

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

**Acyklické organosírné sloučeniny v cibuli kuchyňské**  
**(*Allium cepa*)**

**Bakalářská práce**

**Ondřej Šustr**

Školitelka: Mgr. Iveta Štefanová, Ph.D.

Katedra aplikované chemie, ZF JU

Školitel specialista: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

Katedra aplikované chemie, ZF JU

České Budějovice 2021

Šustr, O., 2021: Acyklické organosírné sloučeniny v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*). [Acyclic organosulfur compounds of onion (*Allium cepa*). Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This Bachelor thesis deals with acyclic organosulfur compounds of onion (*Allium cepa*). The aim of the work was to isolate and structurally characterize some of these compounds using a series of preparative HPLC fractionations. The theoretical part deals with major groups of currently known organosulfur compounds of onion, their formation pathways and biological properties. The experimental part describes the process of isolation of cepaenes.

**Key words:** onion, sulfur compounds, organosulfur compounds, cepaenes, *Allium cepa*, isoalliin, acyclic compounds

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

V Českých Budějovicích dne 14. dubna 2021

## **Poděkování**

Hlavní poděkování patří mé školitelce Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za obrovskou pomoc, trpělivost, ochotu a profesionální vedení při mé bakalářské práci.

Dále bych taktéž rád poděkoval doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za konzultace, pomoc a možnost tvořit svou práci v laboratoři organosirných sloučenin.

V poslední řadě bych rád poděkoval všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku této práce.

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

# Obsah

<b>1</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>2</b>
2.1	Rod <i>Allium</i> .....	2
2.2	Cibule kuchyňská ( <i>Allium cepa</i> ) .....	4
2.3	Organosírné sloučeniny cibule kuchyňské.....	4
2.3.1	<i>S-Alk(en)ylcystein-S-oxidy</i> .....	6
2.3.2	<i>Mechanismus tvorby organosírných sloučenin</i> .....	6
2.3.3	<i>Thiosulfináty</i> .....	8
2.3.4	<i>Slzotvorné látky</i> .....	9
2.3.5	<i>Cepaeny</i> .....	11
2.3.6	<i>Zwiebelany</i> .....	12
2.3.7	<i>Cepathiolany</i> .....	12
2.3.8	<i>Onioniny</i> .....	14
2.3.9	<i>Allithiolany</i> .....	14
2.3.10	<i>Cepadithiolakton A</i> .....	15
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>17</b>
3.1	Chemikálie a materiály.....	17
3.2	Gradientsy používané v HPLC .....	18
3.3	Izolace sloučenin z extraktu cibule kuchyňské .....	19
3.4	HPLC/HRMS analýza extraktu.....	20
3.5	Frakcionace extraktu metodou C8-HPLC/PDA.....	21
3.6	Optimalizované HPLC metody .....	22
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>26</b>
4.1	Izolace cepaenů-184.....	27
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>36</b>

<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>43</b>

# 1 Cíle práce

- ✓ Vypracovat literární rešerši zaměřenou na strukturu, mechanismy tvorby a biologické vlastnosti acyklických organosírných sloučenin cibule kuchyňské (*Allium cepa*),
- ✓ s využitím preparativní HPLC izolovat a spektrálně charakterizovat struktury vybraných acyklických organosírných sloučenin,
- ✓ získané výsledky vhodně vyhodnotit, zdokumentovat a diskutovat.

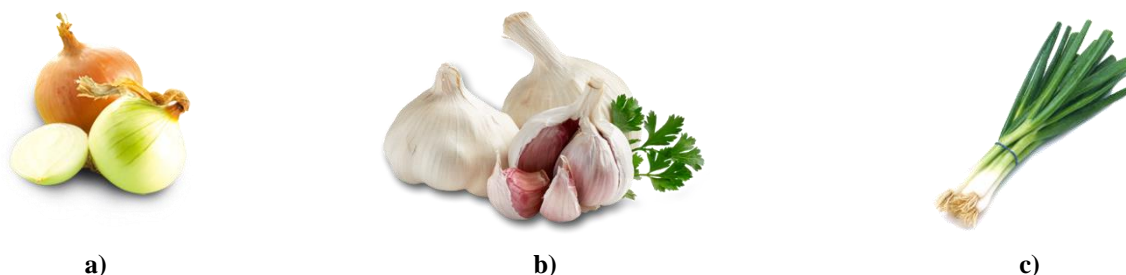
## 2 Úvod

Cibule kuchyňská (*Allium cepa*) patří po celém světě mezi nejoblíbenější kulinářsky zpracovávanou rostlinu, a to hlavně díky svým sensorickým vlastnostem. Její popularitu potvrzuje i druhé místo v žebříčku celosvětové produkce zeleniny.<sup>!</sup> Zmínky o této plodině lze nalézt v Bibli i Koránu.

Pro svou nezastupitelnou úlohu v potravinářském průmyslu i lidovém léčitelství se cibule stala i častým cílem vědeckých výzkumů. I po mnoha desetiletích výzkumů vědci stále objevují nové a nové sloučeniny. Tato bakalářská práce se zabývá vybranými látkami, které vznikají v cibuli ze svých prekurzorů, tj. *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Detailně budou probrány nejvýznamnější skupiny z mimořádně pestré palety organosírných sloučenin cibule kuchyňské.

### 2.1 Rod *Allium*

Rod *Allium* zahrnuje jedny z nejstarších kultivovaných plodin, jako jsou například *A. cepa* (cibule kuchyňská, **Obrázek 1a**), *A. sativum* (česnek kuchyňský, **Obrázek 1b**), *A. schoenoprasum* (pažitka pobřežní), *A. ampeloprasum* (pór letní), *A. porrum* (pór zahradní, **Obrázek 1c**), *A. tuberosum* (pažitka čínská) nebo *A. fistulosum* (cibule zimní).



**Obrázek 1:** Vybrané rostliny rodu *Allium*: a) cibule kuchyňská<sup>\*</sup>; b) česnek setý<sup>†</sup>; c) pór zahradní.<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup> <http://britishonions.co.uk/essential-onion-facts/>, staženo 18. 12. 2020

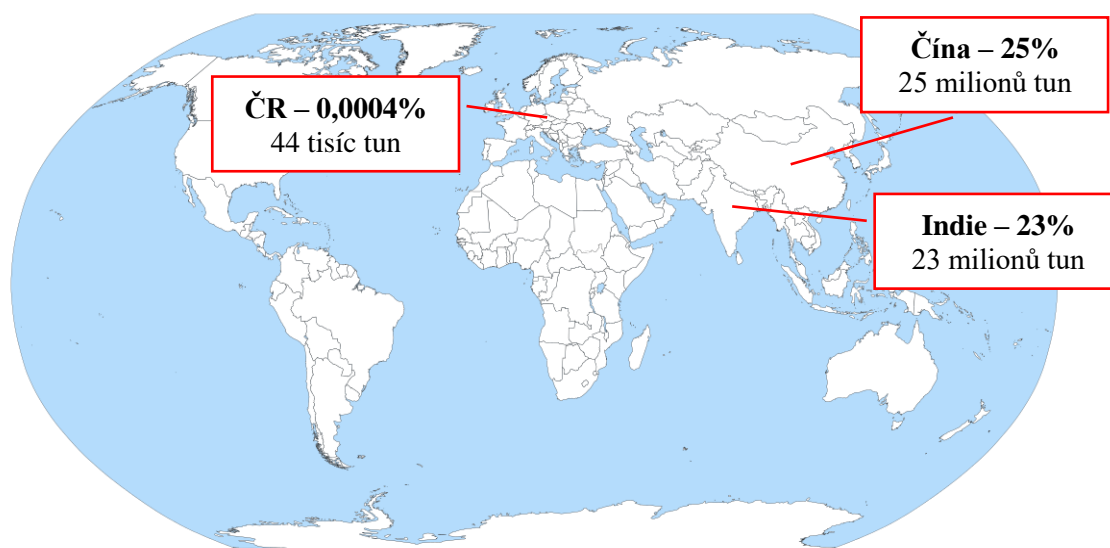
<sup>†</sup> <http://www.auerpak.com/our-products/garlic-products/>, staženo 18. 12. 2020

<sup>‡</sup> <https://stmaartenagriculture.com/product/onion-chives/>, staženo 18. 12. 2020

Dále tento rod obsahuje celou řadu okrasných rostlin. Za zmínku stojí například *A. caeruleum* (česnek azurový), *A. moly* (česnek zlatožlutý), *A. rosenbachianum* (česnek obrovský), *A. roseum* (česnek růžový), *A. sphaerocephalon* (česnek kulatohlavý) nebo *A. cristophii* (česnek ozdobný).

Rod *Allium* obsahuje okolo 750 rostlin, což z něho činí největší rod jednoděložných petaloidních rostlin, pomineme-li orchideje. Z výše uvedených je hospodářsky nejvýznamnější česnek, cibule a pór zahradní (**Obrázek 1**).

Podle FAO<sup>1</sup> (Food and Agriculture Organization of the United Nations) celosvětová produkce cibule činila za rok 2019 téměř 100 milionů tun, přičemž největším producentem byla Čína (téměř 25 milionů tun), následovaná Indií (22 milionů tun). Česká republika přispěla k celkové produkci cibule za rok 2019 více jak 44 tisíci tunami. (**Obrázek 2**).



**Obrázek 2:** Nejvýznamnější producenti cibule za rok 2019 a procentuální zastoupení v celosvětové produkci.\*

\* <https://stmaartenagriculture.com/product/onion-chives/>, staženo 18. 12. 2020



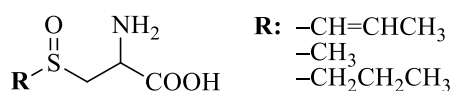
## 2.2 Cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Cibule kuchyňská je dvouletá jednoděložná rostlina spadající do cibulové zeleniny z čeledi amarylkovitých. První rok vytváří zásobní orgán cibuli, druhý rok květenství a semeno. Listy cibule kuchyňské jsou oblé, duté a spolu s kořeny vyrůstají z podpučí. Cibule jako zásobní orgán se vytváří při vyšších teplotách, při kterých se začínají hromadit sacharidy. Cibule je ve skutečnosti zdužnatělá báze listů, jejíž povrch je kryt dvěma až třemi obaly (tzv. šupinami). Když cibule dozrává, postupně se organické látky přesouvají z listů do cibule, listy tak postupně uschnou a ztrácí barvu. Poté dochází k zatažení krčku cibule. Další rok pak cibule kvete, přičemž může mít od 200 až po 2000 obojakých květů. Prašníky u květů zrají dříve než blizny.<sup>2</sup>

## 2.3 Organosírné sloučeniny cibule kuchyňské

V lidovém léčitelství se cibule využívá například při nachlazení pro usnadnění vykašlávání, pro utlumení dráždivého kašle, na potlačení zánětů a zmírnění otoků sliznic, dále při alergických reakcích, bodnutí hmyzem a při kožních zánětech a hemoroidech. Mimo jiné je cibule známá pro své pozitivní účinky na lidské srdce a cévy, zažívací ústrojí, zlepšení látkové výměny, podporu krevetvorby, v boji proti střevním parazitům a při avitaminózách.<sup>3</sup>

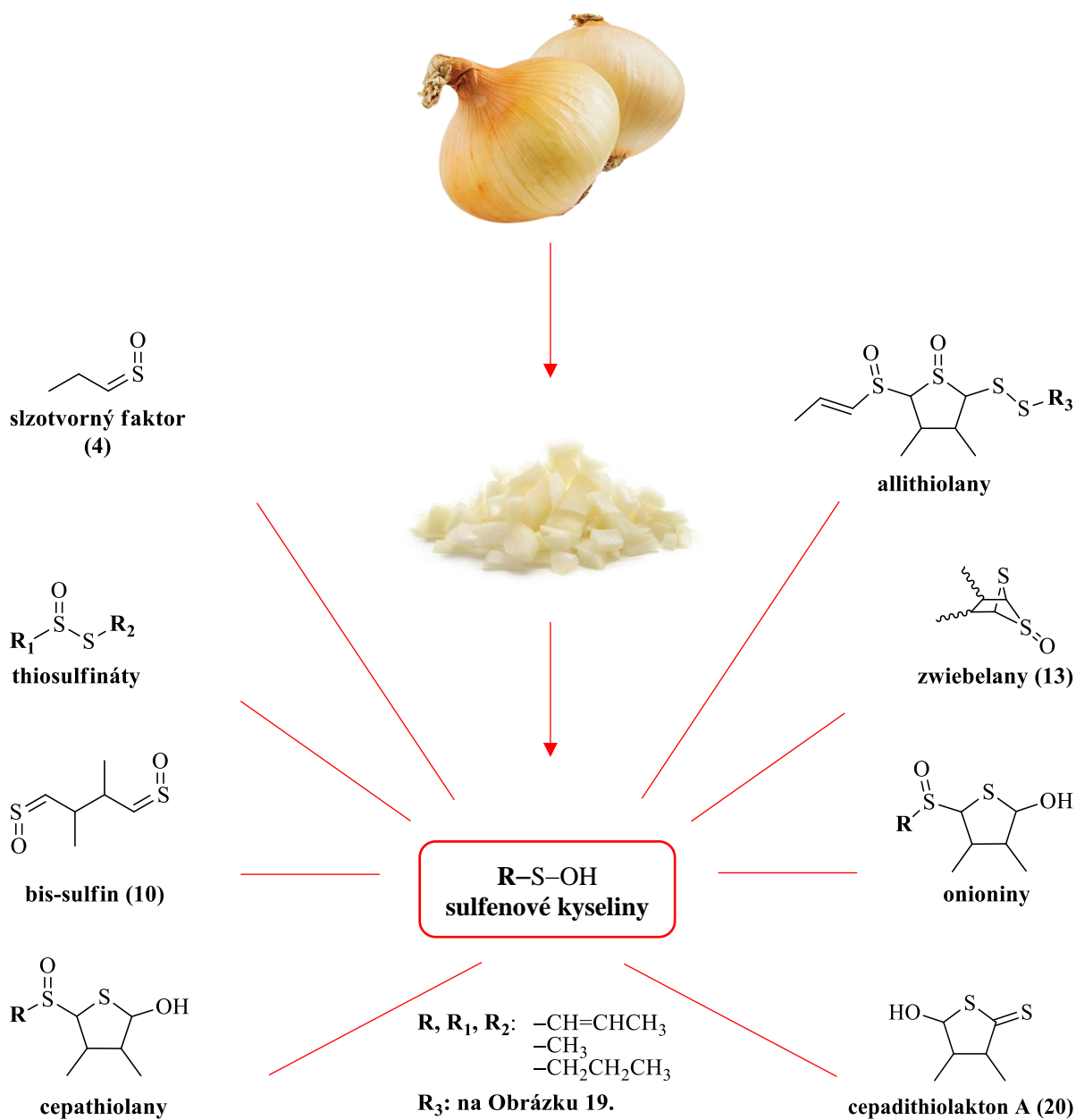
Nezastupitelná úloha cibule v lidovém léčitelství významně inspirovala vědce, kterým se po dlouhá desetiletí daří z cibule izolovat stále nové a nové biologicky aktivní sloučeniny. Vznik těchto organosírných látek probíhá enzymatickým rozkladem prekurzorů, *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů (**Obrázek 3**).



