

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Allithiolany a další strukturně příbuzné organosírné
sloučeniny rostlin rodu *Allium***

Bakalářská práce

Aneta Širná

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

České Budějovice 2021

Sirná, A., 2021: Allithiolany a další strukturně příbuzné organosírné sloučeniny rostlin rodu *Allium*. [Allithiolanes and other structurally related organosulfur compounds in plants of the genus *Allium*. Bc. Thesis, in Czech.] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá organosírnými sloučeninami rostlin rodu *Allium*, které obsahují thiolanové jádro.

Teoretická část se zaměřuje na nejvýznamnější zástupce rodu *Allium*, tedy na cibuli kuchyňskou (*Allium cepa*) a česnek kuchyňský (*Allium sativum*). Zahrnuje jejich produkci a hlavní skupiny organosírných sloučenin, které se v nich tvoří enzymově katalyzovaným rozkladem prekurzorů odvozených od cysteinu (isoalliinu a methiinu). Hlavní pozornost je zaměřena na skupinu sloučenin s názvem allithiolany, které způsobují nežádoucí zhořknutí cibule.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci metod pro izolaci allithiolanů A z extraktu cibule kuchyňské. Dalším cílem bylo vybrané sloučeniny izolovat pomocí preparativní HPLC.

Annotation

This bachelor thesis deals primarily with organosulfur compounds in plants belonging to the genus *Allium* that contain a thiolane core.

The theoretical part describes the most important representatives of the *Allium* genus, in particular onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). This part also includes production of onion and garlic, and main groups of organosulfur compounds, which are formed by enzyme-catalyzed decomposition of precursors derived from cysteine (isoalliin and methiin). It is focused mainly on a group of compounds called allithiolanes, which cause an undesirable bitter taste of processed onion.

The experimental part describes the optimization of methods for the isolation of allithiolanes A from an onion extract and their purification by preparative HPLC.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2021

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za trpělivost a ochotu při vedení této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janu Opekarovi, Ing. Petře Bittnerové, Ph.D. a Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za odborné rady a přátelské prostředí, které mi bylo v laboratoři poskytnuto.

Poděkování patří také všem ostatním, kteří se jakkoliv na této bakalářské práci podíleli.

Bakalářská práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (GAJU 028/2019/Z).

Obsah

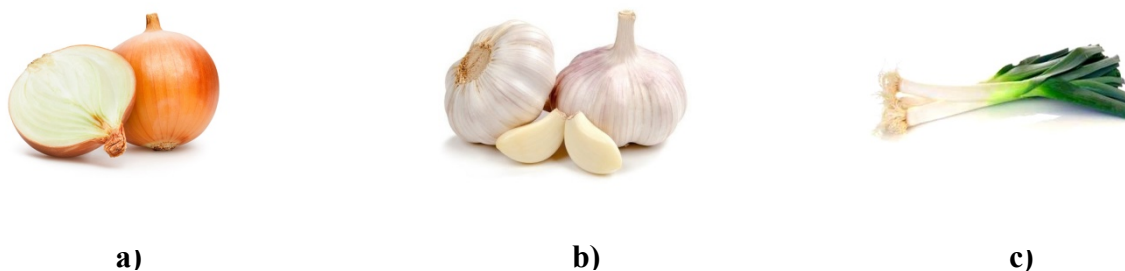
1	CÍLE PRÁCE	1
2	ÚVOD	2
2.1	ORGANOSIRNÉ SLOUČENINY CIBULE.....	3
2.1.1	<i>Sloučeniny obsahující thiolanové jádro</i>	6
2.2	ORGANOSIRNÉ SLOUČENINY ČESNEKU KUCHYŇSKÉHO.....	8
2.3	ALLITHIOLANY	10
2.3.1	<i>Hořknutí cibule</i>	10
2.3.2	<i>Struktura allithiolanů</i>	10
2.3.3	<i>Vznik allithiolanů</i>	12
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
3.1	CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	14
3.2	PŘÍSTROJE.....	14
3.3	GRADIENTY POUŽÍVANÉ V HPLC	15
3.4	IZOLACE ALLITHIOLANŮ Z EXTRAKTU CIBULE KUCHYŇSKÉ	17
3.4.1	<i>Příprava extraktu</i>	17
3.4.2	<i>Frakcionace extraktu</i>	17
3.4.3	<i>Optimalizované HPLC metody</i>	18
4	VÝSLEDKY	23
4.1	IZOLACE ALLITHIOLANŮ A	23
5	DISKUZE	29
6	ZÁVĚR	30
7	REFERENCE	31
8	POUŽITÉ ZKRATKY	36

1 Cíle práce

- A. vypracovat literární rešerši zaměřenou na strukturu a výskyt organosírných sloučenin obsahujících thiolanové jádro v rostlinách rodu *Allium*;
- B. optimalizovat postup pro izolaci allithiolanů A z cibule kuchyňské;
- C. pokusit se vybrané sloučeniny izolovat pomocí preparativní HPLC;
- D. získané výsledky vyhodnotit, vhodně zdokumentovat a diskutovat.

2 Úvod

Rod *Allium* L. je pravděpodobně největším rodem jednoděložných rostlin obsahující přibližně 750 druhů. Taxonomicky se řadí do čeledi česnekovitých (Alliaceae) a zahrnuje celosvětově jedny z nejpoužívanějších a nejrozšířenějších rostlin.¹ Pro tento rod je typické uzavření cibulí v membránových či vláknitých tunikách a volné nebo téměř volné žilnaté okvětní lístky. Díky své výrazné vůni a chuti jsou celosvětově nejpoužívanějšími zástupci cibule kuchyňská (*A. cepa*), česnek kuchyňský (*A. sativum*) a pór zahradní (*A. porrum*) (**Obrázek 1**). Dále do tohoto rodu náleží například česnek medvědí (*A. ursinum*), pažitka pobřežní (*A. schoenoprasum*) a cibule zimní (*A. fistulosum*). Rod *Allium* ovšem nezahrnuje pouze ekonomicky významné druhy běžně používané ke konzumaci, ale také zástupce využívané zejména jako okrasné květiny (*A. sicutum* – česnek sicilský, *A. giganteum* – česnek obrovský, *A. moly* – česnek zlatožlutý).^{2,3}



Obrázek 1: Zástupci rodu *Allium*: a) cibule kuchyňská;* b) česnek kuchyňský;† c) pór zahradní.‡

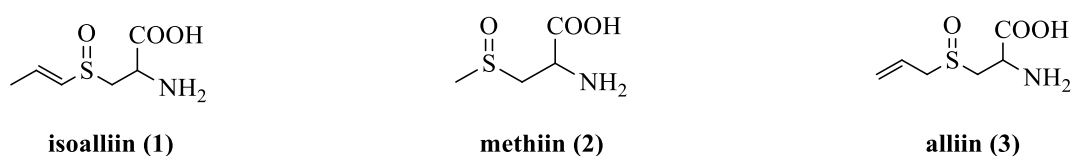
Ekonomicky nejdůležitějšími zástupci rodu *Allium* jsou bezpochyby cibule kuchyňská a česnek kuchyňský, které se každodenně používají v potravinářském průmyslu po celém světě a jejich produkce neustále roste. Podle dat FAO⁴ (Food and Agriculture Organization of the United Nations) byla cibule v roce 2001 druhá nejpěstovanější zelenina hned po rajčatech.¹ V roce 2019 se celosvětově vypěstovalo téměř 100 milionů tun cibule. K tomuto množství ovšem Česká republika přispěla pouhými 45 tisíci tunami. Mezi největší producenty cibule patří Čína (25 milionů tun), Indie (24 milionů tun) a USA (přes 3 miliony tun). Česneku se v roce 2019 celosvětově vypěstovalo téměř 31 milionů tun, přičemž největším producentem je bezpochyby Čína, která vyprodukovala většinu tohoto množství (přes 23 milionů tun).⁴

* <https://www.veggycation.com.au/vegetables/onion/>; staženo 7. 3. 2021

† <https://www.indiamart.com/proddetail/organic-garlic-20846724612.html>; staženo 7. 3. 2021

‡ <https://www.espritsante.com/articles/poireau-bio-allium-porrums>; staženo 7. 3. 2021

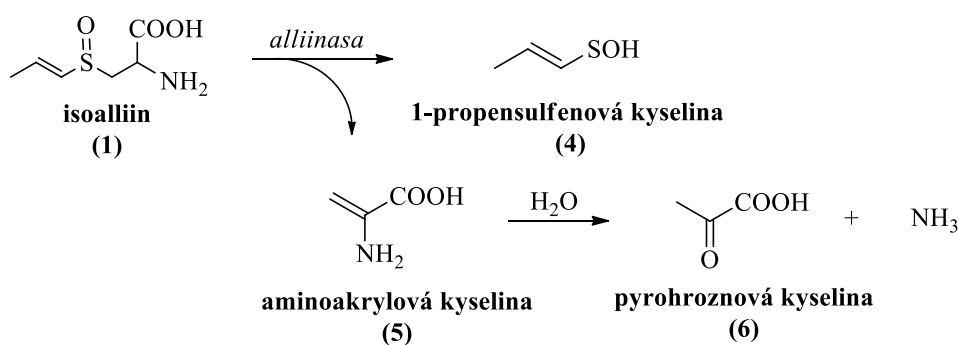
Za výraznou chuť, štiplavou vůni, typické aroma a slzotvorný účinek rostlin rodu *Allium* jsou primárně zodpovědné sloučeniny obsahující síru. Tyto organosírné sloučeniny vznikají enzymově katalyzovaným rozkladem prekurzorů odvozených od aminokyseliny cysteinu po narušení rostlinného pletiva. K tomuto rozkladu dochází při kontaktu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů s enzymem alliinase. Těchto prekurzorů je několik, a v každém rostlinném druhu tak mohou vznikat odlišné sloučeniny. V cibuli je hlavním prekurzorem (*E*)-*S*-(1-propenyl)cystein-*S*-oxid (isoalliin, **1**), v menší míře je zastoupen *S*-methylcystein-*S*-oxid (methiin, **2**), zatímco v česneku je nejvýznamnějším zástupcem *S*-allylcystein-*S*-oxid (alliin, **3**) (**Obrázek 2**).⁵⁻⁷



Obrázek 2: Nejvýznamnější prekurzory organosírných sloučenin česnekovitých rostlin.

2.1 Organosírné sloučeniny cibule

Po narušení buněk rostlinného pletiva probíhá enzymově katalyzovaná reakce, během které enzym alliinasa rozkládá *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy na odpovídající sulfenové kyseliny, R-SOH. Nejznámějším a nejdůležitějším derivátem cysteinu je v cibuli kuchyňské jednoznačně isoalliin (**1**), jehož relativní zastoupení odpovídá 70–90 % ze všech přítomných *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Při rozkladu isoalliinu vzniká 1-propensulfenová kyselina (**4**) za současného odštěpení kyseliny aminoakrylové (**5**), ze které následně vzniká kyselina pyrohroznová (**6**) (**Obrázek 3**). Mimořádně reaktivní 1-propensulfenová kyselina je klíčovým meziproduktem při vzniku většiny sírných sloučenin cibule, jak bude popsáno dále.^{5,8,9}



Obrázek 3: Úvodní fáze tvorby organosírných sloučenin v cibuli kuchyňské.

Slzotvorné látky: sulfin a bis-sulfin

Na rozdíl od česneku obsahuje cibule nejen alliinasu, ale i další enzym, který je zodpovědný za tvorbu slzotvorné sloučeniny. Dříve se předpokládalo, že se kyselina 1-propensulfenová (vznikající z isoalliinu) samovolně přeměňuje na sulfin propanthial-*S*-oxid (7) (**Obrázek 4**). Až v roce 2002 došlo k objevení enzymu LF-synthasy (LFS) katalyzujícího tvorbu (izomeraci) slzotvorného (LF = lachrymatory factor) propanthial-*S*-oxidu z 1-propensulfenové kyseliny.^{10,11,12}

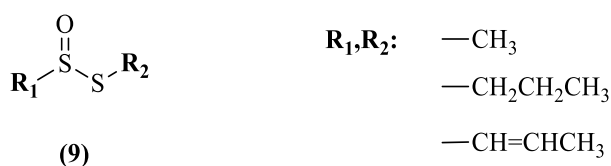
V roce 1990 byl v cibuli identifikován ještě jeden sulfin, tzv. bis-sulfin (8), (*Z,Z*)-2,3-dimethylbutandithial-*S,S'*-dioxid, který zřejmě vzniká vzájemnou reakcí 1-propensulfenové kyseliny a LF (**Obrázek 4**).¹³



Obrázek 4: Struktura sulfinu a bis-sulfinu.

