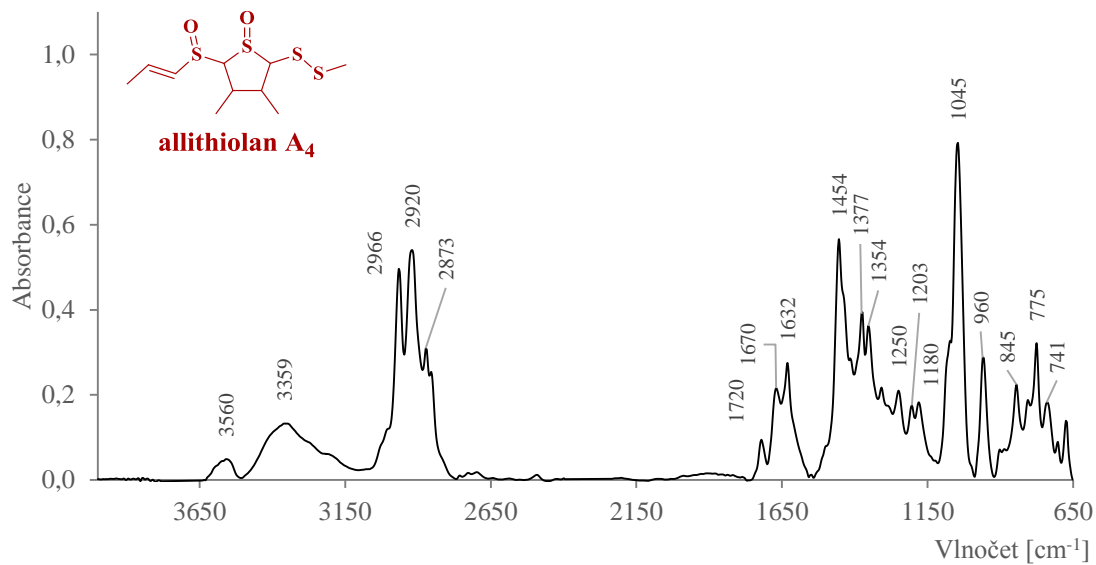


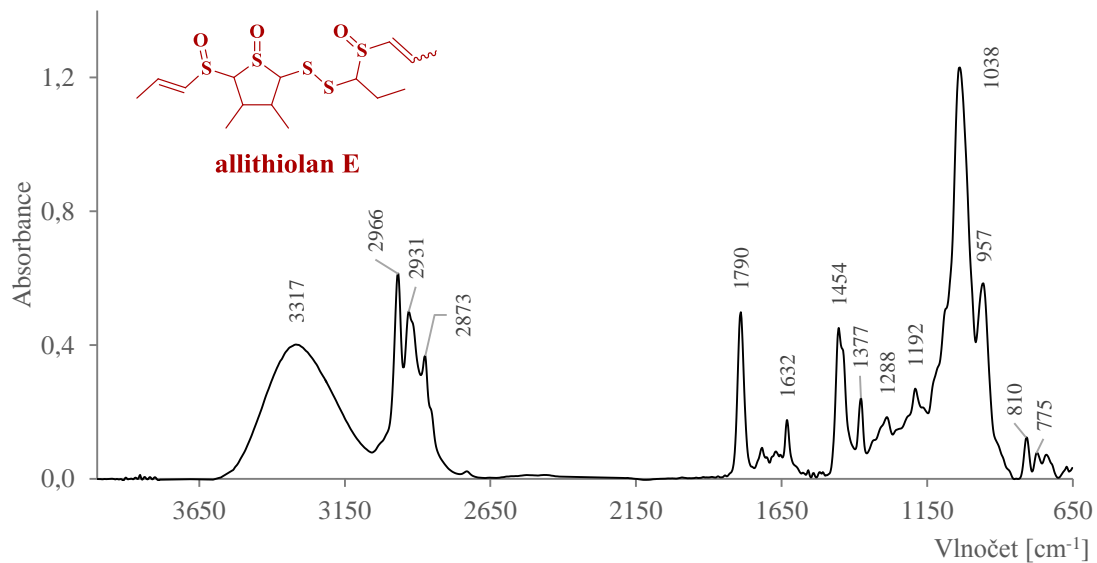
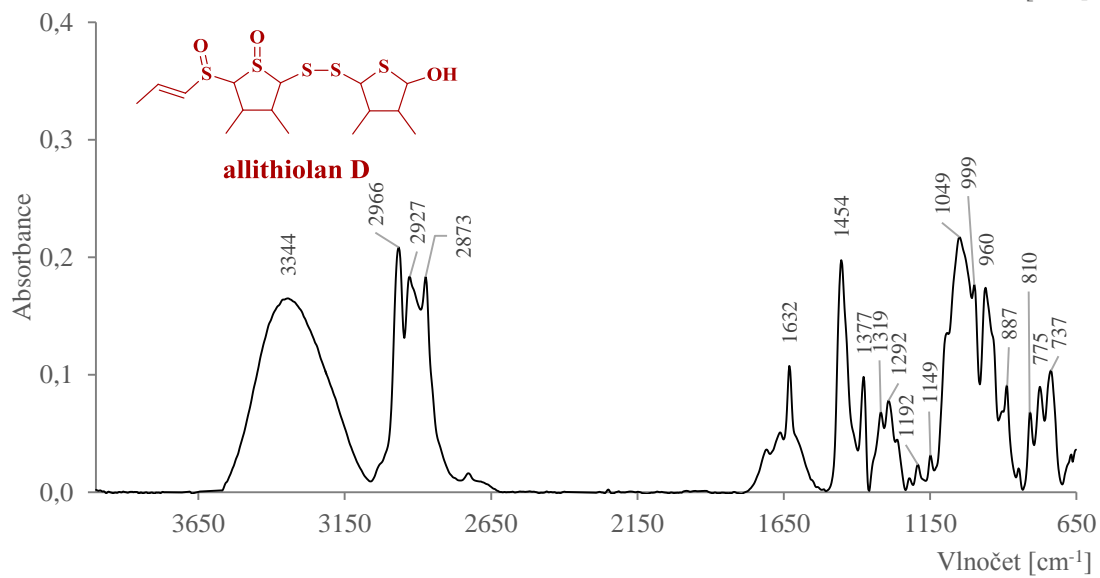
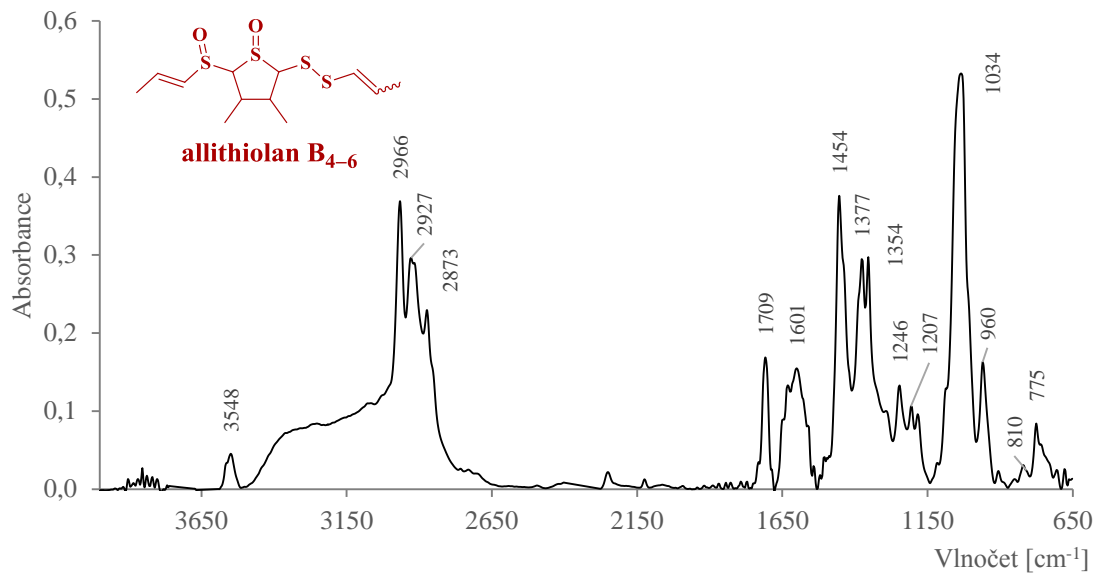
details of HMBc spectrum of allithiolane A₈



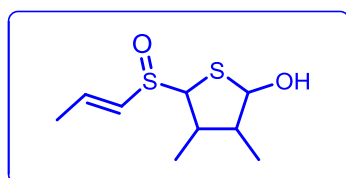
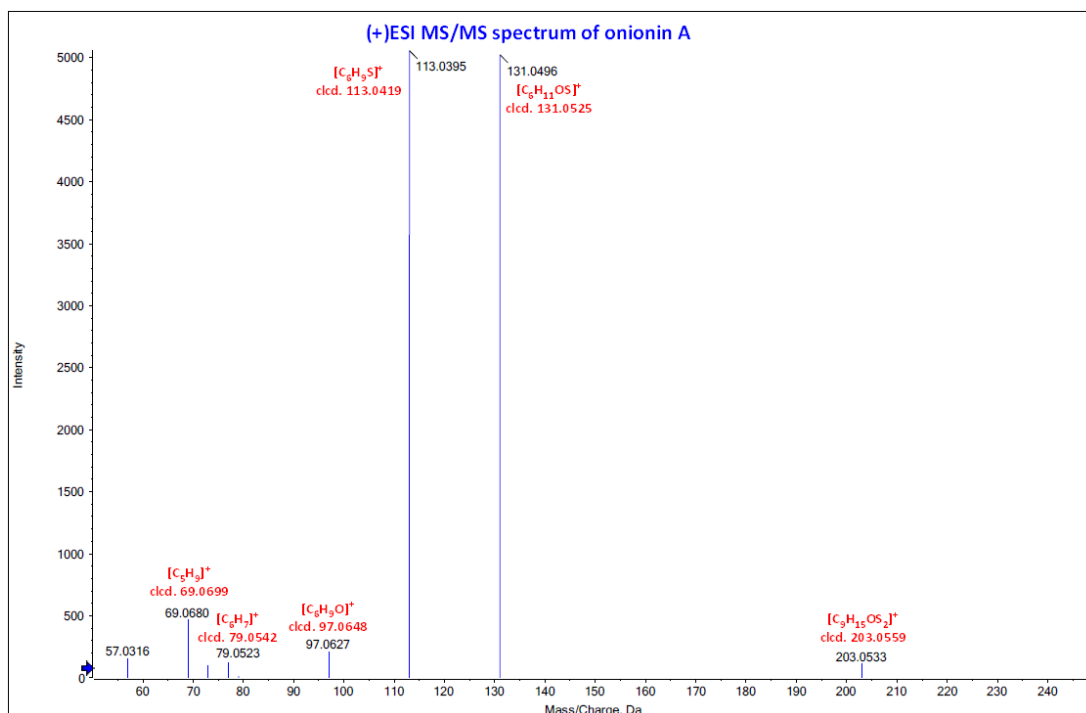
Příloha 6: IČ spektra allithiolanů A₁₋₈, B₄₋₆, D a E.







Příloha 7: MS/MS spektrum onioninu A.

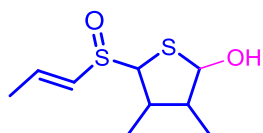


onionin A

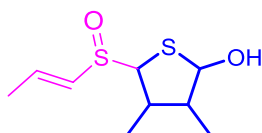
[M + H]⁺ teor. 221.0665 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

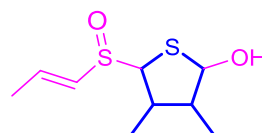
[C₉H₁₇O₂S₂]⁺



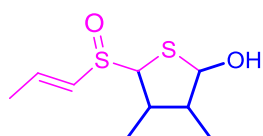
[C₉H₁₅OS₂]⁺
203.0559 Da



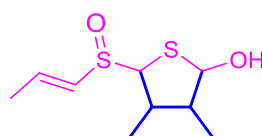
[C₆H₁₁OS]⁺
131.0525 Da



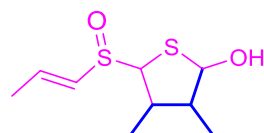
[C₆H₉S]⁺
113.0419 Da



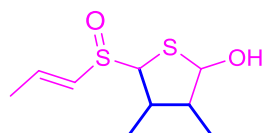
[C₆H₉O]⁺
97.0648 Da



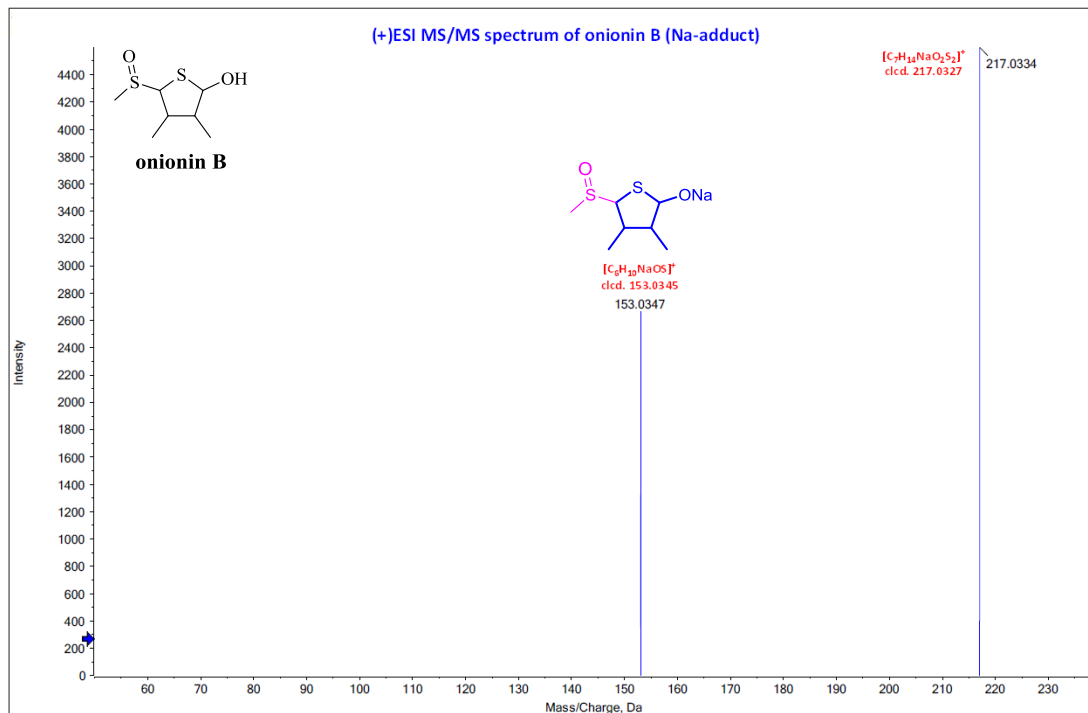
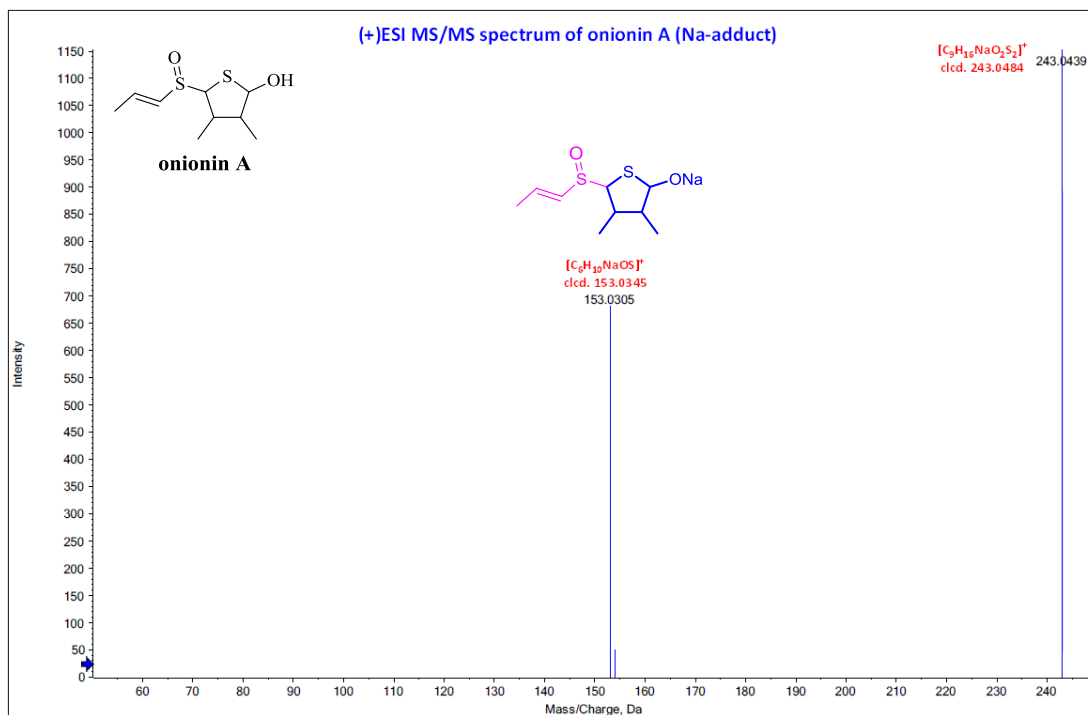
[C₆H₉]⁺
79.0542 Da