**Obrázek 3:** Struktura *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů obsažených v cibuli.

Organosírné látky si cibule a jiné rostliny rodu *Allium* vytvářejí jako ochranu proti konzumaci před ostatními zvířaty a pro zamezení rozvoje mikrobiální kontaminace při narušení rostlinného pletiva. Detekční mechanismus, který odpovídá za tuto nesnášenlivost, se nazývá chemická nocicepce a u lidí vyvolává pláč. Jedná se o receptor A1 nebo také TRPA1, který je

u lidí přítomný již 500 milionů let.<sup>4</sup> Nejvýznamnější zástupce organosírných sloučenin cibule uvádí **Obrázek 4**.



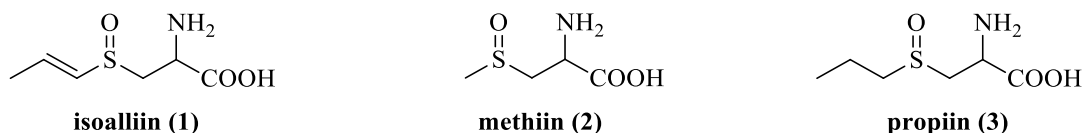
**Obrázek 4:** Struktura hlavních skupin organosírných sloučenin cibule.\*<sup>†</sup>

\* <https://www.hy-vee.com/grocery/PD4647212/Sweet-Yellow-Onions>, staženo 18. 12. 2020

<sup>†</sup> <https://www.readypac.com/product/diced-onion/>, staženo 18. 12. 2020

### 2.3.1 S-Alk(en)ylcystein-S-oxidy

Prekurzory organosírných sloučenin, S-alk(en)ylcystein-S-oxidy, se v cibuli vyskytují celkem tři, tj. isoalliin (**1**), methiin (**2**) a propiin (**3**) (**Obrázek 5**). Z uvedených sloučenin má nejvyšší relativní zastoupení isoalliin (**1**; 78 relat. %), následuje methiin (**2**; 21 relat. %). Propiin (**3**) se v cibuli vyskytuje pouze ve stopovém množství.<sup>5</sup>



**Obrázek 5:** Hlavní S-alk(en)ylcystein-S-oxidy cibule.

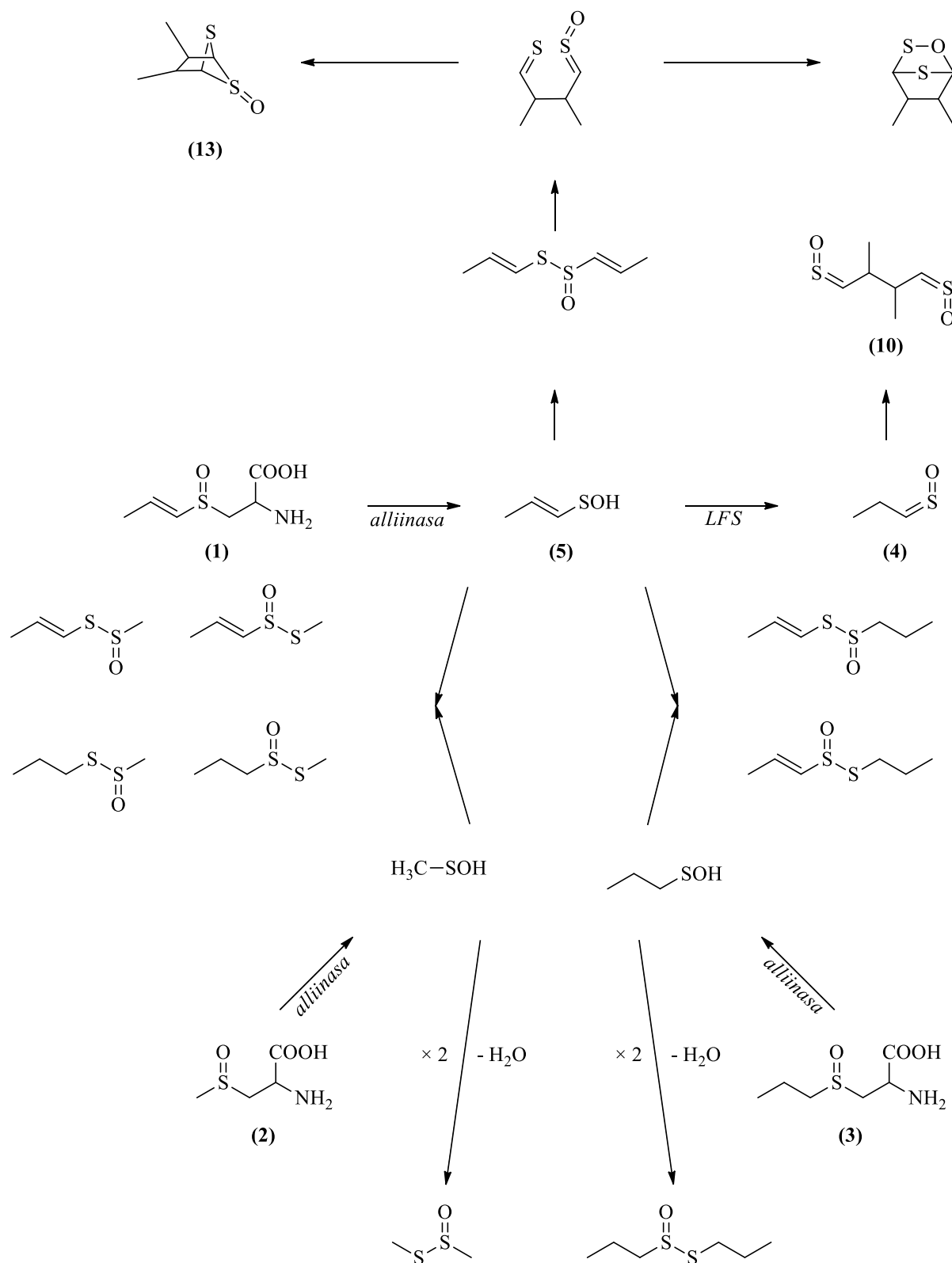
Methiin (**2**) byl poprvé izolován v roce 1959 Virtanenem a Matikkalou.<sup>6</sup> Spolu s methiinem (**2**) se jim podařilo získat také propiin (**3**). Třetí a nejdůležitější prekurzor je ale isoalliin (**1**). Jeho objevení je připisováno dvojici Virtanen a Spare.<sup>7</sup> Tato látka je také prekurzorem pro slzotvorný faktor (**4**; z anglického *lachrymatory factor*, dále jen LF), který při zpracování cibule způsobuje typické slzení očí.

### 2.3.2 Mechanismus tvorby organosírných sloučenin

Velmi důležité je zdůraznit, že v cibuli jsou přítomny dva různé enzymové systémy. Jsou jimi alliinasa a LF-synthasa (dále jen LFS). K enzymové reakci dochází vlivem narušení rostlinného pletiva. Prekurzory organosírných sloučenin se tak dostanou do přímého kontaktu s enzymy, čímž se spustí mimořádně komplexní kaskáda chemických reakcí (**Obrázek 6**).

Isoalliin (**1**) podléhá enzymově katalyzovanému rozkladu za přítomnosti alliinasy na 1-propensulfenovou kyselinu (**5**) a  $\alpha$ -aminoakrylovou kyselinu (**6**). Druhý enzym, tj. LFS, katalyzuje přeměnu 1-propensulfenové kyseliny (**5**) na LF (**4**).<sup>8</sup>

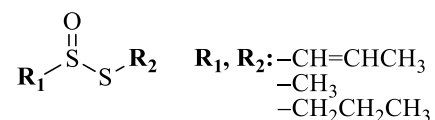
Vznikající organosírné sloučeniny budou detailně popsány v následujících kapitolách.



Obrázek 6: Obecné schéma vzniku organosírných sloučenin v cibuli.

### 2.3.3 Thiosulfináty

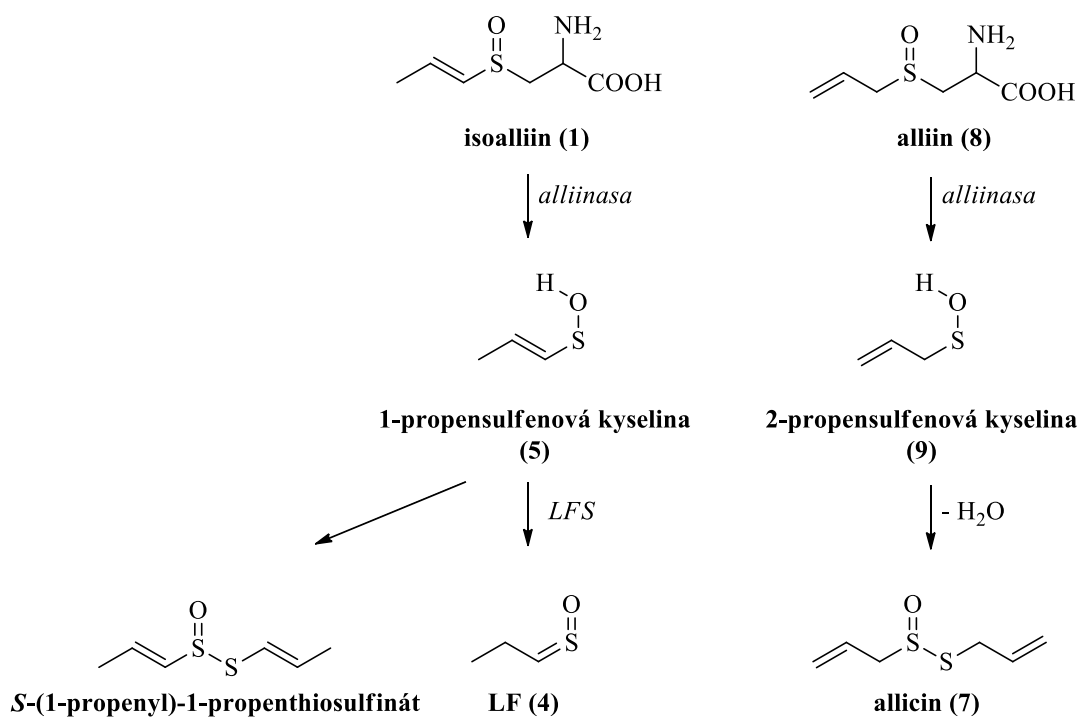
Thiosulfináty patří mezi nejlépe prostudované sloučeniny, které vznikají v rostlinách rodu *Allium*. Již roku 1944 Cavallito a Bailey<sup>9</sup> z česneku izolovali látku zvanou allicin (**7**), která vykazovala antibakteriální účinky. Strukturu thiosulfinátů přítomných v cibuli uvádí **Obrázek 7**.



**Obrázek 7:** Obecná struktura thiosulfinátů v cibuli.

V šedesátých letech minulého století si začali vědci všimnout, že methiin (**2**) a propiin (**3**) se v cibuli enzymaticky rozkládají na příslušné thiosulfináty, kterým byly později připsány charakteristické organoleptické vlastnosti česnekovitých rostlin. Kromě toho si thiosulfináty získaly pozornost svými výraznými antibiotickými vlastnostmi. Na významu těmto látkám také přidává to, že thiosulfináty jsou stabilní v plynné formě a zůstávají v okolí rostliny, kde mohou působit na hmyz (např. jako atraktanty nebo jako repelenty).<sup>10</sup>

Thiosulfináty se dělí na symetrické a asymetrické v závislosti na struktuře výchozích sulfenových kyselin. Ke vzniku thiosulfinátů, podobně jako většiny organosírných sloučenin cibule kuchyňské, dochází až po narušení pletiva. Velmi nestabilní sulfenové kyseliny, které vznikají enzymovým rozkladem *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, kondenzují za vzniku příslušných thiosulfinátů (**Obrázek 8**).



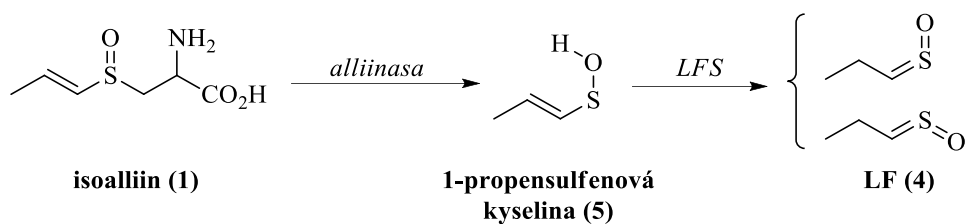
**Obrázek 8:** Rozklad isoalliinu (1) a alliinu (8) na příslušné thiosulfináty.

Odlíšné enzymové systémy v česneku a cibuli nabízí velmi zajímavé porovnání vzniku thiosulfinátů v těchto dvou zástupcích rodu *Allium* (**Obrázek 8**). V cibuli se totiž většina 1-propensulfenové kyseliny (5) vlivem působení LFS přemění na LF (4). Česnek LFS neobsahuje a 2-propensulfenová kyselina (9), která je velmi nestabilním meziproductem rozkladu alliinu (8), neenzymaticky kondenzuje na poměrně stabilní thiosulfinát alliin (7).

### 2.3.4 Slzotvorné látky

#### Sulfiny

Jako sulfiny jsou označovány látky, které mají funkční skupinu  $-\text{CH}=\text{S}=\text{O}$ . Jak již bylo zmíněno, unikátní vlastností cibule oproti česneku je přítomnost dvou různých enzymů (alliinasy a LFS). Ty svým působením umožňují vznik LF (4), systematicky propanthial-S-oxidu, který způsobuje typické slzení očí při zpracování cibule.