Thiosulfináty

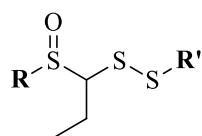
Thiosulfináty (9) jsou početně velmi bohatá skupina organosírných sloučenin (**Obrázek 5**). Tyto látky vznikají spontánní kondenzací dvou molekul sulfenových kyselin a patří mezi nejtypičtější a nejlépe prostudované zástupce organosírných metabolitů česnekovitých rostlin.¹⁴ Řadí se mezi hlavní nositele vůně a chutě čerstvě nakrájené cibule.



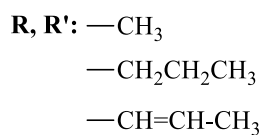
Obrázek 5: Obecná struktura thiosulfinátů.

Cepaeny

Do skupiny cepaenů patří hned několik sloučenin, z nichž první byly objeveny v roce 1989 díky svým antiastmatickým účinkům.¹⁵ Strukturně se jedná o α -sulfinyldisulfidy (10) (**Obrázek 6**) pravděpodobně vznikající, podobně jako bis-sulfin, interakcí sulfinu 7 se sulfenovými kyselinami.¹⁶

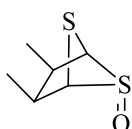


(10)

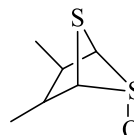
**Obrázek 6:** Obecná struktura cepaenů.

Zwiebelany

Při hledání látek zodpovědných za antiastmatické účinky cibule byly nalezeny dvě sloučeniny se sumárním vzorcem C₆H₁₀OS₂, které dostaly název zwiebelany A a B (**11**, **12**). Jedná se o geometrické izomery obsahující bicyklický skelet, které vznikají ze dvou molekul 1-propensulfenové kyseliny (**Obrázek 7**).¹⁷ Později bylo zjištěno, že zwiebelan A vykazuje také značné fungicidní účinky.¹⁸



zwiebelan A (11)

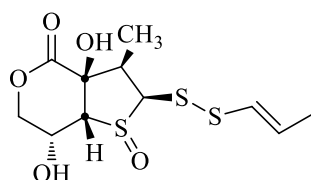
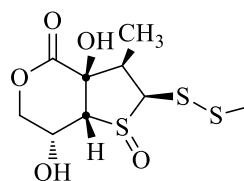


zwiebelan B (12)

Obrázek 7: Struktura zwiebelanů.

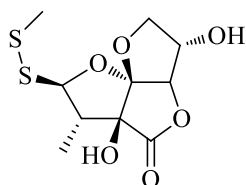
Welsoniny

V posledních letech stále přibývá nově objevených organosirných sloučenin, které vykazují významné biologické účinky. V roce 2015 do této organosirné rodiny přibyly dvě bicyklické sloučeniny, welsonin A₁ a welsonin A₂ (**13**, **14**). Welsoniny byly objeveny v cibuli zimní (*Allium fistulosum*), které se taky říká cibule velšská, proto dostaly název welsoniny (**Obrázek 8**). Welsonin A₁ vykazuje protinádorové účinky.¹⁹

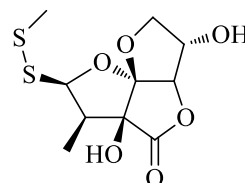
welsonin A₁ (13)welsonin A₂ (14)**Obrázek 8:** Struktura welsoninů.

Kujouniny

O pár let později byly v cibuli zimní nalezeny další sloučeniny, které byly pojmenovány kujouniny (**15**, **16**). Jedná se o látky s poměrně složitou tricyklickou strukturou vykazující potenciální protirakovinné účinky (**Obrázek 9**).^{20,21}



kujounin A₁ (**15**)



kujounin A₂ (**16**)

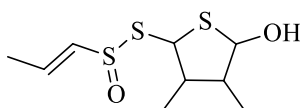
Obrázek 9: Struktura kujouninů.

2.1.1 Sloučeniny obsahující thiolanové jádro

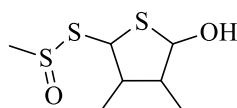
Doposud naprostá většina výše zmíněných sloučenin vznikajících v cibuli kuchyňské má acyklickou strukturu (s výjimkou zwiebelanů, welsoninů a kujouninů) a jejich výzkum probíhá již mnoho let. Až v roce 2010 se díky intenzivnímu výzkumu ukázalo, že v cibuli vzniká daleko více skupin organosírných sloučenin, u kterých se vyskytuje společný strukturální znak, a to 3,4-dimethylthiolanové jádro. Tento thiolanový kruh vzniká spojením dvou molekul 1-propensulfenové kyseliny.¹¹

Cepathiolany

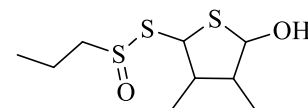
Prvními objevenými sloučeninami s thiolanovým jádrem byly cepathiolany A (**17**), což jsou stereoizomery (*E*)-*S*-(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl) 1-propenthiosulfínátu. K jejich objevení došlo v kultivarech cibule s potlačenou aktivitou LFS.¹¹ Posléze bylo popsáno několik dalších stereoizomerů této látky, jakož i jejich strukturálních homologů – cepathiolanů B a C (**18**, **19**) (**Obrázek 10**).⁸



cepathiolan A (**17**)



cepathiolan B (**18**)



cepathiolan C (**19**)

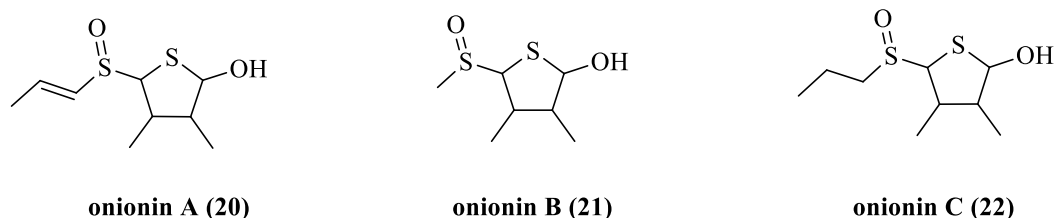
Obrázek 10: Struktura cepathiolanů.

Bylo zjištěno, že cepathiolany A vykazují významnou protisrážlivou aktivitu, přičemž jsou význačně účinnější při inhibici cyklooxygenasy-1 než aspirin.^{10,16}

Onioniny

Struktura onioninu A (**20**) byla původně nesprávně určena jako 3,4-dimethyl-5-(1-propenyl)-tetrahydrothiofen-2-sulfoxid-*S*-oxid.^{22,23,24} Teprve nedávno byla struktura této sloučeniny opravena na (*E*)-3,4-dimethyl-5-(1-propenylsulfinyl)thiolan-2-ol. Zároveň byly izolovány dvě skupiny dalších strukturálních homologů, a sice onioniny B (**21**) a onioniny C (**22**) (**Obrázek 11**).⁸

Bylo prokázáno, že onioniny A vykazují výraznou protinádorovou aktivitu.^{22,24,25} Je pravděpodobné, že podobné vlastnosti mohou vykazovat také onioniny B a C.



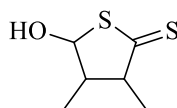
Obrázek 11: Struktura onioninů.

Allithiolany

V roce 2018 byla objevena nová, strukturálně unikátní devítičlenná skupina látek s thiolanovým kruhem – allithiolany A–I. Bylo prokázáno, že právě tyto sloučeniny jsou zodpovědné za vysoce nežádoucí hořkou chuť, která se tvoří několik minut po rozmělnění rostlinného pletiva cibule.²⁶ Struktura těchto látek, jakož i mechanismus jejich tvorby bude podrobně popsán v kapitole 2.3.

Cepadithiolaktony

K těmto organosirným látkám se zatím řadí pouze jediná skupina sloučenin se sumárním vzorcem C₆H₁₀OS₂. Doposud byly izolovány celkem tři stereoizomery, které byly pojmenovány triviálním názvem cepadithiolaktony A₁–A₃ (**23**). Jedná se o vůbec první (a dosud jediný) příklad přirozeně se vyskytujícího γ -dithiolaktonu (**Obrázek 12**).⁸

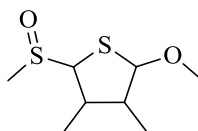


cepadithiolakton A (23)

Obrázek 12: Struktura cepadithiolaktonu.

Allium sulfoxid A

Společně s kujoniny byly objeveny také tři stereoizomery sloučeniny pojmenované *Allium* sulfoxid A (24) (**Obrázek 13**). Přesný mechanismus tvorby, ani biologická aktivita těchto sloučenin však není dosud známa.^{20,21}

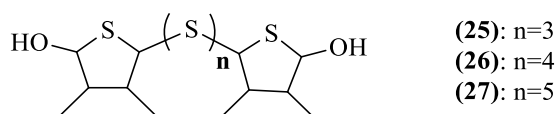


Allium sulfoxid A (24)

Obrázek 13: Struktura *Allium* sulfoxidu A.

Bisthiofanové polysulfidy

Zcela nejnovějšími přírůstkami do skupiny organosírných sloučenin obsahujících thiofanový kruh jsou bisthiofanové polysulfidy (25–27). Stejně jako u cepathiofanů k jejich objevení došlo v modelových systémech resp. v cibuli s potlačenou aktivitou LFS. Podobné jako cepathiofan, také tyto sloučeniny vykazují značnou protisrážlivou aktivitu (**Obrázek 14**).²⁷

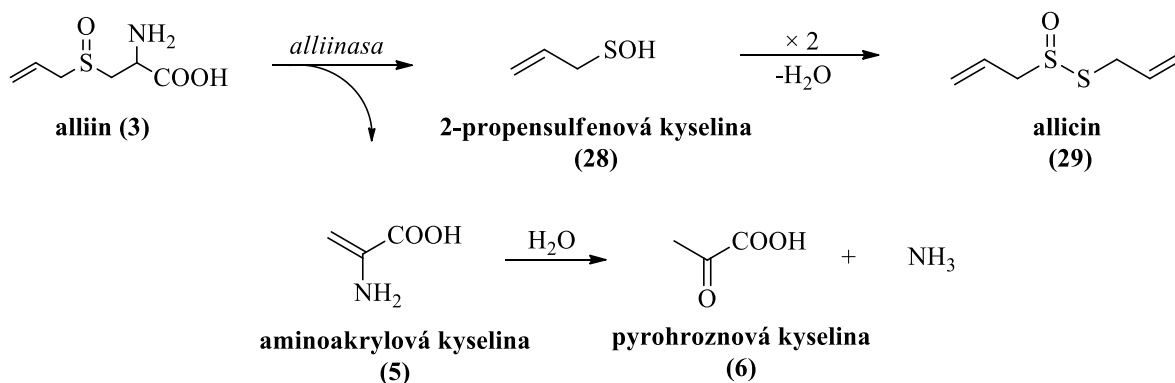


Obrázek 14: Struktura bisthiofanových polysulfidů.

2.2 Organosírné sloučeniny česneku kuchyňského

Podobně jako v cibuli, také v česneku vzniká celá řada organosírných sloučenin. Tento proces je spuštěn narušením buněk rostlinného pletiva, kdy dochází k enzymatické reakci. Hlavním prekurzorem je v tomto případě polohový izomer isoalliinu, alliin (*S*-allylcystein-*S*-oxid) (3), který se účinkem alliinasy rozkládá na 2-propensulfenovou kyselinu (28) a aminoakrylovou kyselinu (5). V česneku se v menší míře vyskytují také methiin (2) a isoalliin (1). Relativní

zastoupení těchto dvou v česneku minoritních prekursorů se zpravidla pohybuje kolem 10 % ze všech přítomných *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Z těchto třech prekursorů účinkem alliinasy vznikají příslušné sulfenové kyseliny, jejichž vzájemnou kondenzací se tvoří thiosulfináty. Mezi zdaleka nejznámější zástupce thiosulfinátů patří allicin (**29**) (**Obrázek 15**). Další transformací thiosulfinátů vznikají např. ajoeny, vinylthiiny a různé oligosulfidy.^{9,28}



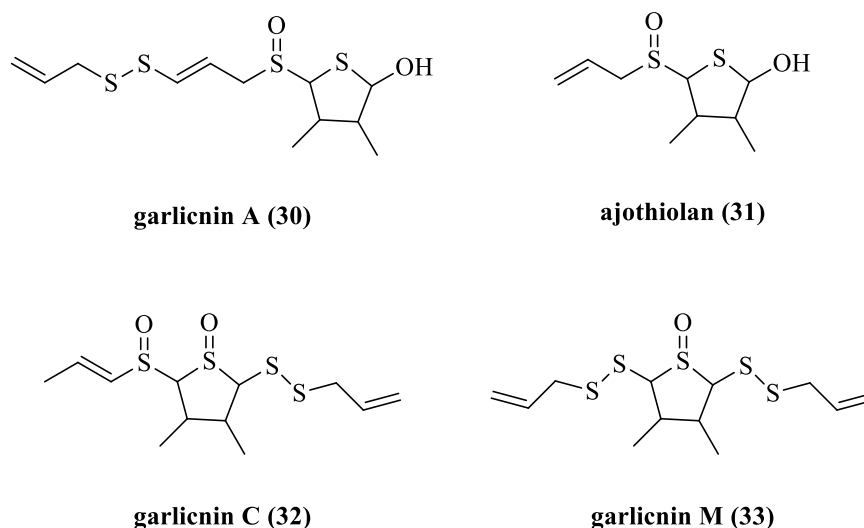
Obrázek 15: Úvodní fáze tvorby organosírných sloučenin v česneku kuchyňském.