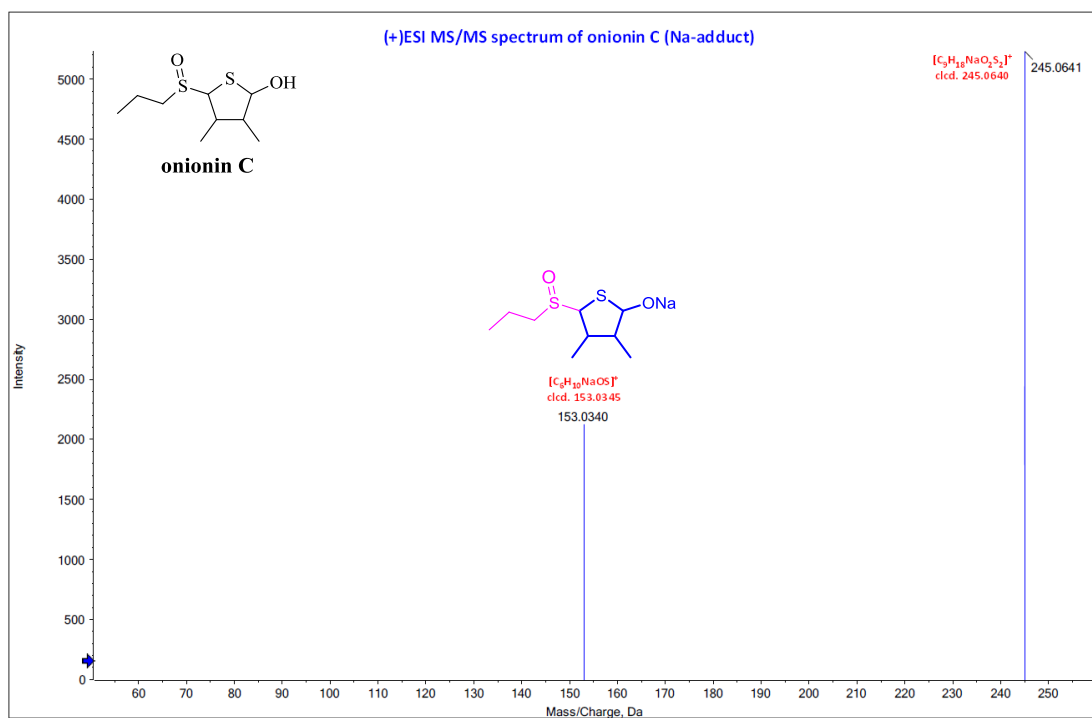


[C₅H₉]⁺
69.0699 Da

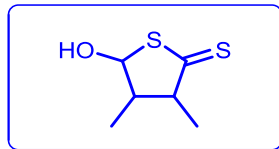
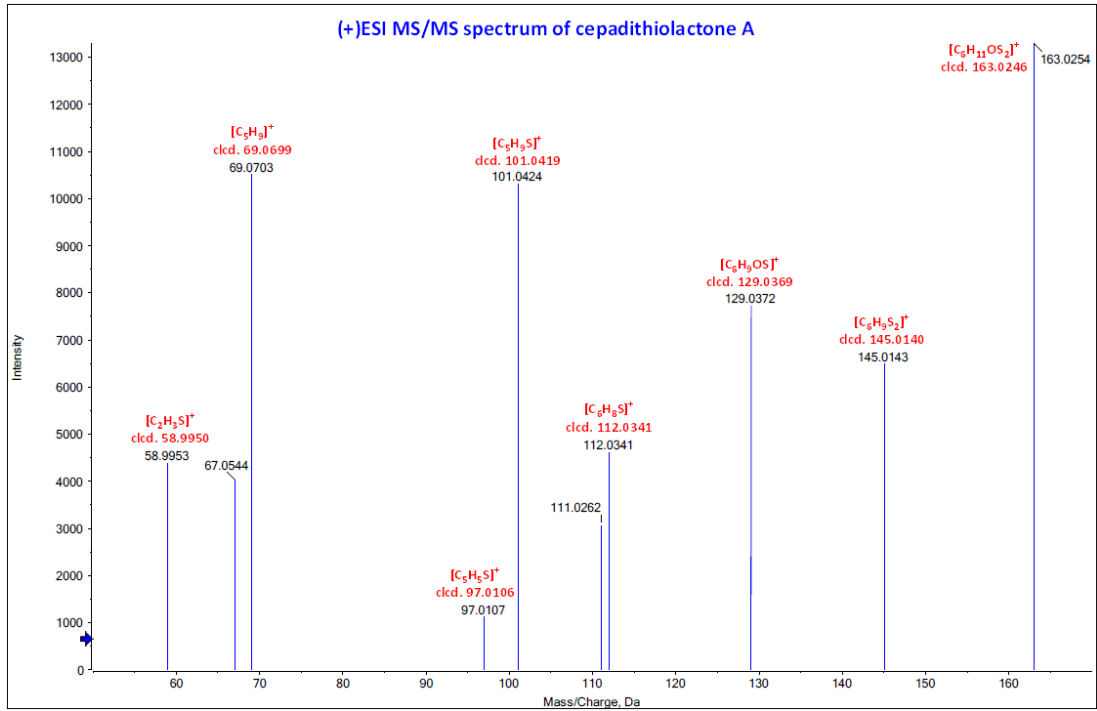


Příloha 8: MS/MS spektrum onioninu A, B a C.





Příloha 9: MS/MS spektrum cepadithiolaktonu A.



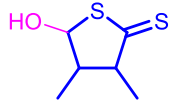
[C₆H₁₁OS₂]⁺

cepadithiolakton A

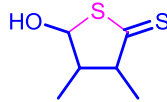
[M + H]⁺ teor. 163.0246 Da

exp. 163.0248 Da

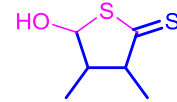
(+)ESI-HRMS - fragmentace



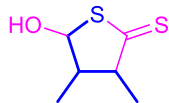
[C₆H₉S₂]⁺
145.0140 Da



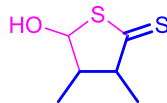
[C₆H₉OS]⁺
129.0369 Da



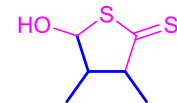
[C₆H₈S]⁺ [C₆H₇S]⁺
112.0341 Da 111.0263 Da



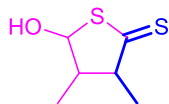
[C₅H₉S]⁺
101.0419 Da



[C₅H₅S]⁺
97.0106 Da

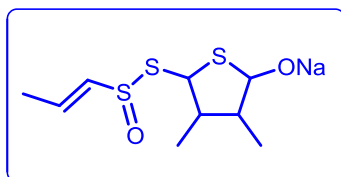
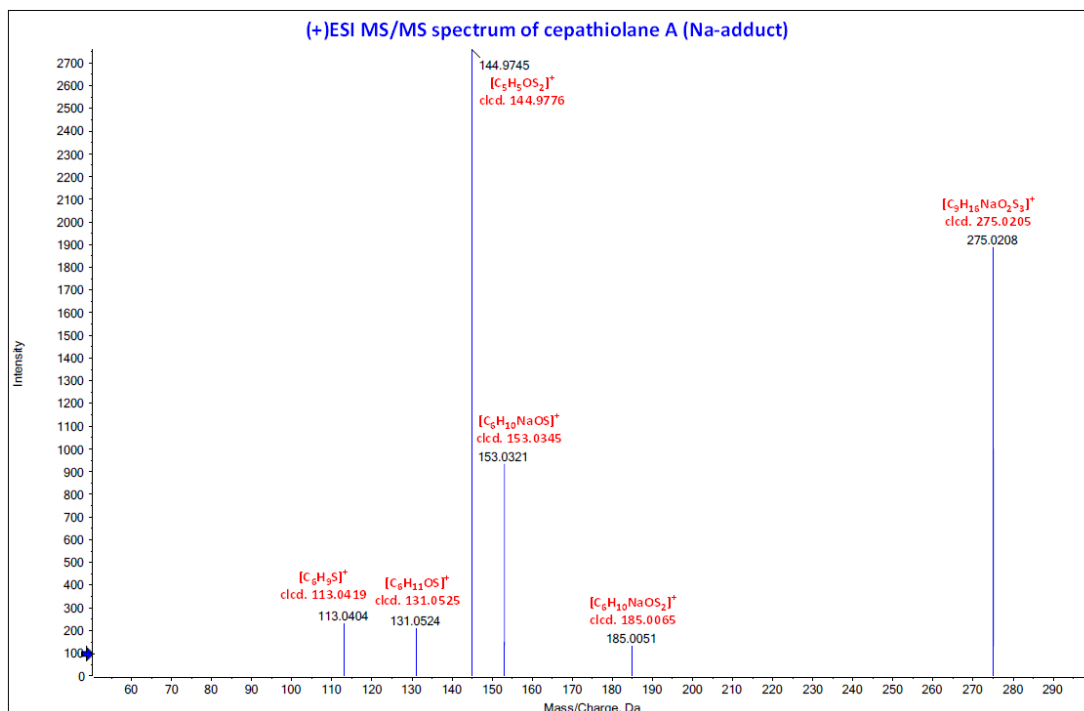


[C₅H₉]⁺
69.0699 Da



[C₂H₃S]⁺
58.9950 Da

Příloha 10: MS/MS spektrum cepathiolanu A.



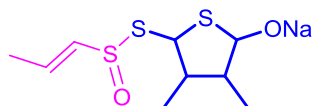
cepathiolan A (Na-adukt)

$[M + Na]^+$ teor. 275,0205 Da

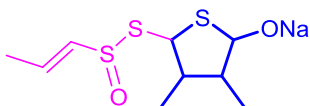
exp. 275,0196–275,0206 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

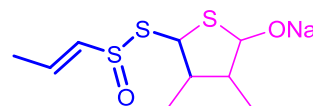
$[C_9H_{16}NaO_2S_3]^+$



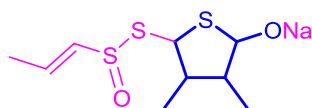
$[C_6H_{10}NaOS_2]^+$
185.0065 Da



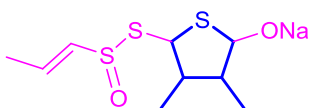
$[C_6H_{10}NaOS]^+$
153.0345 Da



$[C_5H_5OS_2]^+$
144.9776 Da

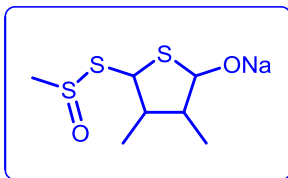
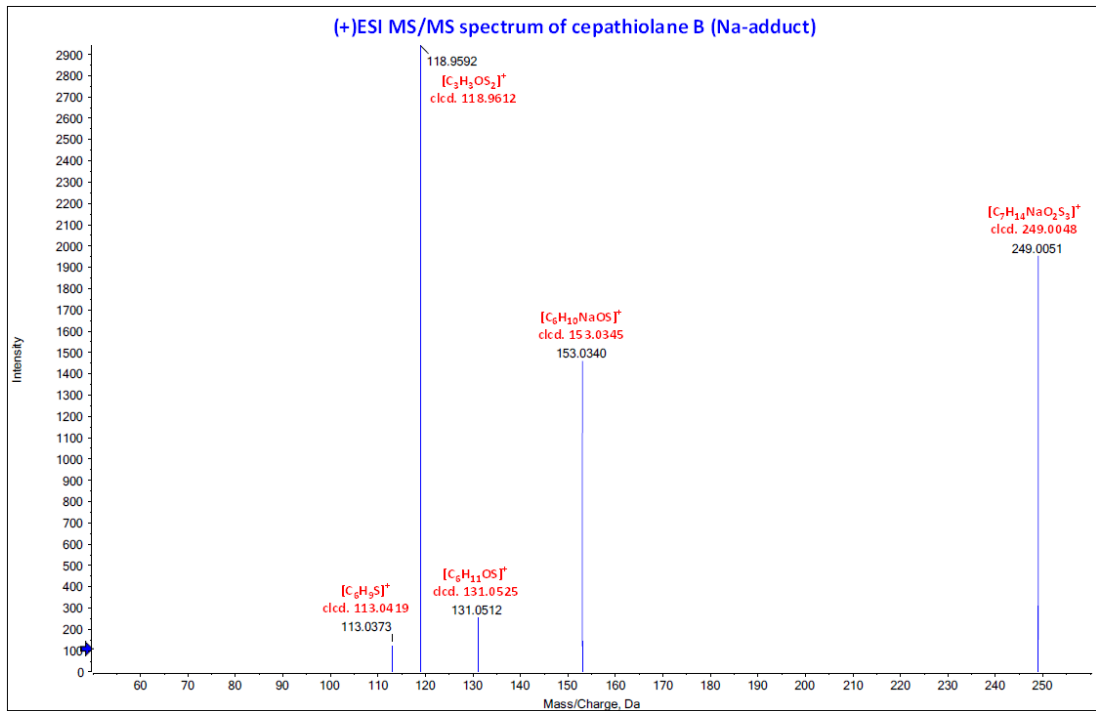


$[C_6H_{11}OS]^+$
131.0525 Da



$[C_6H_9S]^+$
113.0419 Da

Příloha 11: MS/MS spektrum cepathiolanu B.



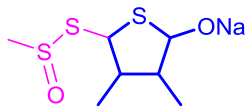
cepathiolan B (Na-adt)

$[M + Na]^+$ teor. 249,0048 Da

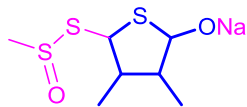
exp. 249,0040-249,0059 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

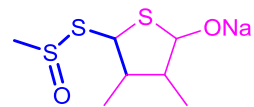
$[C_7H_{14}NaO_2S_3]^+$



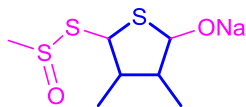
$[C_6H_{10}NaOS]^+$
153,0345 Da



$[C_6H_{11}OS]^+$
131,0525 Da

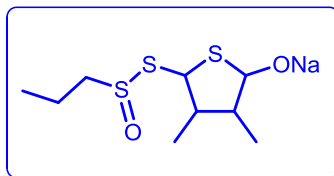
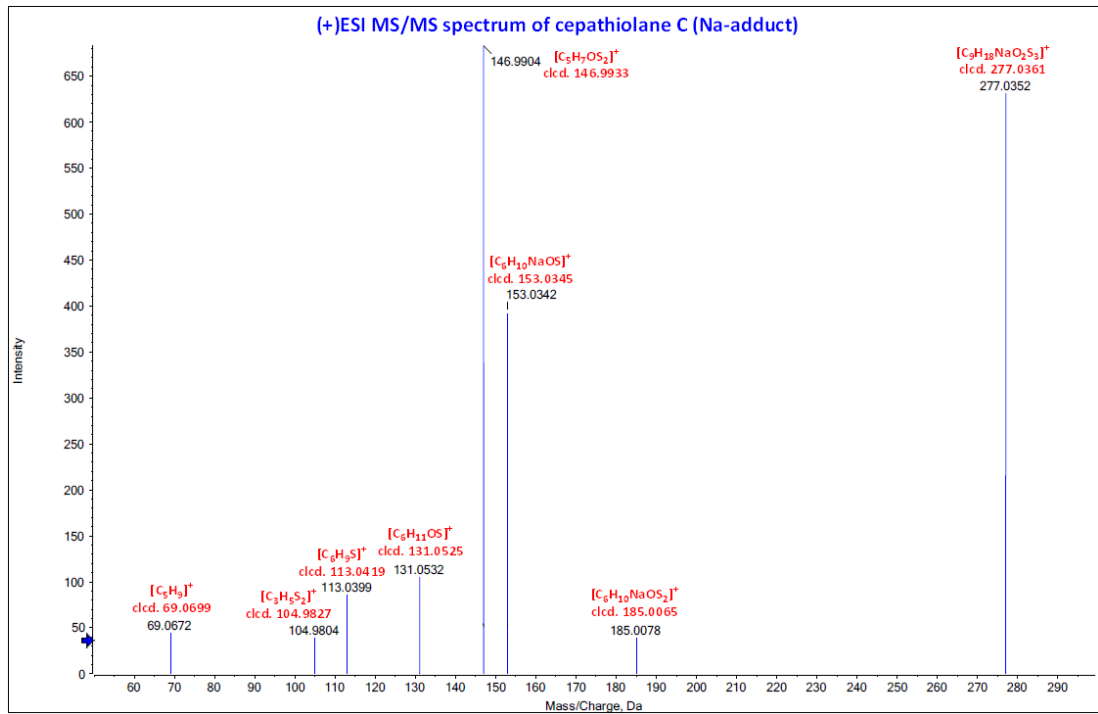


$[C_3H_3OS_2]^+$
118,9612 Da



$[C_6H_9S]^+$
113,0419 Da

Příloha 12: MS/MS spektrum cepathiolanu C.



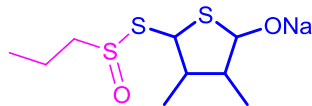
cepathiolane C (Na-addukt)