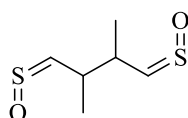


**Obrázek 9:** Mechanismus vzniku LF (4).<sup>11</sup>

Na **Obrázku 9** je popsán mechanismus vzniku LF (4) v cibuli. Působením alliinasy se isoalliin (1) přemění na 1-propensulfenovou kyselinu (5), ze které působením LFS z velké části vzniká LF (4). K objasnění tohoto mechanismu přispěli v roce 2002 Imai a kol.<sup>11</sup>, kteří dokázali, že ke vzniku LF (4) je potřeba obou enzymů (alliinasy i LFS). Do té doby se předpokládalo, že LF (4) vzniká spontánní izomerací 1-propensulfenové kyseliny (5) a pro vznik této sloučeniny tedy postačí pouze přítomnost alliinasy. Správná struktura LF (4) byla objasněna Brodnitzem a Pascalem roku 1971.<sup>12</sup>

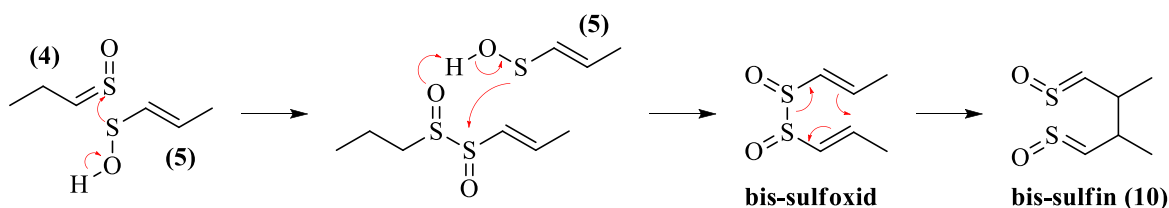
### Bis-sulfin

Jako první tuto přirozeně se vyskytující sloučeninu ze skupiny slzotvorných látek poprvé popsala dvojice Block a Bayer<sup>13</sup> ve své studii v roce 1990. Jednalo se o (Z,Z)-2,3-dimethyl-1,4-butandithial-S,S'-dioxid, triviálně bis-sulfin (**10**, **Obrázek 10**).



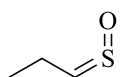
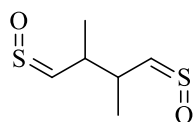
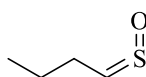
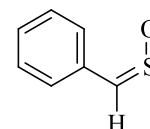
**Obrázek 10:** Struktura bis-sulfinu (10).

Mechanismus reakce v této studii předpokládá, že bis-sulfin (10) vzniká thiofilní adicí 1-propensulfenové kyseliny (5) na LF (4) a poté nukleofilním atakem druhé molekuly 1-propensulfenové kyseliny (5) (**Obrázek 11**).



**Obrázek 11:** Mechanismus vzniku bis-sulfinu (10).

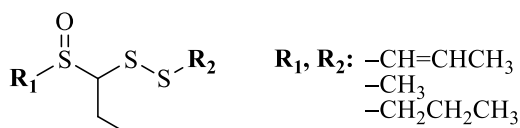
V cibuli se tedy vyskytují dva thioaldehyd-*S*-oxydy (sulfiny). Jsou jimi LF (**4**, systematicky (Z)-propanthial-*S*-oxid) a bis-sulfin (**10**, systematicky (Z,Z)-2,3-dimethyl-1,4-butandithial-*S,S'*-dioxid). Další zástupci slzotvorných sulfinů se také vyskytují v *Allium siculum* (systematicky butanthial-*S*-oxid; **11**)<sup>14</sup> a v *Petiveria alliacea* (systematicky (Z)-thiobenzaldehyd-*S*-oxid; **12**).<sup>15</sup> Struktury uvádí **Obrázek 12**.

*Allium cepa**Allium siculum**Petiveria alliacea***(4)****(10)****(11)****(12)**

**Obrázek 12:** Rostliny obsahující bis-sulfiny.\*, †, ‡

### 2.3.5 Cepaeny

Název těchto sloučenin pochází z latinského názvu rostliny, ze které byly poprvé izolovány, tj. cibule kuchyňské (lat. *Allium cepa*). Cepaeny (**Obrázek 13**) byly objeveny při hledání látek, které jsou zodpovědné za inhibici cyklooxygenasy a 5-lipoxygenasy. Poprvé byly popsány ve studii Bayera a kol.<sup>16</sup> v roce 1989, kteří tyto do té doby neznámé látky izolovali. K objevu cepaenů došlo díky snaze o objasnění, které konkrétní látky jsou zodpovědné za antiastmatické a antialergické účinky cibule.



**Obrázek 13:** Obecná struktura cepaenů.

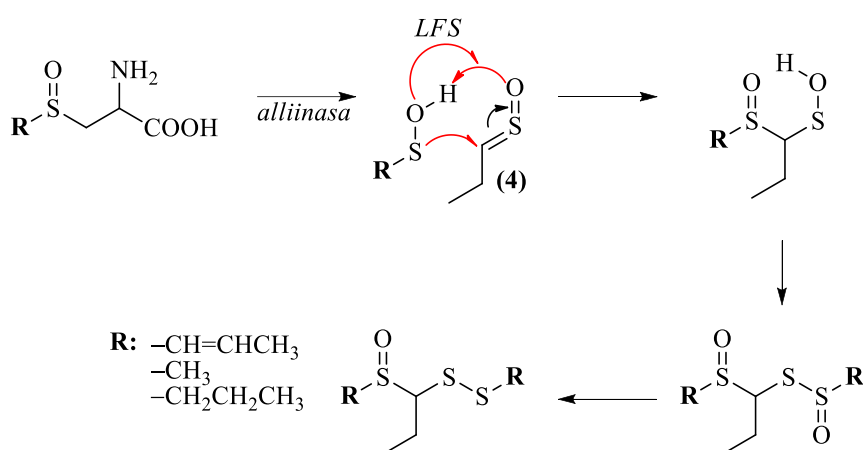
\* <https://www.veryediblegardens.com.au/iveg/vegetable-lore/onion/>, staženo dne 15. 2. 2021

† <https://www.perenniculium.cz/trvalky/nectaroscordum-siculum/>, staženo dne 15. 2. 2021

‡ <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:323288-2>, staženo dne 15. 2. 2021



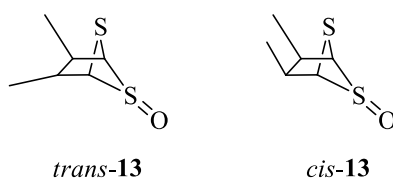
Mechanismus vzniku cepaenů, který v reakci předpokládá účast LF (4), uvádí **Obrázek 14**.



**Obrázek 14:** Mechanismus vzniku cepaenů.<sup>17</sup>

### 2.3.6 Zwiebelany

Název zwiebelany pochází z německého výrazu pro cibuli (tj. die Zwiebel) a poprvé byl použit Bayerem a kol.<sup>18</sup>. Autoři této studie hledali látku zodpovědnou za antialergické vlastnosti cibule. Dvě látky, které objevili, měly sumární vzorec  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$ . Jednalo se o dva *cis*-/*trans*- izomery zwiebelanů se systematickým názvem 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyklo[2.1.1]hexan-5-oxid (**13**, **Obrázek 15**).

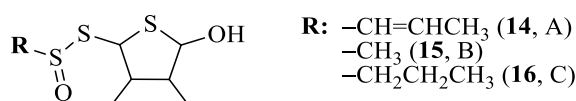


**Obrázek 15:** Struktura zwiebelanů (**13**).

### 2.3.7 Cepathiolany

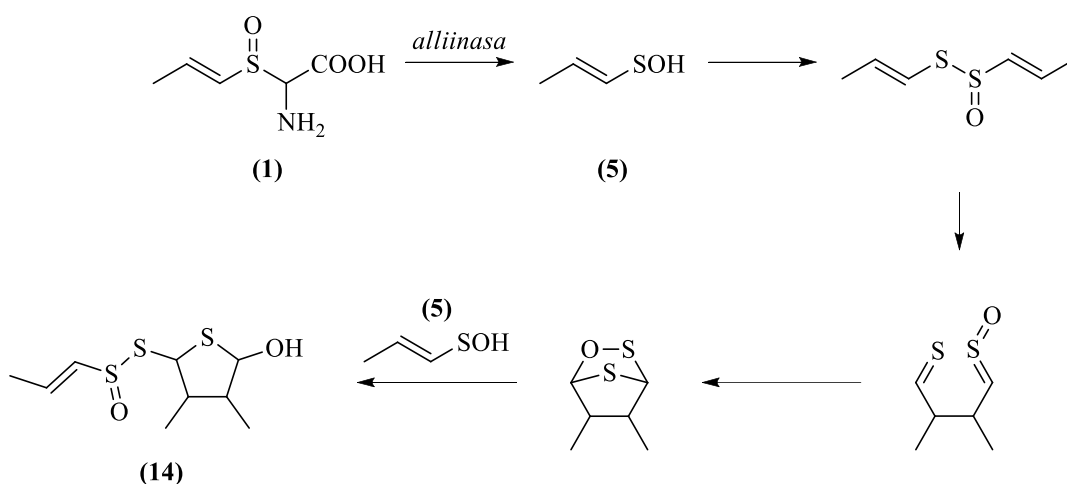
Cepathiolany byly poprvé izolovány Yoshidou a kol.<sup>19</sup> v roce 2010. Název je opět odvozen od latinského názvu cibule (*Allium cepa*), v názvu je ale také zohledněna přítomnost thiolanového jádra. V roce 2011 Aoyagi a kol.<sup>20</sup> objevili další stereoizomer této látky, který ve své studii pojmenovali cepathiolan A (**14**). Cepathiolan A (**14**) vzniká ze tří molekul

1-propensulfenové kyseliny (**5**), přičemž dvě ze tří molekul se podílejí na vzniku thiolanového jádra a třetí tvoří thiosulfínátový řetězec. Aoyagi také popsal biologické účinky těchto látek. Cepathiolan A (**14**) například vykazoval dvakrát silnější antikoagulační vlastnosti než aspirin, který se používá při léčbě ischemické choroby srdeční. V roce 2019 Štefanová a kol.<sup>21</sup> našli ve své studii propylové a methylové homology, které pojmenovali cepathiolany B (**15**) a C (**16**). Uvedené struktury shrnuje **Obrázek 16**.



**Obrázek 16:** Struktura cepathiolanů.

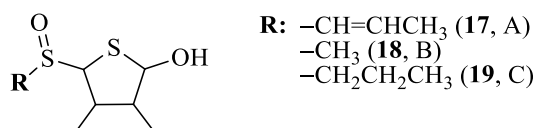
Mechanismus vzniku cepathiolanu A (**14**) uvádí **Obrázek 17**.



**Obrázek 17:** Mechanismus vzniku cepathiolanu A (**14**).<sup>20</sup>

### 2.3.8 Onioniny

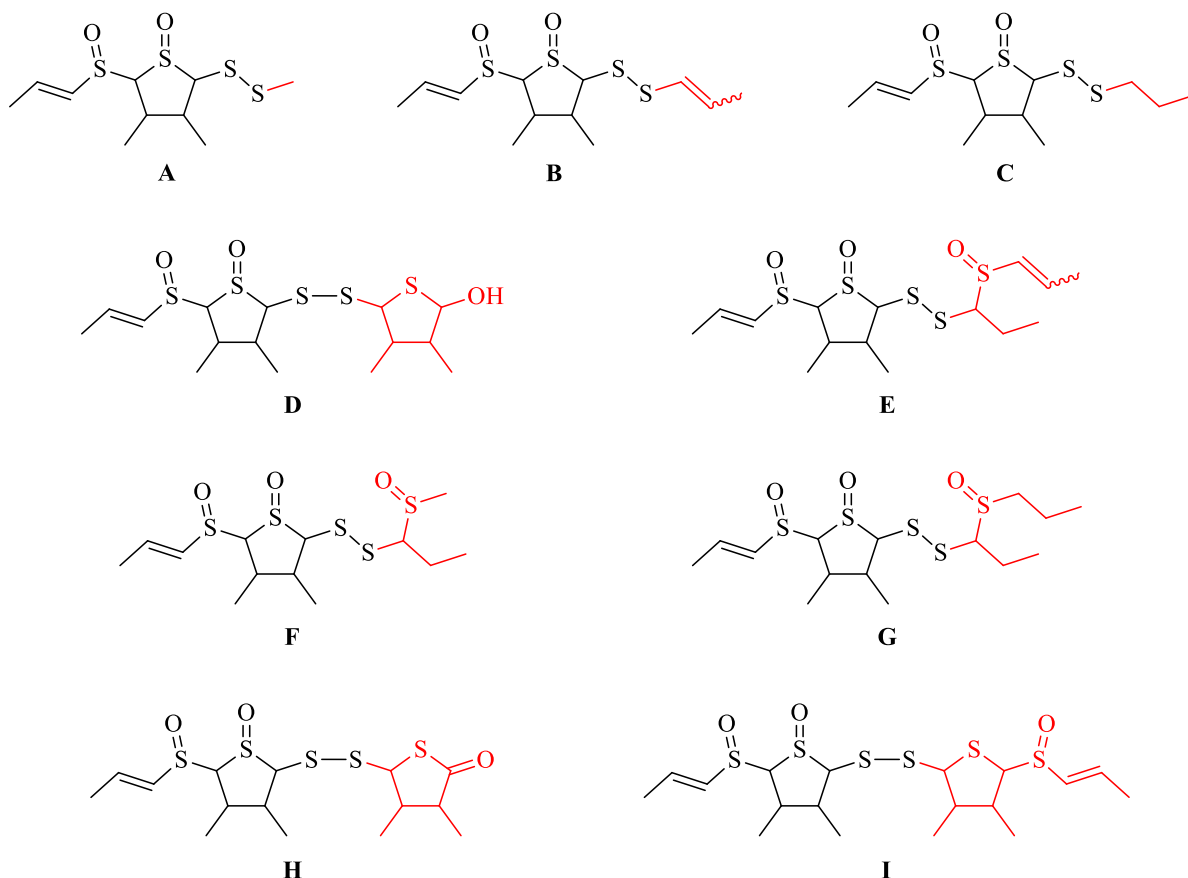
El-Aasr a kol.<sup>22</sup> v roce 2010 izolovali z cibule prvního zástupce ze skupiny tzv. onioninů. Označení onionin je opět odvozen od rostliny, z níž byla izolována, tentokrát z anglického názvu pro cibuli (*onion*). Zároveň bylo objeveno, že tato látka, pojmenovaná jako onionin A (**17**), vykazuje protirakovinotvorné účinky, jelikož potlačuje proliferační dělení nádorových buněk. V roce 2014 Nohara a kol.<sup>23</sup> objevili další dva stabilní stereoizomery onioninu A (**17**). V roce 2019 Štefanová a kol.<sup>21</sup> na základě průkazných spektroskopických dat vyvrátili původně navržené struktury onioninu A (**17**) obou autorů. Autoři této studie také objevili do té doby nepopsané methylové, resp. propylové homology onioninu A (**17**), tj. onioniny B (**18**), resp. onioniny C (**19**). Struktury těchto sloučenin uvádí **Obrázek 18**.