Také v česneku bylo v nedávné době objeveno několik sloučenin obsahujících 3,4-dimethylthiolanové jádro, nicméně jejich počet je zatím výrazně nižší než v případě cibule. Konkrétně se jedná o garliciny A (**30**), B (**31**), C (**32**) a M (**33**), přičemž garlicin B je také označován jako ajothiolan.^{28,29,30,31,32}

Garliciny a ajothiolan

Garlicin A, (*E*)-5-((3-(allyldisulfanyl)allyl)sulfinyl)-3,4-dimethylthiolan-2-ol (**30**), je strukturním analogem onioninů A–C vyskytujících se v cibuli. Ukázalo se, že garlicin A má stejně jako již zmíněný onionin A protirakovinné vlastnosti.²⁸

Do skupiny ajothiolanů patří několik stereoizomerů 5-(2-allylsulfinyl)-3,4-dimethylthiolan-2-olu (**31**). Jedná se o sloučeninu, která byla původně pojmenována garlicin B, ale byla chybně určena její struktura (**Obrázek 16**).^{29,30} Po opravě její struktury se již označuje jako ajothiolan.³¹ Naopak garlicin C (**32**) lze na základě jeho struktury zařadit mezi allithiolany (je polohovým izomerem allithiolanu B).^{29,30} Lze se oprávněně domnívat, že i tyto sloučeniny mohou vykazovat výrazné biologické účinky, což je další důvod k jejich výzkumu do budoucna.^{8,29}



Obrázek 16: Struktura garlicininů a ajothiolanu.

2.3 Allithiolany

Allithiolany jsou jedny z nejnověji objevených skupin organosírných sloučenin česnekovitých rostlin. Doposud o nich byla vydána jedna jediná publikace, proto je o těchto sloučeninách zatím pouze velmi omezené množství informací.²⁶ Bylo popsáno devět skupin těchto látek, které byly triviálně pojmenovány allithiolany A–I. Tyto sloučeniny jsou zodpovědné za nežádoucí hořknutí cibule během jejího zpracování. Jejich triviální název je odvozen od latinského označení pro rod česnekovitých rostlin (*Allium*) a od přítomnosti thiolanového jádra v jejich struktuře.²⁶

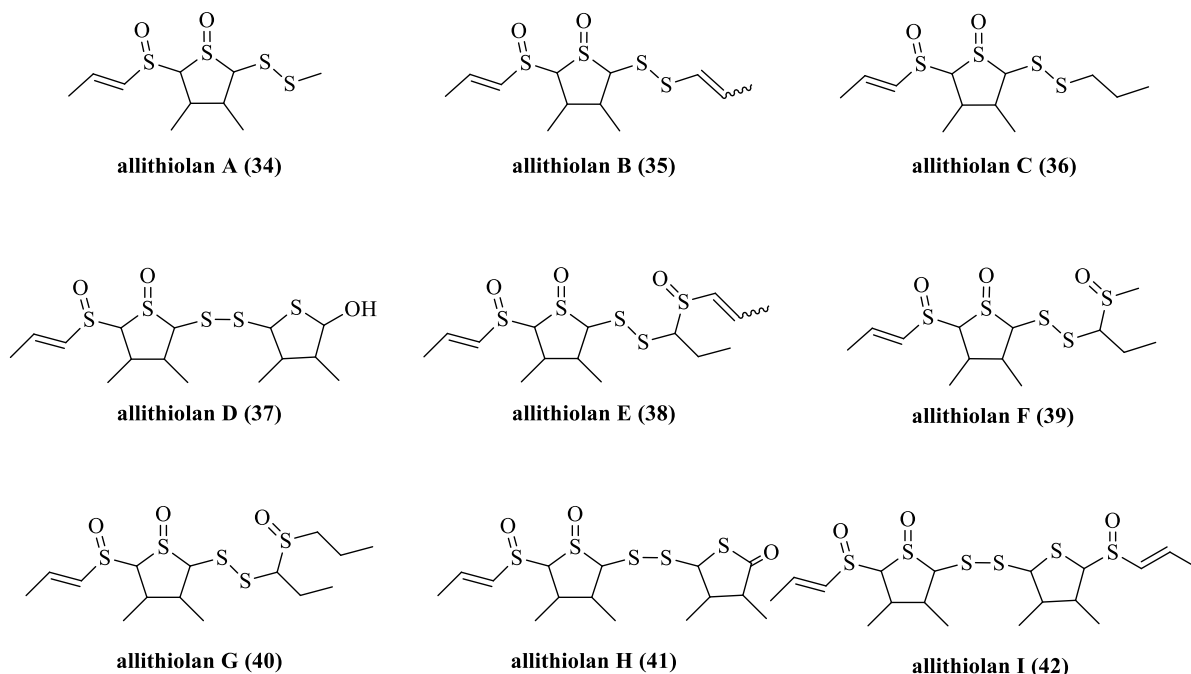
2.3.1 Hořknutí cibule

Pokud ponecháme delší dobu nakrájenou cibuli kuchyňskou bez jakékoliv tepelné úpravy, může se stát, že výrazně zhořkne. Tento jev probíhá spontánně po několika minutách od mechanického narušení rostlinného pletiva. Pro výrobce, kteří zpracovávají velká množství cibule, to představuje značný technologický problém, jelikož hořká až kovová pachut' může zkazit celý výsledný produkt.

2.3.2 Struktura allithiolanů

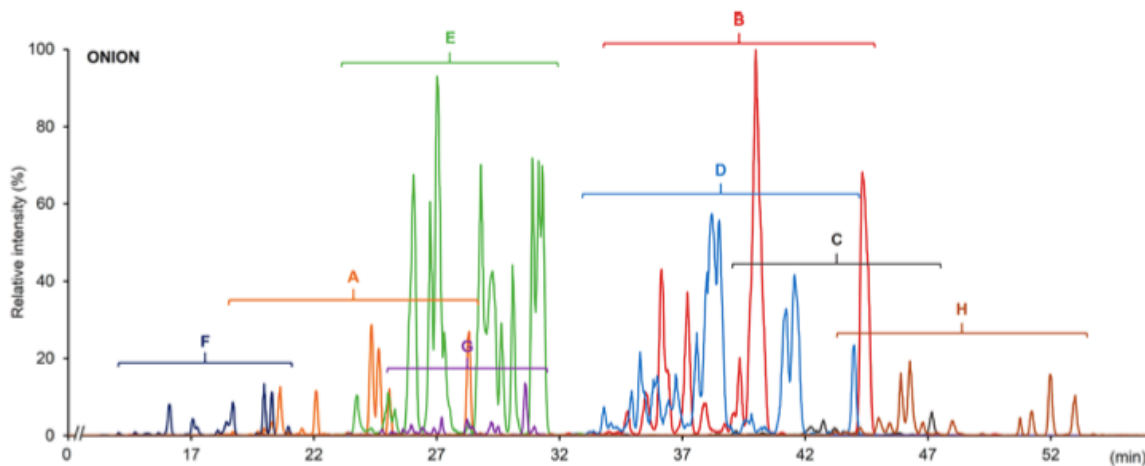
Allithiolany A–I jsou strukturně příbuzné deriváty 3,4-dimethylthiolan-*S*-oxidu mající sumární vzorce $C_xH_yO_2S_4$, $C_xH_yO_3S_5$ popř. $C_xH_yO_4S_6$ ($x = 10–18$, $y = 18–30$).²⁶ Všech 9 dosud popsaných skupin allithiolanů (34–42) obsahuje 3,4-dimethylthiolanový kruh s (*E*)-1-propenylsulfínovou skupinou navázanou v pozici 5. Navzájem se od sebe odlišují

strukturou postranního řetězce navázaného na disulfanylovou skupinu v pozici 2 (**Obrázek 17**). U strukturně nejjednoduššího allithiolanu A (**34**) je například na společný základ navázána pouze methylová skupina, zatímco u allithiolanu C (**36**) skupina propylová.²⁶



Obrázek 17: Struktura allithiolanů A–I.

Ze vzorců uvedených na **Obrázek 17** je patrné, že všechny skupiny allithiolanů obsahují hned několik chirálních center, a tudíž mohou tvořit celou řadu stereoizomerů. Například allithiolan A obsahuje 6 chirálních center, které teoreticky umožňují existenci celkem 64 stereoizomerů.²⁶ Že se v cibuli skutečně od každého allithiolanu tvoří několik desítek stereoizomerů, dokumentuje **Obrázek 18**. Tato skutečnost samozřejmě nesmírně komplikuje izolaci jednotlivých látek, jakož i jejich kvantifikaci.

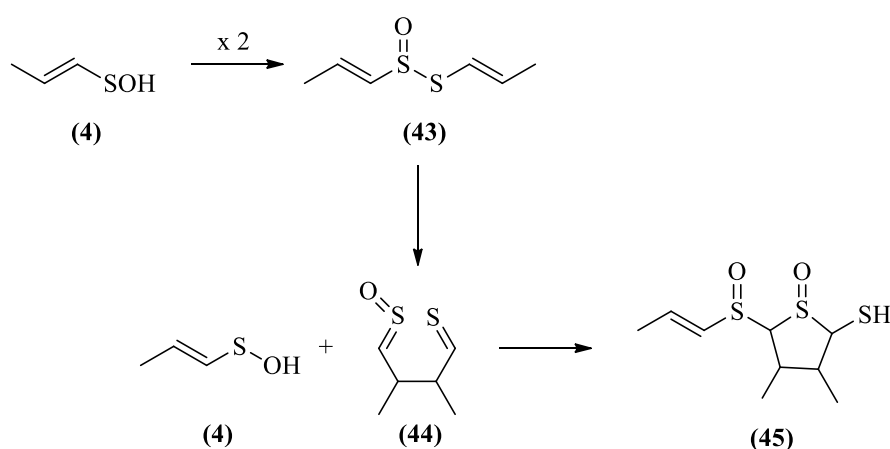


Obrázek 18: Zastoupení jednotlivých allithiolanů v cibuli (převzato z Kubec *et al.*²⁶).