$[M + Na]^+$ teor. 277,0361 Da

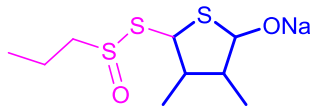
exp. 277,0352–277,0371 Da

(+)ESI-HRMS - fragmentace

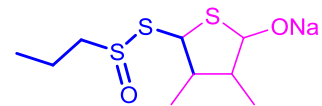
$[C_9H_{18}NaO_2S_3]^+$



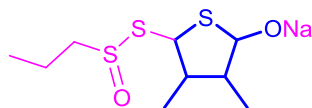
$[C_6H_{10}NaOS_2]^+$
185.0065 Da



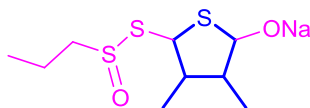
$[C_6H_{10}NaOS]^+$
153.0345 Da



$[C_5H_7OS_2]^+$
146.9933 Da

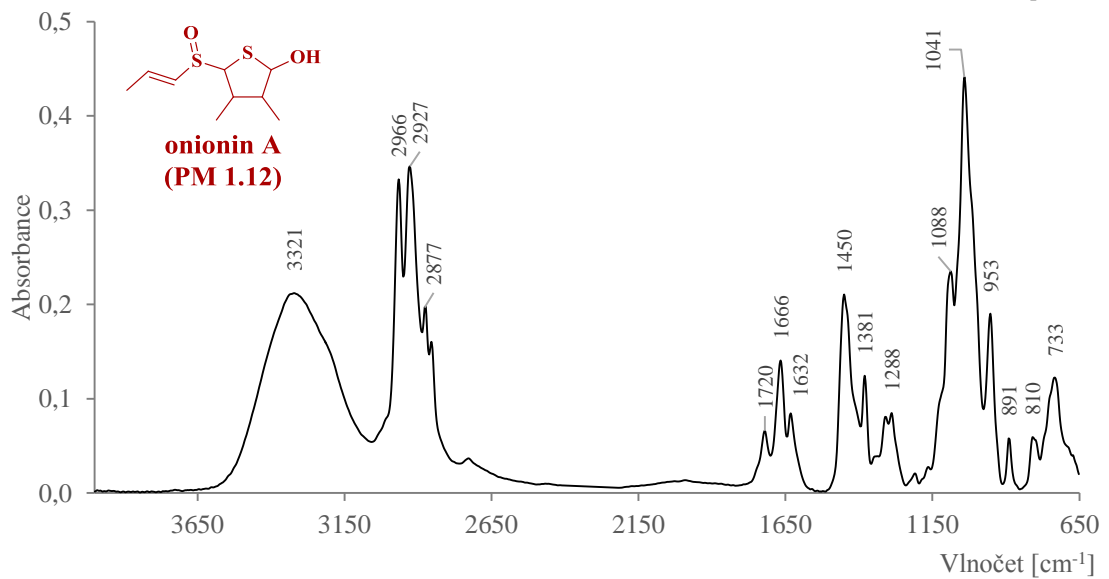
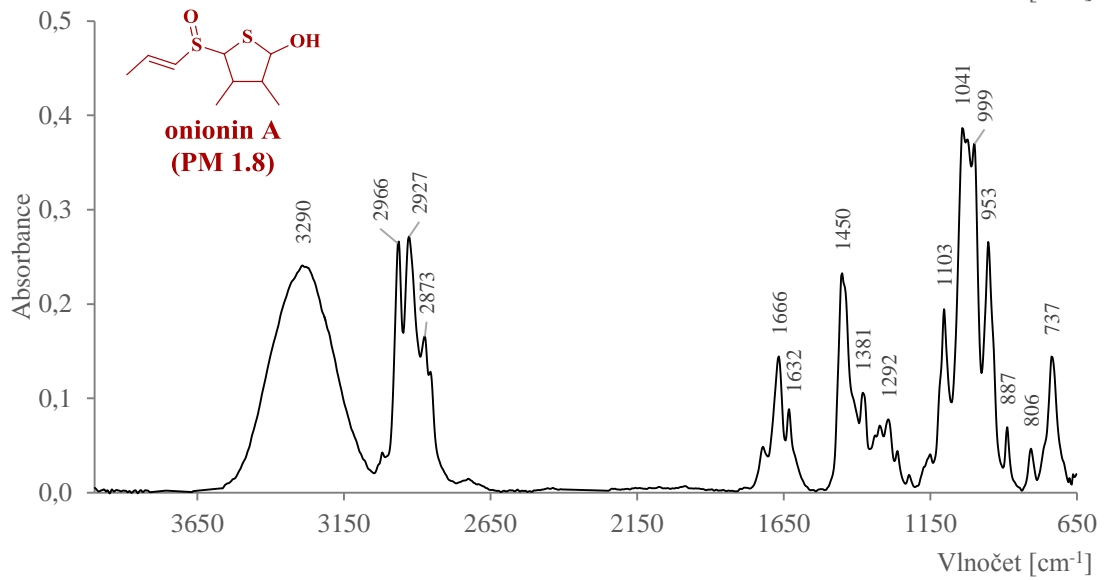
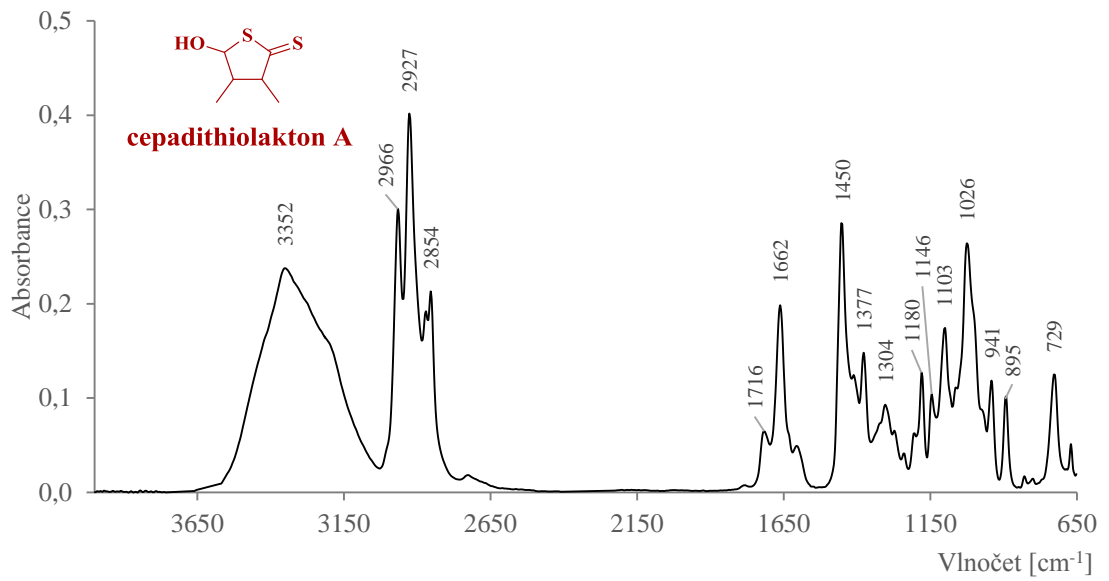


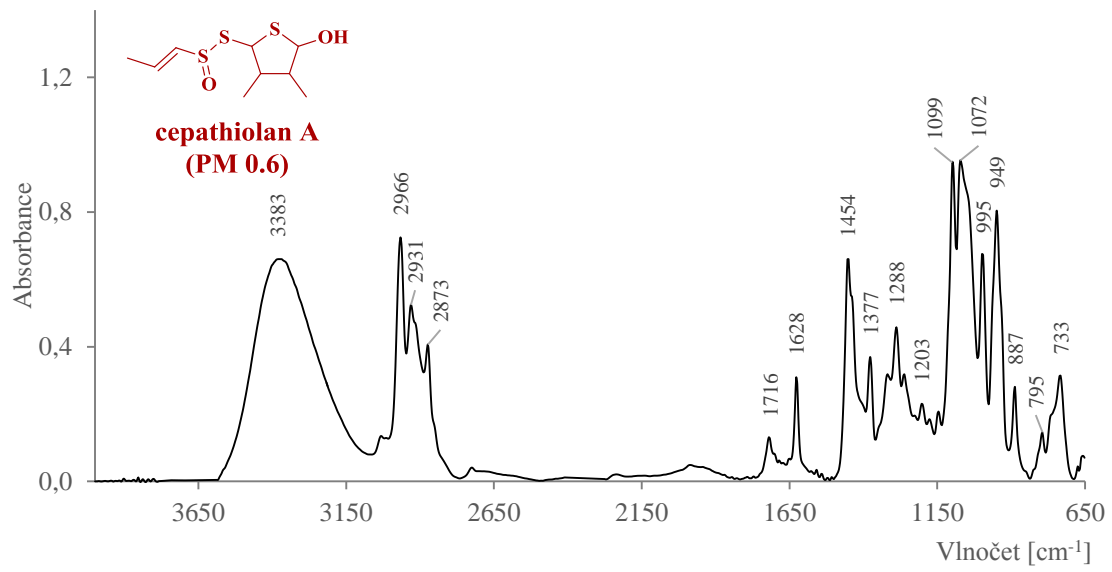
$[C_6H_{11}OS]^+$
131.0525 Da



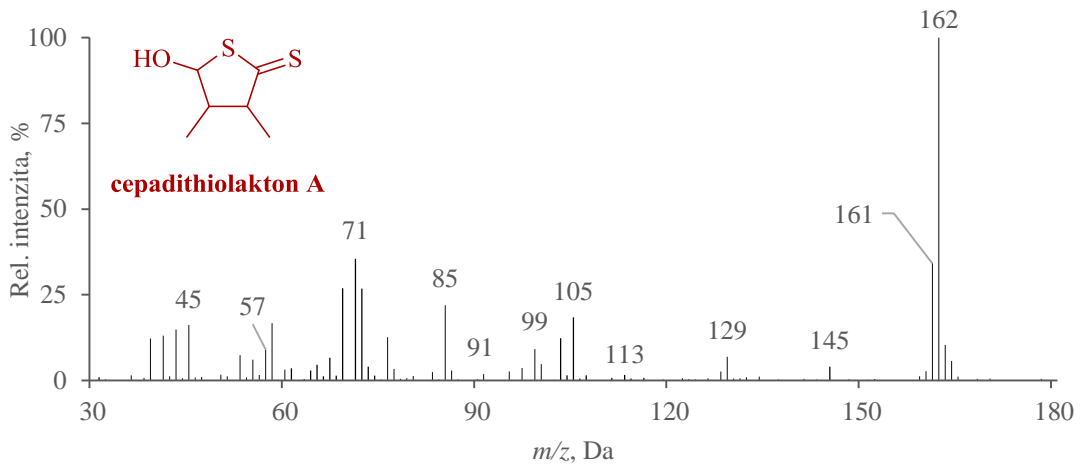
$[C_6H_9S]^+$
113.0419 Da

Příloha 132: IČ spektra onioninu A, cepadithiolaktonu A a cepathiolanu A.





Příloha 14: EI/MS spektrum cepadithiolaktonu A.



Kubec, R., Štefanová, I., Moos, M., Urajová, P., Kuzma, M., & Zápál, J. Allithiolanes: nine groups of a newly discovered family of sulfur compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 8783–8794.

Allithiolanes: Nine Groups of a Newly Discovered Family of Sulfur Compounds Responsible for the Bitter Off-Taste of Processed Onion

Roman Kubec,^{*,†} Iveta Štefanová,[†] Martin Moos,[‡] Petra Urajová,[§] Marek Kuzma,[⊥] and Jakub Zápál[⊥]

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

[‡]Laboratory of Analytical Biochemistry, Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

[§]Centre Algatech, Institute of Microbiology, The Czech Academy of Sciences, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň, Czech Republic

[⊥]Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology, The Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: The compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion (*Allium cepa*) were studied. Using a series of sensory-guided HPLC fractionations, the existence of nine groups of hitherto unknown sulfur compounds has been revealed. On the basis of spectroscopic data (MS, NMR, and IR), it was found that these compounds, trivially named allithiolanes A–I, are members of a large family of structurally closely related derivatives of 3,4-dimethylthiolane *S*-oxide, with the general formulas of $C_xH_yO_2S_4$, $C_xH_yO_3S_5$, and $C_xH_yO_4S_6$ ($x = 10–18$, $y = 18–30$). The presence of multiple stereoisomers was observed for each group of allithiolanes. Allithiolanes possess an unpleasantly bitter taste with detection thresholds in the range of 15–30 ppm. Formation pathways of these newly discovered sulfur compounds were proposed.

KEYWORDS: allithiolane, *Allium cepa*, bitter, *cepaene*, *cephathiolane*, *garlicnin*, *isoalliin*, *off-taste*, onion, *onionin*, *taste-dilution analysis*, *thiolane S-oxide*

INTRODUCTION

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most popular vegetables worldwide, attributable mostly to its typical pungent aroma, strong taste, and potent lachrymatory effects. Thanks to these sensory properties, onion is an important ingredient of many meals of nearly all national cuisines. In the food industry, it plays an essential role in the production of numerous products, such as spices, soups, canned food and pickles, sausages and other meat products, salads, and ketchups and dressings, among many others.

Typical food-industry or culinary usage of onion involves chopping, slicing, mincing, pureeing, or other mechanical disruption of the bulbs. During these steps, the onion sometimes acquires an unpleasantly bitter taste, which develops within several minutes after comminution of its tissue. The formation of this bitter off-taste represents a serious issue for food companies, because it may negatively affect the organoleptic quality of many products containing onion.

Despite its significant negative impact on the taste characteristics of processed onion, only two papers dealing with this puzzling phenomenon have thus far been published. In the first report,¹ Schwimmer concluded that the bitter principle was not directly derived from isoalliin (1), the key precursor of the sulfur sensory-active compounds of onion. Contrary to his initial paper, Schwimmer reported in a follow-up study² that the formation of the bitter off-taste was in fact a consequence of the enzyme-catalyzed cleavage of isoalliin. However, the identity of the bitter principle or principles has remained completely unknown until now.

At the time of the publishing of the two pioneering reports of Schwimmer,^{1,2} the only known isoalliin-derived species were thiosulfonates and the lachrymatory factor (although the latter compound was erroneously believed to be 1-propenesulfenic acid). Since then, understanding of the chemistry taking place during onion processing has extended enormously. The correct structure of the lachrymatory factor of onion, propanethial *S*-oxide, has been established,^{3,4} and the exact mechanism of its formation has been clarified.^{5,6} Furthermore, a great number of other sulfur compounds formed upon the disruption of onion tissue have been discovered, such as zwiebelanes,⁷ *cepaenes*,^{8,9} bis(sulfine),¹⁰ *cephathiolanes*,^{11,12} and *onionins A*^{13–15} (Figure 1). Organoleptic characteristics of some of these compounds were evaluated, but none were reported to exhibit a bitter taste.¹⁶

In this work, we aimed to identify the compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion by sensory-guided HPLC fractionation and subsequent spectroscopic characterization. Identification of these compounds may possibly help to develop technological procedures to prevent or minimize their formation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Plant Material. Pyridoxal 5-phosphate, 4-sulfanylpiperidine, 2-sulfanylethanol, and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) were obtained from Sigma-Aldrich. Isoalliin, methiin, crude garlic

Received: June 14, 2018

Revised: July 18, 2018

Accepted: July 25, 2018

Published: July 25, 2018

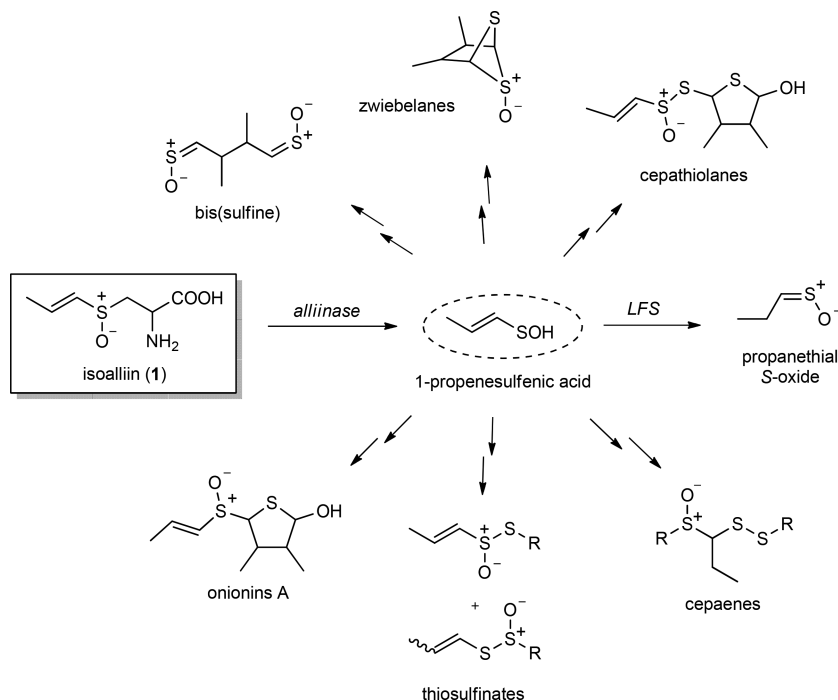


Figure 1. Currently known principal compounds formed in processed onion by alliinase- and LFS-catalyzed cleavage of isoalliin. The correct structure of onionins A is given.¹⁵

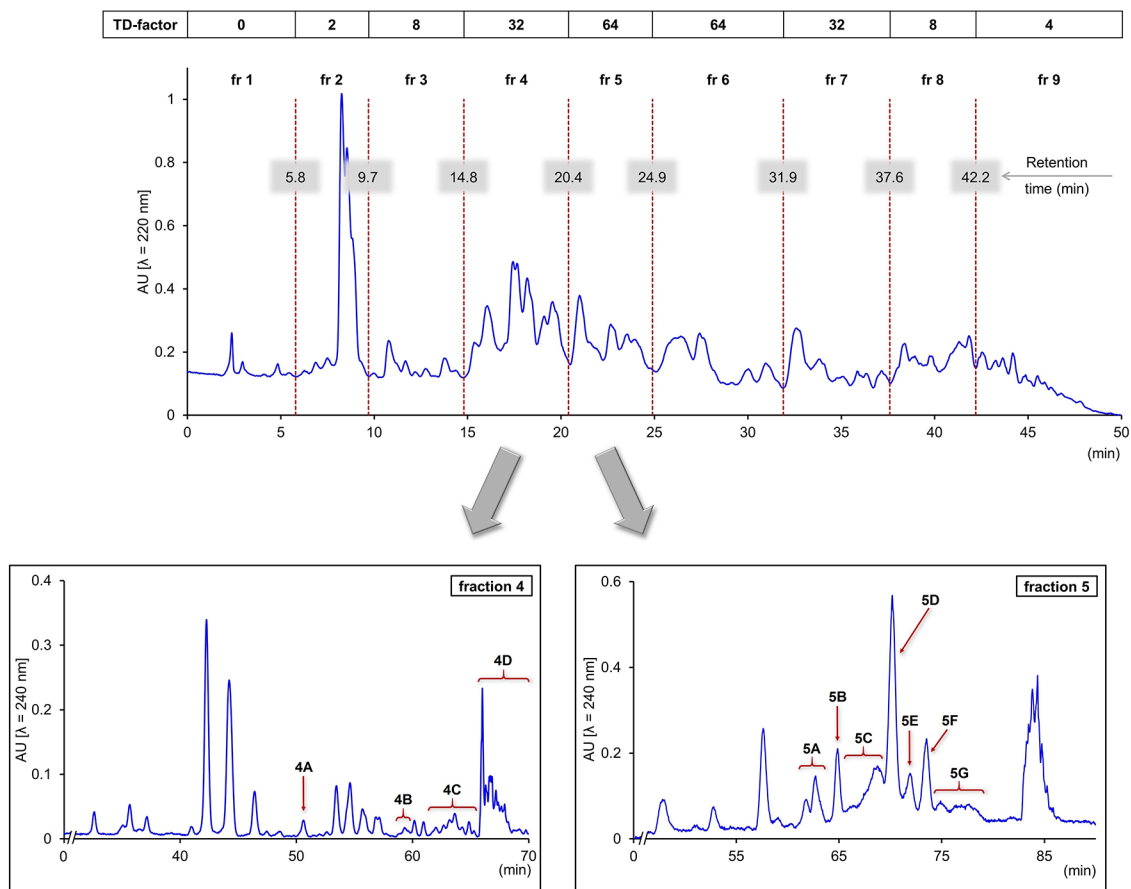


Figure 2. HPLC separation of the extract of homogenized onion (top) and optimized HPLC separation of fractions 4 and 5 (bottom). Only the labeled peaks exhibited a bitter taste.

alliinase, and the alliinase–lachrymatory-factor-synthase (LFS) system from onion were obtained as described previously.^{17–19} Onion (Swift

variety, Czech Republic), leek (The Netherlands), and garlic (China) were purchased in a local store.

General Methods. HPLC separations were achieved by using a Dynamax SD-210 binary pump HPLC system (Varian) employing a Varian PDA 335 detector. (+)ESI-HRMS data were obtained by using an UltiMate 3000 RS system (Thermo Scientific) equipped with an AB SCIEX TripleTOF 6600 (AB SCIEX). The needle voltage was +5.0 kV. Other ion-source parameters were as follows: curtain gas, 35 psi; nebulizer and drying gas, 60 psi; turbo-gas temperature, 600 °C; and declustering potential, 60 V. Spectra were collected using a collision energy of 45 V with a spread of ± 15 V.

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 700 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe (Bruker Biospin). ^1H and ^{13}C chemical shifts were referenced to the signals of residual CHCl_3 (δ 7.27 and 77.00, respectively) or DMSO (δ 2.50 and 39.60, respectively). IR spectra were recorded on a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with an MCT detector and a Continuum microscope (ThermoFisher) in the range of 4000–650 cm^{-1} at a resolution of 8 cm^{-1} . A Mettler Toledo XPR6UD5 ultramicrobalance was used for preparing samples for sensory analysis.

Preparation of Extracts. *Onion.* Peeled onion bulbs (1006 g) were homogenized with a kitchen juicer (Catler JE 4010) and allowed to stand at room temperature for 1 h. The juice was extracted with diethyl ether (2×500 mL), the ether portions were dried over MgSO_4 , and the solvent was removed at reduced pressure (<30 °C) to yield a greenish, viscous residue. Several batches of onion (7.75 kg in total) were processed in a similar manner. The extracts obtained from the individual batches were combined (4.56 g), dissolved in CH_3CN (80 mL), filtered (0.45 μm , PTFE), and passed through a C-18 SPE column (10 g, Agilent) that was washed with CH_3CN (50 mL). The solvent was removed at reduced pressure (<30 °C) to yield a dark-yellow, viscous residue with an unpleasant bitter taste (2.44 g).