**Obrázek 18:** Obecná struktura onioninů A–C (**17–19**).<sup>21</sup>

### 2.3.9 Allithiolany

Izolace a identifikace nové a velmi rozsáhlé skupiny organosirných sloučenin, které nesou odpovědnost za hořkou chuť zpracované cibule, byla výsledkem vědecké studie Kubce a kol. v roce 2018.<sup>24</sup> Bylo objeveno 9 strukturně unikátních sloučenin, které získaly označení allithiolany A–I. Všechny tyto sloučeniny patří do skupiny strukturně příbuzných derivátů 3,4-dimethylthiolan-S-oxidu. Struktury izolovaných allithiolanů uvádí **Obrázek 19**.

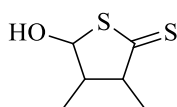


Obrázek 19: Struktury allithiolanů A–I.<sup>22</sup>

Charakteristickou vlastností allithiolanů je tedy jejich výrazně hořká chuť, kvůli které je tvorba těchto sloučenin technologicky velmi nežádoucí.

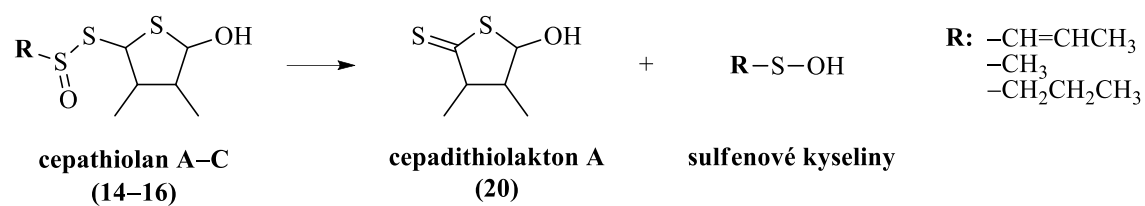
### 2.3.10 Cepadithiolakton A

Dosud nepopsaná sloučenina elementárního složení  $C_6H_{10}OS_2$  byla z cibule poprvé izolována Štefanovou a kol.<sup>21</sup> v roce 2019. Struktura sloučeniny byla určena jako 5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-thion. Jednalo se o vůbec první přirozeně se vyskytující dithiolakton, který s ohledem na svůj původ a strukturu získal triviální označení cepadithiolakton A (**20**, **Obrázek 20**).



Obrázek 20: Cepadithiolakton A (**20**).

Mechanismus vzniku cepadithiolaktonu A (**20**) je uveden na **Obrázku 21**.



**Obrázek 21:** Mechanismus vzniku cepadithiolaktonu A (**20**) rozkladem cepathiolanů.<sup>21</sup>

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie a materiály

#### Chemikálie

*Lach-Ner (Neratovice, České republika)*

Kyselina mravenčí (98%, p. a.), síran hořečnatý (bezvodý, p. a.)

*Sigma Aldrich*

Acetonitril (HPLC grade), dichlormethan (p. a.), methanol (HPLC grade)

#### 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  $\mu\text{m}$ ;  $\varnothing$  13 a 25 mm) – Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) a centrifugační filtry (0,2  $\mu\text{m}$ ; 2 ml) – Watrex (Praha, ČR)

#### Přístroje

HPLC separace byly prováděny na přístroji 1260 Infinity II preparative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s detektorem 1260 Infinity II PDA WR. Používané kolony: analytické Kinetex C8 (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex) a C8 Rainin Dynamax (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 8  $\mu\text{m}$ ; Varian). Při vývoji separačních metod byly testovány také analytické kolony Kinetex Bifenyl, C18, F5 a fenyl-hexyl (všechny 100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex). K izolacím byly použity preparativní kolony Kinetex C8 (100  $\text{\AA}$ ;

250 × 21,2 mm; 5 μm; Phenomenex) a C8 Rainin Dynamax (100 Å; 250 × 21,4 mm; 8 μm; Varian).

(+)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 °C, potenciál coulombické exploze 60 V.

Pro separaci látek na principu kapalinové chromatografie a jejich simultánní detekci pomocí PDA a MS (UHPLC-PDA-MS/MS) byl použit systém UHPLC Ultimate3000, MS LTQ XL. Kapalinový chromatograf Ultimate3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) se systémem vysokotlakých binárních pump HPG-3200SD a detektorem diodového pole PDA-3000. Hmotnostní spektrometr na principu lineární iontové pasti (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

## 3.2 Gradienty používané v HPLC

### METODA A

průtok	čas [min]	H <sub>2</sub> O [%]	CH <sub>3</sub> CN [%]
0,9 ml/min	0:00	70	30
	30:00	55	45
	42:00	5	95
	48:00	5	95
	50:00	70	30
<b>kolona</b>	C8 Rainin Dynamax (100 Å; 250 × 250 × 4,6 mm; 8 μm)		

### METODA B

průtok	čas [min]	H <sub>2</sub> O [%]	CH <sub>3</sub> 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
<b>kolona</b>	C8 Rainin Dynamax (100 Å; 250 × 21,4 mm; 8 μm)		

**METODA C**

průtok	čas [min]	H <sub>2</sub> O + 0,05% HCOOH [%]	CH <sub>3</sub> 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
<b>kolona</b>	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm)		

**METODA D**

průtok	čas [min]	H <sub>2</sub> O [%]	CH <sub>3</sub> CN [%]
0,9 ml/min	0:00	80	20
	22:00	78	22
	23:00	5	95
	29:00	5	95
	30:00	80	20
<b>kolona</b>	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm)		

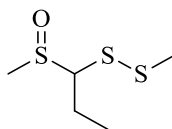
**METODA E**

průtok	čas [min]	H <sub>2</sub> O [%]	CH <sub>3</sub> CN [%]
0,9 ml/min	0:00	90	10
	15:00	90	10
	50:00	70	30
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	90	10
<b>kolona</b>	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm)		

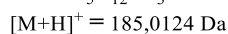
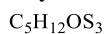
**3.3 Izolace sloučenin z extraktu cibule kuchyňské**

Tato bakalářská práce byla zaměřena na izolaci vybraných homologů ze skupiny cepaenů. Jak již bylo uvedeno v kap. 2.3.5, cepaeny tvoří velmi rozsáhlou skupinu organosírných sloučenin cibule kuchyňské. Pro přehlednost získaly tyto látky v rámci bakalářské práce (s ohledem na svou molekulovou hmotnost) označení cepaeny-184 (**21, Obrázek 22**).





cepaeny-184 (21)



Obrázek 22: Struktura cepaenů-184 (21).

### Příprava extraktu

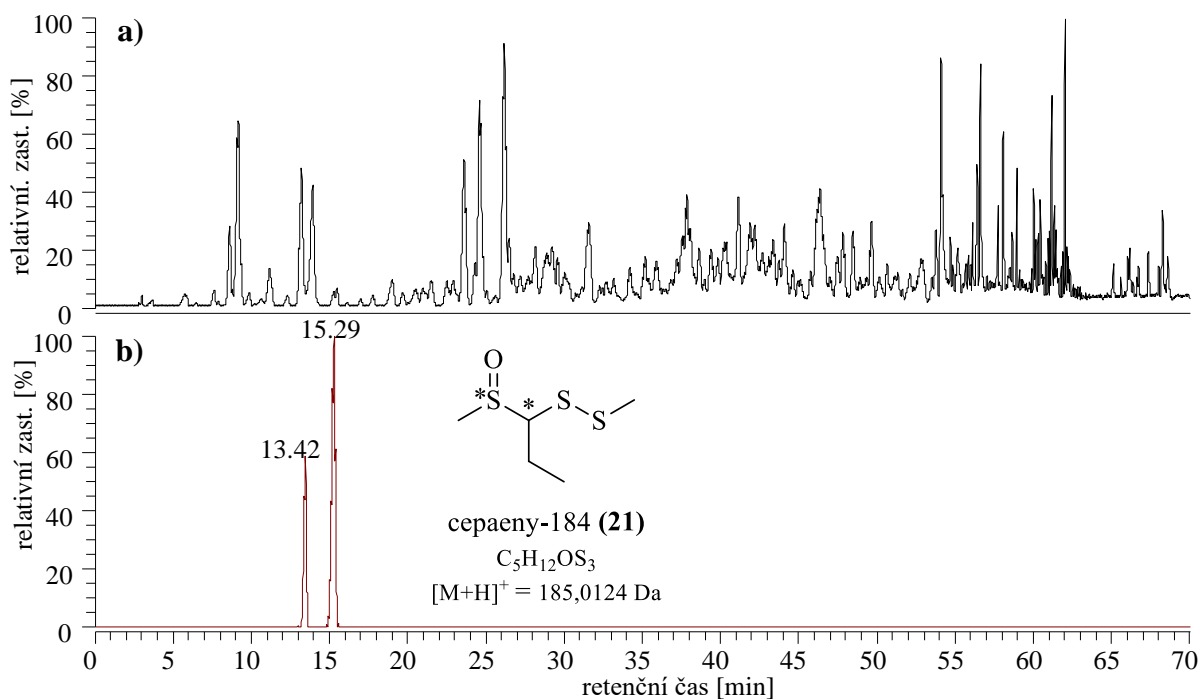
Oloupaná cibule (1209 g) byla zpracována pomocí kuchyňského odšťavňovače (Catler JE 4010). Šťáva byla ponechána po dobu 18 hodin při laboratorní teplotě. Během této doby začala šťáva velmi výrazně hořknout.

Přímá extrakce byla provedena dvakrát pomocí  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o objemu 130 ml. Z důvodu tvorby emulze ve vzorku byl vzorek odstředěn (10 000 rpm; 3 min). Organická fáze byla oddělena a byla provedena druhá extrakce vodné fáze. Obě organické fáze byly poté spojeny. Ze vzorku byl částečně odpařen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a poté byl extrakt přesušen bezvodým  $\text{MgSO}_4$ , přefiltrován přes mikrofiltr (PTFE; 0,45  $\mu\text{m}$ ;  $\varnothing$  25 mm) a nakonec byl zbývající objem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  úplně odpařen pomocí rotační vakuové odparky ( $t < 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; dále jen RVO). Vzniklý odparek (248 mg) byl poté rozpuštěn v 80 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  a zbaven chlorofylu pomocí C18-SPE kolony (10 g; 60 ml). Získaný roztok byl čiré žluté barvy (při použití C8-SPE nedocházelo k zachycení chlorofylu). Poté byl z roztoku odpařen veškerý objem  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Výsledkem byl tmavě žlutý, viskózní roztok s výrazně hořkou chutí.

Uvedeným postupem bylo celkově zpracováno 40,9 kg cibule. Přímou extrakcí bylo takto získáno 24,3 g tmavě zeleného extraktu. Pomocí kolony C18-SPE (10 g; 60 ml) po odstranění chlorofylu bylo získáno celkem 13,2 g tmavě žlutého viskózního extraktu, který byl před dalšími analýzami uchován při teplotě  $-28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.4 HPLC/HRMS analýza extraktu

HPLC/HRMS analýza extraktu byla provedena za účelem zjištění retenčních časů izolovaných organosírných látek, tj. cepaenů-184 (21). Výsledky HPLC/HRMS analýzy uvádí **Obrázek 23 (Metoda A)**.



**Obrázek 23:** HPLC/HRMS analýza:

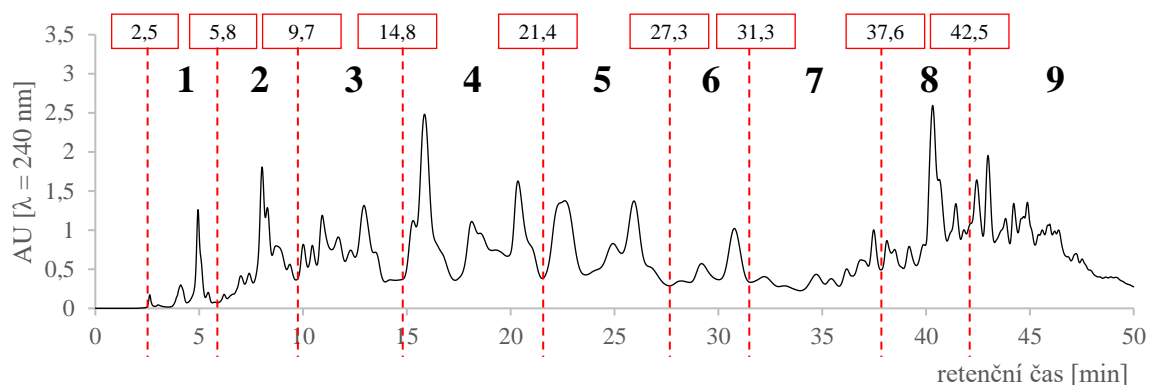
**a)** extraktu cibule (**Metoda A**),

**b)** vygenerovaná hmota cepaenů-184 (**21**)  $[M+H]^+ = 185,0124$  Da (**Metoda A**).

### 3.5 Frakcionace extraktu metodou C8-HPLC/PDA

Preparativní separace za pomoci C8-HPLC/PDA byla provedena na základě výsledků HPLC/HRMS analýzy s cílem frakcionace získaného cibulového extraktu a následné izolace vybraných organosírných sloučenin (tj. cepaenů-184, **21**).

Ze získaného extraktu byl připraven vzorek na HPLC. Naředěním  $CH_3CN/H_2O$  (v/v; 1/1) byl získán vzorek o koncentraci 310 mg/ml. Ten byl dále filtrován pomocí stříkačkového filtru (PTFE; 0,45  $\mu m$ ;  $\varnothing$  25 mm). Preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda B**, nástřikový objem 900  $\mu l$ ) bylo jímáno celkem 9 frakcí (**Obrázek 24**). Touto metodou bylo zpracováno veškeré množství extraktu (13,2 g) získaného ze 40,9 kg čerstvé cibule.