2.3.3 Vznik allithiolanů

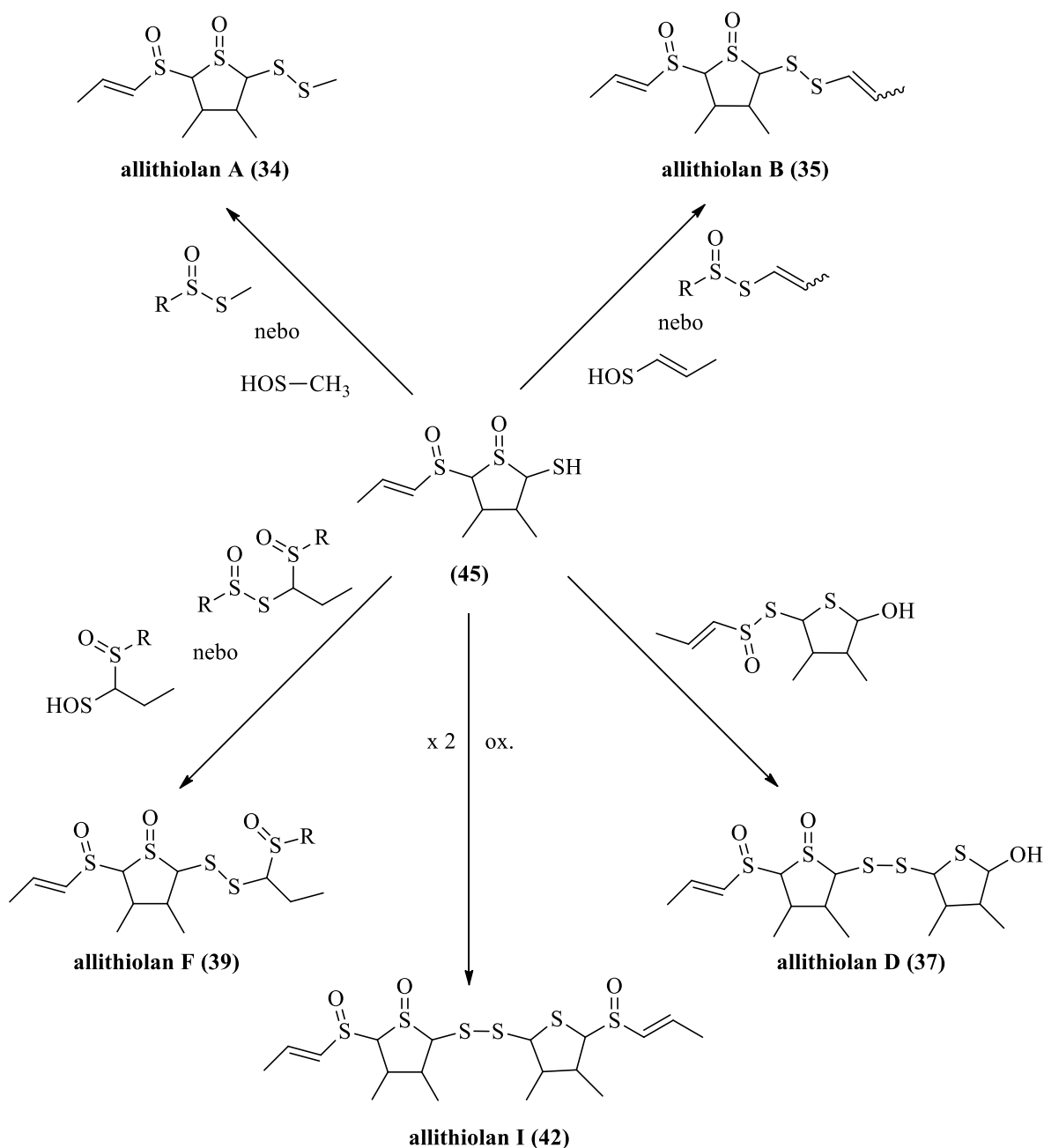
Bylo prokázáno, že klíčovým prekurzorem všech allithiolanů je isoalliin (**1**).²⁶ Navíc bylo zjištěno, že k tvorbě allithiolanů A a F je nezbytný také methiin (**2**).

Isoalliin se katalytickým účinkem alliinasy rozkládá na 1-propensulfenovou kyselinu (**4**), která následně kondenzuje za vzniku *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinátu (**43**).⁹ Tato látka je velmi reaktivní a samovolně izomeruje na 2,3-dimethylbutandithial-*S*-oxid (**44**), který reakcí s další molekulou 1-propensulfenové kyseliny (**4**) poskytuje 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfinyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxid (**45**), což je společný prekurzor všech skupin allithiolanů (**Obrázek 19**).²⁶



Obrázek 19: Mechanismus vzniku allithiolanů – I. fáze.²⁶

3,4-Dimethyl-2-(1-propenylsulfinyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxid (**45**) poté dále reaguje s dalšími látkami, které průběžně vznikají z isoalliinu a methiinu, jak je uvedeno na **Obrázek 20**.



Obrázek 20: Mechanismus tvorby allithiolanů – II. fáze.²⁶

Doposud nejsou známa žádná data týkající se dynamiky tvorby allithiolanů během zpracování cibule, ani možností, jak potlačit jejich tvorbu. S ohledem na často výraznou biologickou aktivitu jiných, strukturně podobných sloučenin, které byly popsány výše, by bylo nepochybně zajímavé prostudovat tyto vlastnosti také u allithiolanů. Pro tyto účely je ovšem nezbytné získání těchto látek v čistém stavu (s ohledem na jejich strukturní složitost nepřipadá jejich laboratorní syntéza v úvahu). A právě izolace a přečištění hlavních zástupců jednotlivých skupin allithiolanů je předmětem probíhajícího výzkumu v pracovní skupině doc. R. Kubce (katedra aplikované chemie, ZF JU). V této bakalářské práci je popsána izolace a přečištění vybraných stereoisomerů allithiolanu A z extraktu cibule kuchyňské.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie

Kyselina mravenčí (98%) a síran hořečnatý (bezvodý) byly zakoupeny od firmy Lachner (Neratovice, ČR). Acetonitril (HPLC grade), dichlormethan (p. a.) a methanol (HPLC grade) byly produkty firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Rostlinný materiál

Cibule kuchyňská (kultivar Swift, Česká republika) byla zakoupena v místním obchodním řetězci.

Ostatní materiál

C18-SPE (10 g; 60 ml) kolonky – 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 centrifugační filtry (0,2 μm ; 2 ml; VDF) – Watrex (Praha, ČR).

3.2 Přístroje

HPLC separace byly prováděny pomocí přístroje 1260 Infinity II preparative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s detektorem 1260 Infinity II DAD WR. Byly použity analytické kolony Kinetex C-8 (100 \AA ; 250 \times 4,6 mm; 5 μm ; Phenomenex) nebo Biphenyl (100 \AA ; 250 \times 4,6 mm; 5 μm ; Phenomenex). Pro nalezení optimální separační metody byly také testovány analytické kolony Kinetex C-18 (100 \AA ; 250 \times 4,6 mm; 5 μm ; Phenomenex) a Kinetex F5 (100 \AA ; 250 \times 4,6 mm; 5 μm ; Phenomenex). Pro izolaci požadovaných látek byly použity preparativní kolony Kinetex C-8 (100 \AA ; 250 \times 21,2 mm; 5 μm ; Phenomenex), Biphenyl (100 \AA ; 250 \times 21,2 mm; 5 μm ; Phenomenex) nebo C-8 Rainin Dynamax (100 \AA ; 250 \times 21,4 mm; 8 μm ; Varian).

Pro separaci a identifikaci látek pomocí UHPLC-PDA-MS/MS byl použit systém sestávající z kapalinového chromatografu Ultimate3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), detektoru diodového pole PDA-3000 a hmotnostního spektrometru pracujícího na principu lineární iontové pasti LTQ XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

(+)ESI-HRMS data byla získána pomocí systému UltiMate 3000 RS (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) s 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 °C, potenciál coulombické exploze 60 V.

3.3 Gradienty používané v HPLC

V průběhu této bakalářské práce byly používány následující gradienty.

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 + 0,05% HCOOH [%]	CH ₃ OH + 0,05% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	80	20
	63:00	50	50
	64:00	5	95
	69:00	5	95
	70:00	80	20
kolona	C-8 Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA C

průtok	čas [min]	H ₂ O +	CH ₃ CN +
		0,05% HCOOH [%]	0,05% HCOOH [%]
0,9 ml/min	0:00	85	15
	60:00	80	20
	61:00	5	95
	69:00	5	95
	70:00	85	15
kolona	C-8 Kinetex (250 × 4,6 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA D

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ OH [%]
		0:00	55
0,9 ml/min	50:00	40	60
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	55	45
	kolona	Kinetex Biphenyl (250 × 4,6 mm; 5 μm; 100 Å)	

METODA E

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ OH [%]
		0:00	45
0,9 ml/min	50:00	35	65
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	45	55
	kolona	Kinetex Biphenyl (250 × 4,6 mm; 5 μm; 100 Å)	

3.4 Izolace allithiolanů z extraktu cibule kuchyňské

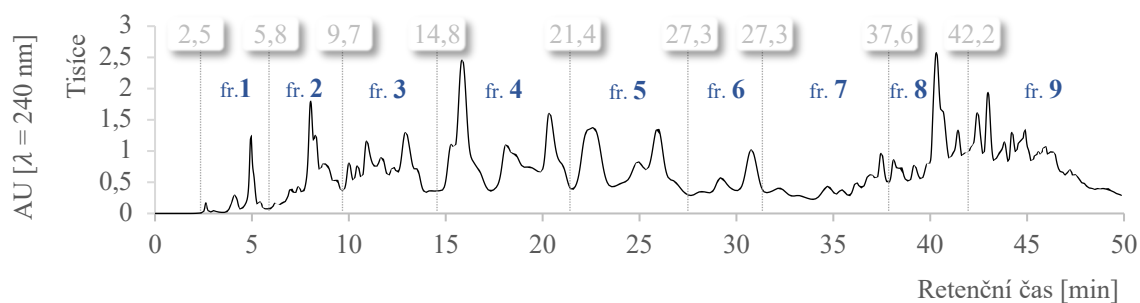
3.4.1 Příprava extraktu

Cibule byla oloupana a pomocí kuchyňského odšťavňovače (Catler JE 4010) bylo zpracováno celkem 1403 g. Poté bylo 850 ml získané šťávy ponecháno stát při laboratorní teplotě 18 hodin, přičemž během této doby začala být šťáva značně hořká. Následovala přímá extrakce, při které bylo použito 2 × 140 ml CH₂Cl₂. Jelikož se v dělicí nálevce tvořila emulze, bylo potřeba vzorek odstředit (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla opětovně extrahována stejným způsobem. Spojené organické fáze byly částečně zakoncentrovány pomocí rotační vakuové odparky (RVO) na přibližně 20 % původního objemu. Získaný extrakt byl přesušen bezvodým MgSO₄, přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,45 μm; ø 25 mm) a zbývající CH₂Cl₂ byl zcela odpařen na RVO ($t < 30$ °C). Tímto postupem bylo získáno 732 mg tmavě zeleného odparku, který byl poté rozpuštěn v 80 ml CH₃CN a zbaven chlorofylu protečením přes kolonku C18-SPE (10 g; 60 ml). Po následném odpaření CH₃CN byl získán vzorek viskózní konzistence, tmavě žluté barvy s velmi výraznou hořkou chutí.

Výše uvedeným způsobem bylo postupně zpracováno celkem 40,9 kg cibule kuchyňské. Pomocí metody přímé extrakce bylo získáno 24,3 g tmavě zeleného extraktu. Po přečištění pomocí kolonky C18-SPE (10 g; 60 ml) bylo získáno celkem 13,2 g tmavě žlutého viskózního extraktu, který byl uchován při teplotě –28 °C před dalším zpracováním.

3.4.2 Frakcionace extraktu

Preparativní separací pomocí C8-HPLC/PDA bylo cílem získaný extrakt cibule frakcionovat. Ze získaného extraktu (13,2 g) byl připraven vzorek vhodný pro HPLC analýzu tím způsobem, že byl naředěn CH₃CN/H₂O (v/v; 1/1) a poté byl vzorek o koncentraci 310 mg/ml zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 25 mm). Následně bylo pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda A**, nástřikový objem 900 μl) opakovaně jímáno celkem 9 frakcí (viz **Obrázek 21**). Odpovídající frakce z jednotlivých nástřiků byly sloučeny, pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbaveny CH₃CN a poté extrahovány metodou přímé extrakce s použitím CH₂Cl₂ (CH₂Cl₂/vzorek v/v; 1/5). Následně byl vzorek přesušen pomocí MgSO₄ a přefiltrován přes Hirschovu nálevku. Po odpaření veškerého CH₂Cl₂ byly získané extrakty jednotlivých frakcí před dalšími analýzami uchovány při teplotě –28 °C.

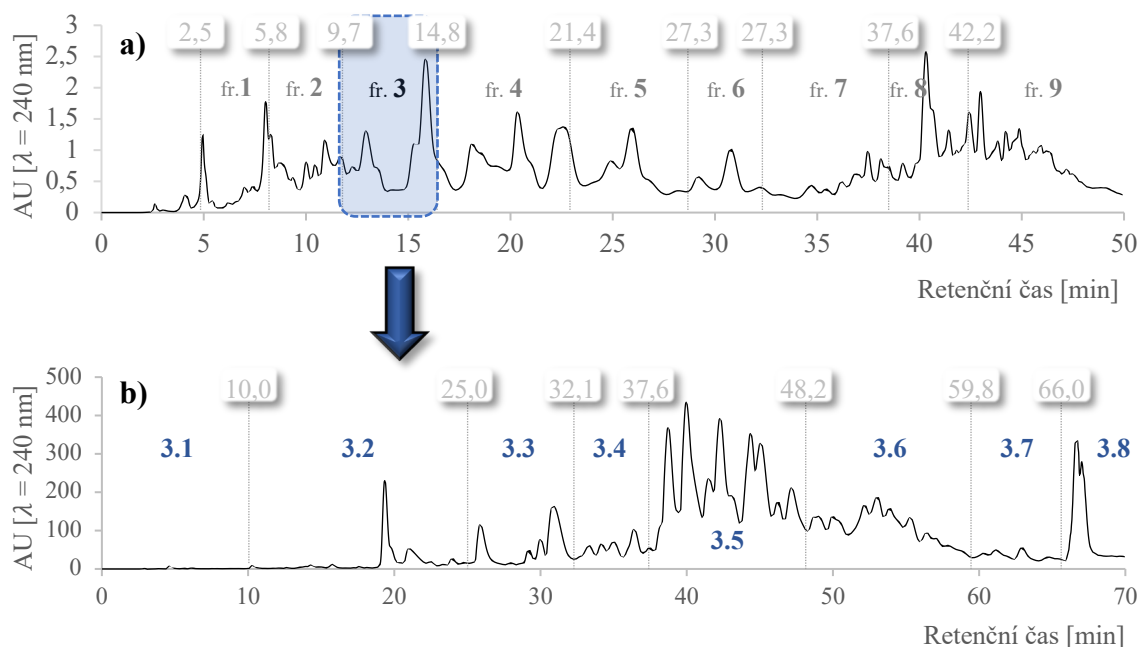


Obrázek 21: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu cibule kuchyňské – úvodní frakcionace (Metoda A).