Leek and Garlic. White parts of leek (130 g) were mixed with H_2O (100 mL) and finely homogenized with a kitchen blender (Braun PowerBlend MX 2050). After standing at room temperature for 1 h, the slurry was filtered through cheesecloth, and extracted with diethyl ether (2×100 mL). The ether portions were dried over MgSO_4 , and the solvent was removed at reduced pressure (<30 °C) to yield a greenish, viscous residue, which was dissolved in CH_3CN (10 mL), filtered (0.45 μm , PTFE), and passed through a C-18 SPE column (1 g, Agilent). The solvent was removed at reduced pressure (<30 °C) to yield an intensely bitter tasting, dark-yellow, viscous residue. The extract of homogenized garlic was prepared analogously. In all cases, centrifugation (2400 rpm, 2 min) was used to separate the layers during the extraction step.

The profiles of allithiolanes present in the extracts of onion and leek shown in Figure 7 were determined by HPLC-MS using a Kinetex C-8 column (250×4.6 mm, 5 μm , Phenomenex). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in both H_2O (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: A/B 85:15 (0 min), 60:40 (50 min), 5:95 (60 min), 5:95 (69 min), and 85:15 (70 min). The flow rate was 0.9 mL min^{-1} .

Taste-Dilution Analysis (TDA). A portion (181 mg) of the solvent extract of onion juice was dissolved in 10 mL of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) and filtered (0.45 μm , PTFE), and aliquots (1 mL) were loaded on a Rainin Dynamax 100 Å preparative C-8 column (250×21.4 mm, 8 μm , Varian). The mobile phase consisted of H_2O (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: A/B 70:30 (0 min), 55:45 (30 min), 5:95 (42 min), 5:95 (48 min), and 70:30 (50 min). The flow rate was 18.0 mL min^{-1} . The effluent was separated into nine fractions as shown in Figure 2. The corresponding fractions obtained from 10 runs were combined, the solvent was removed at reduced pressure (<35 °C), and the aqueous portions were freeze-dried. The residues were dissolved in 2 mL of aqueous ethanol (50:50) and then stepwise diluted 1:1 with tap water. The serial dilutions of each fraction were presented to a sensory panel (three women and three men) in order of increasing concentration. The dilution at which a bitter taste could just be detected was determined as the taste-dilution (TD) factor. TD factors determined by the assessors in three different sessions were averaged.

Isolation of the Bitter-Tasting Compounds from Onion Juice.

Fraction 4. A portion (26 mg) of fraction 4, obtained as described above, was dissolved in 10 mL of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) and filtered

(0.2 μm , PTFE), and aliquots (1 mL) were loaded on a preparative Kinetex C-8 column (250×21.2 mm, 5 μm , Phenomenex). The mobile phase consisted of H_2O (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: A/B 90:10 (0 min), 72:28 (62 min), 5:95 (63 min), 5:95 (69 min), and 90:10 (70 min). The flow rate was 19.1 mL min^{-1} . The effluent was separated into 15 subfractions. The corresponding subfractions obtained from 10 runs were combined, freed of the solvent, and evaluated by sensory analysis. The bitter-tasting samples (labeled as 4A–D in Figure 2) were freeze-dried and further analyzed by spectroscopic methods.

Fraction 5. A portion (86 mg) of fraction 5, obtained as described above, was dissolved in 20 mL of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) and filtered (0.2 μm , PTFE), and aliquots (1 mL) were loaded on a preparative Kinetex C-8 column (250×21.2 mm, 5 μm , Phenomenex). The mobile phase consisted of H_2O (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: A/B 88:12 (0 min), 67:33 (80 min), 5:95 (81 min), 5:95 (89 min), and 88:12 (90 min). The flow rate was 19.1 mL min^{-1} . The effluent was separated into 13 subfractions. The corresponding subfractions obtained from 18 runs were combined, freed of the solvent, and evaluated by sensory analysis. The bitter-tasting samples (labeled as 5A–G in Figure 2) were freeze-dried (yields 1.6–7.2 mg) and further analyzed by spectroscopic methods.

After preliminary NMR analysis, sample 5E was dissolved in 3 mL of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) containing 0.05% formic acid. Aliquots (1 mL) of this solution were loaded on a preparative Kinetex C-8 column (250×21.2 mm, 5 μm , Phenomenex). The mobile phase consisted of 0.05% formic acid in both H_2O (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: A/B 80:20 (0 min), 60:40 (30 min), 5:95 (31 min), 5:95 (39 min), and 80:20 (40 min). The flow rate was 19.1 mL min^{-1} . The fraction eluting at $t_R = 28.8$ –29.3 min was collected. The corresponding fractions obtained from three runs were combined, the solvent was removed at reduced pressure (<30 °C), and the aqueous portion was freeze-dried to obtain 0.3 mg of allithiolane D₁ (see the Supporting Information).

Model Experiments. Isoalliin (30 mg) and methiin (30 mg) were dissolved in 4 mL of 0.5 M KH_2PO_4 buffer (pH 7.0). This solution was placed in an 8 mL vial, and 2 mL of a garlic alliinase solution (30 mg of crude alliinase in 2 mL of 0.5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/10\%$ glycerol/25 μM pyridoxal 5-phosphate) was added. After being stirred for 3 h at room temperature, the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (2×2 mL). The combined CH_2Cl_2 portions were dried over MgSO_4 and evaporated at reduced pressure (<30 °C) to yield a viscous residue, which was further analyzed by HPLC-MS using the methods described above.

Experiments with the alliinase–LFS system obtained from onion were performed analogously. In some cases, these experiments were done in the absence of methiin. Because of the complexity of the experimental procedures, full experimental details about the isolation of allithiolanes A and D from the model systems can be found in the Supporting Information.

Thiosulfinate Test. The collected allithiolanes were mixed with 2-nitro-5-sulfanylbenzoate or 4-sulfanylpiperidine according to the procedures described by Miron et al.^{20,21} These assays were performed with allithiolanes A, B, D, E, and I.

Determination of Taste Thresholds. The following samples of allithiolanes were tested: (a) the fraction of allithiolanes A_{1–8} obtained from the model mixture, (b) fraction 5D (allithiolanes B_{4–6}), (c) allithiolanes D_x obtained from fraction F–III–B, and (d) allithiolanes E_x isolated from fraction 3 (see the Supporting Information). Purities of the tested samples were checked by HPLC-MS.

The taste thresholds were determined with a triangle test by six panelists (three women and three men, ages 29–51) who had been previously trained to recognize bitter tastes using caffeine and quinine hydrochloride solutions. Allithiolanes were dissolved in absolute ethanol, and the tested samples were prepared by serial 1:1 dilutions with tap water. The blank samples were prepared by serial 1:1 dilutions of ethanol with tap water. The samples were presented in order of ascending concentration. The threshold values evaluated in three different sessions were averaged. The values between individuals and separate sessions differed by not more than one dilution step.

Table 1. (+)ESI-HRMS Data of Allithiolanes A–I

allithiolanes	elemental composition	M_r	$[M + H]^+$ calcd	found ^a	RDB ^b
A	C ₁₀ H ₁₈ O ₂ S ₄	298.5	299.0262	299.0254–299.0269	2
B	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ S ₄	324.5	325.0419	325.0412–325.0421	3
C	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ S ₄	326.6	327.0575	327.0569–327.0581	2
D	C ₁₃ H ₂₆ O ₃ S ₅	414.7	415.0558	415.0551–415.0566	3
E	C ₁₃ H ₂₆ O ₃ S ₅	414.7	415.0558	415.0554–415.0567	3
F	C ₁₃ H ₂₄ O ₃ S ₅	388.7	389.0402	389.0398–389.0409	2
G	C ₁₃ H ₂₈ O ₃ S ₅	416.7	417.0715	417.0714–415.0724	2
H	C ₁₃ H ₂₄ O ₃ S ₅	412.7	413.0402	413.0397–413.0408	4
I	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ S ₆	503.8	503.0541	503.0535–503.0551	4

^aValues observed for different stereoisomers. ^bNumber of rings and double bonds.

RESULTS AND DISCUSSION

Peeled onion bulbs were finely homogenized using a kitchen juicer. The freshly obtained juice had the typical sharp oniony taste without perceptible bitter notes. Upon standing at room temperature, the juice became slightly bitter within 10 min, and it acquired an unpleasantly bitter taste after 30 min.

Taste-Dilution Analysis (TDA). To identify the compounds primarily responsible for the bitter taste, a series of HPLC fractionations were performed. The bitter juice was extracted and aliquots of the extract were separated by preparative C-8 HPLC into nine fractions that were subsequently evaluated by taste-dilution analysis (TDA, Figure 2).²²

The results obtained by TDA indicated that not a single compound but rather several components were responsible for the observed bitter taste. In the next stage, our attention was primarily focused on the most intensely bitter tasting fractions, i.e., fractions 4–7. These fractions were chromatographed using optimized methods to achieve better separation of individual components. The samples collected by preparative C-8 HPLC from fractions 4 and 5 were subjected to sensory analysis, which revealed that many of them exhibited a bitter taste (Figure 2). These bitter-tasting samples were subsequently characterized by spectroscopic methods (MS, NMR, and IR). On the other hand, no satisfactory HPLC separation was achieved for fractions 6 and 7. The identities of the bitter principles present in these two fractions were therefore deduced from HPLC-MS data, as described below.

Allithiolanes A. (+)ESI-HRMS data of bitter-tasting compound 4A isolated from fraction 4 corresponded with the elemental composition of C₁₀H₁₈O₂S₄ ($[M + H]^+$ found 299.0261 Da, calcd 299.0262 Da; Table 1). Its ¹³C NMR spectrum contained 10 signals attributable to eight *sp*³ (four CH₃– and four CH) and two *sp*² (–CH=) hybridized carbons (Table 2). Additional NMR experiments (COSY, HSQC, and HMBC) revealed the presence of three mutually isolated structural subunits: a five-membered 3,4-dimethyl heterocycle substituted at positions 2 and 5 together with CH₃– and CH₃CH=CH– groups. The methyl group showed a long-range correlation with carbon C-2, whereas the 1-propenyl moiety exhibited HMBC correlations with carbon C-5 of the ring (see the Supporting Information). Taking into consideration the molecular formula determined by HRMS, it was obvious that the compound possessed the 3,4-dimethylthiolane core shown in Figure 3. The structure of the side chains and positions of the two oxygens in the molecule were deduced on the basis of ¹³C NMR, MS/MS, and IR data, as described below.

The ¹³C NMR shift of the side-chain methyl group (δ 24.9) was perfectly consistent with literature data reported for the

CH₃SS– moiety, whereas the ¹³C NMR values of the CH=CH carbons (δ 130.7 and 138.7) suggested the presence of a CH₃CH=CHS(O)– group (Table 2).^{8,9,12,18,23–26} This assumption was supported by the MS/MS-fragmentation pattern, showing a sequential loss of fragments [C₃H₅S(O)–] and [CH₃S–]/[CH₃SS–] (i.e., 299 → 209 → 161/129 Da). On the other hand, no fragments indicating the presence of C₃H₅S(O)S– or C₃H₅SS(O)– groups were observed. The formation of a dominant fragment with *m/z* 129 Da corresponding to [C₆H₉OS]⁺ provided significant evidence for the presence of the 3,4-dimethylthiolane S-oxide ring in the molecule (see the Supporting Information for detailed MS-fragment assignment). The IR spectrum of the compound contained a strong absorption band at 1045 cm^{–1}, attributable to a sulfoxide group (–S=O) rather than a thiosulfinate functionality (IR bands of –S(O)S– and –SS(O)– typically appear in the region of 1073–1095 cm^{–1}). Finally, the compound did not react with 2-nitro-5-sulfanylbenzoate or 4-sulfanylpyridine, confirming the absence of a thiosulfinate moiety (–S(O)S– or –SS(O)–) in the molecule.^{20,21}

The geometric configuration of the 1-propenyl group was determined by ¹H NMR to be *E* ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 15.0$ Hz). Thus, the structure of the isolated compound was determined to be 3,4-dimethyl-2-(methylsulfonyl)-5-[(*E*)-1-propenylsulfinyl]-thiolane 1-oxide (Figure 4).

Inspection of HPLC-HRMS data revealed that numerous other species with the same elemental composition as compound 4A (i.e., C₁₀H₁₈O₂S₄) were also present in fraction 3. Their MS/MS spectra were very similar, differing only slightly in the relative intensities of the major fragments (see the Supporting Information), which indicated that the compounds were stereoisomers rather than constitutional isomers of 4A (with 6 chiral centers, 64 stereoisomers of the compound may exist). Despite testing several stationary phases (C-8, C-18, F5, biphenyl), no satisfactory HPLC separation was achieved to isolate the individual compounds because of their coelution with other components present in fraction 3. We therefore decided to generate these compounds in a model system consisting of isoalliin (1), methiin (2), and alliinase. Indeed, compounds having retention times and MS/MS spectra fully identical to those of the species present in the onion-juice extract were also found in the model mixture (see the Supporting Information). Along with compound 4A, seven of its isomers were subsequently isolated from the model mixture by preparative HPLC and characterized by MS, NMR, and IR (Tables 1 and 2). The NMR data confirmed our initial assumption that all these compounds, which we named allithiolanes A₁–A₇, were stereoisomers of 4A (allithiolane A₈). ¹³C NMR shifts of the side-chain CH₃– and CH₃CH=CH– groups varied only

Table 2. ¹H and ¹³C NMR Data of Alithiolanes A₁₋₈ and B₄₋₆^a

	CH ₃ CH=CHS(O)–					thiolane frame					–SSR		
	3''	2''	1''	5	4	4-CH ₃	3-CH ₃	3	2	1'	2'	3'	
A ₁	2.05 (dd, 1.4, 1.4)	6.69 (dq, 6.6)	6.63 (dq, 1.4)	3.40 (d, 9.7)	2.33 (ddq, 6.6)	1.37 (d, 6.6)	1.29 (d, 6.5)	2.52 (ddq, 6.5)	3.57 (d, 12.5)	2.53 (s)			
A ₂	18.09	139.62	130.82	92.08	42.23	17.52	15.90	44.61	80.55	24.14			
A ₃	2.04 (dd, 1.6)	6.65 (dq, 6.8)	6.52 (dq, 1.6)	3.66 (d, 7.6)	3.00 (ddq, 6.9)	1.50 (d, 6.9)	1.22 (d, 6.6)	2.43 (ddq, 6.6)	3.70 (d, 11.3)	2.56 (s)			
A ₄	18.08	139.77	130.10	87.36	43.16	14.21	16.39	44.69	88.12	24.10			
A ₅	2.04 (dd, 1.5)	6.81 (dq, 6.7)	6.73 (dq, 1.5)	3.69 (d, 5.7)	3.13 (ddq, 5.7)	1.63 (d, 7.4)	1.33 (d, 6.8)	2.30 (ddq, 6.8)	4.11 (d, 11.6)	2.52 (s)			
A ₆	18.24	140.56	131.37	84.72	42.83	11.22	14.31	44.26	86.35	24.20			
A ₇	2.02 (dd, 1.2)	6.63 (dq, 6.5)	6.58 (dq, 1.2)	3.69 (d, 11.3)	2.85 (ddq, 6.5)	1.26 (d, 6.5)	1.30 (d, 6.6)	1.76 (ddq, 6.6)	3.75 (d, 9.0)	2.53 (s)			
A ₈	17.93	138.34	130.57	81.92	41.68	16.78	16.80	46.82	83.93	24.51			
(E)-B ₄	2.00 (dd, 1.6)	6.53 (dq, 6.9)	6.22 (dq, 1.6)	3.65 (d, 6.9)	2.29 (ddq, 6.8)	1.30 (d, 6.8)	1.27 (d, 6.5)	2.56 (ddq, 6.5)	3.58 (d, 12.6)	2.54 (s)			
(Z)-B ₄	17.85	138.32	129.76	89.39	38.12	20.64	15.44	44.23	80.09	24.11			
(E)-B ₅	2.00 (dd, 1.5)	6.65 (dq, 6.8)	6.55 (dq, 1.5)	4.07 (dd, 1.1)	3.06 (ddq, 7.1)	1.43 (d, 7.1)	1.31 (d, 6.6)	2.08 (ddq, 6.6)	3.72 (dd, 1.1)	2.54 (s)			
(Z)-B ₅	18.14	140.55	131.59	90.17	43.28	14.74	17.14	45.75	85.16	23.87			
(E)-B ₆	2.00 (dd, 1.5)	6.63 (dq, 6.7)	6.47 (dq, 1.5)	3.79 (d, 5.1)	2.91 (ddq, 6.2)	1.34 (d, 7.2)	1.28 (d, 7.1)	2.61 (ddq, 7.1)	4.10 (d, 8.5)	2.54 (s)			
(Z)-B ₆	18.10	140.32	131.43	92.04	39.15	16.05	14.32	43.20	82.38	24.14			
(E)-B ₇	1.99 (dd, 0.7)	6.60 (dq, 5.9)	6.56 (dq, 0.7)	3.66 (d, 8.3)	2.78 (ddq, 6.8)	1.26 (d, 6.8)	1.28 (d, 6.5)	1.78 (ddq, 6.5)	3.97 (d, 10.7)	2.54 (s)			
(Z)-B ₇	18.00	138.74	130.66	80.83	38.70	18.55	16.01	42.77	81.20	24.85			
(E)-B ₈	2.03 (dd, 1.4)	6.63 (dq, 6.7)	6.57 (dq, 1.4)	3.65 (d, 11.5)	2.88 (ddq, 6.5)	1.27 (d, 6.5)	1.30 (d, 6.7)	1.80 (m)	3.73 (d, 8.9)	6.09 (m)	6.09 (m)	1.82 (m)	
(Z)-B ₈	17.93	138.13	130.56	82.06	41.80	16.63	16.90	46.97	83.27	124.00	134.07	18.25	
(E)-B ₉	2.02 (dd, 1.4)	6.63 (dq, 6.7)	6.57 (dq, 1.4)	3.63 (d, 11.5)	2.87 (d, 6.5)	1.27 (d, 6.5)	1.31 (d, 6.7)	1.81 (m)	3.71 (d, 9.0)	6.14 (dq, 1.6)	5.85 (dq, 6.9)	1.80 (dd, 1.6)	
(Z)-B ₉	17.93	138.14	130.54	82.11	41.77	16.68	16.74	46.71	83.58	127.37	130.30	14.56	
(E)-B ₁₀	2.00 (dd, 1.6)	6.53 (dq, 6.9)	6.22 (dq, 1.6)	3.64 (d, 6.9)	2.28 (m)	1.29 (d, 6.8)	1.27 (d, 6.5)	2.53 (ddq, 6.5)	3.59 (d, 12.7)	6.18 (dq, 1.5)	6.06 (dq, 6.7)	1.81 (dd, 1.5)	
(Z)-B ₁₀	17.84	138.23	129.85	89.39	38.31	20.59	15.47	44.49	80.34	124.29	133.50	18.25	
(E)-B ₁₁	2.00 (dd, 1.6)	6.52 (dq, 6.9)	6.22 (dq, 1.6)	3.65 (d, 6.9)	2.29 (m)	1.29 (d, 6.8)	1.27 (d, 6.6)	2.53 (ddq, 6.6)	3.61 (d, 12.7)	6.24 (dq, 1.6)	5.85 (dq, 7.0)	1.79 (dd, 1.6)	
(Z)-B ₁₁	17.84	138.25	129.83	89.32	38.43	20.58	15.46	44.42	80.55	127.50	130.05	14.45	
(E)-B ₁₂	2.02 (dd, 1.5)	6.65 (dq, 6.7)	6.56 (dq, 1.5)	4.06 (dd, 1.2)	3.08 (ddq, 6.1)	1.44 (d, 7.1)	1.32 (d, 6.6)	2.13 (ddq, 6.6)	3.69 (dd, 1.2)	6.11 (m)	6.11 (m)	1.83 (m)	
(Z)-B ₁₂	18.16	140.37	131.59	90.55	43.44	14.74	17.22	45.93	84.34	123.38	134.57	18.29	
(E)-B ₁₃	2.02 (dd, 1.6)	6.65 (dq, 6.7)	6.56 (dq, 1.6)	4.05 (dd, 1.1)	3.08 (m)	1.45 (d, 7.2)	1.32 (d, 6.5)	2.13 (m)	3.67 (dd, 1.1)	6.15 (dq, 1.6)	5.88 (dq, 6.9)	1.81 (dd, 1.6)	
(Z)-B ₁₃	18.16	140.46	131.57	90.41	43.31	14.77	17.08	45.67	84.69	126.87	130.74	14.56	

^aChemical shifts (δ) are given in parts per million, and coupling constants (J) are given in hertz (measured in CDCl₃).