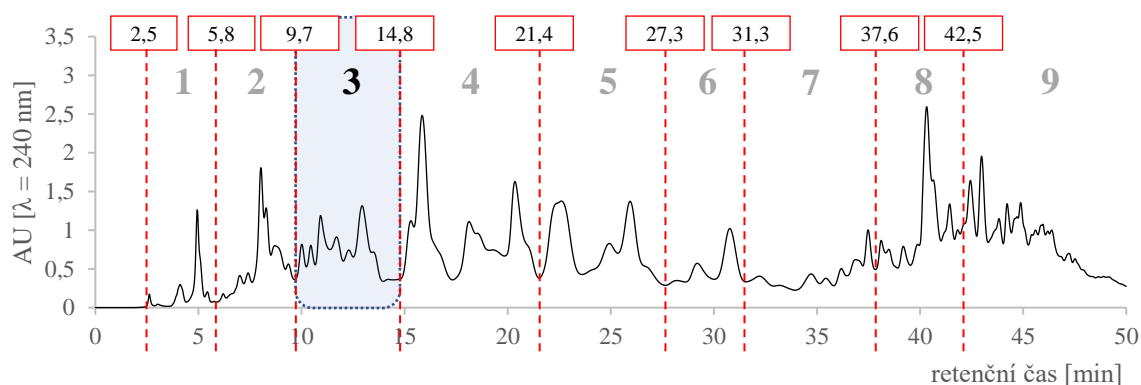


**Obrázek 24:** C8-HPLC/PDA chromatogram cibulového extraktu – frakcionace (**Metoda B**).

Každá frakce byla pomocí RVO ( $t < 30\text{ °C}$ ) zbavena  $\text{CH}_3\text{CN}$  a extrahována metodou přímé extrakce s využitím  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (v/v;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{vzorek}$  1/5). Poté byl vzorek přesušen  $\text{MgSO}_4$ , filtrován přes Hirschovu nálevku a na RVO ( $t < 30\text{ °C}$ ) zbaven veškerého  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Takto získané extrakty jednotlivých frakcí byly uchovány při teplotě  $-28\text{ °C}$ .

### 3.6 Optimalizované HPLC metody

Na základě výsledků HPLC/HRMS analýzy (**Obrázek 23**) byla při pokusu o izolaci cepaenů-184 (**21**; elementární složení  $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{OS}_3$ ) pozornost zaměřena na frakci **3** (retenční čas 9,7–14,8 min) (**Obrázek 25**).

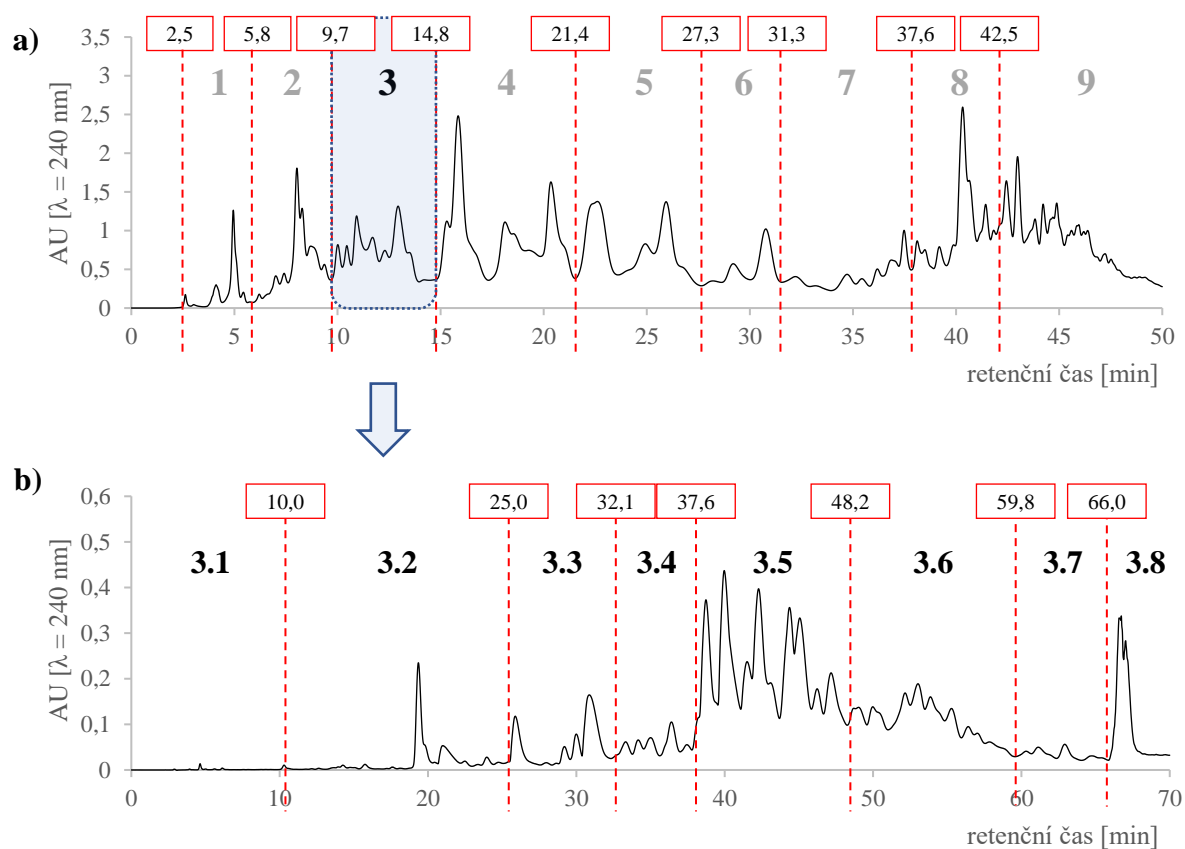


**Obrázek 25:** C8-HPLC/PDA chromatogram cibulového extraktu – frakce **3** obsahující cepaeny-184 (**21**) (**Metoda B**).

### Frakce 3

Frakce **3** (1592 mg) byla naředěna na koncentraci 175 mg/ml rozpuštěním v okyseleném roztoku (v/v; CH<sub>3</sub>OH + 0,05% HCOOH/ H<sub>2</sub>O + 0,05% HCOOH; 3/1) zfiltrována pomocí stříkačkového filtru (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm).

Pro frakci **3** byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA, pomocí které bylo jímáno celkem 8 frakcí (označeny **3.1–3.8**) (Obrázek 26, Metoda C, nástřikový objem 150 μl).



**Obrázek 26:** C8-HPLC/PDA chromatogram:

- a) cibulového extraktu (Metoda B),
- b) cibulové frakce 3 – frakcionace (Metoda C).

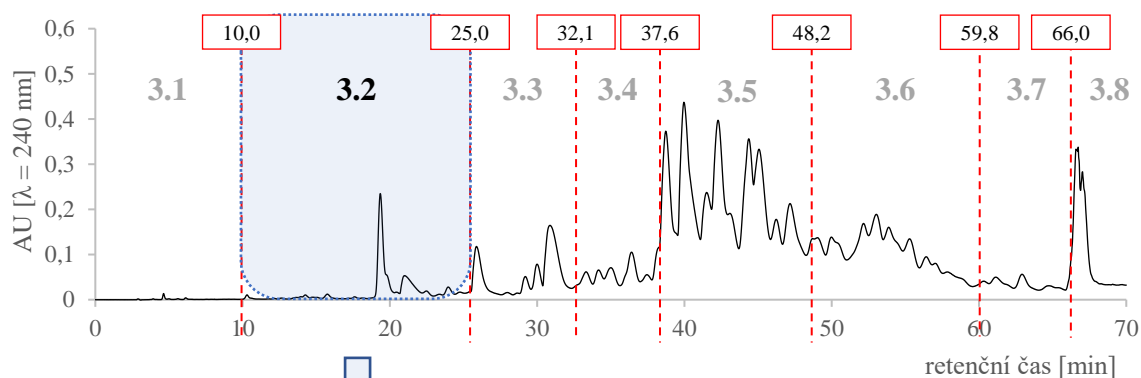
Každá frakce byla pomocí RVO ( $t < 30$  °C) zbavena CH<sub>3</sub>CN a extrahována CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> metodou přímé extrakce (v/v; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/vzorek; 1/5). Po přesušení MgSO<sub>4</sub>, filtraci přes Hirschovu nálevku a odpaření veškerého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> byly získané extrakty jednotlivých frakcí před dalším zpracováním uchovány při teplotě –28 °C.

## Frakce 3.2

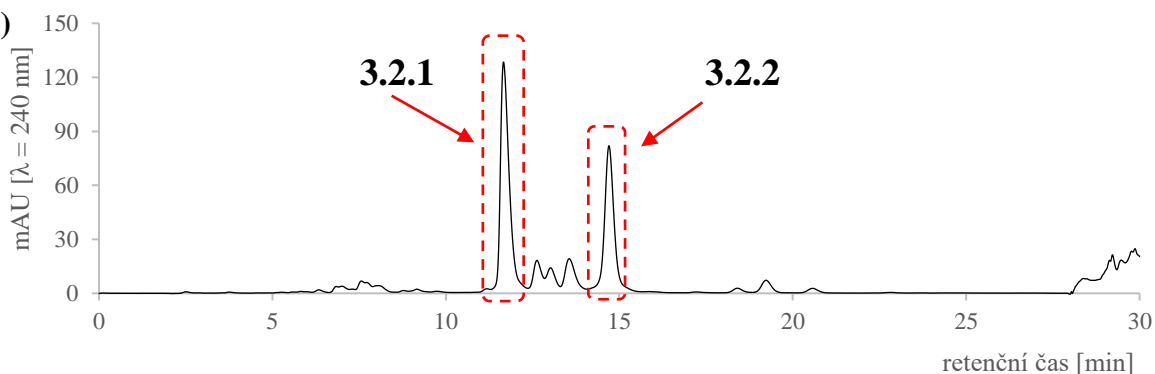
Frakce **3.2** (326 mg) byla naředěna na koncentraci 108 mg/ml (v/v; CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 1/1) a přefiltrována pomocí stříkačkového filtru (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm).

Pro frakci **3.2** byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 27, Metoda D**, nástřikový objem 150 μl). Pomocí této metody byly jímány celkem 2 frakce (označeny **3.2.1** a **3.2.2**; **Obrázek 27b**). Obě frakce (**3.2.1** a **3.2.2**) byly pomocí RVO ( $t < 30$  °C) zbaveny CH<sub>3</sub>CN, extrahovány CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> metodou přímé extrakce (v/v; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/vzorek; 1/5). Po přesušení MgSO<sub>4</sub>, filtraci přes Hirschovu nálevku a odpaření veškerého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> byly oba extrakty (**3.2.1** a **3.2.2**) před dalším zpracováním uchovány při teplotě –28 °C.

a)



b)



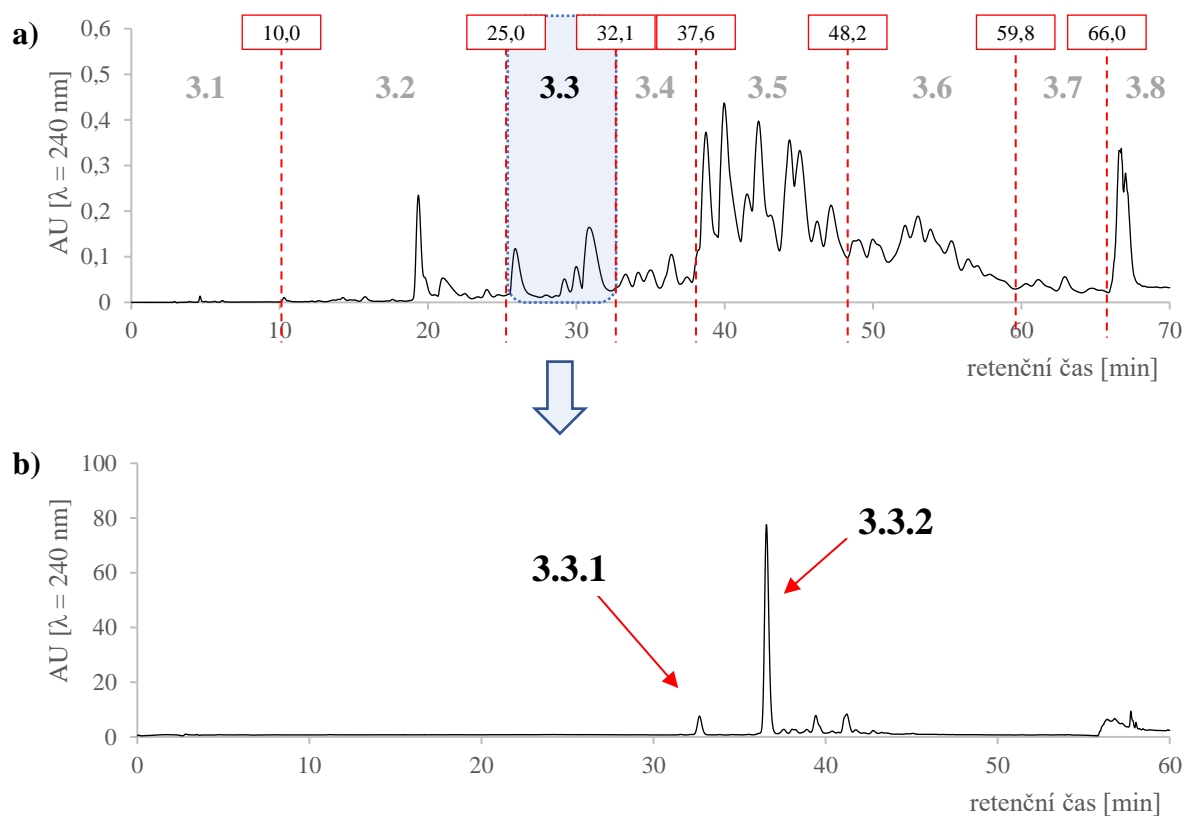
**Obrázek 27:** C8-HPLC/PDA chromatogram:

- a) cibulové frakce **3** – frakcionace (**Metoda C**),
- b) cibulové frakce **3.2** – frakcionace (**Metoda D**).

### Frakce 3.3

Frakce **3.3** (139 mg) byla naředěna na koncentraci 58 mg/ml (v/v; CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 1/1) a přefiltrována pomocí membránového filtru (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm).

Pro frakci **3.3** byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 28, Metoda E**, nástříkový objem 150 μl). Pomocí této metody byly jímány celkem 2 frakce (označeny **3.3.1** a **3.3.2**; **Obrázek 27b**). Tyto frakce (**3.3.1** a **3.3.2**) byly pomocí RVO ( $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zbaveny CH<sub>3</sub>CN a extrahovány CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> metodou přímé extrakce (v/v; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/vzorek 1/5). Po přesušení MgSO<sub>4</sub>, filtraci přes Hirschovu nálevku a odpaření veškerého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> byly oba extrakty (**3.3.1** a **3.3.2**) před dalším zpracováním uchovány při teplotě  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Obrázek 28:** C8-HPLC/PDA chromatogram:

- a) cibulové frakce **3** – frakcionace (**Metoda C**),
- b) cibulové frakce **3.3** – frakcionace (**Metoda E**).