3.4.3 Optimalizované HPLC metody

Frakce 3

Pro frakci 3 byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 22, Metoda B**). Celé množství frakce 3 (1592 mg) bylo naředěno na koncentraci 175 mg/ml rozpuštěním v okyseleném roztoku (v/v; CH₃OH + 0,05% HCOOH/H₂O + 0,05% HCOOH; 3/1) a zfiltrováno přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 22, Metoda B**) bylo jímáno celkem 8 frakcí označených 3.1–3.8.



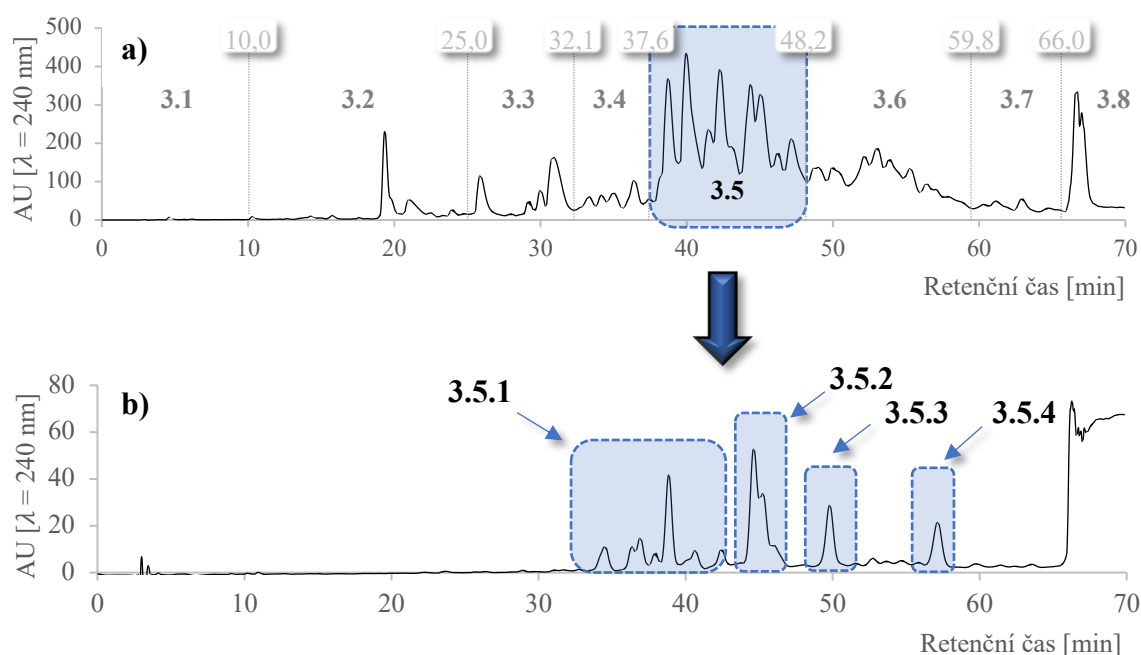
Obrázek 22: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** cibule kuchyňské (Metoda A), **b)** frakce 3 (Metoda B).

Jednotlivé frakce 3.1–3.8 byly pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbaveny CH₃CN a poté extrahovány metodou přímé extrakce s použitím CH₂Cl₂ (v/v; CH₂Cl₂/vzorek 1/5). Následně

byl vzorek přesušen pomocí MgSO_4 a přefiltrován s využitím Hirschovy nálevky. Po odpaření veškerého CH_2Cl_2 byly získané extrakty jednotlivých frakcí 3.1–3.8 před dalšími analýzami uchovávány při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Frakce 3.5

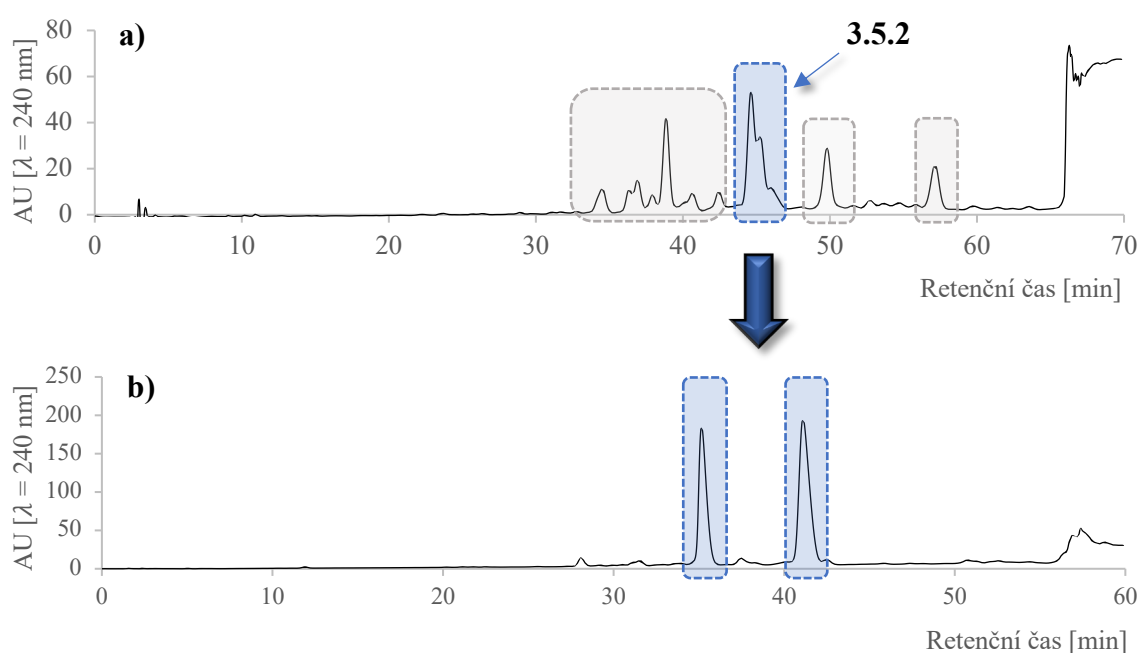
Pro frakci 3.5 byla vyvinuta optimalizovaná metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 23, Metoda C**). Frakce 3.5 (380 mg) byla naředěna na koncentraci 175 mg/ml rozpuštěním v okyseleném roztoku (v/v; $\text{CH}_3\text{OH} + 0,05\% \text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$; 3/1) a zfiltrována pomocí membránového filtru (PTFE; $0,45\text{ }\mu\text{m}$; $\varnothing 13\text{ mm}$). Následně pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda C**, nástřikový objem $150\text{ }\mu\text{l}$) byly jímány celkem 4 frakce označené jako 3.5.1–3.5.4 (viz **Obrázek 23**). Frakce byly pomocí RVO ($t < 30\text{ }^\circ\text{C}$) zbaveny CH_3OH a dále se se získanými frakcemi pracovalo jednotlivě (viz **Frakce 3.5.2**, **Frakce 3.5.3** a **Frakce 3.5.4**).



Obrázek 23: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** frakce 3 (Metoda B), **b)** frakce 3.5 (Metoda C).

Frakce 3.5.2

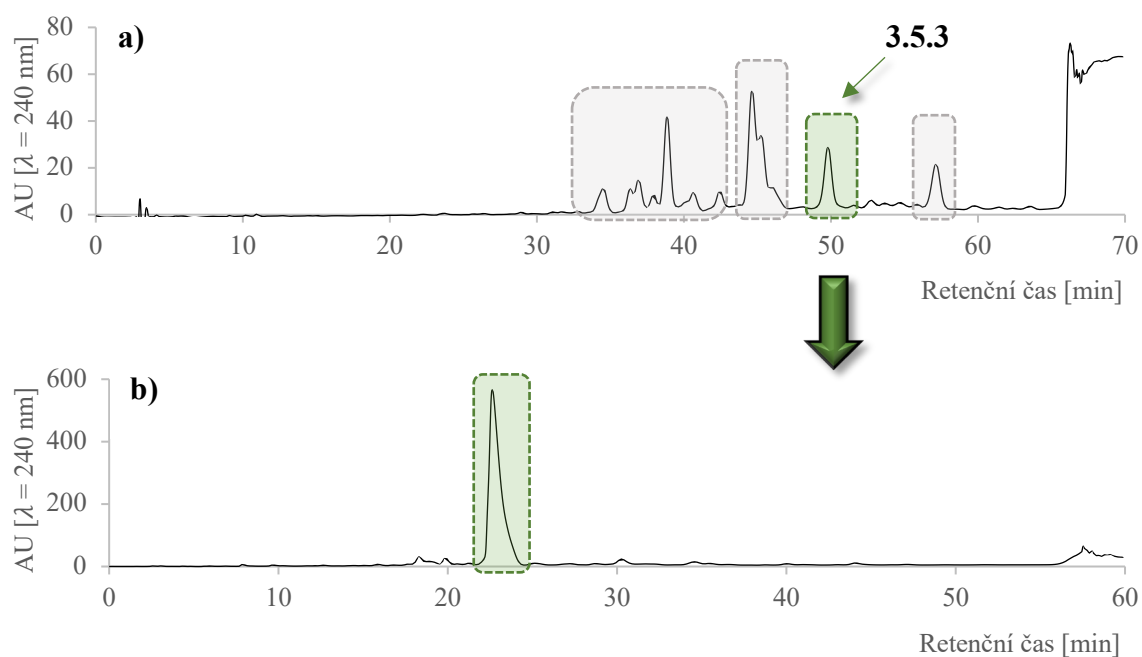
Pro frakci 3.5.2 byla optimalizována metoda preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Obrázek 24, Metoda D**). Nejprve byla frakce 3.5.2 (1500 ml) extrahována 3×200 ml CH₂Cl₂ (v/v; CH₂Cl₂/vzorek 1/5). Následovalo odpaření CH₂Cl₂ pomocí RVO ($t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a příprava vzorku na HPLC separaci. Celé množství vzorku (134 mg) bylo naředěno CH₃OH/H₂O (v/v; 1/1) a zfiltrováno přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm). Následně pomocí preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Metoda D**, nástřikový objem 50 μl) byly jímány celkem 2 frakce (viz **Obrázek 24**). Najímané frakce byly pomocí RVO ($t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) zbaveny CH₃OH a před dalším zpracováním uchovávány při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 24: Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** frakce 3.5 (Metoda C), **b)** frakce 3.5.2 (Metoda D).

Frakce 3.5.3

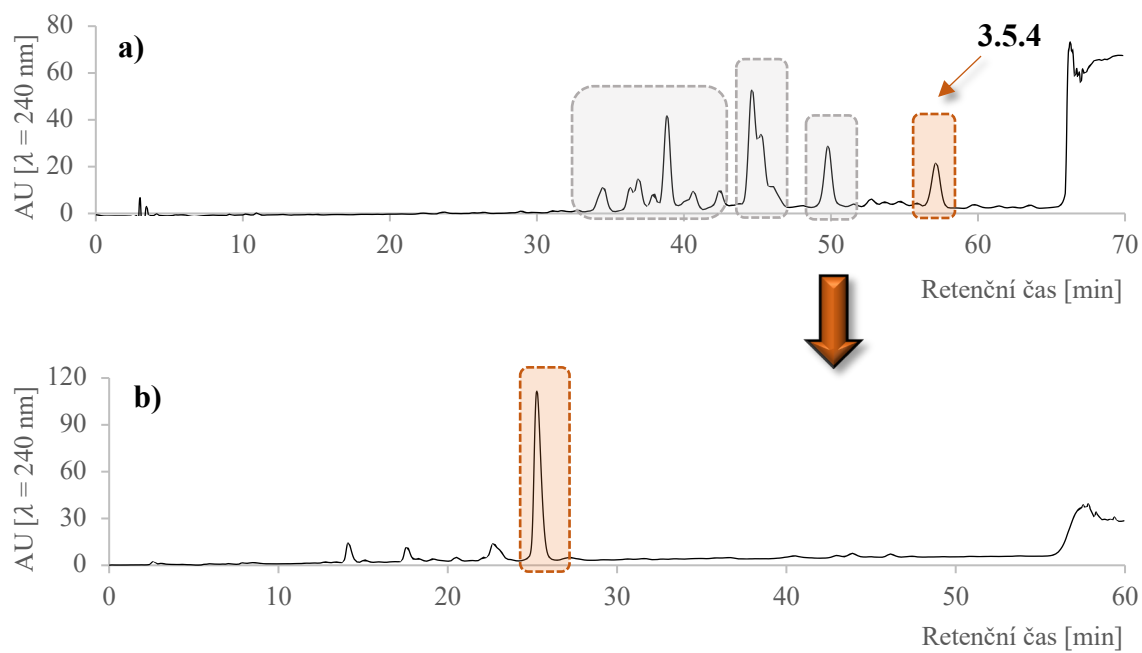
Pro frakci 3.5.3 byla vyvinuta metoda preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Obrázek 25, Metoda E**). Nejprve byla frakce 3.5.3 (700 ml) extrahována metodou přímé extrakce s použitím 280 ml CH₂Cl₂ (v/v; CH₂Cl₂/vzorek 1/5). Následovalo odpaření CH₂Cl₂ pomocí RVO ($t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a příprava vzorku na HPLC separaci. Vzorek o hmotnosti 134 mg byl naředěn CH₃OH/H₂O (v/v; 1/1) a zfiltrován pomocí membránového filtru (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm). Následně pomocí preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Metoda E**, nástřikový objem 100 μl) byla jímána 1 frakce (viz **Obrázek 25**). Frakce z jednotlivých nástřiků byly spojeny, zbaveny CH₃OH pomocí RVO ($t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a získaný vzorek uchováván při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 25: Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** frakce 3.5 (Metoda C), **b)** frakce 3.5.3 (Metoda E).

Frakce 3.5.4

U frakce 3.5.4, stejně jako u frakce 3.5.3, byla použita metoda preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Obrázek 26, Metoda E**). Nejprve byla frakce 3.5.4 (700 ml) extrahována 3×200 ml CH_2Cl_2 . Následně byl odpařen CH_2Cl_2 (RVO, $t < 30$ °C) a byl připraven vzorek na HPLC. Vzorek o hmotnosti 77 mg byl naředěn $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 1/1) a zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; $0,45 \mu\text{m}$; $\varnothing 13$ mm). Následně pomocí preparativní Biphenyl-HPLC/PDA (**Metoda E**, nástřikový objem $100 \mu\text{l}$) byla jímána 1 frakce (viz **Obrázek 26**). Frakce získané během opakovaných nástřiků byly sloučeny, zbaveny CH_3OH (RVO, $t < 30$ °C) a před dalším zpracováním uchovávány při teplotě -28 °C.

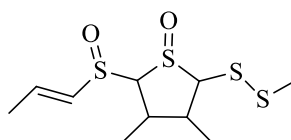


Obrázek 26: Biphenyl-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** frakce 3.5 (Metoda C), **b)** frakce 3.5.4 (Metoda E).

4 Výsledky

Allithiolany jsou sloučeniny, které se v cibuli tvoří ve větším množství až po několika desítkách minut po její homogenizaci.²⁶ Po oloupaní byla cibule zhomogenizována pomocí kuchyňského odšťavňovače, přičemž hořká chuť nejprve nebyla v získané šťávě patrná, bylo cítit pouze typické aroma cibule. Ovšem po 18 hodinách již šťáva vykazovala velmi intenzivní hořkou chuť typickou pro allithiolany. Tato cibulová šťáva byla extrahována CH_2Cl_2 . Po odpaření a naředění byl získaný extrakt rozdělen s použitím preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 28a, Metoda A**) na celkem 9 frakcí.

Cílem této práce byla izolace allithiolanů A, tedy sloučenin o elementárním složení $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 299,0262$ Da). Na základě HPLC-MS analýzy jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že allithiolany A se nacházejí ve 3. frakci (**Obrázek 28a**). Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3, allithiolany jsou sloučeniny, které díky přítomnosti mnoha chirálních center mohou tvořit celou řadu stereoizomerů. Allithiolan A (**34**) obsahuje celkem 6 center chiralit (**Obrázek 27**), a tak může teoreticky existovat 64 stereoizomerů této sloučeniny.²⁶ Ve 3. frakci byla skutečně detekována celá řada látek odpovídajících svojí molekulovou hmotností allithiolanům A, ovšem koelujících s mnoha jinými sloučeninami přítomnými v extraktu. V další fázi bylo cílem získání alespoň některých stereoizomerů v čisté formě.



allithiolan A (34)
 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}_4$

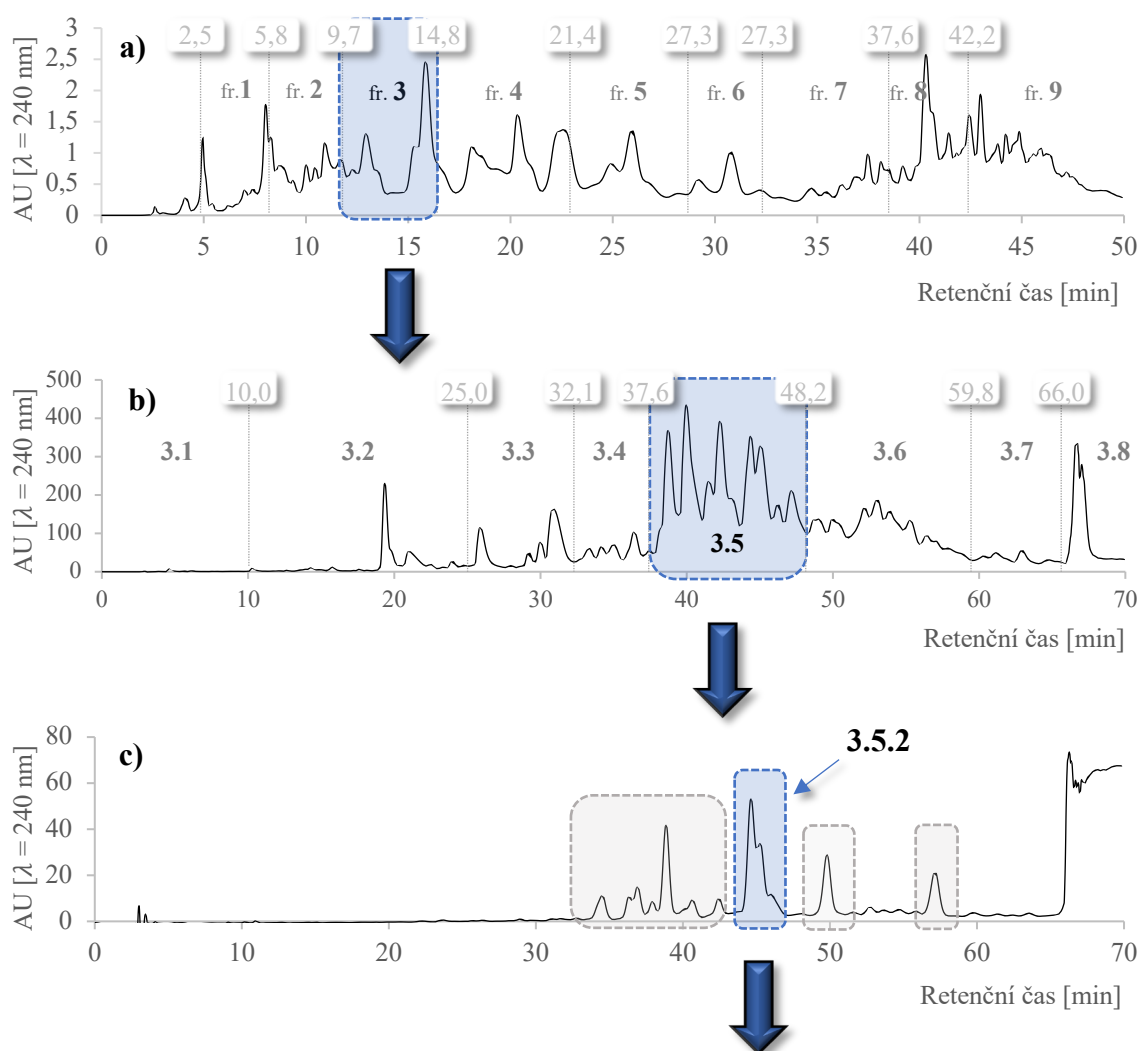
Obrázek 27: Centra chiralit allithiolanu A.

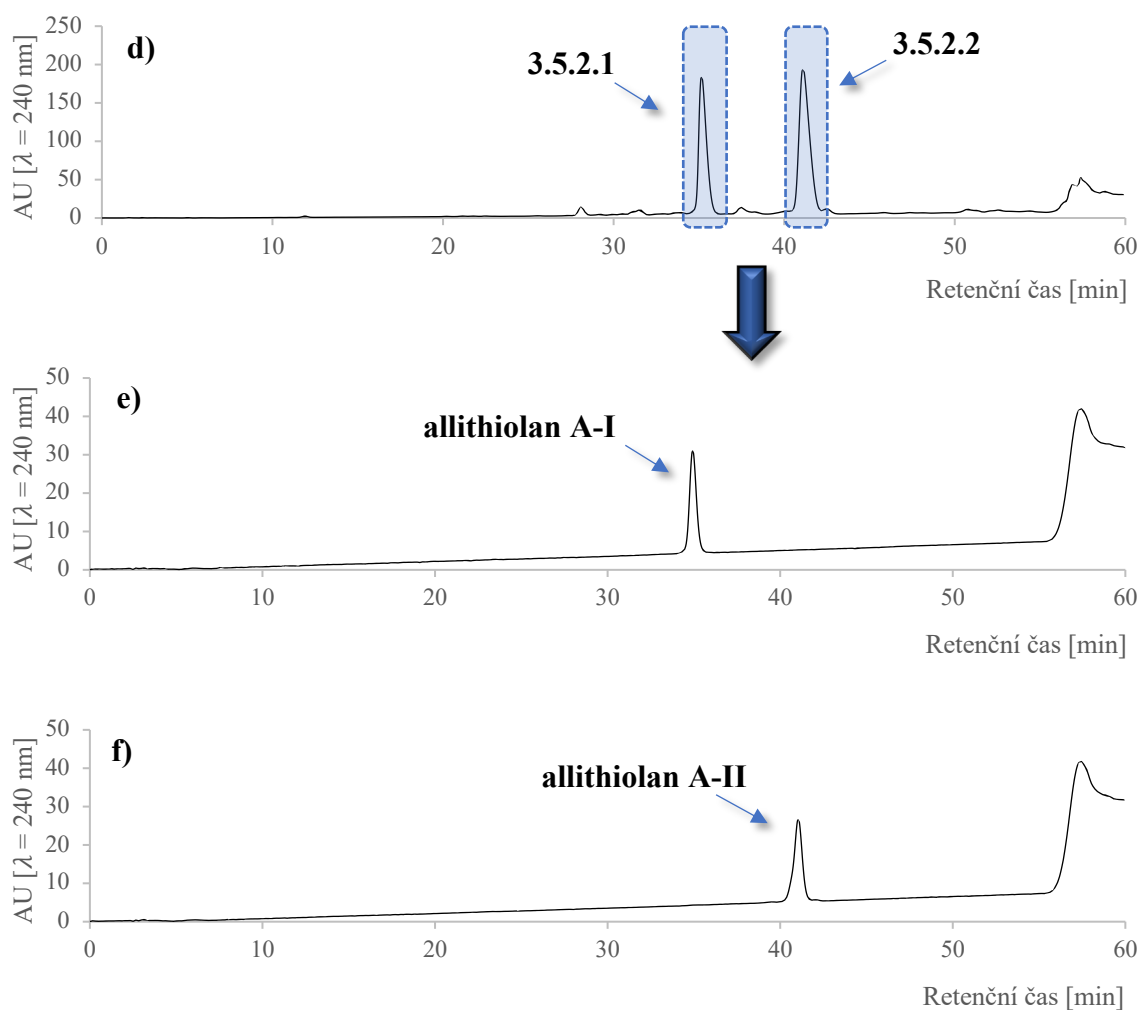
4.1 Izolace allithiolanů A

Frakce 3 byla proto pomocí preparativní C8-HPLC rozdělena na celkem 8 podfrakcí označených 3.1–3.8 (**Obrázek 28b**). Allithiolany A pak byly detekovány pomocí HPLC-MS ve frakci 3.5 (**Obrázek 28a**). Frakce 3.5 byla proto dále rozdělena pomocí optimalizované preparativní C8-HPLC metody na 4 podfrakce označené 3.5.1–3.5.4 (**Obrázek 28c**). Na základě HPLC-MS analýz byly allithiolany A detekovány v celkem 3 frakcích, a sice 3.5.2, 3.5.3 a 3.5.4. Izolace jednotlivých stereoizomerů allithiolanu A z těchto frakcí je popsána níže.

Allithiolany A-I a A-II

První frakcí, ve které byly detekovány allithiolany A, byla frakce 3.5.2 (**Obrázek 28c**), pro níž byla optimalizována HPLC metoda využívající preparativní kolonu s bifenylovou stacionární fází (**Obrázek 28c**). Pomocí této metody byly nakonec získány 2 různé allithiolany A (**Obrázek 28d, e, f**). Získané stereoizomery byly označeny jako allithiolan A-I (frakce 3.5.2.1, **Obrázek 28e**) a allithiolan A-II (frakce 3.5.2.2, **Obrázek 28f**). Postup izolace allithiolanů A-I a A-II je detailně znázorněn na **Obrázek 28**.

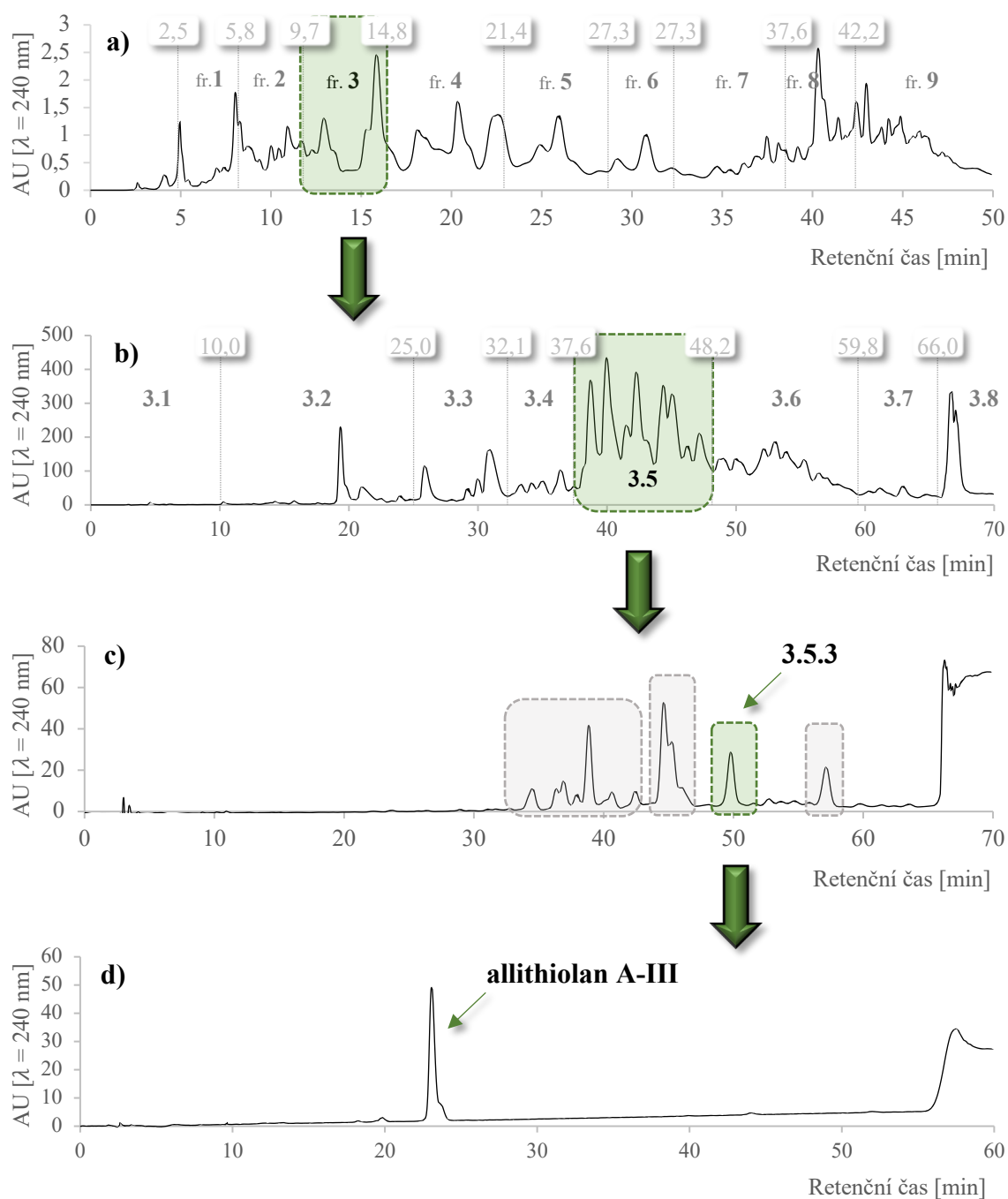




Obrázek 28: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** cibule kuchyňské (Metoda A), **b)** frakce 3 (Metoda B), **c)** frakce 3.5 (Metoda C), **d)** frakce 3.5.2 (Metoda D), **e)** frakce 3.5.2.1, **f)** frakce 3.5.2.2.

Allithiolan A-III

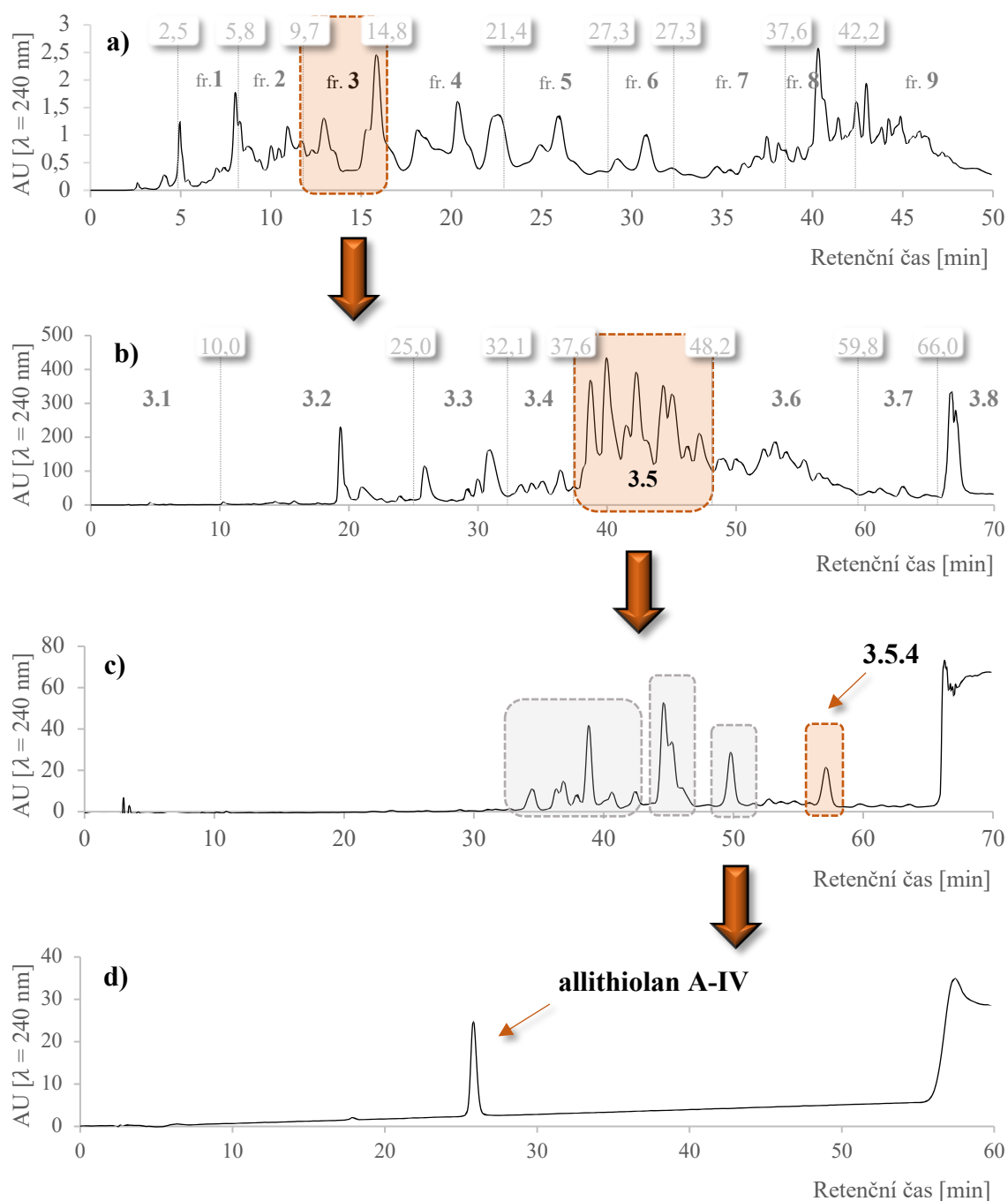
Druhou frakcí, ve které byly detekovány allithiolany A, byla frakce 3.5.3 (**Obrázek 29c**). Také tato frakce byla separována pomocí HPLC metody využívající preparativní kolonu s bifenylovou stacionární fází (**Obrázek 29c**). Pomocí této metody byla získána frakce, která obsahovala čistý stereoizomer allithiolanu A označený jako allithiolan A-III (**Obrázek 29d**). Celý postup izolace allithiolanu A-III je zrekapitulován na **Obrázek 29**.



Obrázek 29: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** cibule kuchyňské (Metoda A), **b)** frakce 3 (Metoda B), **c)** frakce 3.5 (Metoda C), **d)** frakce 3.5.3.1 (Metoda E).

Allithiolan A-IV

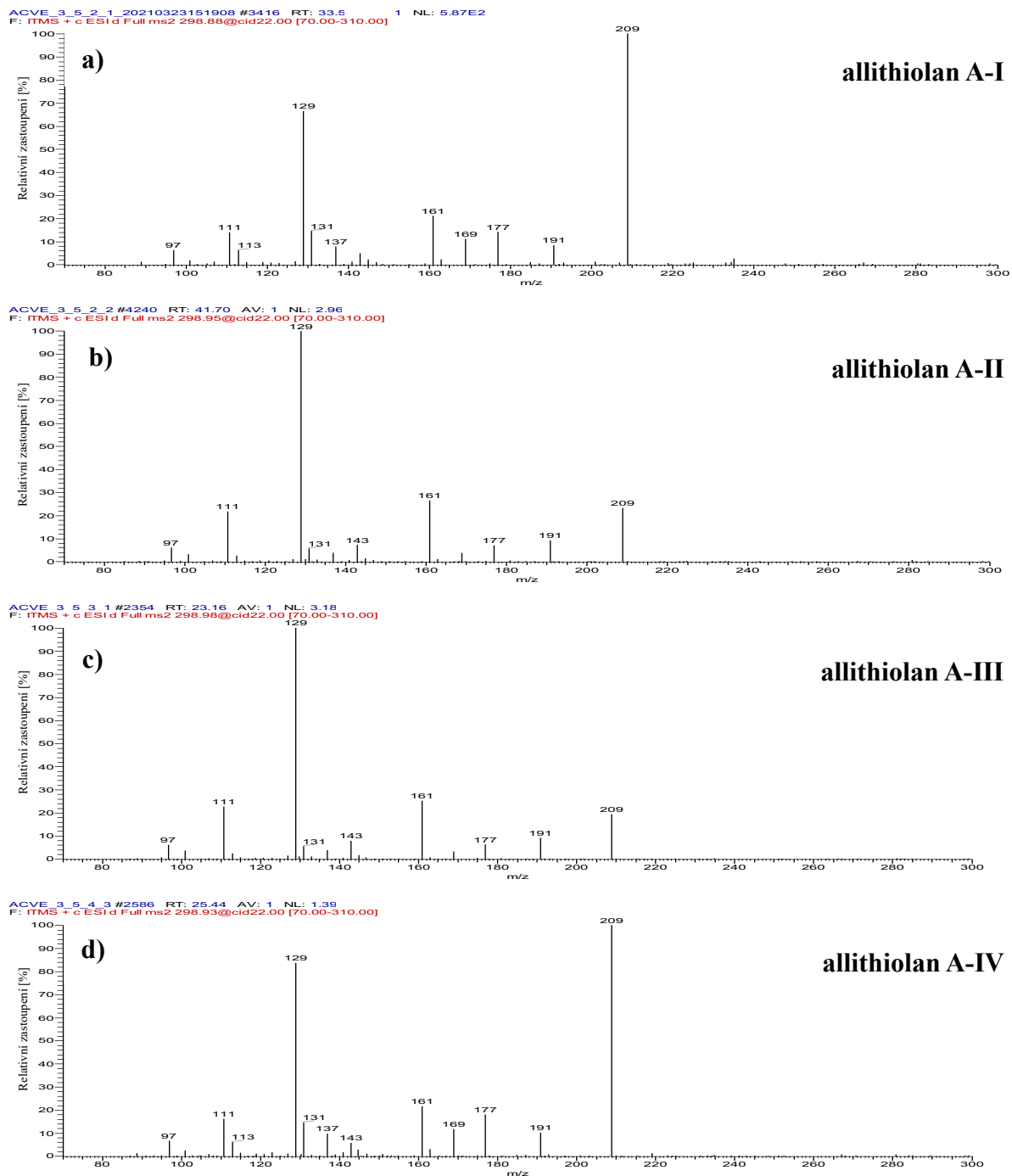
Třetí frakcí, která obsahovala allithiolany A, byla frakce 3.5.4 (Obrázek 30c), pro níž byla také optimalizována HPLC metoda využívající preparativní kolonu s bifenylovou stacionární fází (Obrázek 30c, Metoda D). Pomocí této metody byl získán stereoizomer, který byl označen jako allithiolan A-IV (Obrázek 30d).



Obrázek 30: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** cibule kuchyňské (Metoda A), **b)** frakce 3 (Metoda B), **c)** frakce 3.5 (Metoda C), **d)** frakce 3.5.4.1 (Metoda E).

Identita získaných allithiolanů A byla potvrzena pomocí MS. MS/MS spektra těchto látek jsou v naprostém souladu s dříve publikovanými spektry.²⁶ Je však třeba poznamenat, že označení stereoizomerů allithiolanu A získaných v této práci je pouze dočasné. Jak je patrné z **Obrázku 31**, MS/MS spektra všech získaných látek si jsou velmi podobná. Nelze je tudíž využít pro přiřazení k látkám, jejichž struktura již byla v odborné literatuře popsána a které byly pojmenovány allithiolany A₁–A₈.²⁶ K tomuto účelu bude nutné provést NMR analýzu.

Tato měření, pro něž není na JU k dispozici potřebné instrumentální vybavení, jsou ovšem plánována až po získání dalších skupin allithiolanů.



Obrázek 31: MS/MS spektra: **a)** allithiolanu A-I, **b)** allithiolanu A-II, **c)** allithiolanu A-III, **d)** allithiolanu A-IV.

5 Diskuze

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3, allithiolany jsou poměrně nedávno objevené sloučeniny. K jejich objevení došlo teprve v roce 2018 při hledání důvodu, proč zhomogenizovaná cibule po určité době nepříjemně zhořkne. Doposud byla o těchto sloučeninách vydána pouze jedna jediná publikace.²⁶ V této práci její autoři pro získání čistých stereoizomerů allithiolanu A využili různé modelové reakční systémy sestávající z isoalliinu (**1**), methiinu (**2**) a alliinasy. Tento postup je ovšem velmi časově náročný, neboť isoalliin ani methiin nejsou komerčně dostupné sloučeniny, je tedy potřeba tyto aminokyseliny izolovat (v případě isoalliinu) popř. syntetizovat (v případě methiinu). Postup pro izolaci isoalliinu mimo jiné zahrnuje několikanásobnou separaci pomocí iontoměničové chromatografie, která je časově velmi náročná a vede k získání pouze omezeného množství tohoto klíčového prekurzoru. Navíc také z těchto modelových systémů se poté musí jednotlivé allithiolany získávat za využití opakované preparativní HPLC separace a výtěžky jednotlivých sloučenin se pohybují v řádech pouhých miligramů.²⁶

V rámci této bakalářské práce byl vyvinut postup pro získání allithiolanů A z extraktu homogenizované cibule. Ačkoliv i tento postup je z důvodu obrovské komplexnosti extraktu časově velmi náročný, jeví se tento přístup pro získání allithiolanů časově i ekonomicky výhodnější než výše popsání využití modelových systémů. Kromě získání allithiolanů navíc umožňuje souběžné získání také jiných, z vědeckého hlediska zajímavých sloučenin přítomných v extraktu.

V budoucnu bude třeba podobným způsobem optimalizovat také postupy pro izolaci dalších skupin allithiolanů. Takto získané sloučeniny budou následně využity pro validaci metody umožňující jejich kvantifikaci. Pomocí této metody pak budou moci být detailně studovány možnosti, jak ovlivnit tvorbu těchto senzorycky vysoce nežádoucích látek během zpracování cibule (např. teplota, okyselení, způsob zpracování apod.).

Velmi zajímavou, dosud nezodpovězenou otázkou je také potenciální biologická aktivita allithiolanů. Jak bylo popsáno výše, v cibuli se vyskytuje mnoho sloučenin vykazujících výrazné biologické účinky, takže se lze oprávněně domnívat, že také allithiolany mohou vykazovat významnou biologickou aktivitu.

Pro obě výše zmíněné výzkumné oblasti je ovšem potřebné mít k dispozici látky o vysoké čistotě a množství (alespoň v řádech desítek mg), k čemuž by postupy popsání v této bakalářské práci mohly dopomoci.

6 Závěr

V této bakalářské práci byly optimalizovány metody pro izolaci allithiolanů A (**34**) z extraktu cibule kuchyňské. Pomocí preparativní HPLC a s využitím optimalizovaných metod se podařily získat celkem 4 různé stereoizomery allithiolanu A ve vysoké čistotě.

Získané látky budou využity pro další výzkum. Využijí se jednak při vývoji a validaci metody umožňující kvantifikaci těchto látek. Plánují se také studie biologických účinků těchto strukturně unikátních sloučenin.

7 Reference

1. Rabinowitch, H. D.; Currah, L. *Allium Crop Science: Recent Advances*; CABI: UK, 2002. ISBN 0851995101.
2. Friesen, N.; Fritsch, R.; Blattner, F. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* **2006**, *22* (1), 372–395. <https://doi.org/10.5642/aliso.20062201.31>.
3. Ekşi, G.; Gençler Özkan, A. M.; Koyuncu, M. Garlic and onions: An eastern tale. *Journal of Ethnopharmacology* **2020**, *253*, 112675. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112675>.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed Mar.21, 2021).
5. Block, E. *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*; RSC Pub.: Cambridge, UK, 2010. ISBN 978-0-85404-190-9.
6. Block, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie* **1992**, *31* (9), 1135–1178. <https://doi.org/10.1002/anie.199211351>.
7. Dini, I.; Tenore, G. C.; Dini, A. *S*-Alkenyl cysteine sulfoxide and its antioxidant properties from *Allium cepa* var. *tropeana* (red onion) seeds. *Journal of Natural Products* **2008**, *71* (12), 2036–2037. <https://doi.org/10.1021/np800237w>.
8. Štefanová, I.; Zápál, J.; Moos, M.; Kuzma, M.; Kubec, R. Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67* (35), 9895–9906. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01384>.
9. Block, E.; Dane, A. J.; Cody, R. B. 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* **2011**, *186* (5), 1085–1093. <https://doi.org/10.1080/10426507.2010.507728>.
10. 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* (6908), 685–685. <https://doi.org/10.1038/419685a>.
11. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (20), 10893–10900. <https://doi.org/10.1021/jf202446q>.
12. 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 Chemical Biology* **2017**, *12* (9), 2296–2304. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00336>.
13. 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. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (11), 4584–4585. <https://doi.org/10.1021/ja00167a089>.
14. Shen, C.; Parkin, K. L. *In vitro* biogenesis of pure thiosulfinates and propanethial-*S*-oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (12), 6254–6260. <https://doi.org/10.1021/jf000711g>.
15. Bayer, T.; Breu, W.; Seligmann, O.; Wray, V.; Wagner, H. Biologically active thiosulphinates and α -sulphinyl disulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry* **1989**, *28* (9), 2373–2377. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97987-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97987-1).
16. Morimitsu, Y.; Kawakishi, S. Inhibitors of platelet aggregation from onion. *Phytochemistry* **1990**, *29* (11), 3435–3439. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85252-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85252-B).

17. 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 5-oxides from onion. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (8), 3085–3086. <https://doi.org/10.1021/ja00190a064>.
18. Borjihhan, B.; Ogita, A.; Fujita, K. -ichi; Doe, M.; Tanaka, T. The cyclic organosulfur compound zwibelane A from onion (*Allium cepa*) functions as an enhancer of polymyxin B in fungal vacuole disruption. *Planta Medica* **2010**, *76* (16), 1864–1866. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249935>.
19. Nohara, T.; Fujiwara, Y.; Ikeda, T.; Murakami, K.; Ono, M.; El-Aasr, M.; Nakano, D.; Kinjo, J. Two new bicyclic sulfoxides from welsh onion. *Journal of Natural Medicines* **2016**, *70* (2), 260–265. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0947-z>.
20. Fukaya, M.; Nakamura, S.; Nakagawa, R.; Nakashima, S.; Yamashita, M.; Matsuda, H. Rare sulfur-containing compounds, kujounins A₁ and A₂ and *Allium* sulfoxide A₁, from *Allium fistulosum* ‘kujou’. *Organic Letters* **2017**, *20* (1), 28–31. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03234>.
21. Fukaya, M.; Nakamura, S.; Nakagawa, R.; Kinka, M.; Nakashima, S.; Matsuda, H. Cyclic sulfur-containing compounds from *Allium fistulosum* ‘kujou’. *Journal of Natural Medicines* **2019**, *73* (2), 397–403. <https://doi.org/10.1007/s11418-018-1272-0>.
22. 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*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *62* (11), 1141–1145. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00461>.
23. El-Aasr, M.; Fujiwara, Y.; Takeya, M.; Ikeda, T.; Tsukamoto, S.; Ono, M.; Nakano, D.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Yoshimitsu, H.; et al. Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products* **2010**, *73* (7), 1306–1308. <https://doi.org/10.1021/np100105u>.

24. Fujiwara, Y.; Horlad, H.; Shiraishi, D.; Tsuboki, J.; Kudo, R.; Ikeda, T.; Nohara, T.; Takeya, M.; Komohara, Y. 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* **2016**, *60* (11), 2467–2480. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500995>.
25. Nohara, T.; Fujiwara, Y.; El-Aasr, M.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nakano, D.; Kinjo, J. Antitumor *Allium* sulfides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2017**, *65* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00844>.
26. 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* (33), 8783–8794. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03118>.
27. Aoyagi, M.; Imai, S.; Kamoi, T. Novel bithiolane polysulfides from lachrymatory factor synthase-suppressed onion and their *in vitro* cyclooxygenase-1 inhibitory activity. *Food Chemistry* **2021**, *344*, 128636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128636>.
28. El-Aasr, M.; Fujiwara, Y.; Takeya, M.; Ono, M.; Nakano, D.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T.; Miyashita, H.; Yoshimitsu, H.; et al. Garlicnin A from the fraction regulating macrophage activation of *Allium sativum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2011**, *59* (11), 1340–1343. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.1340>.
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*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *60* (6), 747–751. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.747>.
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*. *Chemical &*

-
- Pharmaceutical Bulletin* **2013**, *61* (7), 695–699. <https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00082>.
31. Block, E.; Dethier, B.; Bechand, B.; Cotelesage, J. J. H.; George, G. N.; Goto, K.; Pickering, I. J.; Mendoza Rengifo, E.; Sheridan, R.; Sneed, E. Y.; et al. Ajothiolanes: 3,4-dimethylthiolane natural products from garlic (*Allium sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66* (39), 10193–10204. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03638>.
32. Nohara, T.; Ono, M.; Nishioka, N.; Masuda, F.; Fujiwara, Y.; Ikeda, T.; Nakano, D.; Kinjo, J. New cyclic sulfides, garlicnins I₂, M, N, and O, from *Allium sativum*. *Journal of Natural Medicine* **2018**, *72* (1), 326–331. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1133-2>.

8 Použité zkratky

DAD	diode array detector
ESI	electrospray ionization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
LF	lachrymatory factor
LFS	lachrymatory-factor synthase
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PDA	photodiode array
ppm	parts per million
PTFE	polytetrafluorethylen
rpm	rotations per minute
RVO	rotační vakuová odparka
SPE	solid phase extraction
TDA	taste dilution analysis