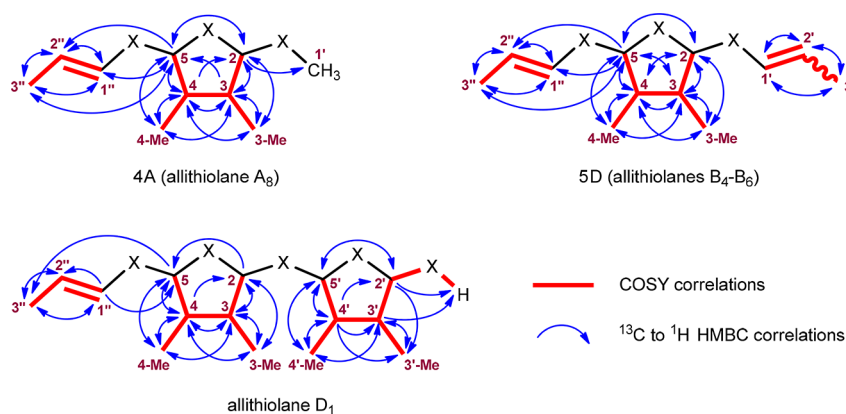


Figure 3. NMR correlations observed in 4A (allithiolane A₈, in CDCl₃), 5D (allithiolanes B₄₋₆, in CDCl₃), and allithiolane D₁ (in DMSO-*d*₆).

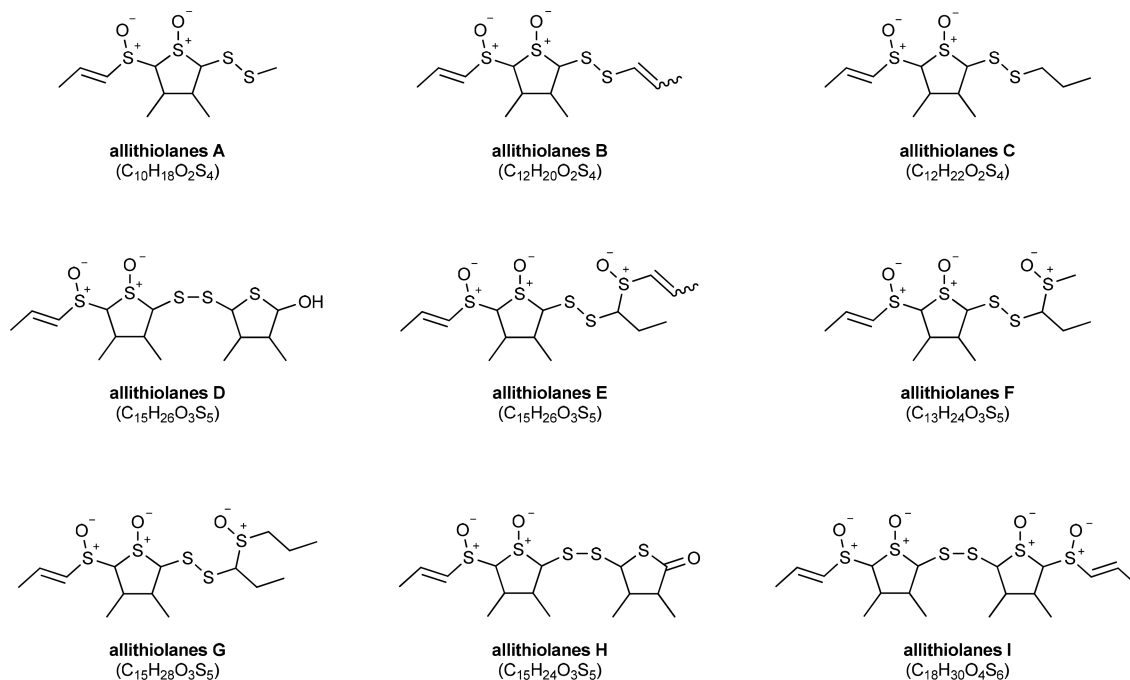


Figure 4. Structures of allithiolanes A–I.

slightly among the individual isomers, and all were perfectly consistent with the literature data reported for the CH₃SS– and CH₃CH=CHS(O)– moieties, respectively.^{8,9,12,18,23–26} In all allithiolanes A_{1–8}, the 1-propenyl group was present exclusively in the *E* configuration ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 14.9\text{--}15.1$ Hz).

Allithiolanes B. (+)ESI-HRMS data of compound 5D isolated from fraction 5 (Figure 2) corresponded with the elemental composition of C₁₂H₂₀O₂S₄ (Table 1), and its IR spectrum contained an intense absorption band at 1034 cm^{−1} (–S=O group).

Although the isolated sample appeared as a single HPLC peak, NMR analysis showed that it was in fact a mixture of three major and three minor stereoisomers with slightly different NMR shifts (Table 2). NMR experiments proved the presence of the same 3,4-dimethylthiolane core that was observed in allithiolanes A, together with two different CH₃CH=CH– groups (Figure 3). ¹³C NMR shifts of the CH=CH carbons of the two 1-propenyl groups were in accordance with literature data reported for the CH₃CH=CHSS– and CH₃CH=CHS(O)– functionalities, respectively.^{8,9,12,18,23–26} The geometric configuration of the CH₃CH=CHS(O)– group was exclusively *E* in all six isomers

($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 15.0$ Hz), whereas the CH₃CH=CHSS– moiety was present in both *E* (major) and *Z* (minor) arrangements ($J_{\text{CH}=\text{CH}} = 14.7$ and 9.2 Hz, respectively).

The MS/MS data indicated a very close structural similarity of these compounds to allithiolanes A. The major MS-fragmentation pathway consisted of a sequential loss of fragments [C₃H₅S(O)–] and [C₃H₅S–]/[C₃H₅SS–] (i.e., 325 → 235 → 161/129 Da), whereas no fragments corresponding to the loss of C₃H₅S(O)S– or C₃H₅SS(O)– groups were observed (see the Supporting Information). Taking into consideration all the above spectroscopic data, the structures of these compounds, named allithiolanes B, were unambiguously determined to be 3,4-dimethyl-2-(1-propenyl-disulfanyl)-5-[(*E*)-1-propenylsulfenyl]thiolane 1-oxide (Figure 4).

With 6 chiral centers and 1 isomerizable 1-propenyl group, 128 stereoisomers of allithiolanes B may exist. Comparison of NMR data of the isolated stereoisomers showed that their ¹³C shifts were very similar to the values of the corresponding carbons in allithiolanes A₄, A₅, and A₆, strongly suggesting identical absolute configurations at the chiral centers of these

compounds. Thus, we named the six isolated isomers allithiolanes (*E/Z*)-B₄, (*E/Z*)-B₅, and (*E/Z*)-B₆, respectively. HPLC-MS analysis showed that many other stereoisomers of allithiolanes B were present in fractions 5 and 6. We isolated some of the other species (peaks 5A–C and 5F in Figure 2) by preparative HPLC, but the collected samples were not suitable for NMR analysis because of the presence of numerous stereoisomers together with some other coeluting components.

Allithiolanes C. HPLC-MS analysis revealed that allithiolanes A and B were accompanied by minor amounts of species with the elemental composition of C₁₂H₂₂O₂S₄ (Table 1). Because of their low abundance in the extract, we did not attempt their isolation by preparative HPLC, and the structures of these compounds, named allithiolanes C, were determined solely on the basis of MS data. Their MS/MS-fragmentation pattern very closely resembled those of allithiolanes A and B (see the Supporting Information), making it obvious that allithiolanes C were their propyl analogues. The mass spectra of all allithiolanes C contained a fragment of *m/z* 237 Da (i.e., [M + H]⁺ – 90), corresponding to the loss of the CH₃CH=CHS(O)– group from the quasimolecular ion. On the other hand, no fragments indicating the presence of a CH₃CH₂CH₂S(O)– moiety were found in their mass spectra. These observations provided conceivable evidence that the propyl group was connected to the disulfide moiety at C-2 rather than to the sulfinyl group at C-5 (Figure 4).

Allithiolanes D. (+)ESI-HRMS data of bitter-tasting compound 5E isolated from fraction 5 corresponded with the elemental composition of C₁₅H₂₆O₃S₅ (Table 1). The intensity of ion [M + H]⁺ at 415 Da was very low, whereas the MS/MS spectrum contained an intense ion with *m/z* 397 Da (i.e., [M + H]⁺ – 18), indicating the presence of a hydroxyl group in the molecule. This assumption was also supported by a broad IR band around 3350 cm⁻¹ (–OH) together with a very strong band at 1049 cm⁻¹, attributable to the –S=O group.

Preliminary NMR analysis showed that the collected sample was a very complex mixture of stereoisomers not suitable for structure determination. After further HPLC fractionation of 5E, we obtained one stereoisomer (allithiolane D₁) that eluted as a well-separated peak. NMR experiments revealed in allithiolane D₁ the presence of one (*E*)-CH₃CH=CHS(O)– group and two 3,4-dimethylthiolane rings substituted at positions 2 and 5 (Figure 3). ¹³C NMR shifts of one of the thiolane rings corresponded with the values observed in allithiolanes A and B. On the other hand, NMR shifts of the second ring were in accordance with the data reported for cepathiolanes.^{11,12} NMR experiments performed in DMSO-*d*₆ confirmed the presence of one exchangeable hydrogen in the molecule. This hydrogen showed correlations with H-2' and with C-2' and C-3' in the COSY and HMBC spectra, respectively (Table 3). On the basis of the above evidence, it could be unambiguously concluded that allithiolane D₁ corresponded to the structure shown in Figure 4.

HPLC-MS analysis showed that many other stereoisomers of allithiolane D₁ were present in fractions 5 and 6 (in theory, 1024 stereoisomers may exist). We generated these compounds in a model mixture consisting of isoalliin and alliinase. Along with allithiolane D₁, we isolated and spectrally characterized another isomer (allithiolane D₂) from the model system (Table 3). Most of the other stereoisomers, however, did not elute as well-separated peaks suitable for isolation by preparative HPLC.

Allithiolanes E. Inspection of HPLC-MS data showed that another group of compounds isomeric with allithiolanes D

Table 3. ¹H and ¹³C NMR Data of Allithiolanes D₁ and D₂^a

atom	allithiolane D ₁		allithiolane D ₂
	CDCl ₃	DMSO- <i>d</i> ₆	CDCl ₃
3''	1.99 (dd, 6.9, 1.6)	1.91 (dd, 6.9, 1.6)	2.05 (dd, 6.9, 1.6)
	17.91	17.42	18.11
2''	6.57 (dq, 15.0, 6.9)	6.32 (dq, 15.0, 6.9)	6.72 (dq, 15.0, 6.9)
	138.87	136.67	139.76
1''	6.28 (dq, 15.0, 1.6)	6.60 (dq, 15.0, 1.6)	6.56 (dq, 15.0, 1.6)
	130.25	130.06	130.13
5	3.64 (d, 7.8)	4.20 (d, 7.3)	3.35 (d, 10.9)
	89.18	87.88	91.16
4	2.27 (m)	2.02 (ddq, 10.1, 7.3, 6.8)	2.21 (m)
	39.57	38.03	40.90
4-CH ₃	1.28 (d, 6.4)	1.16 (d, 6.8)	1.32 (d, 6.4)
	19.92	19.84	16.51
3-CH ₃	1.32 (d, 6.2)	1.17 (d, 6.5)	1.34 (d, 6.3)
	15.98	15.18	16.47
3	2.29 (m)	2.29 (ddq, 12.5, 10.1, 6.5)	2.17 (m)
	46.04	44.25	46.90
2	3.69 (d, 12.3)	3.71 (d, 12.5)	3.69 (d, 12.2)
	81.28	79.19	82.04
5'	4.02 (d, 9.4)	4.35 (d, 9.0)	3.94 (d, 9.7)
	62.92	64.30	62.51
4'	2.24 (ddq, 12.2, 9.4, 6.6)	2.11 (ddq, 11.8, 9.0, 6.7)	2.26 (m)
	45.15	47.86	44.52
4'-CH ₃	1.08 (d, 6.6)	1.13 (d, 6.7)	1.06 (d, 6.5)
	14.69	16.00	14.52
3'-CH ₃	1.11 (d, 6.7)	0.94 (d, 6.7)	1.11 (d, 6.8)
	13.63	13.79	13.61
3'	1.80 (ddq, 12.2, 4.1, 6.7)	1.78 (ddq, 11.8, 4.0, 6.7)	1.77 (m)
	51.07	51.12	50.76
2'	5.17 (d, 4.1)	5.17 (dd, 5.6, 4.0)	5.15 (d, 4.1)
	82.93	83.53	82.96
2'-OH	n.o. ^b	5.97 (d, 5.6)	n.o.

^aChemical shifts (δ) are given in parts per million, and coupling constants (*J*) are given in hertz. ^bNot observed.

present in fractions 3 and 4. The MS/MS-fragmentation pattern of these species indicated their very close structural resemblance with the other groups of allithiolanes (see the Supporting Information). As a consequence of the presence of a multitude of stereoisomers, ¹H NMR spectra of the samples collected by preparative HPLC (peaks 4B–D in Figure 2) were immensely complex, making their interpretation impossible. The structures of these compounds, trivially named allithiolanes E, were therefore determined on the basis of detailed evaluation of their MS/MS-fragmentation and isotopic patterns.

In contrast to allithiolanes D, ion [M + H]⁺ at 415 Da was easily observable in the mass spectra of these compounds, whereas the fragment with *m/z* 397 Da, a typical MS feature of allithiolanes D, was completely absent. The major MS-fragmentation pathway of allithiolanes E consisted of consecutive losses of two C₃H₅S(O)– groups (i.e., 415 → 325 → 215 Da). Provided that one of these groups was bound to carbon C-5, it was obvious that the second was part of the C₆H₁₁OS₃– side chain connected to the C-2 of the 3,4-dimethylthiolane ring. On the basis of the collected MS data, including the MS/MS-

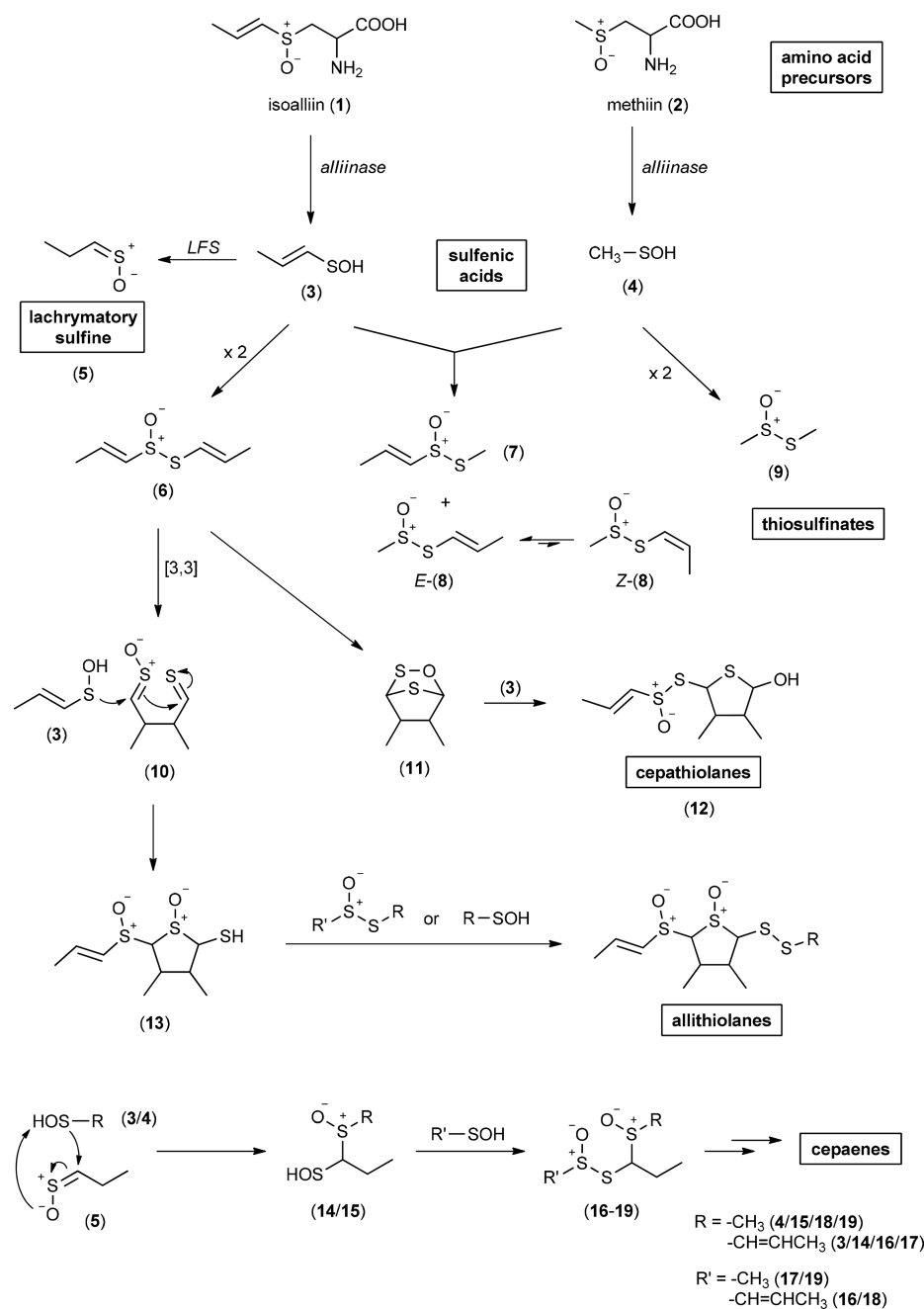


Figure 5. Formation pathways of principal sulfur compounds present in homogenized onion.

fragmentation and isotopic patterns as well as the known *Allium* chemistry, it could be deduced that this side chain had the cepaene-like structure shown in Figure 5 (see the Supporting Information).