## 4 Výsledky

Cepaeny tvoří velmi rozsáhlou skupinu organosírných sloučenin cibulového extraktu (**Obrázek 29a**). Hlavním cílem této práce bylo izolovat pouze methylové homology cepaenů, tj. cepaeny-184 (**21**) o elementárním složení  $C_5H_{12}OS_3$  (**Obrázek 29b**). Standardy těchto sloučenin totiž nejsou komerčně dostupné, a pro další výzkum těchto látek je tedy nutné izolovat je přímo z cibulového extraktu.



**Obrázek 29:** Struktura: **a)** všech homologů cepaenů, které se vyskytují v cibulovém extraktu, **b)** cepaenů-184 s vyznačenými centry chiraloty.

Cibule byla po oloupání odšťavněna kuchyňským odšťavňovačem a šťáva ponechána stát při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin. Po této době byla šťáva extrahována  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a dále zpracována dle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Cepaeny patří mezi sloučeniny, které v cibulovém extraktu vznikají ve větším množství až po delší době od homogenizace. Dosud však nebyly publikovány žádné studie, které by se zaměřily na kvantifikaci organosírných sloučenin vznikajících v cibulovém homogenátu v závislosti na čase. Není tudíž známa optimální doba, po kterou je (pro maximalizaci výtěžku cepaenů) vhodné nechat cibulový homogenát volně reagovat. Izolované standardy cepaenů-184 (**21**) budou v dalším období využity právě pro účely jejich kvantifikace v homogenizované cibuli.

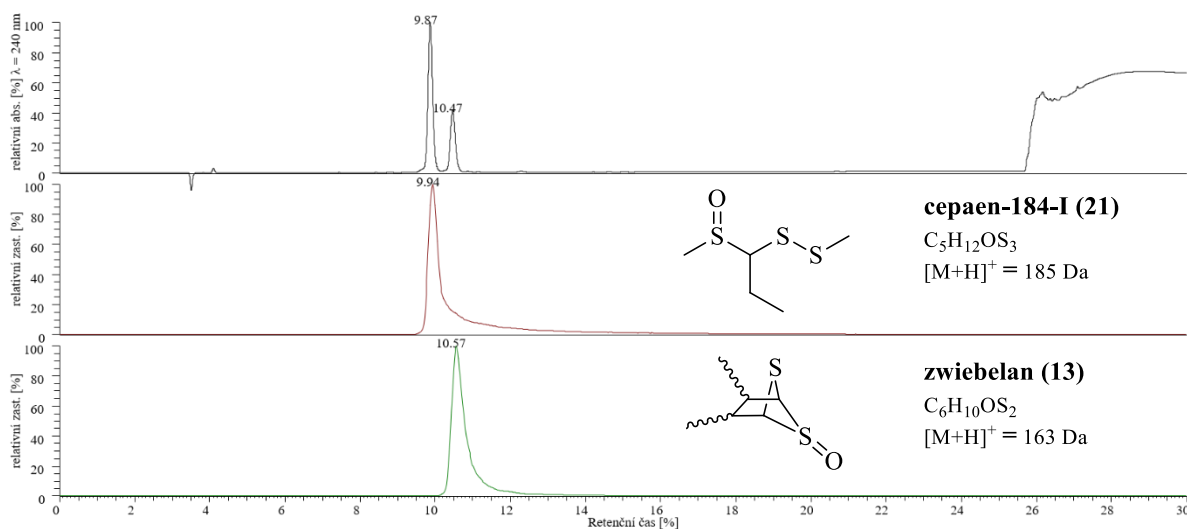
Na základě výsledků HPLC/MS analýzy jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že požadované cepaeny-184 (**21**) se nacházejí ve frakci 3 cibulového extraktu (**Obrázek 31a**). Cepaeny-184 (**21**) mají ve své molekule 2 centra chiraloty (viz **Obrázek 29b**), a v cibulovém extraktu lze tedy očekávat přítomnost celkem 4 stereoizomerů. Opakovanými HPLC/PDA frakcionacemi za využití různých stacionárních fází byly z extraktu izolovány standardy celkem čtyř stereoizomerů cepaenů-184 (**21**), které budou detailně popsány v následujících kapitolách.

## 4.1 Izolace cepaenů-184

Pro frakci **3** cibulového extraktu byla optimalizována HPLC/PDA metoda (**Metoda C**, **Obrázek 32b**). S využitím preparativní C8-HPLC/PDA byla tato frakce rozdělena na celkem 8 frakcí (označeny **3.1–3.8**; **Obrázek 32b**). Pomocí HPLC/MS analýzy jednotlivých frakcí **3.1–3.8** byly cepaeny-184 (**21**) detekovány ve frakcích **3.2** a **3.3**, které byly z důvodu koeluce cepaenů-184 (**21**) s dalšími sloučeninami dále frakcionovány. Frakce **3.2** byla pomocí preparativní C8-HPLC/PDA rozdělena na dvě frakce (**3.2.1** a **3.2.2**) (**Obrázek 32c**, **Metoda D**). Obdobně byly dvě frakce (**3.3.1** a **3.3.2**) získány využitím preparativní C8-HPLC/PDA z frakce **3.3** (**Obrázek 38c**, **Metoda E**).

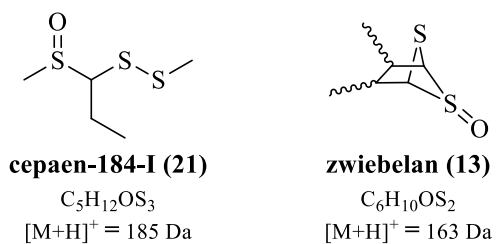
### Cepaen-184-I

Proces izolace frakce **3.2.1** zachycuje **Obrázek 32**. Celkově se podařilo získat 29,6 mg viskózního, mírně nažloutlého roztoku. HPLC/PDA analýza potvrdila vysokou čistotu izolované frakce (**Obrázek 32d**, **Metoda D**). HPLC/MS analýza však prokázala přítomnost dvou sloučenin, tj. cepaenu-184 (**21**) a pravděpodobně zwiebelanu (**13**) (**Obrázek 30**, **Metoda D**). Jelikož se jedná o první izolovaný stereoizomer, získal v rámci této práce označení cepaen-184-I (**21**) (v odborné literatuře žádné jednotné označování těchto sloučenin doposud zavedeno nebylo). Struktury uvedených sloučenin uvádí **Obrázek 31**.



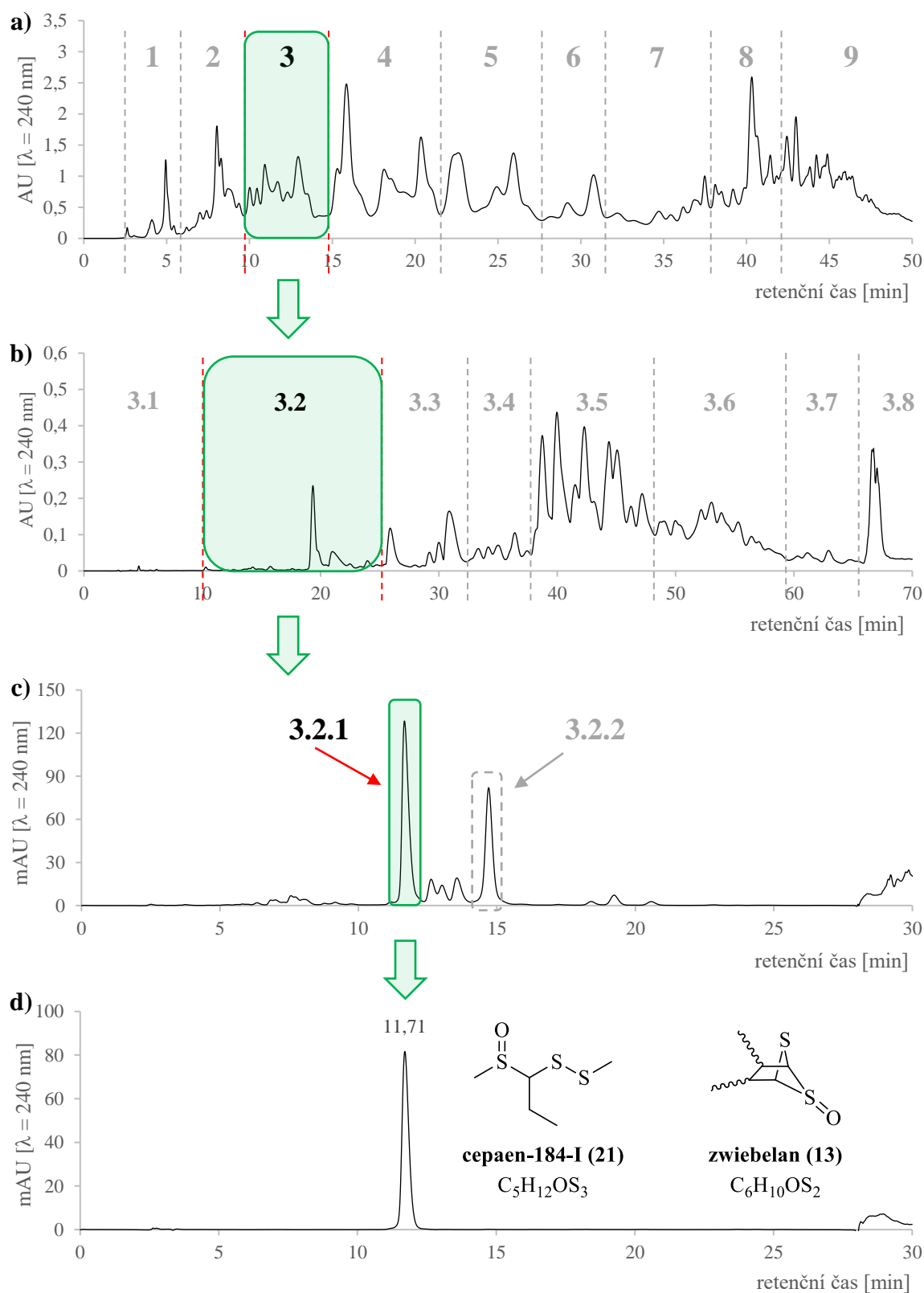
**Obrázek 30:** Analýza frakce **3.2.1**: **a**) C8-HPLC/PDA chromatogram (**Metoda D**), **b**) C8-HPLC/MS - vygenerovaná hmota cepaenu-184-I (**21**)  $[M+H]^+ = 185$  Da (**Metoda D**), **c**) C8-HPLC/MS - vygenerovaná hmota pravděpodobně odpovídající zwiebelanu (**13**)  $[M+H]^+ = 163$  Da (**Metoda D**).





**Obrázek 31:** Předpokládané struktury frakce **3.2.1**.

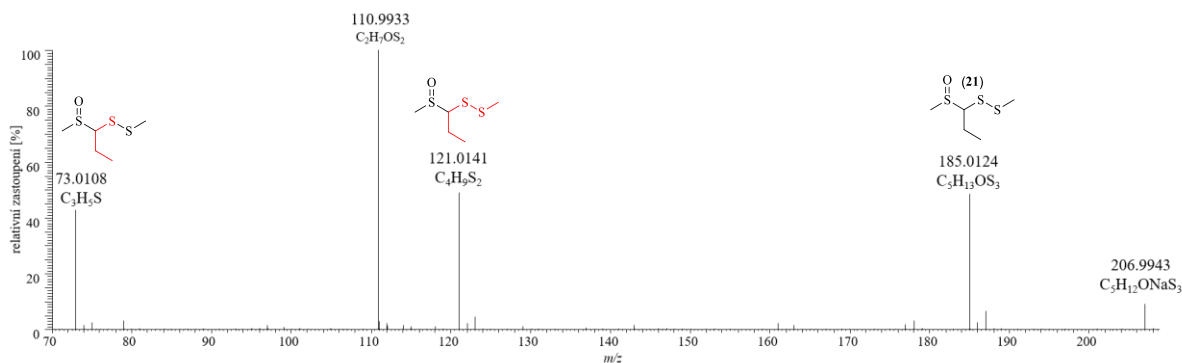
Frakce **3.2.1** bude dále analyzována s cílem optimalizovat HPLC metodu pro separaci jednotlivých sloučenin, tj. cepaenu184-I (**21**) a pravděpodobného zwibelanu (**13**).



**Obrázek 32:** C8-HPLC/PDA chromatogram: **a)** cibulového extraktu (**Metoda B**), **b)** cibulové frakce 3 – frakcionace (**Metoda C**), **c)** cibulové frakce 3.2 – frakcionace (**Metoda D**), **d)** frakce 3.2.1 (**Metoda D**).

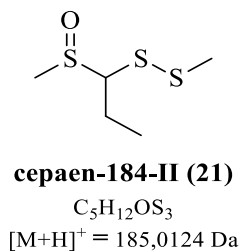
## Cepaen-184-II

Proces izolace frakce s označením **3.2.2** zachycuje **Obrázek 35**. Celkově se podařilo získat 1,7 mg viskózního, mírně nažloutlého roztoku. HPLC/PDA i HPLC/MS analýza potvrdily vysokou čistotu izolované frakce (**Obrázek 35d, Metoda D**).



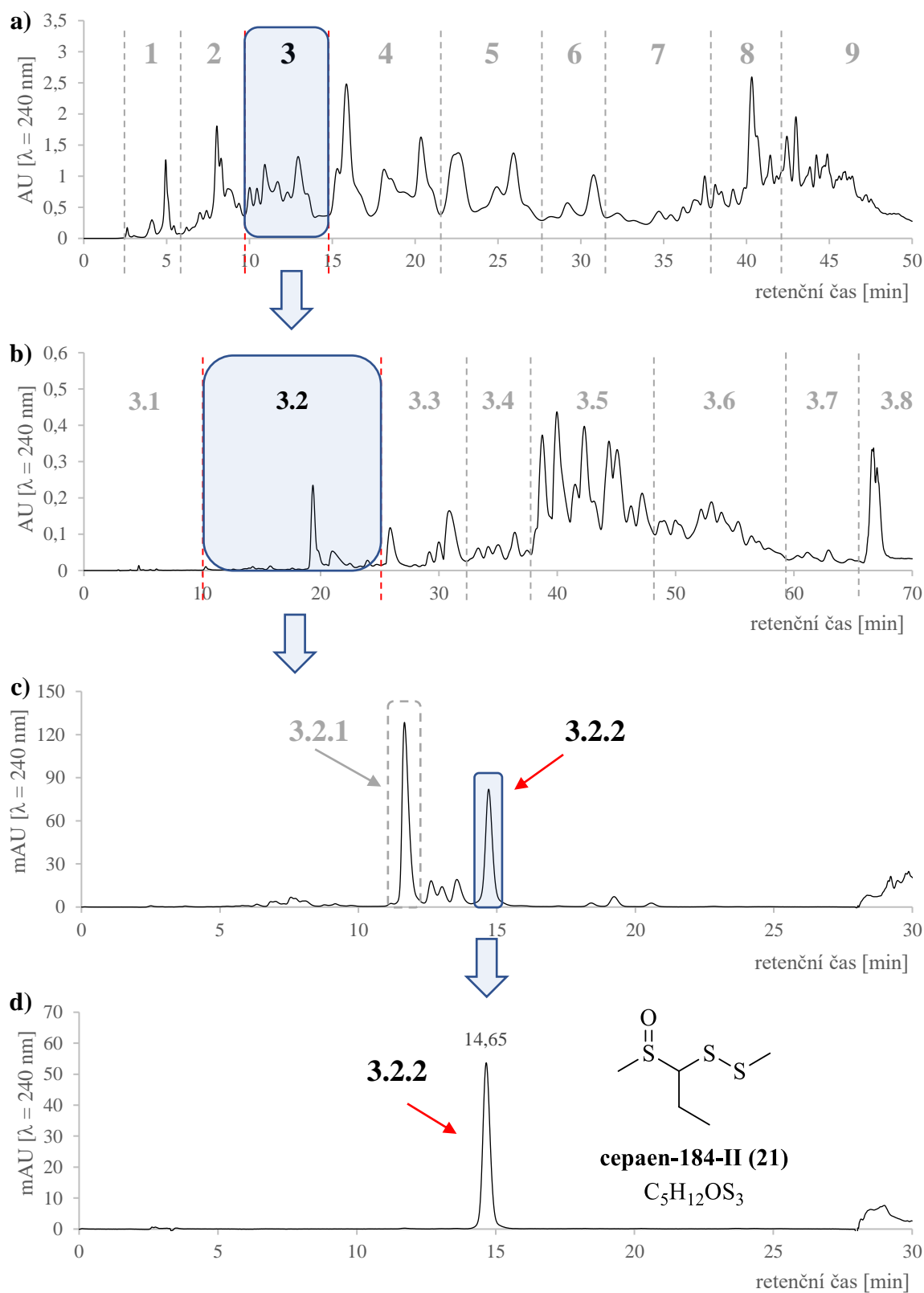
**Obrázek 33:** HPLC/HRMS spektrum frakce **3.2.2**.

HPLC/HRMS analýza frakce **3.2.2** také potvrdila očekávanou hmotu  $[M+H]^+ = 185,0124$  Da (odpovídající elementárnímu složení  $C_5H_{12}OS_3$ ), která je společně se získaným MS/MS spektrem (**Obrázek 33**) v souladu s očekávanou strukturou cepaenu-184 (**21**). Tento stereoisomer získal označení cepaen-184-II (**21**) (**Obrázek 34**).



**Obrázek 34:** Předpokládaná struktura frakce **3.2.2**.

Výsledky NMR analýzy cepaenu-184-II (**21**) bohužel nemohly být z časových důvodů součástí této práce, a strukturu této látky je tedy nutné považovat zatím pouze za vysoce pravděpodobnou, nikoli potvrzenou.



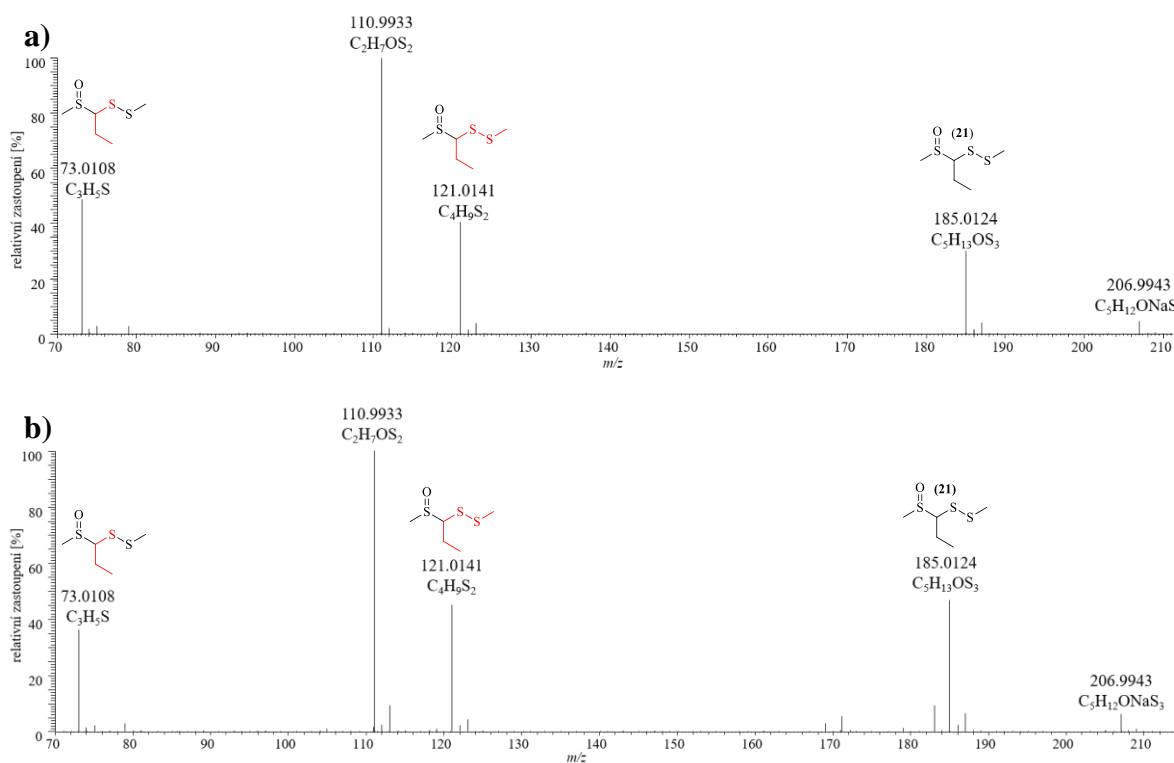
**Obrázek 35:** C8-HPLC/PDA chromatogram: **a)** cibulového extraktu (**Metoda B**), **b)** cibulové frakce 3 – frakcionace (**Metoda C**), **c)** cibulové frakce 3.2 – frakcionace (**Metoda D**), **d)** frakce 3.2.2, tj. cepaenu-184-II (21; **Metoda D**).

## Cepaen-184-III a cepaen-184-IV

Další frakcí, ve které byly detekovány poslední dva stereoizomery cepaenu-184 (**21**), byla frakce **3.3**. Pomocí optimalizované C8-HPLC/PDA metody byly izolovány celkem dvě frakce, tj. frakce **3.3.1** a **3.3.2**. Proces izolace frakce **3.3.1**, resp. **3.3.2** poskytuje **Obrázek 38**, resp. **Obrázek 39**.

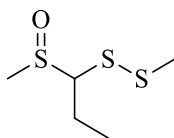
Celkově se podařilo získat 4,6 mg viskózního, mírně nažloutlého roztoku frakce **3.3.1** a 74 mg frakce **3.3.2** obdobného vzhledu. HPLC/PDA i HPLC/MS analýza potvrdila vysokou čistotu obou izolovaných frakcí **3.3.1** i **3.3.2** (**Obrázek 38d** a **39d**, **Metoda E**).

HPLC/HRMS analýza obou frakcí **3.3.1** i **3.3.2** potvrdila očekávanou hmotu  $[M+H]^+ = 185,0124$  Da, která je společně se získanými MS/MS spektry (**Obrázek 36**) v souladu s očekávanou strukturou cepaenu-184 (**21**; **Obrázek 37**). Frakce **3.3.1**, resp. **3.3.2**, získala označení cepaen-184-III (**21**), resp. cepaen-184-IV (**21**).



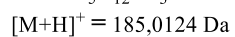
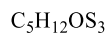
**Obrázek 36:** HPLC/HRMS spektrum frakce:

- a)** **3.3.1**, tj. cepaenu-184-III (**21**),  
**b)** **3.3.2**, tj. cepaenu-184-IV (**21**).



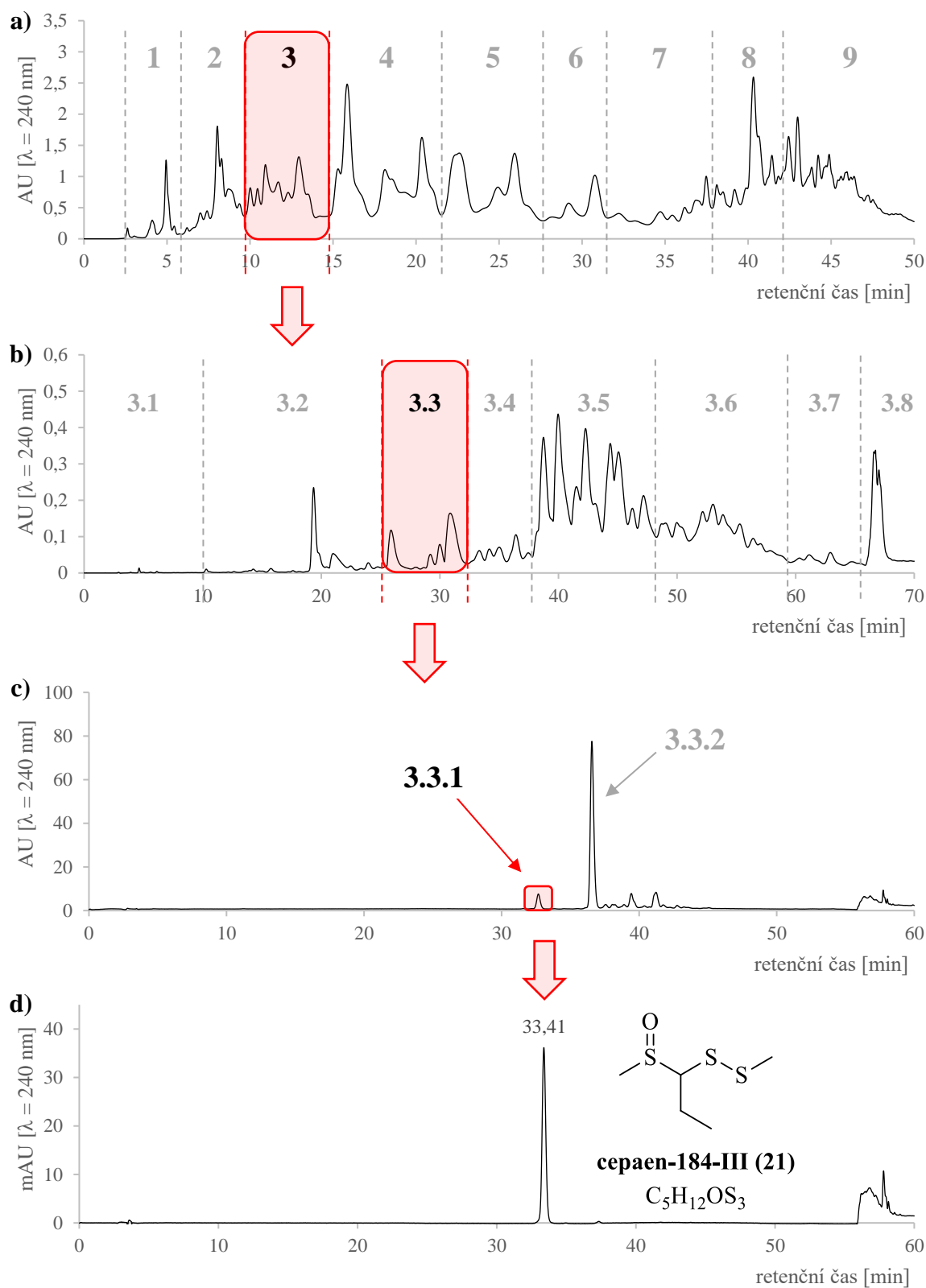
**cepaen-184-III (21) (frakce 3.3.1)**

**cepaen-184-IV (21) (frakce 3.3.2)**

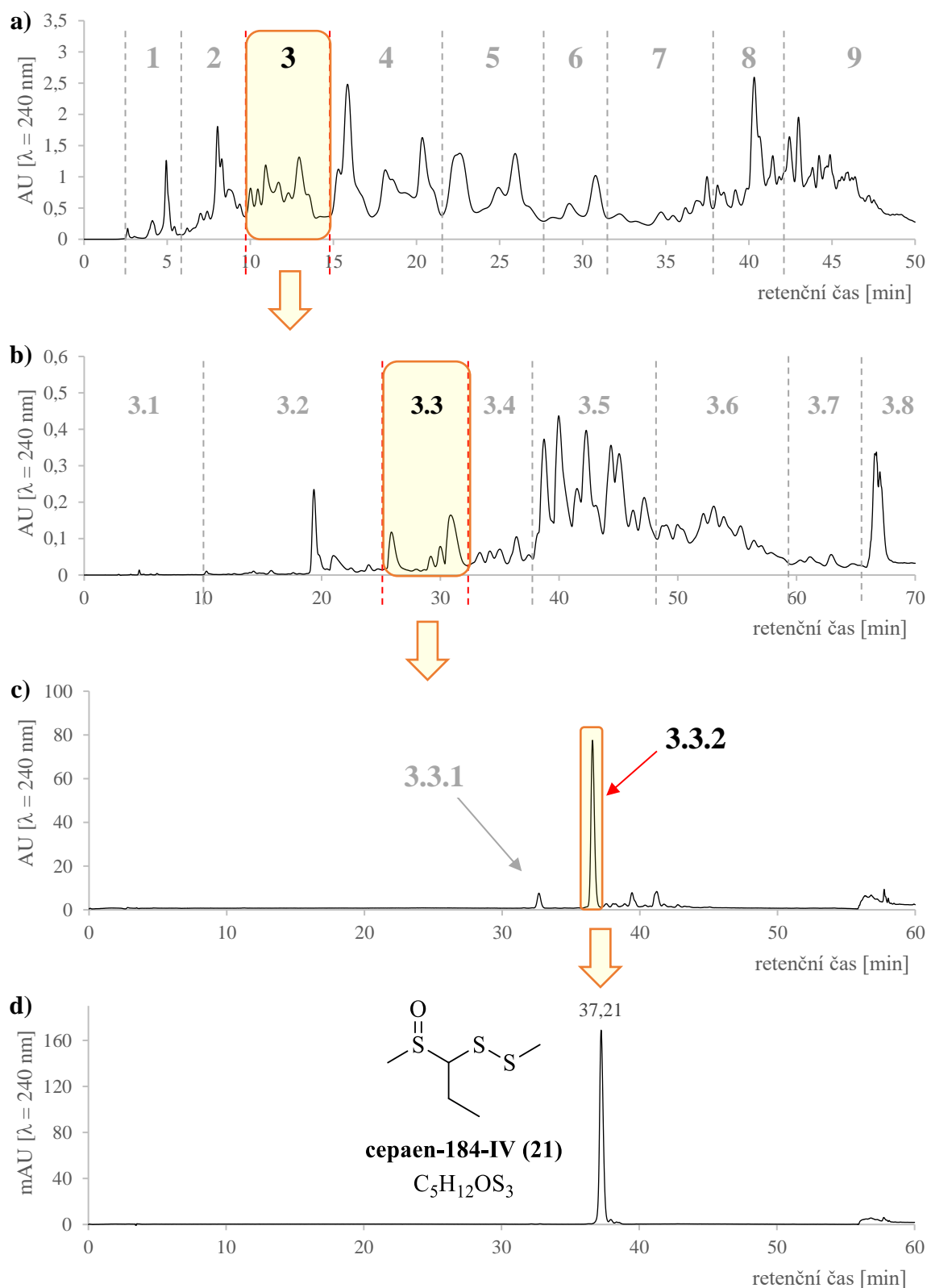


**Obrázek 37:** Předpokládaná struktura cepaenu-184-III (**21**) a cepaenu-184-IV (**21**).

Výsledky NMR analýzy cepaenu-184-III (**21**) i cepaenu-184-IV (**21**) nemohly bohužel být z časových důvodů součástí této práce a strukturu je tedy nutné zatím považovat pouze za předpokládanou, nikoli potvrzenou.