Allithiolanes F and G. The identification of allithiolanes E prompted us to search also for their methyl and propyl cepaene-like homologues whose presence in the extract seemed to be likely. Indeed, two groups of compounds with the expected elemental composition (i.e., C₁₃H₂₄O₃S₅ and C₁₅H₂₈O₃S₅) were found by HPLC-HRMS. Because of their low amounts and coelution with other components present in the extract, isolation of these compounds by preparative HPLC was not feasible. Nevertheless, collected MS/MS data provided conceivable evidence that these species, named allithiolanes F and G,

respectively, corresponded to the expected structures shown in Figure 4.

Allithiolanes H. As mentioned earlier, no satisfactory HPLC separation was achieved for fractions 6 and 7. Along with several stereoisomers of allithiolanes B–D present in fraction 6, HPLC-MS analysis of these two fractions revealed the presence of another group of compounds with a fragmentation pattern very closely resembling those of allithiolanes A–G (see the Supporting Information). Because of the relatively low amounts of these compounds and their coelution with other components, we did not succeed in isolation of a sample of these species suitable for NMR analysis. The structures of these compounds, named allithiolanes H, were therefore determined solely on the basis of MS data and should be considered tentative.

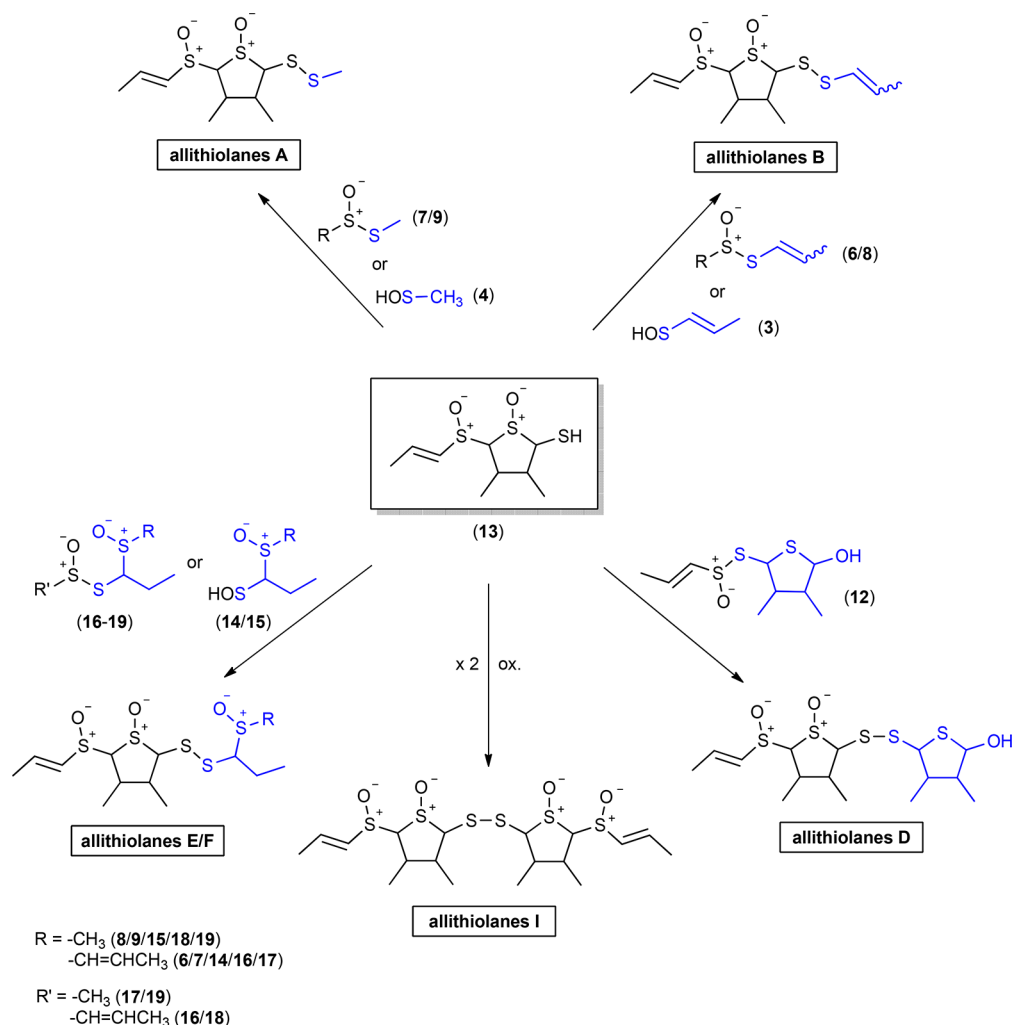


Figure 6. Proposed formation pathways of allithiolanes.

(+)ESI-HRMS data of allithiolanes H corresponded with the elemental composition of $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{S}_5$ (Table 1). The MS/MS fragmentation clearly suggested that allithiolanes H differ from the other groups of allithiolanes only in the structure of the unit connected via the disulfide bond to C-2. It could be deduced from MS data that this unit had the elemental composition of $\text{C}_6\text{H}_9\text{OS}$ (RDB = 2). MS/MS fragmentation of these compounds was initiated by the cleavage of the $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHS}(\text{O})-$ group from the molecule (i.e., 413 \rightarrow 323 Da), followed by the loss of the $\text{C}_6\text{H}_9\text{OS}$ unit (i.e., 323 \rightarrow 195 Da) connected to C-2. The latter unit broke away without undergoing any further extensive fragmentation, indicating the absence of some easily cleavable functional groups. On the basis of these observations, we propose that the $\text{C}_6\text{H}_9\text{OS}$ unit has the thiolactone structure shown in Figure 4. The collected MS data, including MS/MS-fragmentation and isotopic patterns, corresponded perfectly with the structure proposed for allithiolanes H.

Allithiolanes I. During our attempts to isolate allithiolanes A–H, we noticed the presence of another type of isomeric sulfur compounds showing an MS/MS-fragmentation pattern closely analogous to those of the other groups of allithiolanes (see the Supporting Information). These species were present at only very small levels in the extract, but increasing amounts were formed as a consequence of the decomposition of allithiolanes

A–H during isolation. HRMS data showed that their elemental composition corresponded to the formula of $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{S}_6$ (Table 1). We isolated these compounds by preparative HPLC as a mixture of numerous stereoisomers not suitable for NMR analysis. However, MS/MS-fragmentation and isotopic patterns were perfectly consistent with the structure shown in Figure 4. These compounds, named allithiolanes I, represent the heaviest sulfur species ($M_r = 503.8$ Da) spontaneously formed in comminuted onion tissue to be reported thus far.

Taste Characteristics of Allithiolanes. Taste characteristics of allithiolanes A, B, D, and E were evaluated. The tastes of all tested allithiolanes could be described as unpleasantly bitter with metallic notes. No significant differences were observed among the taste profiles of the four tested groups of allithiolanes. Detection thresholds for allithiolanes A, B, D, and E in water were determined to be 30, 30, 15, and 30 ppm, respectively.

Taking into consideration a typical content of isoalliin in onion (about 0.4–0.6 mg/g of fresh weight)^{19,27} and the taste thresholds determined (i.e., 15–30 ppm), it can be estimated that organoleptically detectable levels of allithiolanes in homogenized onion are reached when approximately 10–15% of the isoalliin present in the intact tissue is converted into these bitter-tasting compounds (considering that 3–6 mol of isoalliin are required for the formation of 1 mol of allithiolanes A–I).

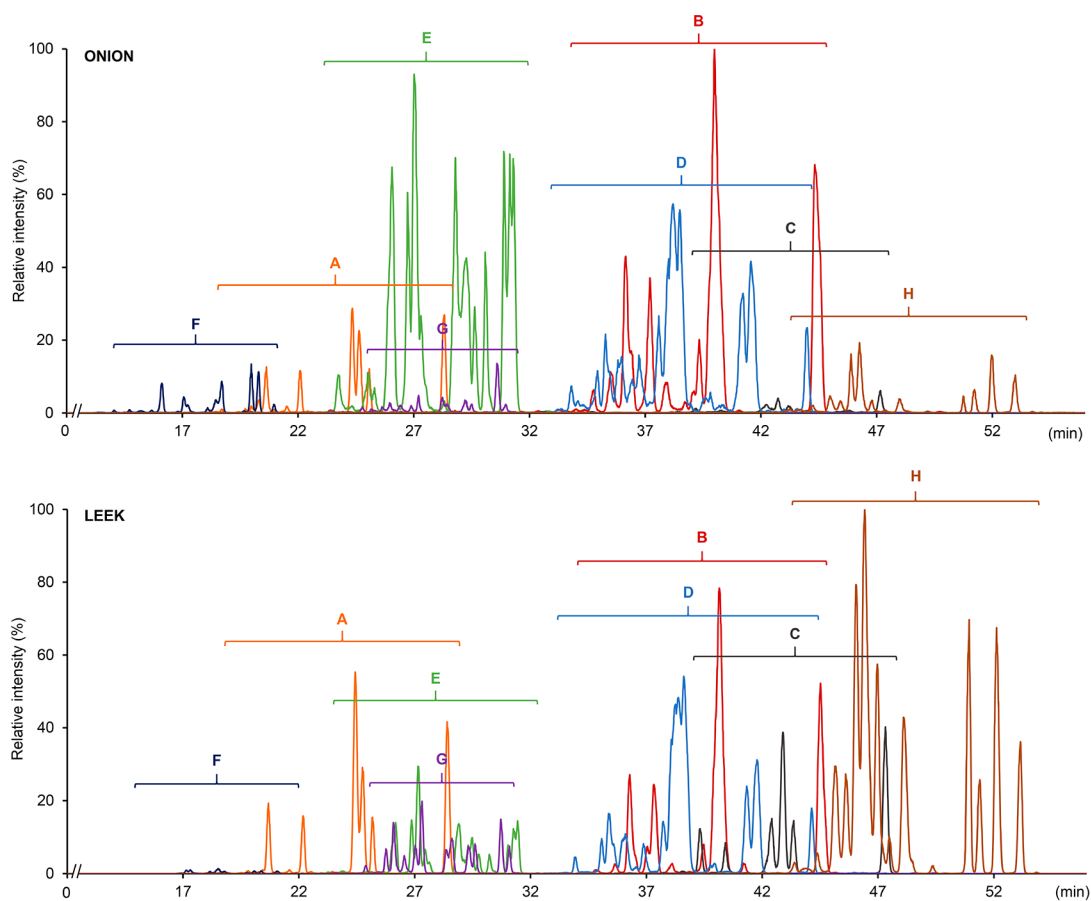


Figure 7. HPLC-HRMS traces of allithiolanes A–H present in the extracts of homogenized onion (top) and leek (bottom). Other coeluting components present in the extracts are not displayed.

Formation Pathways. Isoalliin (**1**) is obviously the principal precursor of all groups of allithiolanes described in this study. This assumption was confirmed by model experiments employing isoalliin, methiin (**2**), and alliinase. Allithiolanes B–E and G–I were produced in the model system containing only isoalliin, whereas the concomitant presence of methiin was required for the formation of allithiolanes A and F. Allithiolanes A–D, H, and I were generated in the model mixtures employing a crude alliinase preparation from either onion or garlic. In contrast, allithiolanes E–G required for their formation the onion enzyme system containing both alliinase and LFS. The latter observation implies that lachrymatory propanethial S-oxide (**5**), formed by the catalytic action of LFS (not present in the garlic enzyme preparation) on 1-propenesulfenic acid, is involved in the production of these three groups of allithiolanes.

Self-condensation of 1-propenesulfenic acid (**3**), formed by the alliinase-catalyzed cleavage of isoalliin, yields S-(1-propenyl) 1-propenethiosulfinate (**6**). This highly reactive thiosulfinate spontaneously undergoes a facile [3,3]-sigmatropic rearrangement to 3,4-dimethylbutanedithial S-oxide (**10**).^{25,28}

We propose that a carbophilic attack of another molecule of 1-propenesulfenic acid on **10** affords 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfanyl)-5-sulfanylthiolane 1-oxide (**13**), which in turn reacts with the –SS(O)– or –SOH functionalities of various compounds simultaneously formed in disrupted onion tissue (Figure 5). Thus, **13** reacts with $\text{CH}_3\text{SS}(\text{O})\text{R}$ and CH_3SOH , $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHSS}(\text{O})\text{R}$ and $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHSOH}$, or sultene (**11**) and cepathiolanes (**12**) to produce allithiolanes A, B, and

D, respectively. Allithiolanes E and F, containing cepaene-like side chains, are presumably formed by the reaction of **13** with the corresponding cepaene intermediates **14**, **16**, and **17**, **18**, and **19**, respectively. Allithiolanes H may be formed by oxidation of allithiolanes D. Allithiolanes I are probably generated by oxidative coupling of two molecules of **13** or by disproportionation of allithiolanes A–H during their isolation (Figure 6).

The propyl group of allithiolanes C and G can originate from propiin (S-propylcysteine sulfoxide) which may be present in minor quantities in the intact onion tissue. However, our experiments showed that allithiolanes C and G (together with propyl-containing thiosulfonates and cepaenes) were also formed in model systems consisting of only isoalliin and crude alliinase–LFS. The propyl side-chain group present in these compounds thus unambiguously originated from the 1-propenyl group of isoalliin. Nevertheless, the mechanism operative in the transformation of this group into the propyl moiety remains unclear.

Allithiolanes in Other *Allium* Species. The formation of allithiolanes is not restricted only to onion tissue. We found that all nine groups of allithiolanes were formed also in homogenized leek, with their relative proportions being somewhat different from those observed in onion (Figure 7). In the leek homogenate, remarkably higher relative amounts of allithiolanes C and H were found. In contrast, considerably lower levels of allithiolanes E and F were present in the homogenized leek. The latter observation is probably a consequence of the suppressed activity of LFS in leek, resulting in lower formation of cepaenes.

In homogenized garlic, on the other hand, no significant amounts of allithiolanes A–I were detected. The only allithiolane-type compounds found in homogenized garlic at higher levels were species with the same elemental composition as allithiolanes B (i.e., C₁₂H₂₀O₂S₄). Although these species had nearly identical MS/MS spectra to those of allithiolanes B, they differed in HPLC retention times. It is likely that these compounds were the allyl analogues of allithiolanes B. Three stereoisomers of these compounds, called garlicnins C₁, C₂, and C₃, were recently isolated from garlic homogenates (Figure 8).^{29,30}

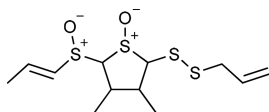


Figure 8. Structure of garlicnins C.

The absence of significant amounts of allithiolanes A–I in processed garlic is not surprising. Although isoalliin is the major flavor precursor present in onion, it typically accounts for not more than 10% of the total cysteine sulfoxide pool in garlic.¹⁹ As a consequence of this difference, the supply of 1-propenesulfenic acid in homogenized garlic tissue is not plentiful enough to allow for the formation of allithiolanes A–I, which require 3–6 molecules of this acid. Furthermore, lachrymatory propanethial S-oxide (S), which is essential for the generation of allithiolanes E–G, is not formed in garlic.

Concluding Remarks. This study shows that the cascade of reactions following the enzyme-mediated cleavage of isoalliin (1) is considerably more complex than thought so far. Along with propanethial S-oxide, thiosulfonates, cepaenes, zwiebelanes, bis(sulfine), onionins A, and cepathiolanes, another very large family of hitherto unknown compounds, trivially named allithiolanes, is spontaneously formed in onion homogenates. These thiolane S-oxide based compounds may negatively affect the organoleptic properties of homogenized onion because of their unpleasant bitter taste. Taking into account the number of molecules of 1-propenesulfenic acid incorporated into allithiolanes A–I (i.e., 3–6), it can be estimated that allithiolanes belong to compounds whose formation consumes a major portion of this acid generated from isoalliin.

As a result of the existence of a multitude of stereoisomers, allithiolanes do not form intense, nicely shaped peaks during HPLC separation, but they rather elute as poorly resolved and mutually overlapping mixtures of isomeric and homologous compounds (Figure 7). Owing to this fact, these compounds are not easily observable when optical detectors (e.g., UV or PDA) are used for their analysis.

The existence of a series of unknown compounds with masses 298 (C₁₀H₁₈O₂S₄), 324 (C₁₂H₂₀O₂S₄), and 326 Da (C₁₂H₂₂O₂S₄) in onion extracts was already observed by Block³¹ 25 years ago. He proposed that these species could be a family of homologous isomers with structures similar to cepathiolanes (12), with the hydroxyl group being replaced with CH₃CH=CHS(O)–. We believe, on the other hand, that the unknown compounds were in fact allithiolanes A, B, and C, respectively, as we did not detect any other species with the respective masses by HPLC-MS.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03118.

Representative (+)ESI-MS/MS, NMR, and IR spectra of allithiolanes; IUPAC names of allithiolanes A–I; and experimental details about the isolation of allithiolanes (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +420-38-7772664. E-mail: kubecr@centrum.cz or kubec@zf.jcu.cz.

ORCID

Roman Kubec: 0000-0002-2934-4443

Funding

Financial support from the Grant Agency of the University of South Bohemia (GAJU 112/2016/Z), the National Program of Sustainability (NPU I LO1509 and NPU I LO1416), and the Ministry of Education of the Czech Republic (LM2015055) is greatly appreciated. The NMR analyses were conducted within infrastructure built with the financial support from the Operational Programme Prague – Competitiveness (CZ.2.16/3.1.00/24023).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kamila Hůrková and Petra Koteňová (ICT Prague, Czech Republic) for their helpful technical assistance. The picture of the onion used in the Table of Contents graphic was downloaded from www.freepik.com.

■ ABBREVIATIONS USED

COSY, correlation spectroscopy; DMSO, dimethyl sulfoxide; ESI, electrospray ionization; HMBC, heteronuclear multiple-bond correlation; HPLC, high-performance liquid chromatography; HRMS, high-resolution mass spectrometry; HSQC, heteronuclear single-quantum correlation; IR, infrared; LFS, lachrymatory-factor synthase; MCT, mercury cadmium telluride; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PDA, photo-diode array; PTFE, polytetrafluoroethylene; RDB, rings and double bonds; TD, taste dilution; TDA, taste-dilution analysis; UV–vis, ultraviolet–visible

■ REFERENCES

- (1) Schwimmer, S. Development of a bitter substance in onion juice. *Food Technol.* **1967**, *21*, 292.
- (2) Schwimmer, S. Enzymatic conversion of *trans*-(+)-S-1-propenyl-L-cysteine S-oxide to the bitter and odor-bearing components of onion. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 401–404.
- (3) Brodnitz, M. H.; Pascale, J. V. Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 269–272.
- (4) Block, E.; Revelle, L. K.; Bazzi, A. A. The lachrymatory factor of the onion: an NMR study. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1277–1280.
- (5) Imai, S.; Tsuge, N.; Tomotake, M.; Nagatome, Y.; Sawada, H.; Nagata, T.; Kumagai, H. An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* **2002**, *419*, 685.
- (6) Silvaroli, J. A.; Pleshinger, M. J.; Banerjee, S.; Kiser, P. D.; Golczak, M. Enzyme that makes you cry – crystal structure of lachrymatory

factor synthase from *Allium cepa*. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2296–2304.

(7) Bayer, T.; Wagner, H.; Block, E.; Grisoni, S.; Zhao, S. H.; Neszmelyi, A. Zwiebelanes: novel biologically active 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane S-oxides from onion. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3085–3086.

(8) Bayer, T.; Breu, W.; Seligmann, O.; Wray, V.; Wagner, H. Biologically active thiosulphinates and α -sulphinyldisulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2373–2377.

(9) Morimitsu, Y.; Kawakishi, S. Inhibitors of platelet aggregation from onion. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3435–3439.

(10) Block, E.; Bayer, T. (*Z,Z*)-*d,l*-2,3-Dimethyl-1,4-butanedithial S,S'-dioxide: a novel biologically active organosulfur compound from onion. Formation of *vic*-disulfoxides in onion extracts. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4584–4585.

(11) Yoshida, M.; Kameyama, M.; Hosoda, H.; Shimizu, Y.; Sakaue, K.; Washino, T.; Iwata, M.; Omoto, M. New thiolane compound and use thereof. Patent JP2010143866A, 2010.

(12) Aoyagi, M.; Kamoi, T.; Kato, M.; Sasako, H.; Tsuge, N.; Imai, S. Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10893–10900.

(13) El-Aasr, M.; Fujiwara, Y.; Takeya, M.; Ikeda, T.; Tsukamoto, S.; Ono, M.; Nakano, D.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T. Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1306–1308.

(14) Nohara, T.; Fujiwara, Y.; Kudo, R.; Yamaguchi, K.; Ikeda, T.; Murakami, K.; Ono, M.; Kajimoto, T.; Takeya, M. Isolation and characterization of new onionins A₂ and A₃ from *Allium cepa*, and of onionins A₁, A₂, and A₃ from *Allium fistulosum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 1141–1145.

(15) Kubec, R.; Štefanová, I.; Zápál, J.; Kuzma, M. Isoalliin-derived thiolanes in processed onion. *J. Agric. Food Chem.*, to be submitted for publication, **2018**.

(16) Block, E.; Calvey, E. M.; Gillies, C. W.; Gillies, J. Z.; Uden, P. Peeling the Onion: Organosulfur and -selenium phytochemicals in genus *Allium* plants. In *Functionality of Food Phytochemicals*; Johns, T., Romeo, J. T., Eds.; Plenum Press: New York, NY, 1997; pp 1–30.

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

(18) Kubec, R.; Hrbáčová, M.; Musah, R. A.; Velišek, J. *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5089–5094.

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

(20) Miron, T.; Rabinkov, A.; Mirelman, D.; Weiner, L.; Wilchek, M. A spectrophotometric assay for alliin and alliinase (alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. *Anal. Biochem.* **1998**, *265*, 317–325.

(21) Miron, T.; Shin, I.; Feigenblat, G.; Weiner, L.; Mirelman, D.; Wilchek, M.; Rabinkov, A. A spectrophotometric assay for alliin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyrindine with thiosulfinates. *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 76–83.

(22) Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231–238.

(23) Kubec, R.; Velišek, J.; Musah, R. A. The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 21–25.

(24) Kubec, R.; Kim, S.; McKeon, D. M.; Musah, R. A. Isolation of S-*n*-butylcysteine sulfoxide and six *n*-butyl-containing thiosulfinates from *Allium siculum*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 960–964.

(25) Block, E.; Bayer, T.; Naganathan, S.; Zhao, S. H. *Allium* chemistry: synthesis and sigmatropic rearrangements of alk(en)yl 1-

propenyl disulfide S-oxides from cut onion and garlic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2799–2810.

(26) Block, E.; Gulati, H.; Putman, D.; Sha, D.; You, N.; Zhao, S. H. *Allium* chemistry: Synthesis of 1-[alk(en)ylsulfinyl]propyl alk(en)yl disulfides (cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4414–4422.

(27) Kato, M.; Masamura, N.; Shono, J.; Okamoto, D.; Abe, T.; Imai, S. Production and characterization of tearless and non-pungent onion. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9.

(28) Joyce, N. I.; Eady, C. C.; Silcock, P.; Perry, N. B.; van Klink, J. W. Fast phenotyping of LFS-silenced (tearless) onions by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1449–1456.

(29) Nohara, T.; Kiyota, Y.; Sakamoto, T.; Manabe, H.; Ono, M.; Ikeda, T.; Fujiwara, Y.; Nakano, D.; Kinjo, J. Garlicnins B₁, C₁, and D, from the fraction regulating macrophage activation of *Allium sativum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 747–751.

(30) Nohara, T.; Fujiwara, Y.; Ikeda, T.; Murakami, K.; Ono, M.; Nakano, D.; Kinjo, J. Cyclic sulfoxides garlicnins B₂, B₃, B₄, C₂, and C₃ from *Allium sativum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 695–699.

(31) Block, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1135–1178.

Další informace k publikaci

Allithiolanes: Nine Groups of a Newly Discovered Family of Sulfur Compounds Responsible for the Bitter Off-Taste of Processed Onion

Overview of attention for article published in Journal of Agricultural & Food Chemistry, August, 2018



SUMMARY

News

Title Allithiolanes: Nine Groups of a Newly Discovered Family of Sulfur Compounds Responsible for the Bitter Off-Taste of Processed Onion
Published in Journal of Agricultural & Food Chemistry, August, 2018
DOI 10.1021/acs.jafc.8b03118 [↗](#)
Pubmed ID 30041517 [↗](#)
Authors Roman Kubec, Iveta Štefánová, Martin Moos, Petra Urajlová, Marek Kuzma, Jakub Zápál
Abstract The compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion (*Allium cepa*) were studied... [\[show\]](#)

[View on publisher site](#)

[Alert me about new mentions](#)

About this Attention Score

In the top 5% of all research outputs scored by Altmetric

MORE...

Mentioned by **5** news outlets

What is this page?

ATTENTION SCORE IN CONTEXT

This research output has an **Altmetric Attention Score of 39**. This is our high-level measure of the quality and quantity of online attention that it has received. This Attention Score, as well as the ranking and number of research outputs shown below, was calculated when the research output was last mentioned on **20 August 2018**.

ALL RESEARCH OUTPUTS

#328,150
of 11,662,003 outputs

OUTPUTS FROM JOURNAL OF AGRICULTURAL & FOOD CHEMISTRY

#185
of 11,587 outputs

OUTPUTS OF SIMILAR AGE

#8,361
of 149,244 outputs

OUTPUTS OF SIMILAR AGE FROM JOURNAL OF AGRICULTURAL & FOOD CHEMISTRY

#5
of 106 outputs

So far Altmetric has tracked 11,587 research outputs from this source. They typically receive a little more attention than average, with a mean Attention Score of 5.8. This one has done particularly well, scoring **higher than 98% of its peers**.



NEWS

Press Pacs

2018

2017

2016

2015

2014

2013

2012

2011

2010

2009

2008

2007

2006

2009

2008

2007

2006

News Releases

Reactions

Science Podcasts

ACS in the News

Cutting-Edge Chemistry

American Chemical Society » News » Press Pacs » 2018 » ACS News Service Weekly PressPac: August 15, 2018 » The origin of off-taste in onions

FOR IMMEDIATE RELEASE

ACS News Service Weekly PressPac: Wed Aug 15 12:53:27 EDT 2018

The origin of off-taste in onions

"Allithiolanes – Nine Groups of Newly Discovered Family of Sulfur Compounds Responsible for the Bitter Off-Taste of Processed Onion"
Journal of Agricultural and Food Chemistry

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in *ACS' Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility — people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility — people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

The researchers acknowledge funding from the Grant Agency of the University of South Bohemia, the National Program of Sustainability and the Ministry of Education of the Czech Republic.

Note: ACS does not conduct research, but publishes and publicizes peer-reviewed scientific studies.



Researchers have identified the compounds behind the off-taste in processed onions.
Credit: GCapture/Shutterstock.com

Scientists uncover origins of that bizarre off-taste present in some onions

A culinary thriller involving onions that has plagued scientists for years has lastly been solved. Not long after we discovered the difficult physics behind the snapping of spaghetti, a group of researchers primarily based within the Czech Republic claims to have answered one other kitchen thriller. Frequent onion eaters is perhaps conversant in the considerably



A culinary thriller involving onions that has plagued scientists for years has lastly been solved.

Not long after we discovered the difficult physics behind [the snapping of spaghetti](#), a group of researchers primarily based within the Czech Republic claims to have answered one other kitchen thriller.

Frequent onion eaters is perhaps conversant in the considerably disagreeable discovery of a peculiar bitter style discovered throughout the contents of an in any other case common selection.

The phenomenon happens when an onion is chopped or processed for cooking, ensuing within the bitter style.

For years, little or no was recognized about why this explicit phenomenon happens.

Earlier analysis recommended that onions launch a compound known as lachrymatory issue syntase when minimize, ensuing within the acquainted stinging of eyes, inflicting somebody to tear up.

Scientists concluded that a number of sulphur-based compounds are additionally fashioned when the onion is chopped, however none of those brought on a bitter style.

9 new compound teams

In a paper printed to the American Chemical Society's *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, the researchers described an experiment that noticed them processing onions with a kitchen juicer.

Whereas freshly obtained onion juice was regular, after 30 minutes it was discovered to develop a robust, bitter style.

With this info, the group went about looking for what precisely occurs on this intervening period of time.

To do that, the researchers carried out sensory-guided high-performance liquid chromatography with the intention to establish the compounds that fashioned over time within the onion juice.

Because it turned out, they found 9 totally different teams of sulphur compounds within the juice, now dubbed allithiolanes.

The compounds had been discovered to type spontaneously when an onion is broken.

Not restricted to onions, allithiolanes had been additionally found in a few of its family, akin to leeks, with one of many teams present in garlic as properly.



Tweety **8 447** Sledování **1 263** Sledující **5 528** Lajky **8 296**

Robert Lee Hotz

@leHotz

I cover science matters for The Wall Street Journal. Distinguished Writer in Residence @nyu_journalism. President of The Alicia Patterson Foundation.

📍 New York

📅 Připojil se květen 2010

Tweety **Tweety a odpovědi** Média



Robert Lee Hotz @leHotz · 15. 8.

Weep no more: Chemists in the Czech Republic today say they've found the bitter chemicals that spoil the taste of one of the world's most popular processed vegetables – onions. [pubs.acs.org/action/doSearc...](https://pubs.acs.org/action/doSearch...)



Here's Why Raw Onions Taste Bitter

Home » Health » [Here's Why Raw Onions Taste Bitter](#)

[Share](#) [Pin](#) [Tweet](#) [Send](#)

Most of us must've experienced a bitter taste of raw onions though we bought good ones from the market and the fact that they don't look rotten. Then what's the reason behind it? *ACS' Journal of Agricultural and Food Chemistry* has finally identified several compounds that develop when a **raw onion** is cut that seem to be causing the smell.

WHY ONIONS MAKES YOU CRY

Earlier researches have shown that onions release lachrymatory which is a compound when it is cut open. This compound is the culprit for **watery eyes of the person cutting an onion**. Along with this compound the scientists have also found that many sulfur-based compounds also form in the onion after it is cut up though these weren't the cause of the bitterness. Which is when Roman Kubec and his colleagues took up the task of identifying them.

[JOIN](#) [POSTS](#) [DISHLISTS](#) [RECIPES](#) [EVENTS](#) [STREET](#) [SOCIAL](#) [DRINK](#) [BUSINESS](#) [HEALTH](#)



To figure out which compounds caused the **bitterness in onions**, the team began by processing the onions in a juicer. They found that the fresh juice wasn't bitter, but kept aside for half an hour, it developed a strong, bitter taste. After this occurrence, a sensory-guided high-performance liquid chromatography was performed to find out the compounds that had formed in the onion juice in the half an hour. They found nine groups of sulfur compounds in the juice which the researchers called as allithiolanes. These allithiolanes seem to form spontaneously when onions are damaged, cut or juiced. These were also identified in leeks and a group was found in garlic as well.

We simply think that cutting onions only when you want to consume it immediately can be your safest bet. Even keeping chopped onion in some water has worked out for us so you can try that too.

[Share](#) [Pin](#) [Tweet](#) [Send](#)



Scientists discover origins of that weird off-taste found in some onions



A culinary mystery involving onions that has plagued scientists for years has finally been solved.

Not long after we found out the complicated physics behind the snapping of spaghetti, a team of researchers based in the Czech Republic claims to have answered another kitchen mystery.

Frequent onion eaters might be familiar with the somewhat unpleasant discovery of a peculiar bitter taste found within the contents of an otherwise regular variety.

The phenomenon occurs when an onion is chopped or processed for cooking, resulting in the bitter taste.

For years, very little was known about why this particular phenomenon occurs.

Previous research suggested that onions release a compound called lachrymatory factor synthase when cut, resulting in the familiar stinging of eyes, causing someone to tear up.

Scientists concluded that several sulphur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste.

Nine new compound groups

In a paper published to the American Chemical Society's Journal of Agricultural and Food Chemistry, the researchers described an experiment that saw them processing onions with a kitchen juicer.

While freshly obtained onion juice was normal, after 30 minutes it was found to develop a strong, bitter taste.

With this information, the team went about trying to find what exactly happens in this intervening amount of time.

To do this, the researchers performed sensory-guided high-performance liquid chromatography in order to identify the compounds that formed over time in the onion juice.

As it turned out, they discovered nine different groups of sulphur compounds in the juice, now dubbed allithiolanes.

The compounds were found to form spontaneously when an onion is damaged.

Not limited to onions, allithiolanes were also discovered in some of its relatives, such as leeks, with one of the groups found in garlic as well.

Why onions can taste bitter



Thursday, 23 August, 2018

Onions are commonly used in a number of meals, both cooked and raw. But you may have noticed they not only bring tears to your eyes but can also leave a bitter taste in your mouth.

This happens when they are chopped or processed, but it was not known why. Published in *ACS's Journal of Agricultural and Food Chemistry*, scientists have found it is down to previously unknown compounds they called allithiolanes.

Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor when cut that causes eyes to water. Several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste.

Roman Kubec and colleagues processed onions with a kitchen juicer and found fresh juice was not bitter, but it developed a strong bitter taste after 30 minutes. After performing sensory-guided high-performance liquid chromatography, the researchers discovered nine groups of new sulfur compounds — allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged.

"Allithiolanes possess an unpleasantly bitter taste with detection thresholds in the range of 15–30 ppm," the study paper stated.

Further testing revealed they were also present in other popular vegetables such as leeks and garlic.

Image credit: ©stock.adobe.com/au/Olga Lyubkin



The origin of off-taste in onions – Allithiolanes



□ Biology, Chemistry, News | ⌚ August 15, 2018

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. After the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility – people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as they are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs.

Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

Why chopped onion is bitter after a while



New sulphur compounds are formed when onion is cut - s-cphoto

Scientists point to new sulphur compounds formed when onion is cut

NEW DELHI, AUGUST 20

Ever wondered why onion tastes awful when diced pieces are exposed to the air for a while? Science may have an answer to explain this foul taste associated with the bulbous vegetable.

A team of Czech chemists has found that leaving chopped onion pieces exposed to air for as little as 30 minutes leads to the formation of new sulphur compounds, hitherto not known to exist. The scientists, led by Roman Kubec of the University of South Bohemia in the Czech Republic, reported their findings in American Chemical Society's *Journal of Agricultural and Food Chemistry* last week.

Its characteristic taste and flavour have made onion one of the most popular vegetables worldwide. It is an important ingredient of most meals of nearly all nationalities. In the food industry, the bulbous vegetable plays an essential role in the production of numerous products, such as soups, canned foods, pickles, salads and meat products like sausages.

But, as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste could leave the resulting meal unsavoury sometimes. Very little, however, is known about why this particular phenomenon occurs, despite its significant negative impact on the taste of processed onion. There have been only two papers dealing with this puzzling phenomenon, in the past, according to the scientists.

In the first paper, published more than 50 years ago, Sigmund Schwimmer, a scientist with the US Department of Agriculture, concluded that the bitter ingredient was not derived from isoalliin, the key precursor of the sulphur sensory-active compounds which cause eyes to water and sting. However, in a subsequent paper, Schwimmer opined that isoalliin may have some role in the formation of a bitter taste. But the identity of the substances that contributed to the foul taste remained elusive, prompting Kubec and colleagues to probe further.

It runs in the family

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulphur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes.

These compounds form spontaneously when the onion is damaged.

Interestingly, the allithiolanes are not limited to onions but are also present in other onion family vegetables such as leeks and garlic.

Published on August 20, 2018



PUBLIC RELEASE: 15-AUG-2018

The origin of off-taste in onions

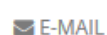
AMERICAN CHEMICAL SOCIETY



SHARE



PRINT



E-MAIL

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility -- people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

###

The researchers acknowledge funding from the Grant Agency of the [University of South Bohemia](#), the National Program of Sustainability and the [Ministry of Education of the Czech Republic](#).

Scientists discover origins of that weird off-taste found in some onions

by Colm Gorey

16 AUG 2018 335 VIEWS



Image: glebchik/Shutterstock

A culinary mystery involving onions that has plagued scientists for years has finally been solved.

Not long after we found out the complicated physics behind [the snapping of spaghetti](#), a team of researchers based in the Czech Republic claims to have answered another kitchen mystery.

Frequent onion eaters might be familiar with the somewhat unpleasant discovery of a peculiar bitter taste found within the contents of an otherwise regular variety.

The phenomenon occurs when an onion is chopped or processed for cooking, resulting in the bitter taste.

For years, very little was known about why this particular phenomenon occurs.

Scientists concluded that several sulphur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste.

Nine new compound groups

In a paper published to the American Chemical Society's *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, the researchers described an experiment that saw them processing onions with a kitchen juicer.

While freshly obtained onion juice was normal, after 30 minutes it was found to develop a strong, bitter taste.

With this information, the team went about trying to find what exactly happens in this intervening amount of time.

To do this, the researchers performed sensory-guided high-performance liquid chromatography in order to identify the compounds that formed over time in the onion juice.

As it turned out, they discovered nine different groups of sulphur compounds in the juice, now dubbed allithiolanes.

The compounds were found to form spontaneously when an onion is damaged.

Not limited to onions, allithiolanes were also discovered in some of its relatives, such as leeks, with one of the groups found in garlic as well.

RELATED: RESEARCH, CHEMISTRY, FOOD



Revealing Onion's Chemical Secrets

NEWS | Aug 16, 2018 | Original Story from the American Chemical Society.



Credit: Pixabay.

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility — people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

This article has been republished from [materials](#) provided by [the American Chemical Society](#). Note: material may have been edited for length and content. For further information, please contact the cited source.



The origin of off-taste in onions



By American Chemical Society — Bio and Archives—August 16, 2018

[Lifestyles](#) | [0 Comments](#) | [Print Friendly](#) | [Subscribe](#) | [Email Us](#)



Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility — people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

The researchers acknowledge funding from the Grant Agency of the University of South Bohemia, the National Program of Sustainability and the Ministry of Education of the Czech Republic.

["Allithiolanes – Nine Groups of Newly Discovered Family of Sulfur Compounds Responsible for the Bitter Off-Taste of Processed Onion"](#)

Can the 'Off-Taste' in Cut Onions be Avoided?

September 21, 2018 • By **Jesse Staniforth**



The average home cook chops an onion just before using it, but those who cut onions in advance—whether for home or industrial cooking—have long noticed a peculiar occurrence: Waiting a while to use onions after cutting them often results in their developing a bitter taste that was not previously present when they were freshly cut.

This bitterness prompted an inquiry by Czech Professor Roman Kubec of the Department of Applied Chemistry at České Budějovice's University of South Bohemia, who led a team in investigating its source. In a **paper published in the Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Kubec and his team explained they had identified the source of bitter off-taste in processed *Allium cepa* onions—nine groups of previously unidentified sulfur compounds they named allithiolanes A through I. They did this by processing onions through a juicer, verifying that fresh juice was not bitter, and noting it developed an off-taste after 30 minutes. Using liquid **chromatography**, the team identified the compounds as they developed spontaneously over time after the onion was damaged. The team also identified the spontaneous development of the same compounds in leeks and garlic.

"For a long time, the only studied sulfur compounds of onion were the lachrymatory factor and thiosulfates that are associated with its typical pungency and biting taste," Kubec tells Food Quality & Safety. "Allithiolanes, on the other hand, are a group of sulfur-rich heterocyclic species with considerably higher molecular weight. Thus, allithiolanes do not affect significantly the smell of onion (they possess only a faint odor), but they have a striking impact on its taste."

The formation of allithiolanes, Kubec explains, is entirely spontaneous, triggered immediately when the onion bulb is cut or otherwise damaged.

"Because allithiolanes are formed from the very same precursor (named isoalliin) as are the other odor- and taste-bearing species of onion, it seems impossible to completely avoid their formation in heat-untreated onions," says Kubec. "Their formation may be slowed by inactivation (e.g., by elevated temperature or acidification) of allinase which is the enzyme that catalyzes the cleavage of isoalliin. However, the best advice I can give to consumers is to cut the onion immediately before use to ensure that the amount of allithiolanes does not reach detectable levels."

In what may be frustrating for those in the food production industry who work with onions and hope to be able to avert the development of allithiolanes in cut and stored onions, Kubec says there is not an obvious industrial application to the study at present.

"I do not expect any immediate impact of our discovery on the food production industry," he says. "At the moment, we only made the very first step by the identification of the bitter principles. In the near future, we will focus on the evaluation of biological properties of allithiolanes. It may turn out that although these species taste awfully bitter, they can also exhibit significant health-promoting activity."

Food Quality & Safety - <https://www.foodqualityandsafety.com/article/can-the-off-taste-in-cut-onions-be-avoided/>

RESEARCHERS DISCOVER THE ORIGINS OF THE STRANGE TASTE IN SOME BULBS

August 16, 2018 Health 3 Views

[Facebook](#) [Twitter](#) [Google+](#) [LinkedIn](#) [Pinterest](#)



A culinary mystery with onions that has been plagued scientists for years has finally been solved.

Not long after we discovered the complicated physics of the spaghetti's snap, a team of researchers in the Czech Republic claims to have responded.

Frequent bulbs can be familiar with the somewhat unpleasant discovery of a remarkable bitter taste found within the contents of a otherwise plain black.

The phenomenon occurs when an onion is chopped or processed for cooking, resulting in

Previous research suggested that onion releases a compound called lachrymatory factor synthase when cut, resulting in the familiar stinging of the eyes, causing someone to tear up.

Researchers concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is hacked, but none of these caused ab

Nine New Compound Groups

In a paper published in the American Chemical Society's *Journal of Agricultural and Food Chemistry* the researchers described an experiment that saw them processing onion with a kitchen juicer.

While freshly caught onion juice was normal, after 30 minutes it was found that it developed a strong, bitter taste.

With this information, the team tried to find what exactly happens during this intermediate time. 1

9659003] To do this, the researchers performed sensory controlled high performance liquid chromatography to identify the compounds formed over time in onion juice.

As it turned out, they discovered nine different groups of sulfur compounds in juice, now dubbed allitians.

The compounds were found to form spontaneously when an onion was damaged.

Not restricted to onion, allitians were also discovered in some of the relatives h as leek, with one of those found in garlic.

▼ Topics

- Alliances / M & A
- Artificial intelligence
- Bee health
- Biodiversity
- Bioinformatics
- Biologicals & inoculants
- Biotechnology
- Cereal crops
- Climate change
- Coexistence
- Cover crops
- Crop protection
- Data analytics
- Drones / UAV
- Drought tolerance
- Education & careers
- Financial
- Food & health
- Food safety
- Forage crops
- Fungicide resistance
- Genome-editing technology
- Genomics
- Heat tolerance
- Herbicide resistance
- Indoor farming
- Insecticide resistance
- Intellectual property protection
- Legal & regulatory
- Legumes
- Plant biotechnology



The origin of off-taste in onions



Vyberte jazyk

Používá technologii Google Překladač

USA
August 15, 2018

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility -- people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

The researchers acknowledge funding from the Grant Agency of the [University of South Bohemia](#), the National Program of Sustainability and the [Ministry of Education of the Czech Republic](#).



Bilim İnsanları Soğan İle İlgili Şaşırtıcı Bilgilere Ulaştı!

Yemeklerin ve kültürümüzün vazgeçilmez sebzelerinden birisi olan soğanın neden acı olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya çıktı. Bilim insanları soğan üzerinde yaptıkları araştırmada oldukça ilginç bilgilere ulaştı! Sebebini bilmediğimiz birçok konuda bizleri aydınlatan, gezegenimiz ve yaşam hakkında bilgiler sunan bilim insanları bakalım soğan hakkında nasıl bilgiler elde etti?

Yemeklerin olmazsa olmazları arasında yer alan soğan diğer sebzelerin aksine göz yaşartıcı ve acı etkilere sahip. Meyve ve sebzeler hakkında bilinmezleri açıklayan araştırmacılar Çek Cumhuriyeti merkezli olan bir ekip kurarak soğanın nasıl ve neden acı olduğu sorusuna açıklık getirdi.

Piştirdiğinizde tadı oldukça lezzetli ve tatlı olan soğan çiğ olarak tükettiğinizde hatta doğradığınızda bile içerisinde ki lakriyomatuvar faktör sentazı olarak isimlendiren bileşik sebebiyle gözleri yaşartır.

Taze bir soğan suyu normal bir tat verirken aradan geçen yarım saat diliminden sonra acı bir tada dönüşen soğan suyu hakkında da araştırma yapıldı ve bunun sebebini bulmak için soğan suyu içerisinde ki bileşiklerin öncesi ve sonrası araştırıldı.

Yapılan araştırma sonucunda; soğan suyu içerisinde 9 farklı kükürt bileşiği tespit edildi. Allithiolanes diye adlandırılan bu madde soğan herhangi bir zarar gördüğü zaman açığa çıktı. Soğan zarar gördüğü anda bu 9 farklı bileşik harekete geçti. Soğanda gerçekleşen bu durumun pırasa gibi sebzelerde de görüldüğü anlaşıldı.

The origin of off-taste in onions

Date: August 15, 2018

Source: American Chemical Society

Summary: Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Share: [f](#) [t](#) [G+](#) [p](#) [in](#) [✉](#)

RELATED TOPICS

Plants & Animals

- > [New Species](#)
- > [Organic](#)
- > [Food](#)
- > [Biotechnology](#)
- > [Biology](#)
- > [Biochemistry Research](#)

ADVERTISEMENT



FULL STORY

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' *Journal of Agricultural and Food Chemistry* that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility — people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.



SciToday

@SciToday.net

Hlavní stránka

Přspěvky

Hodnocení

Fotky

Informace

Komunita

Informace a reklamy

Vytvořit stránku

To se mi líbí Sdílet Poslat zprávu ...



To se mi líbí

Komentář



SciToday

15. srpen v 9:13 · Instagram ·

Chopping #onions is usually associated with watery and stinging eyes, after the onions are diced, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste.

Here's Why: <https://t.co/YW8iVyQMgf>

#chemistry @amerchemsociety #Allithiolanes #News #Science #study #nature #Food #smell



To se mi líbí

Komentář

化学家揭秘洋葱发苦的怪味道从何而来

2018-08-24 20:00 找测网

我要反馈

切洋葱时通常会刺激眼睛让人流泪，而当人们已经把洋葱切成小块不再流泪后，洋葱碎片有时还是会产生一种让人不愉快的苦味，这究竟是怎么回事呢？现在，美国化学学会的《Journal of Agricultural and Food Chemistry》上有研究人员表示，他们已经发现了以前不为人知的引起这种味道的化合物。

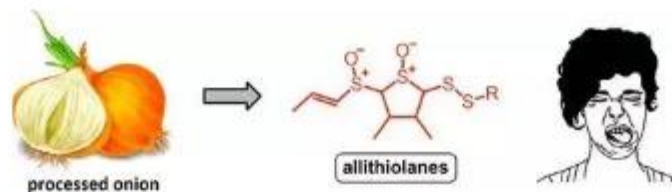


由于洋葱特有的味道以及强烈的气味，使其成为了世界上最受人们欢迎的蔬菜之一。洋葱以多功能性而著称，因此人们经常会生吃洋葱，或者在烹饪时把它们加到其他菜中。但是，当洋葱被切碎后有时会产生一种苦味，这种苦味可能会影响整道菜最后的味道，而一直以来我们对于这种特殊现象发生的原因都知之甚少。

先前的研究表明，洋葱在被切开时会释放出一种叫做催泪因子的化合物，这种化合物会导致人的眼睛流泪和刺痛。此外，科学家们还得出结论，在切洋葱的过程中，也会形成几种硫化物，但这些化合物都不会带来苦味。因此，Roman Kubec和他的同事们想要鉴定引起洋葱发出苦味的这种化合物。

这个研究小组用厨房榨汁机对洋葱进行了加工。刚榨好的蔬菜汁并不苦，但30分钟后就有了强烈的苦味。研究小组在感官引导下对其进行了高效液相色谱分析，以鉴定洋葱汁中随时间而形成的化合物。

研究人员在洋葱汁中发现了九组新的硫化物，他们将其命名为葱油酸 (Allithiolanes)。当洋葱受损时，这些化合物会自发形成。葱油酸不局限于洋葱中存在，进一步的检测表明，韭菜和大蒜中也含有这种物质。



标签 洋葱 味道 化合物 苦味 研究人员



usagnet



[YOUR STATE AG HEADLINES](#) | [MARKETS](#) | [AUCTIONS](#) | [REAL ESTATE](#) | [AGRI-BUSINESS DIRECTORY](#) | [EQUIPMENT LOCATOR](#)

USAgNet Search

[+ BACK TO HOME](#)

[+ ABOUT US](#)

[+ WEBSITE DESIGN](#)

[+ ADVERTISING INFO](#)

[+ CONTACT US](#)



**EMAIL US
NEWS TIPS!**



National & World Ag News Headlines

The Origin of Off-Taste in Onions

USAgNet - 08/28/2018

Chopping onions is usually associated with watery and stinging eyes. But after the onions are diced and the tears are dried, the vegetable pieces can sometimes develop an unpleasant bitter taste. Now, one group reports in ACS' Journal of Agricultural and Food Chemistry that they have identified previously unknown compounds causing this off-taste.

Thanks to onions' characteristic taste and strong smell, they are one of the most popular vegetables around the world. Onions are known for their versatility – people frequently eat them raw or add them to numerous dishes as they cook. But as onions are chopped and processed for cooking, a bitter taste that could affect the taste of the resulting meal can sometimes develop. Very little is known about why this particular phenomenon occurs. Previous research has shown that onions release a compound called lachrymatory factor upon being cut that causes eyes to water and sting. In addition, scientists have also concluded that several sulfur-based compounds are also formed when the onion is chopped, but none of these caused a bitter taste. So Roman Kubec and colleagues wanted to identify the bitter onion compounds.

The team processed onions with a kitchen juicer. Freshly obtained juice was not bitter, but after 30 minutes, it developed a strong bitter taste. The group performed sensory-guided high-performance liquid chromatography to identify the compounds that formed over time in the onion juice. The researchers discovered nine groups of new sulfur compounds in the onion juice, which they dubbed allithiolanes. These compounds form spontaneously when the onion is damaged. The allithiolanes were not limited to onions; further testing showed they were also present in leeks, and one of the groups was found in garlic.

The researchers acknowledge funding from the Grant Agency of the University of South Bohemia, the National Program of Sustainability and the Ministry of Education of the Czech Republic.

The American Chemical Society, the world's largest scientific society, is a not-for-profit organization chartered by the U.S. Congress. ACS is a global leader in providing access to chemistry-related information and research through its multiple databases, peer-reviewed journals and scientific conferences. ACS does not conduct research, but publishes and publicizes peer-reviewed scientific studies. Its main offices are in Washington, D.C., and Columbus, Ohio.

Bilim İnsanları, Soğan Hakkındaki Şaşırtıcı Gerçekleri Ortaya Koydular

Tarafından yedi24 - Ağustos 17, 2018 68 0

PAYLAŞ



Özellikle Türk kültüründe yemeklerin ana maddelerinden birisi olan soğan, şimdi de bilim insanlarının ilgi odağı haline geldi. Soğan hakkında daha önce duymadığımız bilgileri aşığa çıkaran bilim insanları, bu maddenin acı olmasının sebebini buldu.

Bizler haberdar olmasak da bilim insanları gezegenimiz ve yaşam hakkında çeşitli araştırmalarda bulunuyorlar. Bu noktada bilmediğimiz ve belki de sebebini merak ettiğimiz şeyleri açıklığa kavuşturan araştırmacılar, bu defa muhtemelen her gün tükettiğimiz bir gıda maddesini ele aldılar. Özellikle bizim kültürümüzde tahmin edeceğinize üzere neredeyse her yemekte soğan kullanılıyor. Buna ek olarak sade veya çiğ olarak tüketilebilen soğan, diğer sebze ve meyvelerin aksine acı ve göz yaşartıcı bir etkiye sahip.



Daha öncesinde spagettilerin birbirine yapışmasının altında yatan karmaşık fizik sebeplerini çözen araştırmacılar, şimdi bir başka mutfak gizemini daha aydınlatıyor. Çek Cumhuriyeti merkezli oluşturulan ekip, soğanın sahip olduğu acı tada açıklık getirdiler. Öyle ki pişirildiğinde tatlı olan soğan, çiğ olarak kesildiğinde lakriyomatuar faktör sentezi denen bir bileşiği salgılar ve bu da gözlerin yaşarmasına sebep olur.

Öte yandan taze soğan suyu normal bir tada sahipken, aradan 30 dakika zaman geçtiğinde suyun güçlü, acı bir tada sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun üzerinde duran ve suyun herhangi bir etki olmamasına karşın neden acıdığını sorgulayan bilim insanları, soğan suyunun içerisinde olan bileşiklerin öncesini ve sonrasını karşılaştırdılar.



Ortaya çıkan sonuçlara bakıldığında, soğan suyunda allithiolanes diye adlandırılan bir maddeye rastlandı. 9 farklı kükürt bileşiği tespit edilen madde, aslına bakacak olursanız soğan herhangi bir zarar gördüğü anda açığa çıkıyordu. Etki aldığı anda bileşiklerin harekete geçtiğini ifade eden bilim insanları, benzer durumun pırasa gibi bazı sebzelerde mevcut olduğunu belirtti.

Kaynak : <https://www.webtekno.com/bilim-insanlari-sogan-hakkindaki-sasirtici-gercekleri-ortaya-koydular-h51759.html>

Dostupné online:

<https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/presspacs/2018/acs-presspac-august-15-2018/the-origin-of-off-taste-in-onions.html>

https://www.eurekalert.org/pub_releases/2018-08/acs-too081518.php

<https://www.siliconrepublic.com/innovation/weird-off-taste-onions-explained>

<http://worldpronews.com/39296/1171/290/6079bd33c52a16106b37349108b63b1a76a3b926>

<https://twitter.com/lehotz?lang=cs>

<https://www.thehindubusinessline.com/news/variety/why-chopped-onion-is-bitter-after-a-while/article24739206.ece>

<https://www.technologynetworks.com/applied-sciences/news/revealing-onions-chemical-secrets-307675>

<https://satoshinakamotoblog.com/scientists-discover-origins-of-that-weird-off-taste-found-in-some-onions>

<https://canadafreepress.com/article/the-origin-of-off-taste-in-onions>

<https://www.hungryforever.com/heres-why-raw-onions-taste-bitter/>

<https://www.sciencedaily.com/releases/2018/08/180815124020.htm>

<https://phys.org/news/2018-08-off-taste-onions.html>

<https://vaaju.com/ireland/researchers-discover-the-origins-of-the-strange-taste-in-some-bulbs/>

http://www.seedquest.com/news.php?type=news&id_article=100557&id_region=&id_category=&id_crop=

<http://scitoday.net/the-origin-of-off-taste-in-onions-allithiolanes/>

<https://www.foodprocessing.com.au/content/processing/news/why-onions-can-taste-bitter-43830118>

http://infosurhoy.com/cocoon/saii/xhtml/en_GB/science/science-the-origin-of-off-taste-in-onions-report/?doing_wp_cron=1535048716.9402909278869628906250

<http://kozmikbilim.net/bilim-insanlari-sogan-ile-ilgili-sasirtici-bilgilere-ulasti/>

https://yedi24.net/bilim_insanlari_sogan_hakkindaki_sasirtici_gercekleri_ortaya_koydular/

<http://yourbinaryoption.com/scientists-discover-origins-of-that-weird-off-taste-found-in-some-onions/>

<http://mini.eastday.com/a/180824200025721.html>

<http://www.usagnet.com/story-national.php?Id=1706&yr=2018>

<http://www.mp-engineering.co.uk/onions-taste-bitter/>

<https://www.foodqualityandsafety.com/article/can-the-off-taste-in-cut-onions-be-avoided/>