**Obrázek 38:** C8-HPLC/PDA chromatogram: **a)** cibulového extraktu (**Metoda B**), **b)** cibulové frakce **3** – frakcionace (**Metoda C**), **c)** cibulové frakce **3.2** – frakcionace (**Metoda E**), **d)** frakce **3.3.1**, tj. cepaenu-184-III (**21**; **Metoda E**).



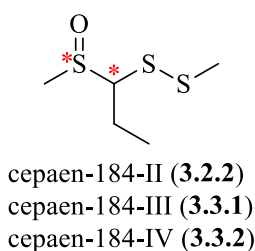
**Obrázek 39:** C8-HPLC/PDA chromatogram: **a)** cibulového extraktu (**Metoda B**), **b)** cibulové frakce **3** – frakcionace (**Metoda C**), **c)** cibulové frakce **3.2** – frakcionace (**Metoda E**), **d)** frakce **3.3.2**, tj. cepaenu-184-IV (**21**; **Metoda E**).



## 5 Diskuze

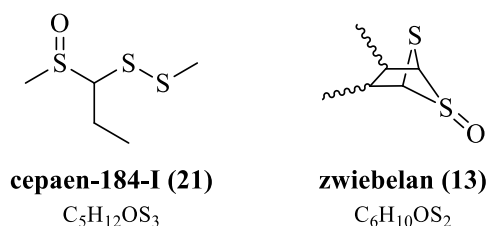
Experimentální část této práce byla zaměřena na izolaci na izolaci jedné skupiny cepaenů, a sice látek  $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{SSCH}_3$  (s označením cepaeny-184; **21**), jejichž molekula obsahuje celkem 2 centra chiralita a v cibulovém extraktu lze tedy očekávat přítomnost celkem 4 stereoizomerů.

Podařilo se izolovat standardy 3 stereoizomerů cepaenu-184 (**21**), tj. sloučeniny **3.2.2** (cepaen-184-II), **3.3.1** (cepaen-184-III) a **3.3.3** (cepaen-184-IV), které dle výsledků HPLC/HRMS analýzy mají totožná MS/MS spektra odpovídající struktuře cepaenů-184 (**21**). Tyto sloučeniny byly izolovány v dostatečném množství i čistotě, a jsou tedy vhodné pro následnou NMR analýzu, jejíž výsledky nemohly bohužel být z časových důvodů součástí této práce. Předpokládanou strukturu izolovaných cepaenů-184-I–III, včetně označení přítomných center chiralita, uvádí **Obrázek 40**.



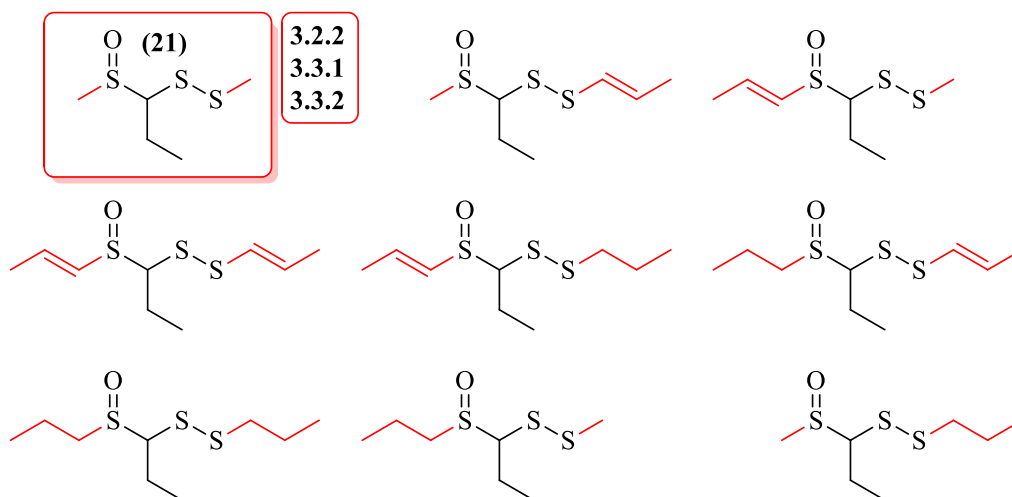
**Obrázek 40:** Předpokládaná struktura izolovaných standardů stereoizomerů cepaenu-184-I–IV (**21**) včetně označení center chiralita.

Čtvrtý stereoizomer byl identifikován ve frakci **3.2.1** (tj. cepaen-184-I, (**21**)), ve které se však dle výsledků HPLC/MS analýzy vyskytoval ve dvojici s další sloučeninou, pravděpodobně zwiebelanem (**13**) (**Obrázek 41**). Tuto frakci bude nutné dále analyzovat a vytvořit pro ni optimalizovanou HPLC metodu pro separaci jednotlivých sloučenin.



**Obrázek 41:** Předpokládaná struktura sloučenin v izolované frakci **3.2.1**.

O cepaenech-184 pojednává studii Bayera a kol.<sup>16</sup>, která však není zaměřena na izolaci těchto látek. Druhá vědecká studie Morimitsa a kol.<sup>25</sup> popisuje izolaci cepaenů-184 z cibulového extraktu. Doposud byla publikovaná celá řada vědeckých studií popisující cepaeny. Převážná většina z nich byla zaměřena na biologickou aktivitu těchto látek. Wagner a kol<sup>26</sup> se ve studii zabývali anti astmatickými vlastnostmi cepaenů. Dorsch a kol<sup>27</sup> se ve své studii zaměřili na protisrážlivé vlastnosti cepaenů.

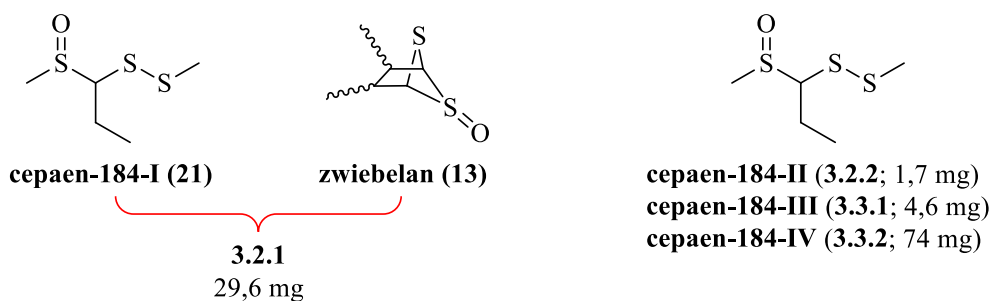


**Obrázek 42:** Struktury všech homologů cepaenů cibule kuchyňské a zvýrazněná struktura izolovaných sloučenin cepaenů-184 (21).

Cibulový extrakt obsahuje také další homology cepaenů-184 (21) (Obrázek 42), které se na rozdíl od izolovaných cepaenů-184 (21) v extraktu vyskytují ve výrazně vyšších koncentracích. Izolace těchto sloučenin bude předmětem následující kvalifikační práce.

## 6 Závěr

Byly optimalizovány HPLC metody pro izolaci cepaenů-184 (**21**) z extraktu cibule kuchyňské. Pomocí preparativní HPLC/PDA byly získány celkem 4 stereoizomery této sloučeniny. Tři stereoizomery cepaenu-184 (**21**) se podařilo získat v čisté formě (tj. sloučeniny **3.2.2**, **3.3.1** a **3.3.2**; **Obrázek 40**). Čtvrtá izolovaná frakce (**3.2.1**) byla dle HPLC/MS směsí dvou sloučenin, tj. cepaenu-184-I (**21**) a pravděpodobně zwibelanu (**13**). Struktury izolovaných sloučenin spolu s jejich výtěžky jsou uvedeny na **Obrázku 43**.



**Obrázek 43:** Navržené struktury izolovaných sloučenin (**3.2.1**, **3.2.2**, **3.3.1** a **3.3.2**) a hodnoty výtěžků.

## 7 Literatura

- (1) The Food and Agriculture Organization (FAO). *Faostat* [online]. 2018 [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- (2) Malý, I., & Petříková, K. (2000). *Základy pěstování cibulové zeleniny*. Institut výchovy a vzdělání MZe ČR.
- (3) Prath-Krejčová, Illona. *Zahrada přírodní, okrasná, užitková*. 2019. ISBN 978-80-271-2074-1.
- (4) Kang, K., Pulver, S. R., Panzano, V. C., Chang, E. C., Griffith, L. C., Theobald, D. L., & Garrity, P. A. (2010). Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature*, 464(7288), 597–600. <https://doi.org/10.1038/nature08848>.
- (5) Kubec, R., & Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal of Chromatography A*, 1216(41), 6957–6963. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.032>.
- (6) Virtanen, A. I., Matikkala, E. J., Laland, S., & Refn, S. (1959). The isolation of *S*-methylcysteine-sulphoxide and *S*-*n*-propylcysteine-sulfoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chemica Scandinavica*, 13, 1898–1900. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.13-1898>.
- (7) Spåre, C. G., Virtanen, A. I., Munch-Petersen, J., Kvande, P. C., & Meisingseth, E. (1963). On the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*) vapours and its precursor. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 641–650. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.17-0641>.
- (8) 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(5), 1085–1093. <https://doi.org/10.1080/10426507.2010.507728>.

- (9) 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(11), 1952–1954. <https://doi.org/10.1021/ja01239a049>.
- (10) Soni, S. K., & Finch, S. (1979). Laboratory evaluation of sulphur-bearing chemicals as attractants for larvae of the onion fly, *Delia antiqua* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae). *Bulletin of Entomological Research*, 69(2), 291–298. <https://doi.org/10.1017/S0007485300017764>.
- (11) 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(6908), 685–685. <https://doi.org/10.1038/419685a>.
- (12) Brodnitz, M. H., & Pascale, J. V. (1971). Thiopropanal *S*-oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(2), 269–272. <https://doi.org/10.1021/jf60174a009>.
- (13) 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(11), 4584–4585. <https://doi.org/10.1021/ja00167a089>.
- (14) Kubec, R., Kim, S., & Musah, R. A. (2003). The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, 63(1), 37–40. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00759-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00759-8).
- (15) 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 siculum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1121–1128. <https://doi.org/10.1021/jf903733e>.
- (16) Bayer, T., Breu, W., Seligmann, O., Wray, V., & Wagner, H. (1989). Biologically active thiosulphinates and  $\alpha$ -sulphonyldisulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 28(9), 2373–2377. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97987-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97987-1).
- (17) Block, E. (2010). *Garlic and other Alliums: the lore and the science*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. ISBN: 978-1-84973-180-5.

- (18) Bayer, T., Wagner, H., Block, E., Grisoni, S., Zhao, S. H., & Neszmelyi, 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*(8), 3085–3086. <https://doi.org/10.1021/ja00190a064>.
- (19) Yoshida, M.; Kameyama, M.; Hosoda, H.; Shimizu, Y.; Sakaue, K.; Washino, T.; Iwata, M.; Omoto, M. Japan Patent Kokai, 2010-143866, 2010.
- (20) 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*(20), 10893–10900. <https://doi.org/10.1021/jf202446q>.
- (21) Štefanová, I., Zápál, J., Moos, M., Kuzma, M., & Kubec, R. (2019). Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(35), 9895–9906. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01384>.
- (22) El-Aasr, M., Fujiwara, Y., Takeya, M., Ikeda, T., Tsukamoto, S., Ono, M., Nakano, D., Okawa, M., Kinjo, J., Yoshimitsu, H., & Nohara, T. (2010). Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products*, *73*(7), 1306–1308. <https://doi.org/10.1021/np100105u>.
- (23) Nohara, T., Fujiwara, Y., Kudo, R., Yamaguchi, K., Ikeda, T., Murakami, K., Ono, M., Kajimoto, T., & Takeya, M. (2014). Isolation and characterization of new onionins A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> from *Allium cepa*, and of onionins A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and A<sub>3</sub> from *Allium fistulosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *62*(11), 1141–1145. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00461>.
- (24) 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*(33), 8783–8794. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03118>.
- (25) Morimitsu, Y., Kawakishi, S. (1990). Inhibitors of platelet aggregation from onion. *Phytochemistry*, *29*(11), 3435–3439. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85252-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85252-B).

- 
- (26) Wagner, H., Dorsch, W., Bayer, T., Breu, W., & Willer, F. (1990). Antiasthmatic effects of onions: Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and “Cepaenes”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 39(1), 59–62. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(90\)90173-I](https://doi.org/10.1016/0952-3278(90)90173-I)
- (27) Dorsch, W., Schneider, E., Bayer, T., Breu, W., & Wagner, H. (2004). Anti-Inflammatory Effects of Onions: Inhibition of Chemotaxis of Human Polymorphonuclear Leukocytes by Thiosulfinates and Cepaenes. *International Archives of Allergy and Immunology*, 92(1), 39–42. <https://doi.org/10.1159/000235221>

## 8 Použité zkratky

ESI	electrospray ionization
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
LF	lachrymatory factor
LFS	lachrymatory factor synthase
MS	mass spectrometry
PDA	photo diode array
PTFE	polytetrafluorethylen
RVO	rotační vakuová odparka
SPE	solid phase extraction
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance