

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

TĚKAVÉ LÁTKY UVOLŇOVANÉ Z CIBULE
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Martina Machová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

VOLATILE SUBSTANCES RELEASED FROM ONION
THESIS

AUTOR: Bc. Martina Machová

SUPERVISOR: Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Machová**
Osobní číslo: **C16626**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Těkavé látky uvolňované z cibule**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na těkavé látky obsažené v cibuli.
2. V experimentální části prostudujte změny v profilu těkavých sloučenin uvolňovaných z krájené cibule v závislosti na čase. Studii proveďte s využitím mikroextrakce tuhou fází. Dále proveďte antibakteriální účinnost šťávy z cibule.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

Katedra analytické chemie

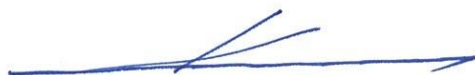
Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 5. 2018

Bc. Martina Machová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Tomášovi Bajerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Další poděkování patří paní doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za konzultace, pomoc a odborné rady. Nakonec bych ráda poděkovala svému nejbližšímu okolí za podporu a trpělivost.

ANOTACE

První část diplomové práce se zabývá sledováním těkavých látek v parním prostoru nad vzorkem krájené cibule. Pro extrakci těkavých látek byla použita metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME) ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). V druhé části byly sledovány antimikrobiální účinky šťávy z čerstvé cibule na 8 různých mikroorganismech pomocí diskové difúzní a jamkové difúzní metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cibule, isoalliin, alliináza, slzný faktor, mikroextrakce tuhou fází (SPME), antimikrobiální účinky

ANNOTATION

The first part of the thesis deals with the monitoring of volatile substances in headspace above the sample of sliced onions. The solid phase microextraction (SPME) method was used to extract the volatile compounds in combination with gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). In the second part of this thesis were monitored the antimicrobial effects of fresh onion juice on 8 different microorganisms. It was used disk diffusion method and wells diffusion method.

KEYWORDS

Onion, isoalliin, alliinase, lachrymatory factor, solid phase microextraction (SPME), antimicrobial effects

OBSAH

ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Cibule.....	15
1.2. Látky obsažené v cibuli	17
1.2.1. Flavonoidy	17
1.2.2. Saponiny a sapogeny	21
1.2.3. Aldehydy a alkohol	22
1.2.4. Látky obsahující síru.....	22
1.2.5. Slzný faktor	28
1.2.6. Thiosulfináty	31
1.3. Biologické účinky	32
1.3.1. Antimikrobiální účinky.....	33
1.3.2. Protirakovinné účinky.....	34
1.3.3. Antioxidační vlastnosti	34
1.4. Extrakce SPME.....	35
1.4.1. Headspace SPME.....	37
1.4.2. Přímá SPME	37
1.5. Instrumentální metody	37
1.5.1. Plynová chromatografie	37
1.5.2. Hmotnostní spektrometrie.....	39
1.5.3. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)...	40
1.5.4. Kvalitativní analýza	40
1.5.5. Kvantitativní analýza	41
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
2.1. Sledování profilu těkavých látek z krájené cibule	42
2.1.1. Chemikálie a plyny	42
2.1.2. Přístroje	42
2.1.3. Vzorek.....	42
2.1.4. Příprava vzorků.....	42
2.1.5. SPME extrakce	43

2.1.6.	Chromatografická analýza	43
2.2.	Testování antimikrobiálních účinků cibule.....	44
2.2.1.	Chemikálie	44
2.2.2.	Přístroje a pomůcky	44
2.2.3.	Příprava vzorku.....	44
2.2.4.	Disková difúzní metoda	45
2.2.5.	Jamková difúzní metoda	45
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
3.1.	Sledování profilu těkavých látek	47
3.1.1.	Kinetika těkavých sloučenin.....	50
3.1.2.	Thiopropanal S-oxid	60
3.2.	Sledování antimikrobiální aktivity.....	63
3.2.1.	Disková difúzní metoda	65
3.2.2.	Jamková difúzní metoda	67
4.	ZÁVĚR	70
5.	LITERATURA.....	71

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Cibule kuchyňská - <i>Allium cepa</i> L	15
Obrázek 2 Struktura flavonoidů, antokyanů a kaempferolu přítomných v <i>Allium cepa</i>	18
Obrázek 3 Struktury hlavních kvercetinů obsažených v cibuli	19
Obrázek 4 Struktura hlavních saponinů obsažených v cibuli	21
Obrázek 5 Biogeneze prekurzorů obsažených v cibuli.....	22
Obrázek 6 Prekurzory senzorycky aktivních sirných látek v běžných druzích rostlin rodu <i>Allium</i>	23
Obrázek 7 Enzymatická tvorba allicinu z alliinů za účasti alliinázy	24
Obrázek 8 Tvorba různých organosirných sloučenin při zpracování cibule a česneku	26
Obrázek 9 Přeměna trans-S-1-propenyl-L-cysteinsulfoxidu na kyselinu 1-propensulfenovou, amoniak a pyruvát, dále pak enzym LF syntáza způsobí rozpad kyseliny 1-propensulfenové na thiopropanal S-oxid a thiosulfináty	28
Obrázek 10: Porovnání normální degradační cesty při krájení cibule s geneticky modifikovanou cibulí, u níž je snížena aktivita LF syntázy	30
Obrázek 11 Spontánní disproportionace methyl methanthiosulfinátu	31
Obrázek 12 Navrhovaná reakce mezi thiosulfináty a -SH skupinou buněčných proteinů ..	32
Obrázek 13 Scématické znázornění technického uspořádání pro SPME	35
Obrázek 14 Základní schéma plynového chromatografu	37
Obrázek 15 Pomůcky při testování antimikrobiálních látek.....	43
Obrázek 16 Chromatogram druhého měření u vzorku žluté cibule.....	48
Obrázek 17 Spontánní rozklad thiopropanal S-oxidu na propanal	50
Obrázek 18 Grafy všech vzorků popisující závislost přeměny propanalu na 1-propanol na čase, sekundární osa patří 1-propanolu	50
Obrázek 19 Závislost relativního množství uvolňovaného propanthiolu na čase	54
Obrázek 20 Závislost relativního množství uvolňovaného dipropyldisulfidu na čase	55
Obrázek 21: Závislost relativního množství uvolňovaného 1-((E)-Prop-1-en-1-yl)-2-((Z)-prop-1-en-1-yl)disulfidu na čase.....	56
Obrázek 22 Závislost relativního množství uvolňovaného dipropyltrisulfidu na čase.....	57
Obrázek 23 Závislost relativního množství uvolňovaného (Z)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu na čase.....	58
Obrázek 24 Závislost relativního množství uvolňovaného (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu na čase.....	59

Obrázek 25 Chromatogram vzorku cibule při první analýze.....	60
Obrázek 26 Experimentální uspořádání extrakce při sledování uvolňování slzného faktoru60	
Obrázek 27 Graf znázorňující závislost množství uvolňovaného thiopropanal S-oxidu v závislosti na čase od rozkrojení cibule během prvních 14 minut	61
Obrázek 28 Graf znázorňující závislost množství uvolňovaného thiopropanal S-oxidu v závislosti na čase od rozkrojení cibule během prvních 2 minut	61
Obrázek 29 Pozitivní kontrola pomocí antibiotických disků u kmene <i>B. subtilis</i> (vlevo) a <i>Ps. aeruginosa</i> (vpravo).....	63
Obrázek 30 Inhibiční zóna kmene <i>Candida albicans</i> u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo).....	65
Obrázek 31 Kmen <i>E. coli</i> bez inhibiční zóny u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo).....	65
Obrázek 32 Inhibiční zóny kmene <i>B. cereus</i> při použití jamkové difúzní metody u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo).....	67
Obrázek 33 Inhibiční zóny kmene <i>C. albicans</i> při použití jamkové difúzní metody u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo).....	68
Tabulka 1 Použité vzorky cibule, místo zakoupení, původu, dodavatel a číslo šarže	41
Tabulka 2 Identifikované sloučeniny, jejich CAS čísla, retenční časy a retenční indexy ...	46
Tabulka 3 Homologická řada <i>n</i> -alkanů, jejich retenční časy a retenční indexy	49
Tabulka 4 Popis použitých mikroorganismů pro sledování antimikrobiální aktivity cibule62	
Tabulka 5 Velikost inhibičních zón u použitých antibiotik	63
Tabulka 6 Velikost inhibičních zón vzorků cibule při využití diskové difúzní metody	64
Tabulka 7 Velikost inhibičních zón vzorků cibule při využití jamkové difúzní metody	66

SEZNAM ZKRATEK

- 1-PRENSCO — Trans-S-1-propenyl-L-cysteinsulfoxid
- ACSO — S-alk(en)ylcysteinsulfoxidy
- CAS — registrační číslo látky (Chemical Abstract Service)
- DAS — diallylsulfid
- DI-SPME — Přímá mikroextrakce tuhou fází
- DNA — Deoxyribonukleová kyselina
- GC — Plynová chromatografie
- GC-MS — Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
- GLC — chromatografie v systému plyn-kapalina
- GSC — chromatografie v systému plyn-tuhá fáze
- HPLC — vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HS-SPME — headspace mikroextrakce tuhou fází
- LDL — nízkodenzitní lipoprotein
- LF — slzný faktor
- LF syntáza — enzym tvořící slzný faktor
- MH agar — Mueller-Hinton agar
- mRNA — messenger ribonukleová kyselina
- MS — hmotnostní spektrometrie
- PLOT— typ kolony, u které je na vnitřní stěně kapiláry nanášena nebo chemicky vytvořena pórovitá vrstva (Porous Layer Open Tubular)
- RI — retenční indexy
- RNA — ribonukleová kyselina
- SCOT —typ kolony, kde je na stěně vrstvička nosiče, na které je zakotvena stacionární fáze (Support Coated Open Tubular)
- SPME — mikroextrakce tuhou fází
- SPME-GC-MS — spojení mikroextrakce tuhou fází s plynovou chromatografií a hm. spektrometrem
- TIC — total ion current
- TS — thiosulfináty
- WCOT — typ kolony, kde je nosičem vnitřní stěna kapiláry, na které je zakotvená tenká vrstva stacionární fáze (Wall Coated Open Tubular)

ÚVOD

Cibule (*Allium Cepa* L.) patří mezi nejstarší pěstované rostliny a je celosvětově široce využívaná při přípravě pokrmů, hlavně pro její chuťové a aromatické vlastnosti. V řadě studií byly ověřovány její blahodárné účinky, především antimikrobiální. Cibule se hojně využívá při léčení a prevenci řady nemocí, včetně rakoviny, koronárních onemocnění srdce, obezity, hypercholesterolemie, diabetu typu II, hypertenze a poruchy gastrointestinálního traktu [1].

Cibule spadá v naší republice ke skupině velmi oblíbených zelenin, dokonce se řadí ve spotřebě na druhé místo hned po hlávkovém zelí [2]. Díky výborné skladovatelnosti je její spotřeba během roku vyrovnaná. Konzumuje se syrová jako součást různých salátů, konzervářsky zpracovaná nebo sušená. Vzhledem k velkému množství spotřebované cibule v potravinovém průmyslu je dobré vědět, jaké bonusy včetně chuťového požitku nám její konzumace přináší. Tyto tělu prospěšné vlastnosti mají po většinou za následek siričné látky obsažené v cibuli, na které je diplomová práce zaměřená.

Tématem této práce jsou změny v profilu těkavých látek uvolňovaných z krájené cibule, a to zejména organosiričných látek. V teoretické části je sledováno chemické složení těkavých látek obsažených v cibuli a jejich účinky, kde je největší část věnována antimikrobiálním účinkům, které byly testovány a jsou popsány v experimentální části. Dále je uvedena metoda mikroextrakce tuhou fází a také instrumentace použitého plynového chromatografu s hmotnostním analyzátozem. V experimentální části je popsán postup přípravy samotného vzorku, a to jak při měření na plynovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem, tak při mikrobiologických testech. Výsledky všech měření jsou zpracovány v samostatné kapitole, kde jsou i diskutovány s ostatními studii.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Cibule

Cibule kuchyňská neboli *Allium cepa* L. (obrázek 1), patří do čeledi *Alliaceae* (česnekovité), podčeď *Allioideae* a řadí se do rodu *Allium*, společně s česnekem (*A. sativum* L.), pažitkou (*A. schoenoprasum* L.), pórem (*A. porrum* L.) a v poslední době stále více konzumovaným medvědí česnekem (*A. ursinum* L.). Tato čeď zahrnuje více než 800 různých druhů rostlin rostoucích po celém světě, zejména v Evropě a Asii, z toho rod *Allium* má asi 660 zástupců [1].

Je to jednoletá, dvouletá nebo vytrvalá rostlina. Vlastní kulovitá cibule o velikosti až 10 cm je pokrytá bílými, u některých odrůd červenými až fialovými blanitými šupinami. Z cibule vyrůstají úzké zelené listy a dutá lodyha, nejčastěji 30-100 cm vysoká, končící nahoře typickým bílým nebo fialovým květenstvím. V přírodě roste více než 300 druhů cibule a pěstuje se po celém světě několik tisíc let [3; 4; 5; 6]. Její původ je s největší pravděpodobností ve střední Asii (Afghánistán), je však od nepaměti pěstována v Číně, Indii a Egyptě [2]. Světová produkce cibule vzrostla nejméně o 25 % v posledních 10 letech, na současnou produkci zhruba 64 milionů tun ročně, čímž se stala druhou nejvýznamnější zahradní plodinou po rajčatech [1; 7]. Cibule mají vynikající dlouhodobé skladovací vlastnosti, které umožňují jejich celosvětové obchodování a celoroční dodávky [8]. V současnosti se pěstuje velké množství kultivarů, které se liší tvarem a velikostí cibule, zbarvením šupin a chuťovými vlastnostmi. Cibule kuchyňská se podle chuti dělí na tři skupiny: ostrá, polosladká a sladká, kdy paradoxně ostré odrůdy obsahují více cukrů než sladké. Koncentrace pyruvátu produkovaného aktivitou enzymu alliináza udává ostrost cibule. Ve farmaceutickém průmyslu a léčitelství se používá pouze vlastní cibule (*Bulbus allii cepae*), která se sklízí zpravidla na podzim, ale v kuchyni lze využít také listy [3; 4; 5; 6; 9; 10].

V léčitelství má kuchyňská cibule díky svým účinným látkám velmi široké uplatnění. Nejen že je antiseptická, má ale i výrazné fytoncidní účinky, působí močopudně, podněcuje chuť k jídlu, má slabě projímavé účinky, zvyšuje sekreci žaludečních šťáv, tvorbu žluče i pankreatických enzymů, snižuje obsah cukrů v krvi. Tuto schopnost má nejen syrová cibule, ale i vařená a lihové extrakty z ní připravené [2; 6]. Listy působí hojivě na vředy, hnisavé rány a z lidové medicíny jsou známy účinky proti angíně a černému kašli [3]. Příznivě působí na nemoci dýchacích cest, při angínách, bronchitidě, rýmě. Strouhaná cibule s medem zmírňuje

úporný kašel. Příkladá se po bodnutí hmyzem na postižené místo, kde působí jako detoxikační činidlo a zabraňuje otokům [2].

Cibule má přibližně 90 % vody s vysokým obsahem vlákniny a cukrů. Pokud jde o vitamíny a minerální obsah, cibule má nízký obsah sodíku a vysoký obsah vitamínu B₆, kyseliny listové, vápníku, hořčíku, fosforu a draslíku. Cibule má nízký obsah lipidů [1].

Široké použití rostlin rodu *Allium* jako ochucovacla v potravinách je dobře známo, avšak vzhledem k jejich příznivým vlastnostem vznikají nové aplikace v potravinářském průmyslu. Organosírné sloučeniny vzbuzují velký zájem při zvyšování trvanlivosti a bezpečnosti potravinářských výrobků podléhajících zkáze. Je zkoumáno využití těchto sloučenin jako konzervačních prostředků a možnost jejich náhrady za chemické látky. V tomto ohledu je hlavní problém velká variabilita složení látek z extraktů rostlin *Allium*, jejich nestabilita a poněkud silný zápach [11; 12]. Studie Puerta a kol. [12] se zabývala testováním propylthiosulfinát oxidu, jako potencionálního konzervačního činidla. Tato sloučenina vzniká biosyntézou z propiinu (S-propylcystein-S-oxid) přítomného v rodu *Allium* a vědci testovali jak její antimikrobiální aktivitu, tak i případnou cytotoxicitu pro lidské buňky. Výsledky této studie ukázaly, že tato látka je účinná proti mikroorganismům a není škodlivá pro lidské zdraví v koncentracích, které by byly potencionálně používané při konzervaci a balení potravin.



Obrázek 1: Cibule kuchyňská - *Allium cepa* L. [13]

1.2. Látky obsažené v cibuli

Cibule jsou důležitým zdrojem několika fytonutrientů jako jsou flavonoidy, fruktooligosacharidy a thiosulfináty a další sloučeniny síry, které jsou považovány za důležité prvky středomořské stravy [9]. Složení cibulové šťávy je velmi pestré, najdeme zde kromě velkého množství sírných látek i jiné významné sloučeniny, jako jsou kvercetin, vitamíny řady B, vitamín C, flavonoidy, sacharidy, vláknina a minerální látky, především draslík, železo, mangan, zinek a kobalt [3; 5; 6; 9]. Listy cibule jsou důležitým zdrojem karotenu [5].

Jedním z výrazných znaků chemického složení rostlin rodu *Allium* je velké množství organicky vázané síry [14; 15]. Lidé tyto rostliny konzumují především pro jejich typickou chuť a vůni, díky kterým se staly nedílnou součástí při přípravě pokrmů. V poslední době ovšem stále více lidí konzumuje tyto rostliny také díky jejich blahodárným vlastnostem, které jsou potvrzené několika studiemi [16; 17]. Ty naznačují, že biologická aktivita a léčivé účinky cibule jsou způsobeny především vysokým obsahem sloučenin síry. V přírodě se tyto látky vyskytují v nejvyšších množstvích právě v rostlinách rodu *Allium*. Typickou a velmi výraznou látkou v cibuli je thiopropanal S-oxid (tzv. slzný faktor), který se tvoří při krájení nebo jiném narušení stěny cibule. O této látce bude pojednáno v samostatné kapitole.

Sírné sloučeniny v cibuli a také v česneku získaly velkou pozornost díky potencionálním antibiotickým, antioxidačním, antikarcinogenním, antimutagenním, antiastmatickým [1] účinkům a bakteriostatické aktivitě proti *Helicobacteru pylori*, který je odpovědný za vředy a rakovinu žaludku. Je třeba zdůraznit, že množství sírných látek v jednotlivých rostlinách se liší podle odrůdy, zralosti, kulturních a klimatických podmínek a v případě stanovení těchto látek také podle metod přípravy vzorků. Studie zjistily, že výraznost chuti, slzný potenciál a celkový obsah síry v drcené cibuli vykazují významnou korelaci s koncentrací sulfátu v půdě [9; 14; 15; 18].

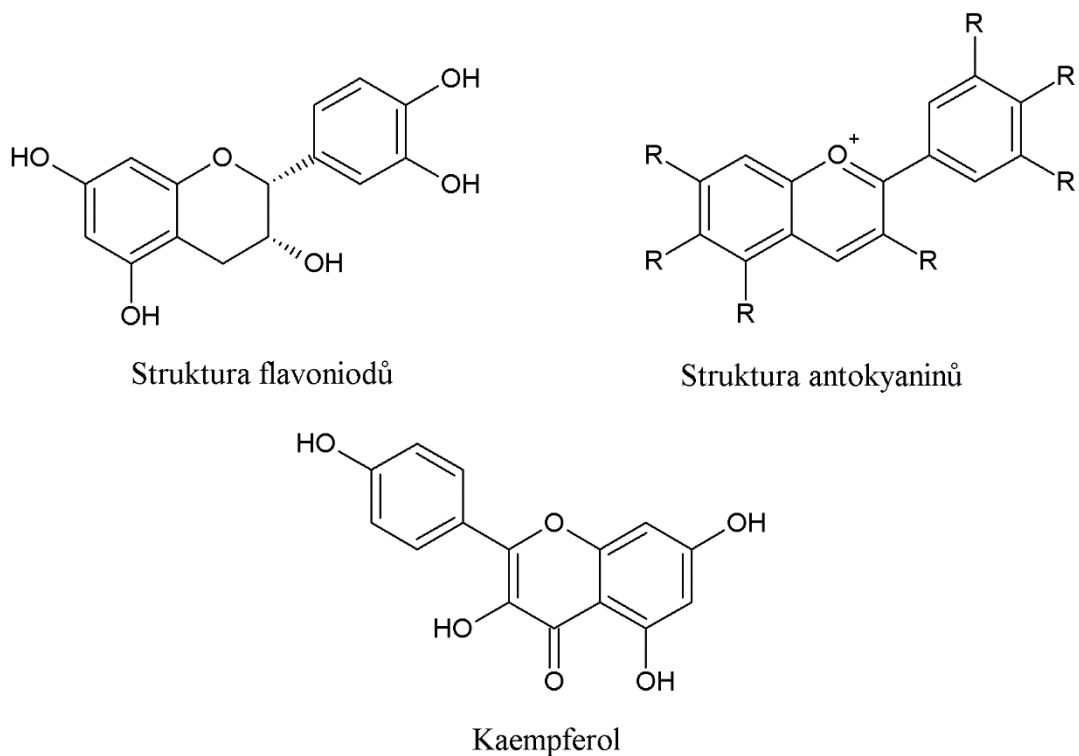
Další sloučeniny, jako jsou organické kyseliny a cukry, mohou přispět k sensorickému profilu cibule. Organické kyseliny ovlivňují kyselost a pH cibulové šťávy ve větším či menším rozsahu; rozpustné cukry ovlivňují sladkost cibule, a tím i přijatelnost této rostliny pro spotřebitele [9].

1.2.1. Flavonoidy

Cibule obsahuje velké množství fenolických sloučenin, které mají kromě pozitivních účinků proti různým degenerativním patologickým stavům (kardiovaskulární a neurologické

choroby, dysfunkce založené na oxidativním stresu) antioxidační vlastnosti [9]. Biosyntéza flavonoidů začíná tvorbou chalkonu přes chalkonsyntázu z malonyl CoA a kumaroyl CoA, což je derivát aminokyseliny fenylalaninu. Chalkon je nakonec izomerizován za vzniku flavanonu. Specifické enzymy pak katalyzují tvorbu každé podskupiny flavonoidů [16]. Flavonoidy mohou být zařazeny do různých podtříd (flavony, flavanony, flavonoly, isoflavony, flavanonoly, flavanoly, chalkony a antokyany) na základě stupně nenasycenosti a stupně oxidace centrálního kruhu. Z flavonoidů jsou v cibuli nejvíce zastoupeny flavonoly kvercetin a kaempferol, ve formě glykosidů, a to ve vyšší koncentraci (280-400 mg/kg) oproti ostatním druhům zeleniny a ovoce (tj. 100 mg/kg brokolice, 50 mg/kg v jablku) [9]. Kvercetin a kaempferol od sebe odlišuje stupeň hydroxylace [16]. Flavonoidy jsou převládajícími pigmenty cibule, kvercetin a jeho deriváty jsou zodpovědné za žluté a hnědé zbarvení, zatímco antokyany jsou přítomny hlavně v červené cibuli (250 mg/kg), kde způsobují její zbarvení [1; 9]. Červená cibule s vysokým obsahem polyfenolů je kultivar doporučený pro spotřebu za čerstva, například do salátů, protože tepelné zpracování může vést k degradaci flavonoidů [7]. V cibuli jsou tyto sloučeniny hojně zastoupeny, zatímco v česneku a póru se nachází pouze stopová množství a studie dokazují širokou variabilitu obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity mezi různými kultivary a mezi česnekem a cibulí [19; 20].

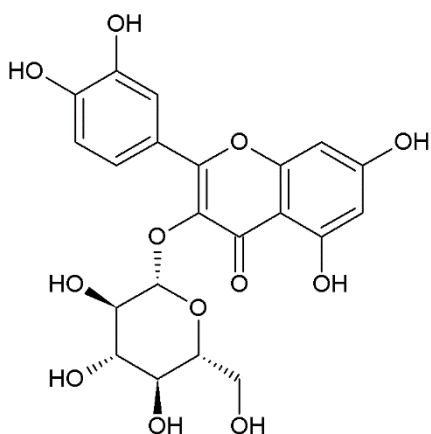
Flavonoidy, všudypřítomné v rostlinné říši, byly široce studovány pro jejich antioxidační účinky. Antioxidační aktivitu vykazují antokyany a flavonoly kvercetin a kaempferol [9]. Oxidace DNA nebo proteinů reaktivními druhy kyslíku hraje důležitou roli v širokém spektru běžných onemocnění, včetně rakoviny a kardiovaskulárních, zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba a další degenerativní stavy spojené s věkem [1; 9]. Struktura flavonoidů je zobrazena na obrázku 2.



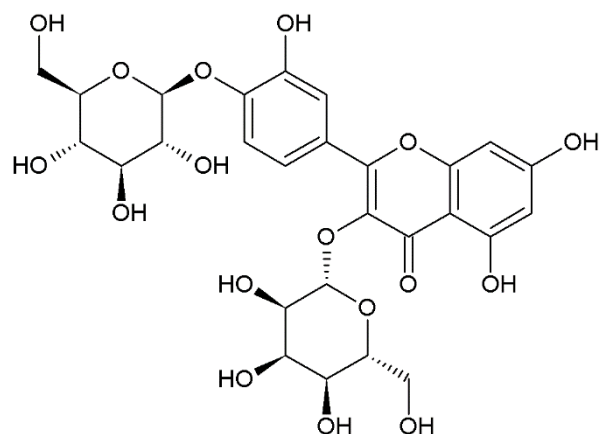
Obrázek 2: Struktura flavonoidů, antokyanů a kaempferolu přítomných v *Allium cepa* [19]

1.2.1.1. Kvercetin

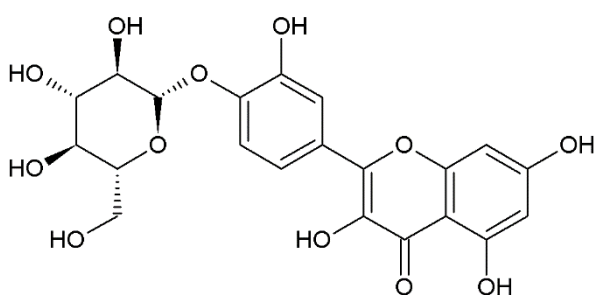
Cibule obsahuje flavonoid, který se nazývá kvercetin, jež je nejčastěji přijímaným flavonoidem v lidské stravě. Studie provedené na zemědělské univerzitě ve Wageningen v Holandsku [21] ukazují dvakrát vyšší absorpci kvercetinu z cibule v poměru k čaji, a třikrát vyšší v porovnání s jablkem [1]. Deriváty kvercetinů jsou nejhojnější ve všech kultivarech cibule. Jejich glykosylové skupiny jsou téměř výlučně tvořeny glukózou, která je připojena hlavně k polohám 4', 3' nebo 7'. Kvercetin-3, 4'-diglukosid a kvercetin-4'-glukosid jsou většinou uváděny jako hlavní flavonoly cibule, jejich struktura je znázorněna na obrázku 3. Tyto glukosidy kvercetinu představují asi 90 % celkového obsahu u různých druhů rostlin rodu *Allium*, dalšími kvercetiny jsou kvercetin-3'-diklukosid, kvercetin-3'-rutinosid a isohamnetin-4'-glukosid [1; 9]. Dalším účinkem kvercetinu je zlepšení biologické dostupnosti některých antivirotik a zvýšení antivirotických účinků jako takových s výraznou aktivitou proti HIV [1; 19].



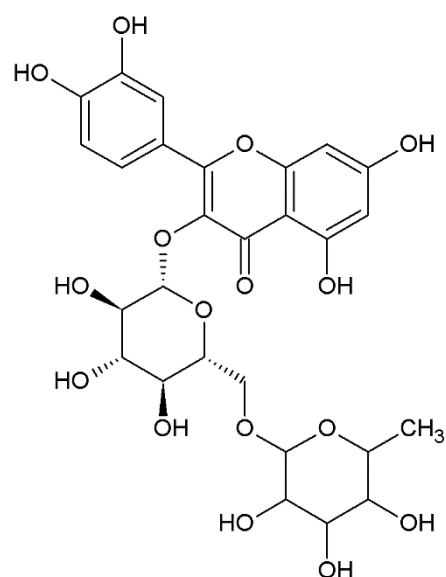
Kvercetin-3'-glukosid



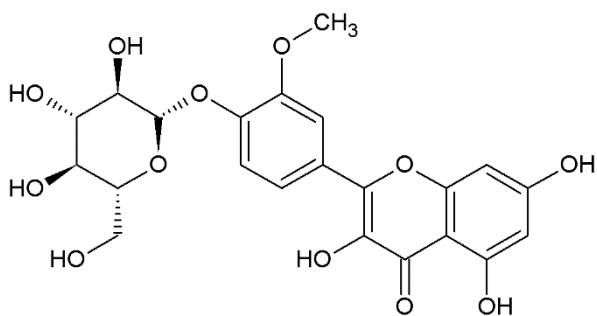
Kvercetin-3,4'-diglukosid



Kvercetin-4'-diglukosid



Kvercetin-3'-rutinosid



Isohamnetin-4'-diglukosid

Obrázek 3: Struktury hlavních kvercetinů obsažených v cibuli [7]

Je známo, že kvercetin pomáhá při léčbě žaludečních vředů, a to tím že likviduje volné radikály. Dále je vysoce účinný při indukci apoptózy buněk kolorektálního karcinomu. Kvercetin funguje mnoha způsoby, snižuje růst nádorového onemocnění, podporuje hojení žaludečních vředů, inhibuje proliferaci buněk rakoviny vaječníků, prsu a tlustého střeva. Existuje významný antiproliferační účinek kvercetinu na karcinom vaječníků a buněk rakoviny

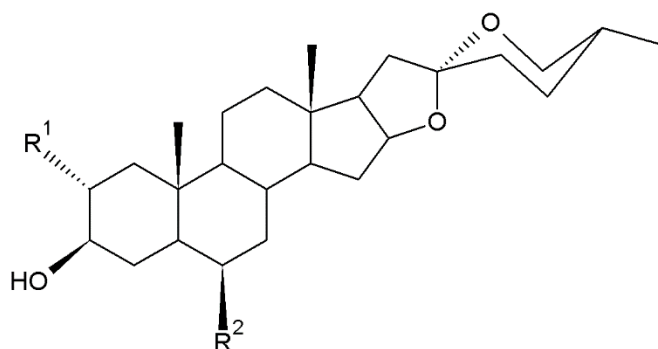
prsu zvýšením aktivity reduktázových enzymů, o kterých je známo, že inaktivují cytotoxické karcinogenní sloučeniny a synergicky zvyšují aktivaci chinoidních protinádorových léčiv [19].

Suché vnější vrstvy cibule také obsahují velké množství kvercetinu, kvercetin glykosidu a jejich produkty oxidace, které jsou účinnými antioxidanty proti neenzymatické lipidové peroxidaci a oxidace LDL [1]. Kvercetin a jeho dimerizovaná sloučenina vykazují vysokou antioxidační aktivitu, která je srovnatelná s α -tokoferolem [1; 19]. Bylo potvrzeno, že jeho absorpce je na rozdíl od jiných dietních antioxidantů, jako jsou vitamíny C a E, nízká, což omezuje jeho schopnost působit jako plazmatický antioxidant *in vivo* [1].

1.2.2. Saponiny a sapogeny

Saponiny jsou hlavní skupinou sekundárních metabolitů, které se vyskytují u široké škály druhů rostlin. Jejich jméno pochází z latinského "sapo", což znamená "mýdlo" a rostlinný materiál obsahující saponiny byl dlouho používán k čištění oděvů. Saponiny jsou glykosidy s triterpenoidním nebo steroidním aglykonem. Triterpenové saponiny jsou v přírodě široce distribuovány, zatímco steroidní saponiny se vyskytují méně. Je známo, že cibule je bohatým zdrojem steroidních saponinů, které se dále rozdělují do tří skupin: cholestan, furostan a spirostan [7]. Saponiny jsou sloučeniny s výraznou antimikrobiální aktivitou a jsou běžně klasifikovány jako fytoanticipiny, protože chrání rostlinu před útokem patogenů. Jejich antifungální aktivita je způsobena schopností vytvářet komplexy se steroly a vede ke zvýšení permeability membrány a tím úniku buněčného obsahu [22] Dále mají protirakovinné účinky a snižují cholesterol [14].

V cibuli byly nalezeny následující saponiny: diosgenin, gitogenin, β -chlorogenin, cepagenin, alliospirosidy A–D, alliofurosid A, tropeosidy A1/A2, tropeosidy B1/B2. Struktury hlavních saponinů v cibuli jsou na obrázku 4. Bylo zjištěno, že tyto saponiny mají antispasmodickou aktivitu, která by mohla přispět k vysvětlení tradičního používání cibule v léčbě poruch gastrointestinálního traktu [14].



	R ₁	R ₂
Gitogenin	OH	H
Diosgenin	H	H
β-chlorengenin	OH	OH

Obrázek 4: Struktura hlavních saponinů obsažených v cibuli [14]

1.2.3. Aldehydy a alkohol

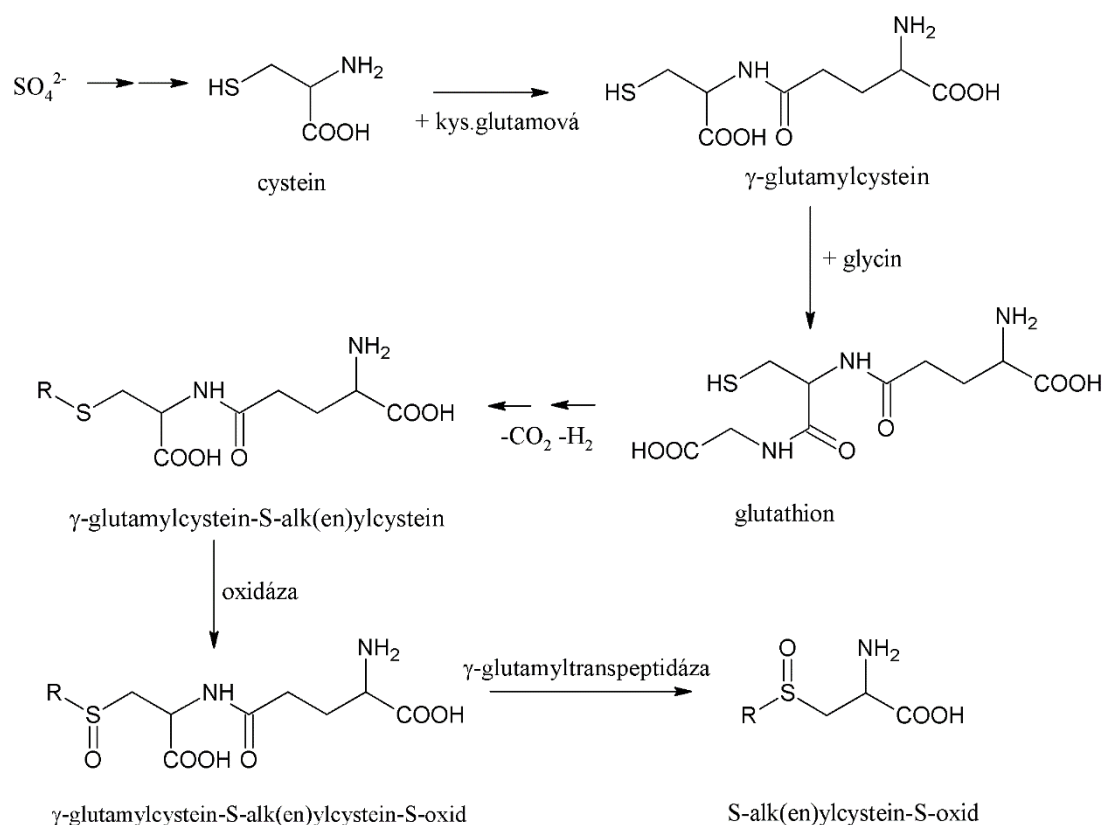
Je známo, že aldehydy a alkoholy se tvoří více v cibuli než v česneku, pravděpodobně proto, že se v cibuli tvoří velké množství thiopropanal-S-oxidu, který se v česneku netvoří [15]. Propanal je jednou z nejdůležitějších aromatických látek v syrové cibuli, avšak je třeba zdůraznit, že chuť čerstvé cibule je ovlivněna přítomnými cukry. Boelens a kol. ve své studii [23] uvádí, že v krájené cibuli se aldehydy vytvářejí mnohem rychleji než sulfidové sloučeniny. Patnáct minut po nakrájení se v prostoru nad vzorkem tvořil především ethanal, propanal, 2-methylbutanal a 2-methylpentanal a ve velmi malém množství se vyskytoval dipropyldisulfid. Po 60 minutách bylo dipropyldisulfidu podstatně více a po 120 minutách byl hlavní složkou vyskytující se v prostoru nad vzorkem dipropyldisulfid. Methylpropyldisulfid byl v nejvyšším množství prokázán po 120 minutách. Ve stejné studii bylo zjištěno, že rychlost tvorby uvedených složek závisí mimo jiné na stupni homogenizace cibule.

Jak propanal, tak pyruvát pravděpodobně podléhají dalším reakcím, což vede k tvorbě několika aldehydů a k redukci na alkoholy, které jsou stanovovány v parním prostoru nad vzorkem krájené cibule [15].

1.2.4. Látky obsahující síru

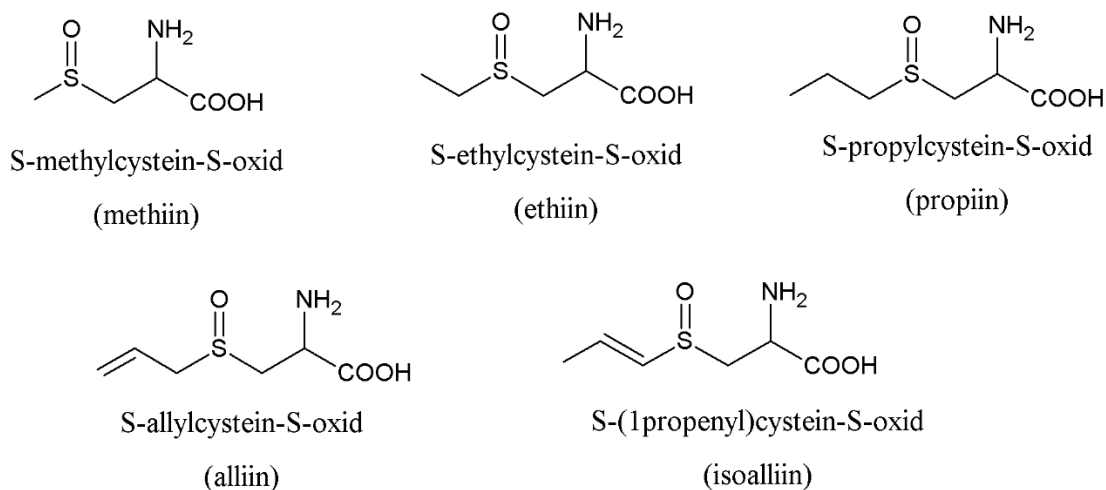
Rostliny rodu *Allium* získávají síru ze síranových iontů (SO₄²⁻), které se přirozeně vyskytují v půdě a postupně se zabudovávají do molekuly cysteinu [24]. Schopnost absorpce

síranů z půdy a účinnost syntézy aromatických prekurzorů se liší u různých kultivarů cibule, přičemž některé odrůdy obsahují přibližně 3krát více sírných těkavých látek než ostatní [7]. Primární složky obsahující síru v neporušené cibuli jsou nebiřkovinné aminokyseliny odvozené od L-cysteinu, jejichž biogeneze je znázorněna na obrázku 5.



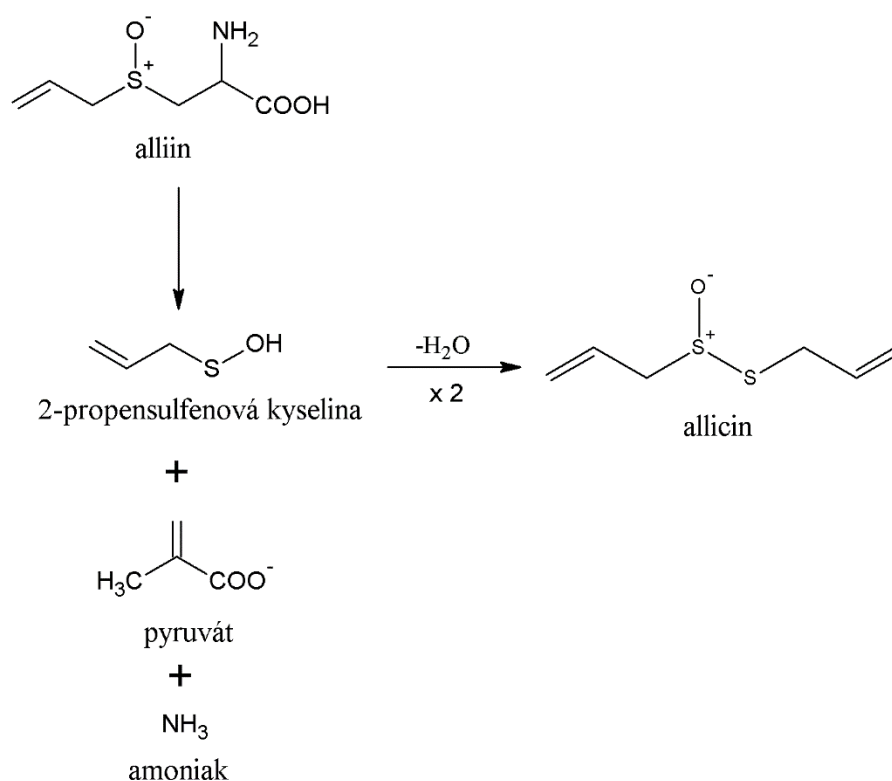
Obrázek 5: Biogeneze prekurzorů obsažených v cibuli [24]

V listech nejdříve vzniká γ -glutamylcystein a glutathion, z nichž se dále tvoří různé γ -glutamylcystein-S-alk(en)ylcystein-S-oxidy. Tyto látky jsou během růstu rostliny přepraveny do podzemních částí, kde jsou uloženy jako zásobní forma síry a dusíku. Vlivem γ -glutamyltranspeptidázy se vytvoří S-alk(en)ylcystein-S-oxidy (ACSO). Mezi nejběžnější zástupce této třídy látek patří S-methylcystein-S-oxid, S-ethylcystein-S-oxid, S-propylcystein-S-oxid, S-allylcystein-S-oxid, (trans-S-(1-propenyl)cystein-S-oxid, triviálně nazvané methiin, ethiin, propiin, alliin a isoalliin [24; 25; 26]. Strukturální vzorce těchto sloučenin jsou na obrázku 6.



Obrázek 6: Prekurzory sensoricky aktivních sirných látek v běžných druzích rostlin rodu *Allium* [14]

Mezi nejdůležitější primární prekurzory sirných látek vznikajících v rostlinách rodu *Allium* se řadí alliin (S-allylcystein-S-oxid), který se vyskytuje v česneku a jeho různých odrůdách, a γ -glutamylcystein, z nichž při různých metabolických procesech v každé rostlině vznikají těkavé látky. Hlavním rozkladným produktem alliinu je thiosulfinát allicin (obrázek 7), z něhož při dalším zpracování vznikají jiné sensoricky a biologicky aktivní látky. Tyto sloučeniny poskytují česneku a cibuli jejich charakteristický zápach a chuť. Poměrný obsah těchto látek se liší v každém ze zástupců rodu *Allium* [18; 27].



Obrázek 7: Enzymatická tvorba allicinu z alliinu za účasti alliinázy [19]

V rodu *Allium* se S-alk(en)ylcystein-S-oxidy vyskytují přirozeně jako (+)-L-enantiomery [28]. Nejčastěji vyskytujícími se cysteinovými deriváty v cibuli je methiin (S-methylcystein-S-oxid), propiin (S-propylcystein-S-oxid) a isoalliin [trans-S-(1-propenyl)cystein-S-oxid] [1]. Tento polohový izomer alliinu, je hlavním prekurzorem nacházejícím se pouze v cibuli, pažitce, póru a šalotce [27]. V poslední době bylo v cibuli stanoveno 11 prekurzorů chuti obsahujících síru, včetně derivátů S-alk(en)yl-L-cysteinu, methiinu, alliinu, isoalliinu, cykloalliinu, deoxyalliininu, N-(gamma-glutamyl)-S-methyl-L-cysteinu, N-(gamma-glutamyl)-S-(2-propenyl)-L-cysteinu, N-(gamma-glutamyl)-S-(E-1-propenyl)-L-cystein(Glu-PEC), N-(gamma-glutamyl)-S-(2-propenyl)-L-cystein-S-oxidu, N-(gamma-glutamyl)-S-(E-1-propenyl)-L-cystein-S-oxidu (Glu-PECSO) a S-(2-carboxypropyl) glutathionu [1].

1.2.4.1. Chemické procesy při krájení cibule

V cibuli se ACSO nacházejí v cytoplasmě a enzym alliináza ve vakuolách [11]. Alliináza (EC 4.4.1.4), též nazývána C-S lyáza, je pyridoxal-5-fosfát dependentní enzym [8; 29], který katalyzuje konverzi ACSO bez zápachu na těkavé thiosulfináty. Tato reakce probíhá extrémně

rychle, což je v souladu s okamžitým uvolňováním typického aromatu [30]. Teplota, pH, čas, zpracování a potravinová matrice mohou ovlivnit aktivitu alliinázy a stabilitu bioaktivních sloučenin. Zahřívání vede k denaturaci alliinázy, což vede k poklesu tvorby organosírných metabolitů. Tento pokles je spojen se snížením zápachu cibule a snížením protirakovinného a antimikrobiálního potenciálu [31].

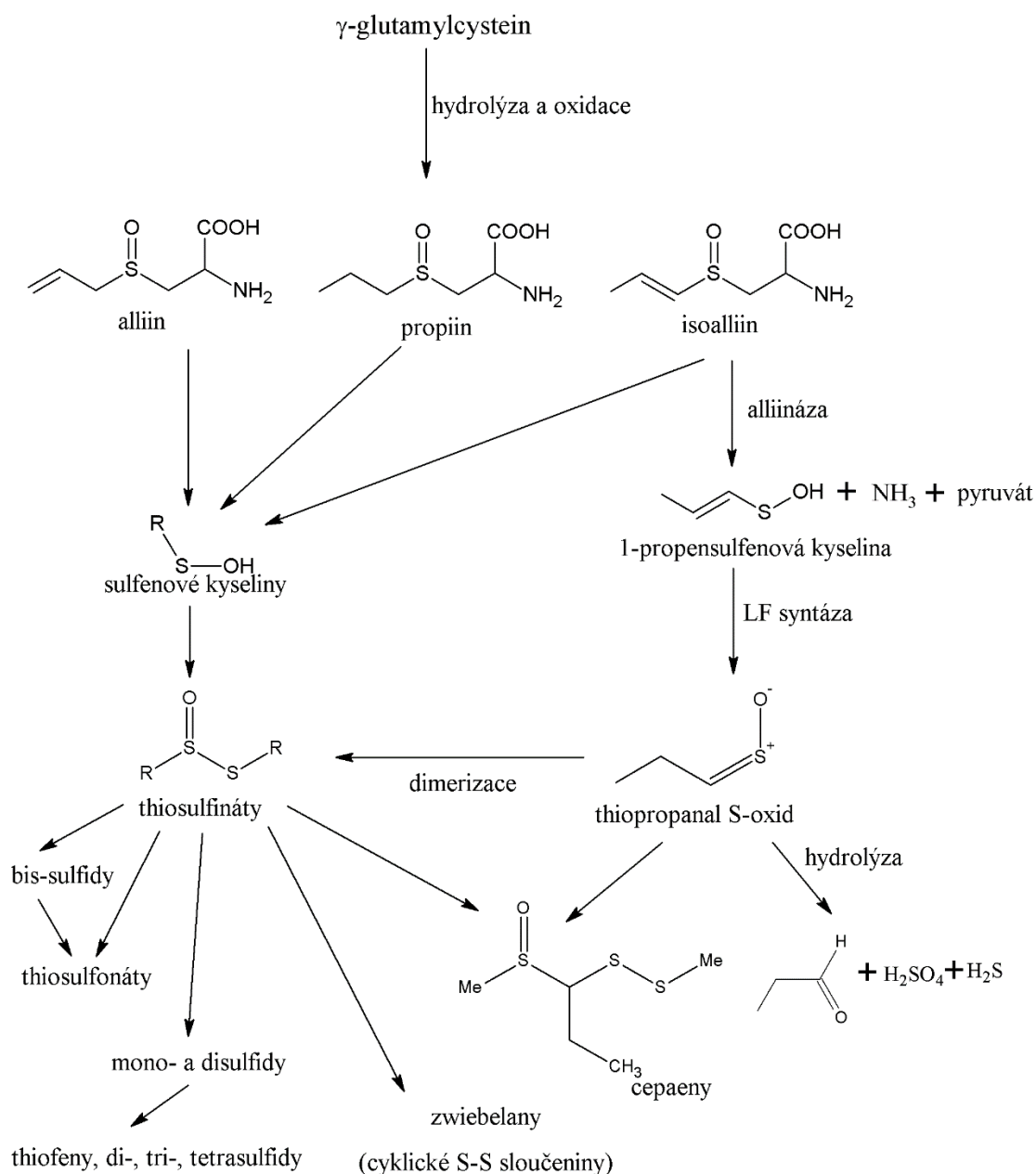
Když je cibulová tkáň narušena řezáním, drcením nebo žvýkáním, jsou ACSO enzymaticky přeměňovány alliináзой na kyselinu iminopropionovou a alk(en)ylcysteiniosulfenové kyseliny. Kyselina iminopropionová se spontánně hydrolyzuje za vzniku amoniaku a kyseliny pyrohroznové (pyruvát = konjugovaná báze kyseliny pyrohroznové). Kyseliny sulfenové se rozkládají spontánně, methyl- a propylsulfenové kyseliny poskytují převážně thiosulfináty, zatímco 1-propenylsulfenová kyselina tvoří jak thiosulfináty, tak i slzný faktor thiopropanal S-oxid [1].

Při rozpadu isoalliinu vzniká thiopropanal S-oxid, amoniak a pyruvát. Hladiny pyruvátu jsou korelovány s celkovým obsahem thiosulfinátů v cibuli. Kromě určování obsahu thiosulfinátů může předpovídat chuť cibule i hladina pyruvátu, jak naznačují studie Cavagnara a kol. [32] a Wall a Corgana [33] zabývající se vztahem mezi hladinou pyruvátu a intenzitou smyslového vnímání syrové cibule. Tyto studie dokazují důležitost analýzy pyruvátu pro odhad intenzity chuti a koncentrace bioaktivních organosírných sloučenin v syrové cibuli. Pyruvátová analýza je široce používána mezi potravinářskými technologiemi a biochemiky. Nejpoužívanější metodou pro stanovení pyruvátu je metoda podle Schwimmera a Westona. Tento postup je založený na reakci karbonylových skupin s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. V důsledku tvorby aduktů pyruvátu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem se mění barva vodného roztoku, jejíž intenzita se měří spektrofotometrem při 420 nm. Intenzita barvy je přímo úměrná koncentraci pyruvátu ve vodném extraktu. Je třeba poznamenat, že tento postup kvantifikuje celkový pyruvát, tudíž jak pyruvát vzniklý enzymatickou reakcí, tak i pyruvát pocházející z Krebsova cyklu. U cibule tento neenzymatický pyruvát představuje 10-30 %, tudíž je nutné ho stanovit samostatně a poté odečíst od celkového obsahu pyruvátu [28].

Dalšími produkty vznikajícími reakcí mezi 1-propenylsulfenovou kyselinou a thiopropanal S-oxidem jsou cepaeny. Tyto látky jsou velmi podobné ajoenům přítomným v česneku jak strukturně, tak příznivými biologickými účinky. Z isoalliinu vzniká také unikátní skupina látek triviálně nazvané zwiebelany, podle německého die Zwiebel, tj. cibule [24; 34].

Sírné aminokyseliny a thiosulfináty mají svou roli i v zažívacím traktu. Při kousání cibulové tkáně se buněčné pletivo v ústech zcela nerozmělní a část ACSO projde dál do žaludku beze změny. Alliináza je vlivem žaludečních šťáv zničena a bakterie přítomné ve střevech rozštěpí sulfoxidy na příslušné disulfidy. Thiosulfináty, které jsou vytvořeny enzymaticky ještě před degradací alliinázy vydrží při nízkém pH žaludeční šťávy krátkou dobu, ale i tak dokáží inhibovat růst patogenních mikroorganismů [24].

Na obrázku 8 jsou znázorněny veškeré degradační cesty probíhající v cibuli a česneku.



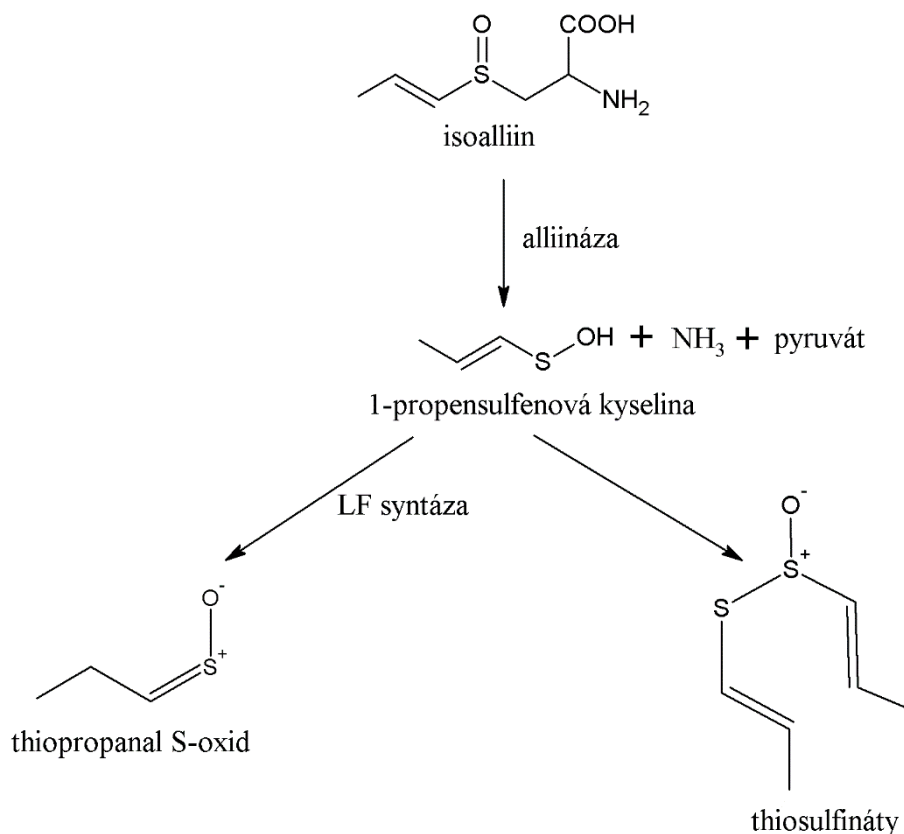
Obrázek 8: Tvorba různých organosírných sloučenin při zpracování cibule a česneku [18]

Dalšími významnými sirnými látkami uvolňovanými z cibule jsou sulfidy. Hlavní složkou detekovanou z headspace prostoru nad krájenou cibulí jsou disulfidy. V největším množství je přítomen dipropyldisulfid (44-93 %), následovaný methylpropylsulfidem, dimethylsulfidem, allylpropylsulfidem a menším množstvím allylmethylsulfidu, diallyldisulfidu a diallylsulfidu [15].

1.2.5. Slzný faktor

Typickým znakem pro cibuli je tvorba slzného faktoru (LF z angl. lachrymatory factor) po narušení buněčné tkáně, například při jejím krájení. Tvorba LF je hlavní rozdíl mezi cibulí a česnekem a předpokládá se, že produkce LF v cibuli způsobuje nepřítomnost těkavých sirných složek, jejichž analogy jsou známy v česneku díky svým zdravotním přínosům [35].

Trans-S-1-propenyl-L-cysteinsulfoxid (1-PRENSCO), neboli isoalliin [30], je hlavní známý prekurzor slzného faktoru, v cibuli se nachází v množství cca 2 g/kg [15; 36]. Na tento prekurzor působí enzym alliináza, která způsobí přeměnu na kyselinu 1-propenylsulfenovou, amoniak a pyruvát, dále pak enzym působící vznik slzného faktoru (LF syntáza) zapříčiní rozpad kyseliny sulfenové na thiopropanal S-oxid (slzný faktor) a thiosulfináty [37], jak je znázorněno na obrázku 9 [38].



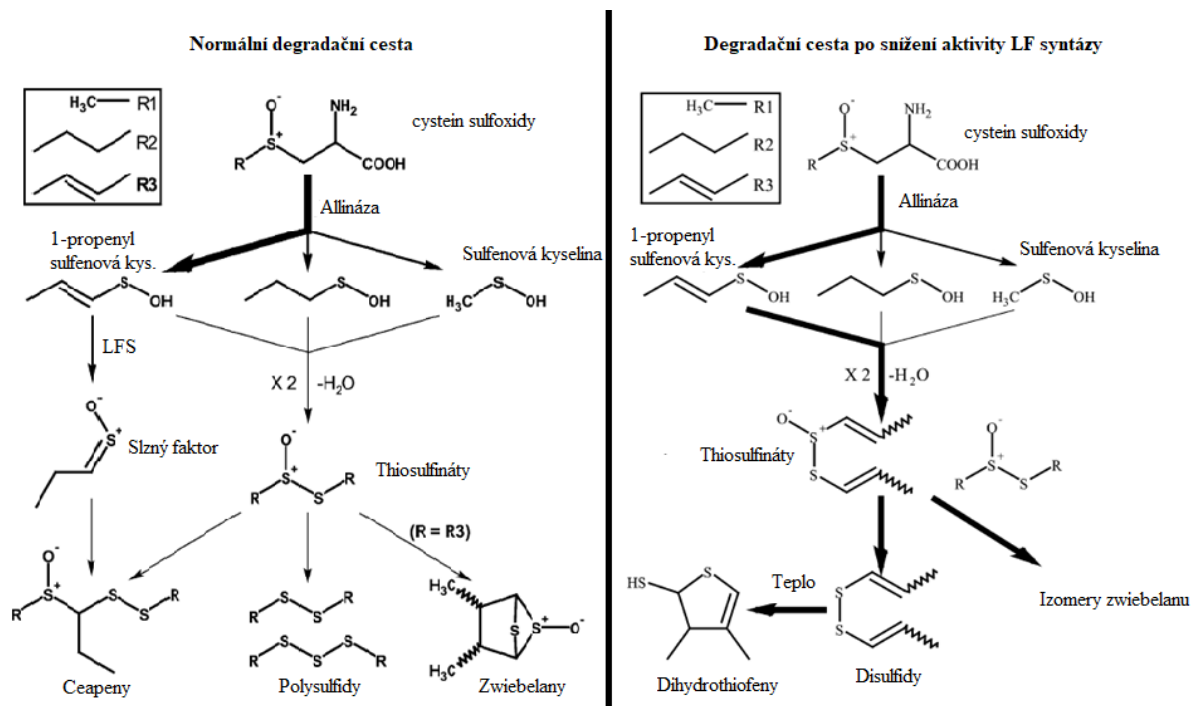
Obrázek 9: Přeměna trans-S-1-propenyl-L-cysteinsulfoxidu na kyselinu 1-propensulfenovou, amoniak a pyruvát, dále pak enzym LF syntáza způsobí rozpad kyseliny 1-propensulfenové na thiopropanal S-oxid a thiosulfináty [37].

Jak je znázorněno na obrázku 9, byla potvrzena existence LF syntázy. Identifikace tohoto enzymu vyvolává otázky ohledně možnosti modifikovat cibuli, která by při narušení tkáně netvořila LF, ačkoli je docela pravděpodobné, že by byla ovlivněna také její chuť. Tuto myšlenku rozšířila studie Kato a kol. [39], ve které bylo pomocí ozáření semen cibule těžkými neonovými ionty vypěstováno několik linií cibulí bez zápachu a tvorby slzného faktoru. Toto ozáření mělo na svědomí expresi mRNA u enzymu alliinázy a tím i snížení její aktivity, tudíž 1-PRENSCO zůstal i po rozkrojení cibule v nezměněné formě. Koncentrace LF se v těchto cibulích snížila přibližně 7,5krát oproti normální cibuli. Zápach, ostrost a slzný faktor byly posuzovány jak pomocí sensorických panelů, tak analýzou HPLC. Tato studie je slibným začátkem pro geneticky modifikované cibule, které by nejednomu uživateli usnadnili práci s ní, nicméně ve většině zemí však nově vyvinuté transgenní rostliny musí projít procesem obtížného schvalování předtím, než budou pěstovány komerčně [39].

Colin a kol. provedli studii [35], ve které pomocí genetické transformace RNA snížili aktivitu LF syntázy, což mělo za následek snížení produkce LF. Jelikož LF syntáza působí na kyselinu 1-propenylsulfenovou, při snížení aktivity tohoto enzymu dochází pouze k částečné tvorbě LF a kyselina 1-propenylsulfenová se spontánně disproportionuje na di-1-propenylthiosulfínát. Vlivem toho se zvýšily hladiny thiosulfínátu obsahující 1-propenyl skupinu, čímž se zároveň zvýšily hladiny neenzymaticky vytvářených izomerů zwiebelanů a di-1-propenyldisulfidu. Toto bylo potvrzeno měřením, kdy byla detekována mnohem větší množství izomerů zwiebelanů a di-1-propenyldisulfidu u rostlin se sníženou aktivitou LF syntázy.

Arnault a kol. [40] uvádí, že thiosulfínáty jsou přeměňovány na disulfidy při SPME-GC-MS analýze vlivem jejich tepelné nestability. Block a Zhao [41] popsali, že zahříváním di-1-propenyldisulfidu se tvoří dihydrothiofeny, které byly také nalezeny ve studii Colina a kol. [35], kde byl detekován 2-merkapt-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen. Z toho vyplývá, že při snížení aktivity LF syntázy dochází ke zvýšené tvorbě thiosulfínátů, tím pádem i di-1-propenyldisulfidu, ze kterého se vlivem tepla při SPME-GC-MS tvoří zvýšené množství 2-merkapt-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofenu. Normální degradační cesta v porovnání s degradační cestou při snížení aktivity LF syntázy je popsána na obrázku 10.

Zvýšené množství nenasyceného thiosulfínátu obsahující 1-propenyl skupinu, nacházející se v cibuli se sníženým obsahem LF, může poskytnout cibulím zdravotní účinky, které byly předtím spojeny s nenasyceným thiosulfínátem allicinem, přítomným v česneku [35].



Obrázek 10: Porovnání normální degradační cesty při krájení cibule s geneticky modifikovanou cibulí, u níž je snížena aktivita LF syntázy [35]

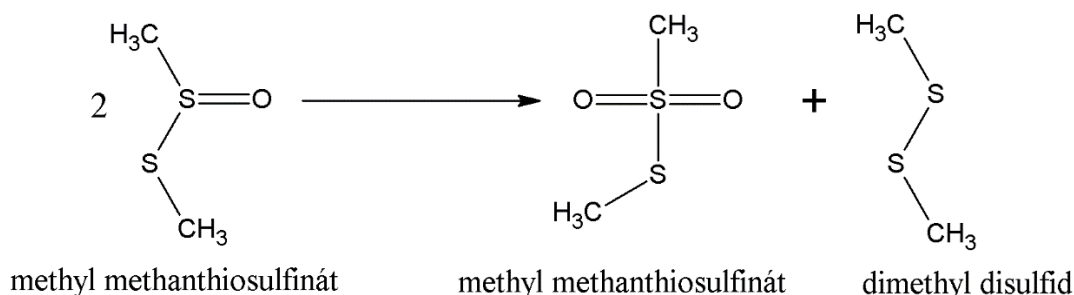
Slzný faktor je příčinou nepříjemné štiplavé vůně spojované s krájením cibule. Disulfidové a dihydrothiofenové sloučeniny jsou spojeny se sladší vůní vařené nebo smažené cibule. *Trans*- a *cis*-zwiebelany jsou spojeny se sladkou chutí syrové cibule. Počáteční čichové hodnocení autorů zjistilo, že v cibulích se sníženou aktivitou LF syntázy chybělo ostré aroma a byla přítomna sladší vůně [35]. Tato studie může být jednou z možností, jak ulehčit konzumentům práci s cibulí, avšak je zapotřebí prozkoumat bezpečnost geneticky modifikované cibule.

1.2.6. Thiosulfínáty

Thiosulfínáty (TS) jsou nejvíce studované a dobře známé sloučeniny tvořené v rostlinách rodu *Allium*. Byly nalezeny u všech druhů tohoto rodu a rozdíly mezi druhy jsou způsobeny typem a relativním obsahem jejich prekurzorů (ACSO) [14]. Jedním z významných TS vyskytujícím se v cibuli je isoalliin.

Thiosulfínáty jsou nestabilní, zvláště při zahřívání, a rozkládají se na komplexní směs sloučenin, ve kterých převažují mono-, di-, tri- a tetrasulfidy [42]. Dipropylsulfid, dipropyltrisulfid a propenylsulfidy jsou hlavními složkami těkavých látek uvolňovaných z cibule, ale byly identifikovány mnohé další sloučeniny, např. dipropylsulfid a

dipropenylsulfid [1]. Spontánní disproportionace thiosulfinátu na disulfid je znázorněna na obrázku 11.



Obrázek 11: Spontánní disproportionace methyl methanthiosulfinátu [11]

Důkazem termální nestability TS je i práce Brodnitze a kol. [28], ve které byla snaha o stanovení allicinu pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Touto metodou byly stanoveny pouze rozkladné produkty allicinu. Z toho plyne, že separační techniky založené na plynové chromatografii nejsou pro stanovení TS vhodné z důvodu jejich termolability.

1.3. Biologické účinky

Sírné sloučeniny, které se obecně vyskytují v různých druzích zeleniny rodu *Allium*, jsou odpovědné např. za snížení příznaků spojených s diabetem mellitem a zabraňují zánětlivým procesům spojených s astmatem [16]. Složení sírných sloučenin se v jednotlivých druzích rostlin liší, např. sírné deriváty v česneku mají obecně thioallylovou část, zatímco cibulové extrakty obsahují sírné látky s thiopropylovou skupinou s poněkud odlišnými chemickými vlastnostmi [43].

Samotná cibule získala velkou pozornost z důvodu blahodárných účinků na lidské tělo a je již po staletí používána v lidovém léčitelství. Nedávné výzkumy potvrdily, že cibule má antibakteriální, antimutagenní, antifungální, antimikrobiální, antiagregační a antioxidační vlastnosti [44].

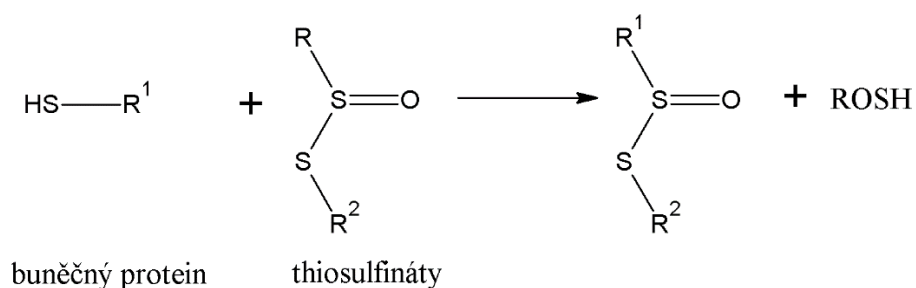
Na druhou stranu je navzdory příznivým účinkům přisuzovaným rostlinám rodu *Allium* známo, že nadměrná konzumace především česneku, může způsobit problémy, jako jsou poškození gastrointestinálního traktu, alergické reakce, anémie, ztráta hmotnosti a toxicita pro srdce, játra a ledviny, stejně jako poškození chromozomů. Na základě těchto důkazů je česnek klasifikován jako alergen typu I, přičemž jako alergeny jsou identifikovány diallyldisulfid, allylpropyldisulfid, allylmerkaptan a allicin [12]. V případě cibule nejsou známy

příliš závažné nežádoucí účinky, ačkoli byly popsány gastrointestinální poruchy, plynatost, změny střevní mikroflóry a dermatologické problémy u vnímavých jedinců [18].

1.3.1. Antimikrobiální účinky

Cibule byla již ve starověku využívána jako léčivá rostlina pro své antimikrobiální vlastnosti. Vysoký obsah fytoncidů, obzvláště ve zralých cibulích, má za následek antibakteriální efekt hlavně při onemocnění sliznic dutiny ústní, dýchacího ústrojí a angíně. Vyšší antibakteriální aktivitu mají cibule fialové a červené, nižší cibule bílé [2; 5].

Hlavními antimikrobiálními látkami rodu *Allium*, jsou látky patřící do skupiny thiosulfinátů. Antimikrobiální aktivita thiosulfinátů byla vysvětlena jako obecná reakce mezi thiosulfináty, konkrétně skupině -S-(O)-S- v molekulách, a -SH skupinami esenciálních buněčných proteinů daných mikroorganismů [11]. V cibuli mají nejvyšší antibakteriální účinky S-methyl-methanthiosulfinát a S-propyl-propanthiosulfinát [24]. Navrhovaný mechanismus účinku těchto látek je zobrazen na obrázku 12.



Obrázek 12: Navrhovaná reakce mezi thiosulfináty a -SH skupinou buněčných proteinů [11]

Je známo, že cibulové a česnekové extrakty vykazují baktericidní účinky na *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* a *Prevotella intermedia* (grampozitivní bakterie), které jsou považovány za hlavní bakterie zodpovědné za zubní kazy a parodontitidu u dospělých [18]. Kromě organosírných sloučenin mají antibakteriální účinky také další sloučeniny, např. některé produkty oxidace kvercetinu, který se nachází v cibuli, vykazují antibakteriální účinnost proti *Helicobacter pylori* a multirezistentnímu *Staphylococcus aureus* [45].

1.3.2. Protirakovinné účinky

Uvádí se, že příjem česneku a cibule snižuje riziko sarkomu a karcinomu v různých tkáních a orgánech, jako je žaludek, tlusté střevo, jícen, prostata, močový měchýř, játra, plíce a mozek [18].

Bylo navrženo několik mechanismů, které vysvětlují účinky konzumace zeleniny z rodu *Allium* při prevenci rakoviny. Patří mezi ně inhibice mutageneze, modulace enzymových aktivit, inhibice tvorby DNA aduktu, zachycování volných radikálů a účinky na proliferaci buněk a růst nádoru [43]. Chemopreventivní účinky proti rakovině žaludku a jícnu mohou souviset s antibakteriálními vlastnostmi. Inhibice růstu bakterií v žaludeční dutině může mít za následek menší konverzi dusičnanů na dusitany v žaludku, sníženou pravděpodobnost endogenní tvorby karcinogenních N-nitrososloučenin a snížení specifické infekce *Helicobacter pylori* [31; 43]. Dalším protirakovinným účinkem může být inhibice nitrosaminů a heterocyklických aminů. Nitrosaminy a heterocyklické aminy jsou potenciální dietní karcinogeny, které nejsou běžně přítomny v potravinách, ale mohou vznikat při konzervaci nebo vaření [31].

Literatura [43] uvádí, že pokud bychom chtěli zjistit množství látky pro antikarcinogenní účinek, vedlo by to k nerealistickým odhadům. Např. diallylsulfid (DAS) je sulfid přítomný v česneku, u kterého jsou uváděny antikarcinogenní účinky u zvířat v rozmezí 50-400 mg/kg. Abychom docílili efektu ochrany před nádory tak osoba vážící 70 kg by musela zkonzumovat 3,5-28 g DAS denně. Koncentrace DAS v česneku je 0,03-0,1 mg/g, z čehož vyplývá, že by muselo být spotřebováno 40-100 g česneku za den, což odpovídá 10-100 česnekovým stroužkům za denně.

Jedna z epidemiologických studií [46] našla inverzní vztahy mezi rizikem rakoviny plic a příjmem cibule, pravděpodobně kvůli vysokému obsahu flavonoidů. V této souvislosti je zmiňován kvercetin a kaempferol. Kromě toho nedávné studie [47; 48] uvádějí, že kvercetin zvyšuje biologickou dostupnost některých protirakovinných léčiv [18]. Zjistilo se, že organické sloučeniny síry jako diallylsulfid, S-allylcystein a S-methylcystein inhibují karcinogenezi střev a ledvin [16].

1.3.3. Antioxidační vlastnosti

V důsledku normálního aerobního metabolismu se v lidských buňkách produkují reaktivní druhy kyslíku. Nadprodukce těchto molekul může způsobit buněčné poškození nebo

destrukci biologických makromolekul, jako jsou cholesterol, nukleové kyseliny, proteiny nebo polypeptidy, což může způsobit několik chronických onemocnění spojených se srdečními a mozgovými cévami. Konzumace přírodních antioxidantů v potravinách má velký význam pro ochranu těchto biomolekul před oxidačním poškozením buněk [20]. Antioxidační aktivita extraktů z rostlin rodu *Allium* je zvláště zajímavá kvůli vztahu mezi oxidačním stresem a patologickými stavy, jako je ateroskleróza, rakovina a stárnutí, ve kterých hrají roli volné radikály a reaktivní molekuly kyslíku [44]. Mnozí výzkumníci dospěli k jednoznačným závěrům a naznačili, že thiosulfináty a příbuzné organosírné složky jsou primárně zodpovědné za pozorované antioxidační účinky, i když mnoho jiných endogenních složek může mít také antioxidační vlastnosti. Naproti tomu Xiao a Parkin [44] uvádí, že thiosulfináty jsou antioxidačně účinné pouze jako čistá činidla a jejich účinnost je až o 3 řády nižší než u jiných antioxidačních sloučenin, tudíž se antioxidační aktivita v cibuli přisuzuje jiným látkám, s největší pravděpodobností kvercetinů jak již bylo popsáno výše.

Dipropyltrisulfid, který byl izolován z cibule, svojí antioxidační aktivitu ovlivňuje průběh Alzheimerovy choroby [49].

1.4. Extrakce SPME

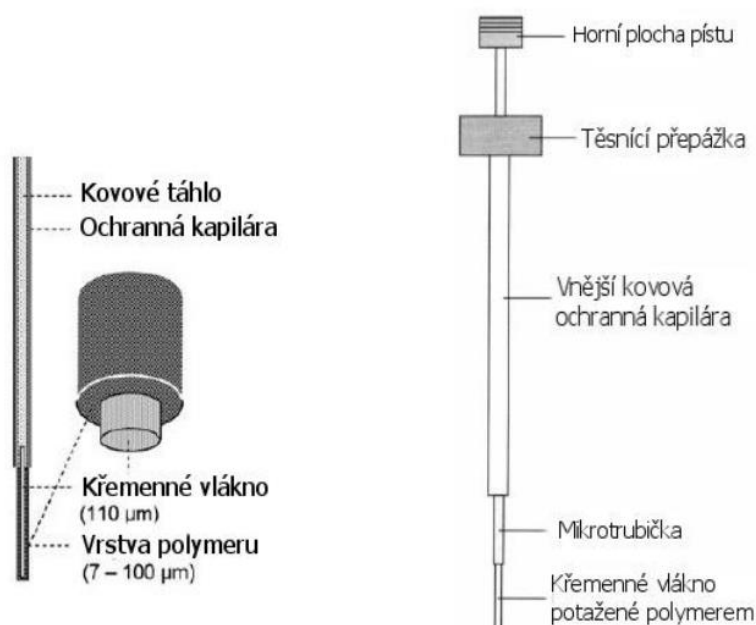
Metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně/desorpční technika, kdy dochází k zakoncentrování analytu. Od tradiční techniky extrakce tuhou fází se odlišuje tím, že stacionární fáze je nanosená na povrch křemenného vlákna, jehož vnější průměr je menší než 1 mm. Stacionární fáze je polymerní látka [50], která se liší polaritou, ale i sorpčními vlastnostmi. Principem této metody je rozdělení analytu mezi dvě fáze, z nichž jedna je tuhá. Cílem většiny SPME metod přípravy vzorku před analýzou je získání analytu v dostatečném, detekovatelném množství, bez nežádoucích příměsí. Tuto metodu lze používat jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu látek. Volbou vhodného vlákna lze dosáhnout výborných a reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů [51; 52]. Sloučeniny nasorbované na vláknech je pak možné analyzovat na plynovém i kapalinovém chromatografu [28].

Tato metoda byla vyvinuta v roce 1990, později se stala komerčně dostupná. Pro extrakci pomocí SPME je možné použít jak kapalné, tak i plynné a tuhé vzorky, kdy se analyt extrahuje na stacionární fázi a následně se tepelně desorbuje např. v nástřikovém prostoru plynového chromatografu [53]. Těžké analyty mohou být sorbovány na vlákno tak, že vlákno je ponořeno

přímo do vzorku (tzv. přímé SPME neboli DI-SPME) nebo je umístěno v prostoru parní fáze nad vzorkem (tzv. headspace SPME neboli HS-SPME). Netěkavé analyty mohou být extrahovány pouze ponořením vlákna do vzorku [51]. Aplikace SPME pro studium těkavých látek uvolňovaných z krájené cibule umožňuje použití obou těchto postupů. HS-SPME může zachytit ty sloučeniny, které jsou uvolňovány do prostoru horního prostoru z matrice vzorku. Ponořením vlákna do vodného roztoku lze analyzovat hydrofilní sloučeniny [54].

Hlavními výhodami SPME jsou rychlost, nenákladnost, snadná automatizovatelnost a obecně to, že se pracuje bez jakéhokoli rozpouštědla. Výhodou také je, že tato metoda lze použít pro široké spektrum vzorků, např. biologické (moč, krev), vzorky životního prostředí (pesticidy, voda) nebo vzorky potravin. Nevýhodou SPME je, že vlákno jako takové je velmi křehké a musí být vhodně upraveno pro manipulaci s ním, aby byla možná např. penetrace septa nádoby se vzorkem nebo nástřikového bloku chromatografu. Ochranu vlákna tvoří kapilára z nerezové oceli, v níž je vlákno zasunuto. Během extrakce musí být vlákno vysunuto, aby byl umožněn jeho kontakt se vzorkem [50; 53].

SPME je poměrně citlivá na experimentální podmínky, jako jsou doba extrakce, teplota extrakce, objem vzorku v extrakční nádobce, homogenita vzorku, podmínky desorpce nebo volba vlákna (tloušťka a polarita) [55]. Je obecně známo, že rychlost extrakce se zvyšuje s teplotou [50]. Schématické znázornění technického uspořádání vlákna je na obrázku 13.



Obrázek 13: Scématické znázornění technického uspořádání pro SPME [50; 53]

1.4.1. Headspace SPME

Extrakce těkavých analytů z parní fáze nad vzorkem je nejčastěji využívanou aplikací SPME. Principem je, že vlákno se umístí tak, že není v přímém kontaktu se vzorkem a sorbuje se pouze těkavé látky. Extrakce může být prováděna ručně nebo automaticky. Kromě účinného oddělení cílových sloučenin od netěkavých rušivých komponent matrice a obohacení látek je výhodou minimalizace poškození vlákna agresivními nebo nevratně sorbovanými složkami matrice. Proto lze zpravidla analyzovat více než 100 vzorků stejným vláknem [50].

Při HS-SPME mohou být na vlákno zachyceny pouze sloučeniny, které jsou těkavé při zvolených analytických podmínkách. Plochy píků získané metodou SPME-GC-MS nemusí nutně odrážet skutečné podíly složek v prostoru nad vzorkem nebo ve vzorku, protože různé třídy sloučenin, a dokonce i jednotlivé sloučeniny s různými strukturami mají rozdílnou těkavost, stejně jako jiné odlišné fyzikální vlastnosti, které mohou ovlivnit rozdělovací koeficienty. Touto metodou se však mohou zkoumat trendy výskytu a vymizení jednotlivých sloučenin ve vzorcích [54].

1.4.2. Přímá SPME

Přímá extrakce analytů ponořením vlákna do roztoku se používá pro netěkavé nebo málo těkavé analyty. Vzhledem k tomu, že vzorek je v přímém kontaktu s vláknem, je nutné se vyhnout silně kyselým nebo zásaditým podmínkám. Pokud se zabrání agresivním podmínkám, vlákna mohou být stabilní i v přímém kontaktu se vzorky [50].

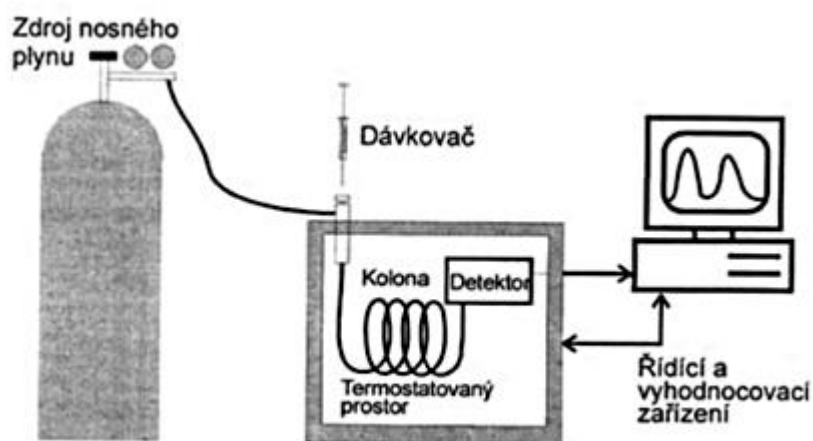
1.5. Instrumentální metody

1.5.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) se řadí mezi analytické separační metody. Je to fyzikálně chemická metoda separace látek založena na distribuci látek mezi dvě heterogenní fáze [56]. Tato metoda nese své jméno podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Nejčastěji používaným nosným plynem je helium, dále pak dusík nebo vodík. Mobilní fáze se pohybuje vlivem tlakového spádu [52]. Stacionární fáze může být dvojího typu, tuhá povrchově aktivní látka (např. silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta apod.) nebo kapalný film zakotvený na inertním nosiči. Podle toho dělíme plynovou chromatografii na chromatografii v systému plyn-tuhá fáze (GSC) nebo systému plyn-kapalina (GLC) [52; 56]. V prvním případě metoda využívá dělení analytu mezi stacionární fází a mobilní fází na základě absorpce nebo síťového efektu, ve druhém případě se látka rozděluje mezi kapalinou a plynou mobilní fází [57]. U obou

se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Metoda plynové chromatografie se využívá ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení látek. Signál měřicího zařízení je funkcí množství analytu a citlivosti [52; 57]. Plynová chromatografie je určena především pro analýzu těkavých a středně těkavých látek, které je možné převést do plynného stavu [58].

Plynový chromatograf se skládá z několika základních částí, které jsou popsány na obrázku 14.



Obrázek 14: Základní schéma plynového chromatografu [58]

Dávkovací zařízení má za úkol vpravit vzorek do kolony, pokud možno co nejrychleji a s co největší reprodukovatelností. Kapalné vzorky musí být okamžitě zplyněny, proto musí být tento prostor vyhříván.

Velmi důležitou roli při separaci látek mají kolony. V podstatě je rozlišujeme na dva typy, a to kolony náplňové nebo kapilární. Náplňové kolony jsou trubice většinou vyrobené ze skla či nerezové oceli, o délce 2-6 metrů a vnitřním průměru 2-4 mm, naplněné buď adsorbentem (GSC) nebo nosičem pokrytým kapalnou fází (GLC). Kapilární kolony jsou nejčastěji křemenné trubice s délkou obvykle 10-30 metrů, při některých aplikacích i 100 metrů, o vnitřním průměru 50-350 μm . Mohou se však vyrábět i z nerezové oceli, podmínkou však je, aby byly dostatečně tvárné [52; 56; 58]. Podle způsobu uložení stacionární fáze rozlišujeme 3 základní typy: WCOT (Wall Coated Open Tubular), SCOT (Support Coated Open Tubular) a PLOT (Porous Layer Open Tubular). WCOT kolony jsou nejrozšířenější a nosičem je vnitřní stěna kapiláry, na které je zakotvená tenká vrstva stacionární fáze. U SCOT kolon je na stěně vrstvička nosiče, na které je zakotvena stacionární fáze. Třetí typ jsou kolony PLOT, u kterých je na vnitřní stěně kapiláry nanášena nebo chemicky vytvořena pórovitá vrstva [56].

K detekci složek vycházejících z kolony plynového chromatografu se využívají, detektory, na které jsou v plynové chromatografii kladeny vysoké nároky a požadavky. Ideální detektor by měl být univerzální pro všechny sloučeniny a zároveň selektivní, s vysokou citlivostí a linearitou signálu. V praxi ale těchto podmínek není možné dosáhnout, a proto se na různé aplikace používají různé detektory. Detektory dělíme na destruktivní vs. nedestruktivní a koncentrační vs. hmotnostní. Nejčastěji používané detektory pro plynovou chromatografii jsou: tepelně vodivostní, plamenově ionizační, detektor elektronového záhytu, plamenový fotometrický, hmotnostní spektrometr atd. [52; 56]. V této práci byl jako detektor použit naposledy zmíněný hmotnostní spektrometr, proto o něm bude pojednáno podrobněji v následující kapitole.

1.5.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, která slouží k určení hmotnosti částic a chemické struktury molekul. Jednotlivými kroky procesu jsou převedení molekul na ionty, rozdělení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů do hmotnostních spekter. Mezi jeho hlavní přednosti patří vysoká citlivost, možnost kvantitativní i kvalitativní analýzy a minimální spotřeba vzorku. Nevýhodou tohoto analyzátoru jsou vysoké pořizovací náklady a destrukce vzorku.

Základní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, který slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice, hmotnostní analyzátor, jež rozděluje ionty v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru m/z , poslední částí je detektor iontů, který určuje hodnoty m/z a relativní intenzity jednotlivých iontů. Další důležitou součástí hmotnostního spektrometru je např. vakuový systém.

Neutrální molekuly analytu je nutné převést na ionty. K tomu slouží ionizační techniky, které se dělí podle množství vnitřní energie po ionizaci na tvrdé a měkké ionizační techniky. Při proměřování vzorků cibule byla použita elektronová ionizace, proto bude dále podrobněji rozebrána pouze tato technika.

Elektronová ionizace je nejtvrďší ionizační technikou, což se projeví fragmentací molekulárního iontu. Pro tuto ionizační techniku jsou podrobně popsána pravidla fragmentace a vytvořeny rozsáhlé knihovny spekter (Wiley, NIST). Principem elektronové ionizace je žhavení elektrody (wolframové nebo rheniové vlákno), která emituje elektrony, jež procházejí iontovým zdrojem, zde ionizují molekuly vzorku a poté jsou zachyceny na anodě. Vzniklé ionty jsou fokusovány a urychleny do hmotnostního analyzátoru [59].

1.5.3. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)

V dnešní době je spojení těchto dvou analytických metod zcela běžným vybavením analytické laboratoře, kombinuje totiž výhody obou technik a používá se při rutinních analýzách. Pomocí GC-MS lze separovat a identifikovat složité směsi látek a při použití elektronové ionizace lze přímo porovnat naměřená spektra s knihovny spekter v databázích [60]. Problémem spojení separačních a spektrometrických metod jsou velmi rozdílné požadavky na měření, a to hlavně jejich tlaková nekompatibilita. Tlak na výstupu z kolony plynového chromatografu je přibližně atmosférický, zatímco hmotnostní spektrometr pracuje ideálně za vysokého vakua [52]. Pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je podstatné, aby plynný eluent vyhovoval režimu v hmotnostním spektrometru. Při separaci na kapilárních kolonách se používají průtoky plynů v jednotkách ml/min, proto jsou tyto kolony upřednostňovány před náplňovými kolonami, u nichž jsou průtoky v desítkách ml/min. Důvodem je, aby do hmotnostního spektrometru nešlo velké množství plynného eluentu. Jako nosný plyn se nejčastěji používá helium, jelikož jeho přebytek v eluentu lze snadno odčerpat vakuovými pumpami.

Pro spojení GC-MS se používá otevřené rozhraní, které tvoří kapilára z plynového chromatografu zavedená do konstrukce tvaru T. Toto rozhraní je vyhříváno, aby se zabránilo případné kondenzaci látek [52; 61].

1.5.4. Kvalitativní analýza

Při identifikaci látek neboli kvalitativní analýze se v plynové chromatografii využívá retenčního času. Aby mohla být látka označena, jako přítomná ve vzorku musí být překonána tzv. mez detekce. Mez detekce je definována jako trojnásobek šumu. Pro identifikaci látky se kromě hmotnostních spekter používají i retenční indexy, např. tzv. Kovatsův nebo van den Doolův index. Tento index je vztažen na rozsáhlou skupinu standardních látek, kterou je homologická řada n -alkanů. Identifikace neznámé látky se poté provádí porovnáním vypočítaného indexu s indexy známých látek. Při izotermálních separacích se využívají Kovatsovy indexy, při separacích s programovanou teplotou van den Doolovy indexy. Rovnice pro výpočet Kovatsova indexu je uvedena v rovnici 1, pro výpočet van den Doolova indexu v rovnici 2.

$$I_x = 100n + 100 \frac{\log t_x - \log t_z}{\log t_{z+1} - \log t_z}$$

Rovnice 1: Rovnice pro výpočet Kovatsova indexu

$$I_x = 100n + 100 \frac{t_x - t_z}{t_{z+1} - t_z}$$

Rovnice 2: Rovnice pro výpočet van den Doolova indexu

kde n = počet atomu uhlíku v nejbližším nižším n -alkanu, t_z = retenční čas nejbližšího nižšího n -alkanu, t_{z+1} = retenční čas nejbližšího vyššího n -alkanu, t_x = retenční čas neznámé látky.

V této práci byla k identifikaci látky využita shoda hmotnostního spektra s dostupnými knihovnamí spekter, shoda je poté uváděna v procentech. Potvrzení identity sloučenin bylo provedeno porovnáním vypočítaných retenčních indexu s publikovanými daty.

1.5.5. Kvantitativní analýza

Výška nebo plocha chromatografického píku příslušející dané látce jsou měřítkem množství této komponenty ve vzorku. Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky ve vzorku na základě použití vzorku dané látky o známém množství či koncentraci, tzv. standardu. Kvalita kvantitativní analýzy je ovlivněna především přípravou vzorků, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody [56].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Sledování profilu těkavých látek z krájené cibule

2.1.1. Chemikálie a plyny

Standardní roztok *n*-alkanové směsi (C8-C20) byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) v koncentracích 40 mg·l⁻¹ rozpuštěných v *n*-hexanu. Dále helium 5.0 (Linde Gas a.s., Praha Česká republika).

2.1.2. Přístroje

Plynový chromatograf model GC-2010 s hmotnostním spektrometrem QP 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a automatickým vzorkovacím zařízením PAL-Combi (CTC Analytics AG, Zwingen, Švýcarsko).

2.1.3. Vzorek

Pro analýzu byly použity vzorky cibule s českým původem, zakoupené v místních obchodních řetězcích. Aby byl zajištěn dostatečně reprezentativní vzorek byly vybrány tři různé šarže z různého místa původu, viz tabulka 1.

Tabulka 1: Použité vzorky cibule, místo zakoupení, původu, dodavatel a číslo šarže

Název	Zakoupeno	Dodavatel	Místo původu	Číslo šarže
Cibule kuchyňská žlutá	Lidl	Jihomoravská zelenina	Velké Bílovice	4004
Cibule kuchyňská žlutá	Kaufland	Agrico Bohemia s.r.o.	Tábor	0407
Cibule červená	Kaufland	Družstvo Bramko	Semice	L0807

2.1.4. Příprava vzorků

Z cibule byly odstraněné suché obalové vrstvy a bezprostředně před samotnou analýzou byl vzorek rozkrájen na malé kousky cca 3x3x3 mm. 2 g ± 0,1 g nakrájeného vzorku bylo převedeno do headspace nádoby o objemu 20 ml a uzavřeno víčkem, bez septa (pro navození reálné situace během přípravy pokrmů, při uzavření septem by mohlo dojít k nasycení prostoru,

případně až k zastavení enzymatické reakce). Nádobka byla ihned přenesena do autosampleru a zahájena SPME.

2.1.5. SPME extrakce

Dle studie [55], která se zabývá optimalizací extrakce sirných látek, byla zvolena metoda mikroextrakce tuhou fází. Podle výsledků této studie je pro stanovení těkavých sirných látek z parního prostoru nad vzorkem nejvhodnější šedé vlákno se smíšeným sorbentem 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, proto bylo použito při našich experimentech.

Mikroextrakce byla prováděna bezprostředně po nakrájení vzorku cibule. Doba extrakce byla při sledování profilu těkavých látek zvolena 10 minut při laboratorní teplotě a stanovení bylo opakovaně prováděno po dobu cca 4,5 hodiny. Při experimentu sledování slzného faktoru byla doba extrakce nejdříve 2 minuty/extrakční krok v prvním pokusu, ve druhém pokusu půl minuty/extrakční krok.

2.1.6. Chromatografická analýza

Systém GC-MS byl vybaven kapilární kolonou ZB-5HT Inferno o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium 5.0 při konstantní lineární rychlosti 30 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Teplota nástřikového bloku byla udržována na 200 $^{\circ}\text{C}$. Gradient teploty byl naprogramován následovně: počáteční teplota byla 40 $^{\circ}\text{C}$ (3 minuty) a poté byla zvyšována rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ až na 210 $^{\circ}\text{C}$. Celková doba analýzy byla 20 minut. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu plného skenování v hmotnostním rozsahu m/z 35-500 a v režimu elektronové ionizace (70 eV), v čase 11,5 minut bylo sníženo napětí na detektoru z důvodu vysokých koncentrací látky a bez snížení docházelo k saturaci detektoru a jeho automatickému vypnutí, v čase 12,5 minut bylo napětí vráceno na původní hodnotu.

Lineární retenční indexy (RI) byly vypočteny pro homologickou řadu n -alkanů (C8-C20) analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky. Sloučeniny byly identifikovány porovnáním hmotnostních spekter získaných s referenčními hmotnostními spektry z knihoven spekter (WILEY, NIST, FFNSC2) za použití kritéria přinejmenším 80% podobnosti a porovnáním s lineárními retenčními indexy.

2.2. Testování antimikrobiálních účinků cibule

2.2.1. Chemikálie

Pro analýzu antimikrobiálních účinků byly použity agary od firmy HiMedia (Mumbai, Indie), konkrétně Mueller-Hinton agar a MALT agar. Na přípravu antimikrobiálních suspenzí byl použit fyziologický roztok (0,5% roztok NaCl).

2.2.2. Přístroje a pomůcky

Půdy byly sterilizovány v autoklávu Sterilab (BMT, Brno, Česká republika), denzita suspenzí byla měřena pomocí McFarland denzitometru (Biosan, Warren, USA), pro inkubaci mikroorganismů byl použit biologický termostat BT120M (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) nastavený na teplotu 37 °C, Petriho misky s inhibičními zónami byly foceny pomocí přístroje BACMED 6iG2 (Aspiag, Litomyšl, Česká republika), vzorek a suspenze byly dávkovány automatickými mikropipetami (Eppendorf, Hamburg, Německo).

2.2.3. Příprava vzorků

Z cibule byly odstraněny suché vnější obalové vrstvy a bezprostředně před samotnou aplikací byla cibule pomocí struhadla nastrouhána a vzniklá šťáva byla napipetována na sterilní disk nebo do jamky vyříznuté v agaru. Pomůcky pro tento experiment jsou zobrazeny na obrázku 15.



Obrázek 15: Pomůcky při testování antimikrobiálních látek

2.2.4. Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda je založena na vlastnostech různých testovaných látek, které mají schopnost difundovat do pevného kultivačního média. Disky jsou kusy filtračního papíru nasáklého antibiotiky, uložené na pevném kultivačním médiu, na kterém byla inokulována bakteriální kultura. Látka difunduje do okolí disku a pokud je studovaný mikroorganismus citlivý na antibiotikum nebo antimikrobiální látku, nebude se rozvíjet kolem disku a médium zůstane čiré, vznikne inhibiční zóna, ale příslušná bakteriální kultura se bude rozvíjet ve zbytku média v Petriho misce [62]. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a snadná a poskytuje dostatečné informace pro praktické a klinické potřeby. Výhodou je použití téměř pro všechny antimikrobiální látky.

Ke stanovení antimikrobiálních účinků cibulové šťávy byly použity Petriho misky s Mueller-Hinton (MH) agarem pro bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcobacter butzleri*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Petriho misky s MALT agarem byly použity pro kvasinky *Candida albicans*. Byla připravena bakteriální suspenze s turbiditou podle stupnice McFarlanda odpovídající stupni 0,5; tj. 10^8 CFU·ml⁻¹. Takto připravenou suspenzí byl agar inokulován pomocí stěrového tampónu daným mikroorganismem. Poté byl na agar aplikován sterilní disk, na který bylo pipetováno 8 µl cibulové šťávy. Bakterie byly inkubovány 24 h při 37 °C, kvasinky a *Arcobacter* 48 h při 37 °C. U kvasinky a *Arcobacteria* byla po 24 hodinách inkubace doplněna na disky čerstvá cibulová šťáva. Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón (mm) včetně disku, z čehož byla vyhodnocena antimikrobiální aktivita. Přítomnost inhibiční zóny značí antimikrobiální aktivitu proti testovaným bakteriím a kvasinkám. Každý experiment se vzorky cibulové šťávy byl proveden na dvou Petriho miskách, přičemž na každé misce byly vždy dva disky se shodným vzorkem, tudíž se velikost inhibiční zóny průměrovala ze 4 hodnot.

2.2.5. Jamková difúzní metoda

Při této metodě se pomocí tzv. korkovrtů udělají jamky do vyšší vrstvy agarů na Petriho misce. Po aplikaci mikroorganismu na povrch půdy se do jamek aplikuje testovaná látka, která difunduje do okolí a pokud je studovaný mikroorganismus citlivý na antibiotikum nebo antimikrobiální látku, nebude se rozvíjet kolem disku a médium zůstane čiré, vznikne inhibiční zóna, ale příslušná bakteriální kultura se bude rozvíjet ve zbytku média v Petriho misce [63].

Byly použity Petriho misky s Mueller-Hinton (MH) agarem pro bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcobacter butzleri*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Petriho misky s MALT agarem byly použity pro kvasinky *Candida albicans*. K inokulaci byla použita stejná suspenze jako u diskové difúzní metody. Petriho misky s agarem byly nejdříve inokulovány mikroorganismem pomocí stěrového tampónu a poté byla asepticky vyříznuta jamka, do které byla následně napipetována čerstvá cibulová šťáva až po okraj. Takto připravené misky s bakteriemi byly inkubovány 24 hodin při 37 °C, kvasinky a *Arcobacter* 48 hodin při 37 °C. U kvasinky a *Arcobacteria* byla po 24 hodinách inkubace doplněna do jamek cibulová šťáva. Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón (mm) včetně jamky, z čehož byla vyhodnocena antimikrobiální aktivita. Přítomnost inhibiční zóny značí antimikrobiální aktivitu cibulové šťávy proti testovaným bakteriím a kvasinkám. Každý experiment se vzorky cibulové šťávy byl proveden na dvou Petriho miskách, přičemž na každé misce byly vždy dvě jamky se shodným vzorkem, tudíž se velikost inhibiční zóny průměrovala ze 4 hodnot.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Sledování profilu těkavých látek

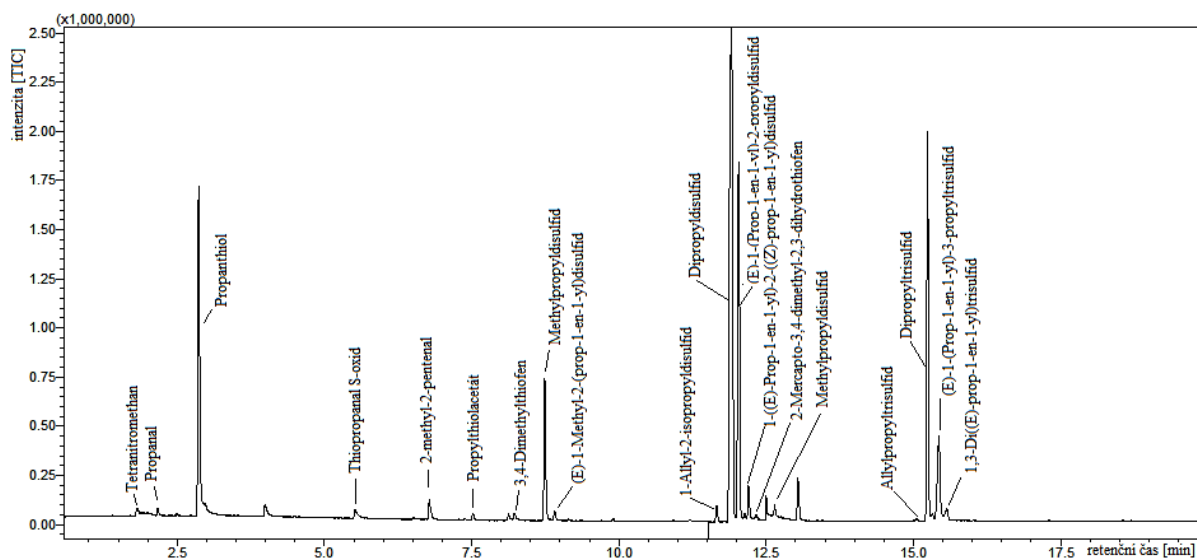
Bylo provedeno několik počátečních měření pro zjištění vhodné přípravy vzorku, doby extrakce, teplotního programu a doby analýzy. Po optimalizování těchto parametrů byly provedeny série měření, ze kterých byly zpracovány výsledky. V tabulce 2 jsou uvedeny všechny identifikované sloučeniny během měření, CAS čísla, jejich retenční časy a vypočítané retenční indexy. Retenční indexy byly vypočítány s použitím retenčních časů homologické řady alkanů (tabulka 3) Tučně vyznačené sloučeniny jsou látky obsahující síru, z nichž je pro konzumenty cibule asi nejzajímavější thiopropanal S-oxid, známý jako slzný faktor. Kromě sírných látek se v cibuli také nacházejí aldehydy a alkoholy. Při měřeních vzorku zakoupeném v řetězci Lidl byl nalezen 2-undekanon a 2-undekanol, který nebyl nalezen v žádné z dosud publikovaných studií, pouze ve studii [23] byl nalezen 2-tridekanon v cibulovém oleji jako produkt degradace kyseliny myristové. Podle literatury [64] se 2-undekanon nachází v hřebíčku, oleji z palmových jader, oleji ze sójových bobů, v banánech, zázvoru a jahodách. Používá se v parfumerii a potravinářském průmyslu, ale vzhledem k jeho zápachu je primárně používán jako repelent proti hmyzu, tudíž není vyloučeno, že cibule jej tvoří právě z tohoto důvodu. Některé z nalezených sloučenin jsou na obrázku 16.

Tabulka 2: Identifikované sloučeniny, jejich CAS čísla, retenční časy a retenční indexy

Název sloučenin	Retenční čas [min]	Retenční index vypočtený	Retenční index referenční [65]	CAS číslo	Shoda MS spektra [%]
Tetranitromethan	1,83	<800	399	509-14-8	88
Acetaldehyd	1,94	<800	400	75-07-0	89
Methylmerkaptan	2,00	<800	473	74-93-1	87
Propanal	2,18	<800	511	123-38-6	97
1-Propanol	2,50	<800	562	71-23-8	94
Propanthiol	2,88	<800	624	107-03-9	93
Thiopropanal S-oxid	5,42	768	760	32157-29-2	97
2-Methyl-2-pentenal	6,78	830	829	623-36-9	96

Název sloučenin	Retenční čas [min]	Retenční index vypočtený	Retenční index referenční [65]	CAS číslo	Shoda MS spektra [%]
Propylthiolacetát	7,53	867	877	2307-10-0	93
3,4-Dimethylthiofen	8,23	901	908	632-15-5	96
Methylpropyldisulfid	8,75	930	931	2179-60-4	95
(E)-1-Methyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid	8,91	937	940	23838-19-9	85
1-Allyl-2-isopropyldisulfid	11,66	1091	1099	67421-85-6	95
(Z)-1-Allyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid	11,73	1099	1097	2179-57-9	90
Dipropyldisulfid	11,89	1107	1107	629-19-6	90
(E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid	12,03	1116	1118	23838-21-3	93
1-(E)-Prop-1-en-1-yl-2-(Z)-prop-1-en-1-yldisulfid	12,20	1125	1124	121609-82-3	96
2-Merkapto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	12,33	1135	1139	137363-86-1	80
Methylpropyltrisulfid	12,65	1156	1154	17619-36-2	93
2-Undekanon	14,73	1292	1291	112-12-9	97
2-Undekanol	14,82	1299	1303	1653-30-1	84
Allylpropyltrisulfid	15,07	1317	1320	33922-73-5	84

Název sloučenin	Retenční čas [min]	Retenční index vypočtený	Retenční index referenční [65]	CAS číslo	Shoda MS spektra [%]
Dipropyltrisulfid	15,25	1330	1328	6028-61-1	94
(Z)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfid	15,33	1336	1332	23838-26-8	92
(E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfid	15,44	1344	1345	23838-27-9	86
1,3-Di((E)-prop-1-en-1-y)trisulfid	15,57	1354	1348	115321-81-8	85



Obrázek 16: Chromatogram druhého měření u vzorku žluté cibule

Tabulka 3: Homologická řada *n*-alkanů, jejich retenční časy a retenční indexy

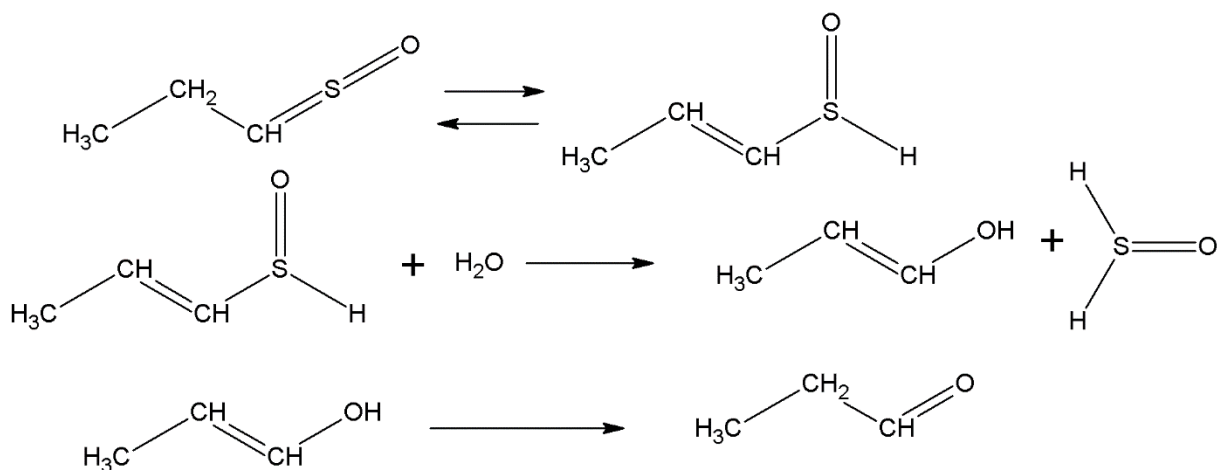
<i>n</i>-alkan	retenční čas [min]	retenční index
C8	6,15	800
C9	8,21	900
C10	10,10	1000
C11	11,81	1100
C12	13,38	1200
C13	14,84	1300
C14	16,20	1400
C15	17,48	1500
C16	18,69	1600
C17	19,83	1700
C18	20,92	1800
C19	21,96	1900
C20	22,94	2000
C21	23,88	2100
C22	24,84	2200

3.1.1. Kinetika těkavých sloučenin

Data byla vyhodnocena tak, že množství dané sloučeniny z první analýzy každé sekvence bylo bráno jako 100 % a z dalších analýz byl poté dopočten ekvivalentní přírůstek/úbytek v relativních procentech. V případě, že v prvním měření byl obsah sloučeniny pod mezí detekce, jako 100 % rel. bylo stanoveno první detekované množství v následujících analýzách.

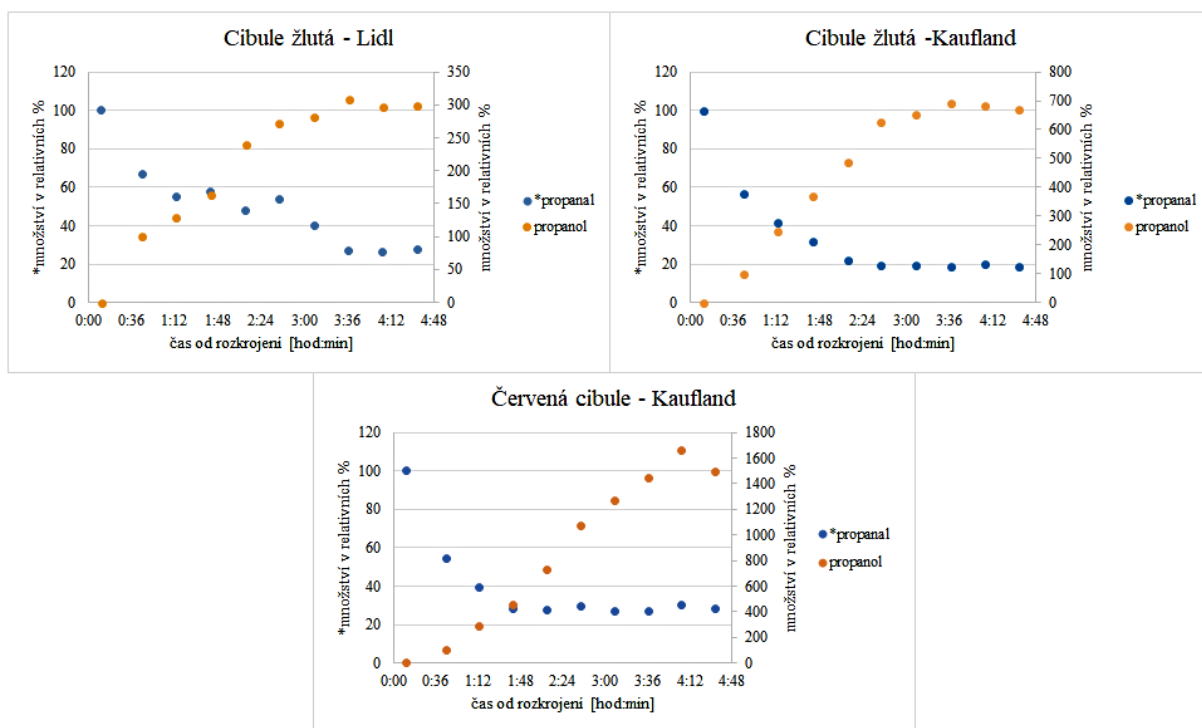
3.1.1.1. Kyslíkaté sloučeniny

Jak uvádí studie [23], přítomnost aldehydů v cibuli není překvapující. Propanal je jednou z nejdůležitějších chuťových přísad v syrové cibuli. Literatura [15] uvádí, že se propanal spontánně tvoří ze slzného faktoru. Tato reakce je znázorněna na obrázku 17.



Obrázek 17: Spontánní rozklad thiopropanal S-oxidu na propanal [15]

Experimentální měření v této práci potvrzuje přítomnost propanalu. Navíc byl během měření detekován 1-propanol, který je produktem redukce propanalu. Jak je znázorněno na obrázku 18, ve všech vzorcích s ubývajícím množstvím propanalu přibývalo množství 1-propanolu, tudíž je vystižená jejich vzájemná přeměna v čase.



Obrázek 18: Grafy všech vzorků popisující závislost přeměny propanalu na 1-propanol na čase, sekundární osa patří 1-propanolu

V žádném z dostupných zdrojů nebylo nalezeno podobné hodnocení přeměny 1-propanolu na propanal, proto není možné porovnání s literárními zdroji.

3.1.1.2. Sirné sloučeniny

Celkem bylo detekováno 19 sirných sloučenin s různými profily uvolňování (tabulka 2). Propylthiolacetát se vždy začal objevovat až v druhém měření, tzn. cca po 45 minutách od rozkrojení, jeho koncentrace měla nejdříve stoupající charakter, po hodině a půl postupně klesala až pod mez detekce. 3,4-Dimethylthiofen měl svojí maximální koncentraci v prvním měření, postupem času množství klesalo a po hodině a půl od rozkrojení cibule nebyl pík 3,4-dimethylthiofenu detekován. Pík odpovídající methylpropyldisulfidu byl přítomen již v prvních měřeních, maximální množství bylo po 45 minutách od rozkrojení, pak docházelo k úbytku a po 3,5 hodinách byla koncentrace pod mezí detekce. (E)-1-Methyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid byl zaznamenán pouze v prvních 4 chromatogramech, tzn. od rozkrojení až do hodiny a tři čtvrtě, s maximem koncentrace v 45. minutě. Sirná sloučenina 1-allyl-2-isopropyldisulfid se začala vyskytovat až ve druhém měření, kdy byla její koncentrace maximální a postupně se snižovala. (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid byl detekován od prvního měření a maximální koncentrace dosáhl po 45 minutách od rozkrojení vzorku cibule, s postupným ubýváním až pod detekovatelné množství. Pík patřící 2-merkapt-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofenu byl vždy přítomný v prvních dvou až třech měřeních, což znamená, že se uvolňuje pouze během první hodiny a čtvrt. Methylpropyltrisulfid byl přítomný až po tři čtvrtě hodiny od rozkrojení, a v následujících měřeních mělo jeho množství klesající tendenci. Allylpropyltrisulfid se nevyskytoval v prvním měření žádné sekvence, pík odpovídající této látce byl nalezen až ve druhém měření, ve třetím měření byla koncentrace tohoto trisulfidu maximální a poté docházelo ke snižování až pod mez detekce. 1,3-Di((E)-prop-1-en-1-yl)trisulfid se v některých vzorcích nevyskytoval vůbec a pokud byl detekován pík patřící této látce, tak pouze v prvních dvou měřeních.

Pro přehlednost budou dále v grafech zobrazeny a diskutovány pouze sirné látky, u kterých byly změny plochy píku během analýz nejvýraznější. To jsou následující sloučeniny: propanthiol, dipropyldisulfid, 1-((E)-Prop-1-en-1-yl)-2-((Z)-prop-1-en-1-yl)disulfid, dipropyldisulfid, (Z)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfid a (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfid.

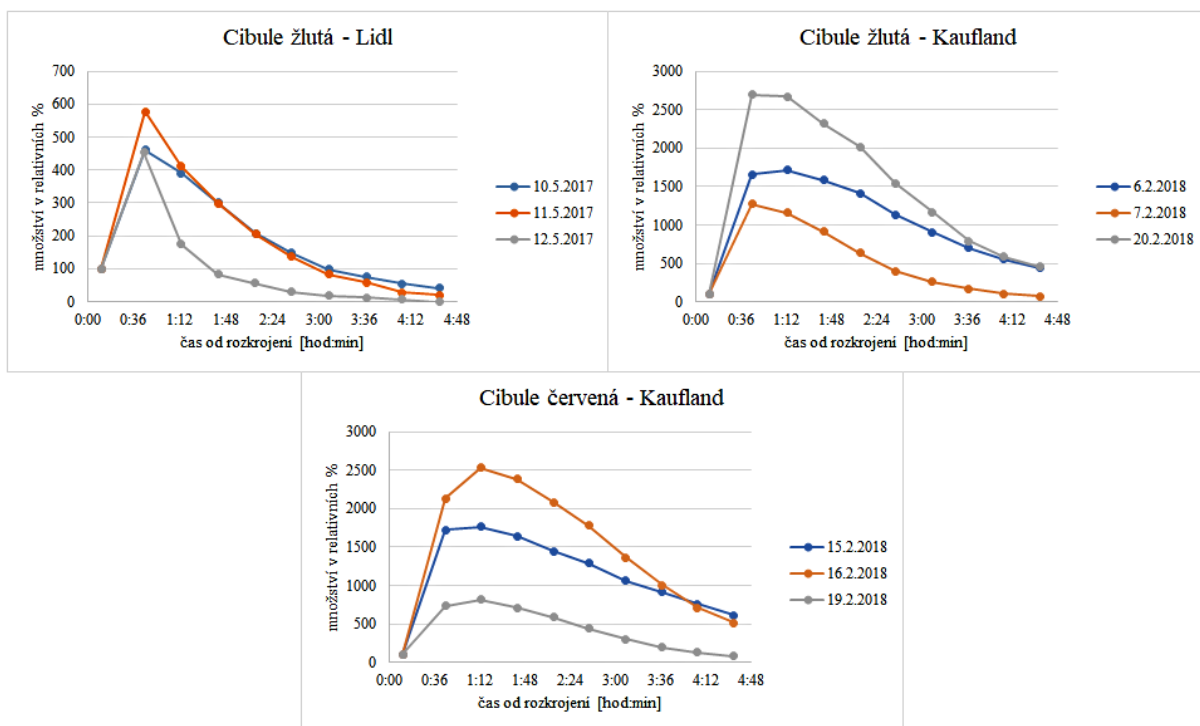
Colina-Coca a kol. [66] ve své studii analyzovali krájenou cibuli pomocí dynamické headspace analýzy ve spojení s GC-MS, s tím rozdílem, že ke vzorku přidali jako vnitřní

standard allylmethylsulfid a takto upravené vzorky zahřívají na 80 °C po dobu 40 minut, během nichž byly těkavé látky zachytávány a koncentrovány v zařízení typu „purge and trap“ a následně desorbovány pro analýzu v plynovém chromatografu. I přes rozdílné podmínky stanovení se s naší studií shodovali ve značném množství identifikovaných sloučenin, mezi něž patří propanal, propanthiol, 2-methyl-2-pentenal, propylthioacetát, 3,4-dimethylthiofen, methylpropyldisulfid, (E)-1-methyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid, 1-allyl-2-isopropyldisulfid, dipropyldisulfid, (E)-1-(prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid, methylpropyltrisulfid. V této studii je shodně uvedeno, že hlavními těkavými složkami cibule jsou disulfidy, trisulfidy a aldehydy. Boelens a kol. [23] studovali headspace nad krájenou cibulí a následně analyzovali pomocí HS-GC-MS, teplotní program byl od 70 do 200 °C při 1 °C/min. S touto diplomovou prací se shodují v některých identifikovaných sloučeninách, které jsou: propanal, 2-methyl-2-pentenal, 3,4-dimethylthiofen, methylpropyldisulfid, (E)-1-(prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid, dipropyldisulfid a (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid. V této studii na rozdíl od naší práce nebyly identifikovány žádné trisulfidy. Liguori a kol. [9] použili pro analýzu těkavých složek mixované cibule extrakt získaný parní destilací a následnou extrakcí dichlormethanem, který analyzovali pomocí GC-MS. S touto studií se také shodujeme ve značném množství látek, mezi které patří: propanal, propanthiol 2-methyl-2-pentenal, 3,4-dimethylthiofen, methylpropyldisulfid, (E)-1-(prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid, dipropyldisulfid, (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid, methylpropyltrisulfid a dipropyltrisulfid. I přes velmi rozdílné podmínky přípravy vzorku je mnoho identifikovaných sloučenin shodných s naší prací. Gítin a kol. [10] stanovovali sirné látky z hydrodestilátu cibule pomocí GC-MS. Detekovali pouze 5 sirných látek, přičemž naše studie se shodovala pouze se dvěma sloučeninami, konkrétně methylpropyldisulfid a dipropyldisulfid. Je možné, že tato studie detekovala takto malé množství látek z důvodu rozpustnosti některých sloučenin ve vodě. Kremr a kol. [55] studovali sirné sloučeniny v rostlinách rodu *Allium*. Rozmixovanou cibulí analyzovali pomocí SPME-GC-MS. V cibulí detekovali celkem 18 sirných látek, s naší studií se shodují pouze ve 4 sloučeninách, a to: (E)-1-methyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid, dipropyldisulfid, (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfid a dipropyltrisulfid. Rozdílnost může být způsobená různou dobou mezi prvním narušením cibulové tkáně a samotnou analýzou.

Jediná dostupná studie experimentálně shodující se s naší studií je práce Järvenpää a kol. [54]. Pracovníci analyzovali v časových intervalech headspace prostor nad krájenou cibulí pomocí SPME-GC-MS, kdy pro SPME extrakci využili šedé vlákno. V měření po extrakci

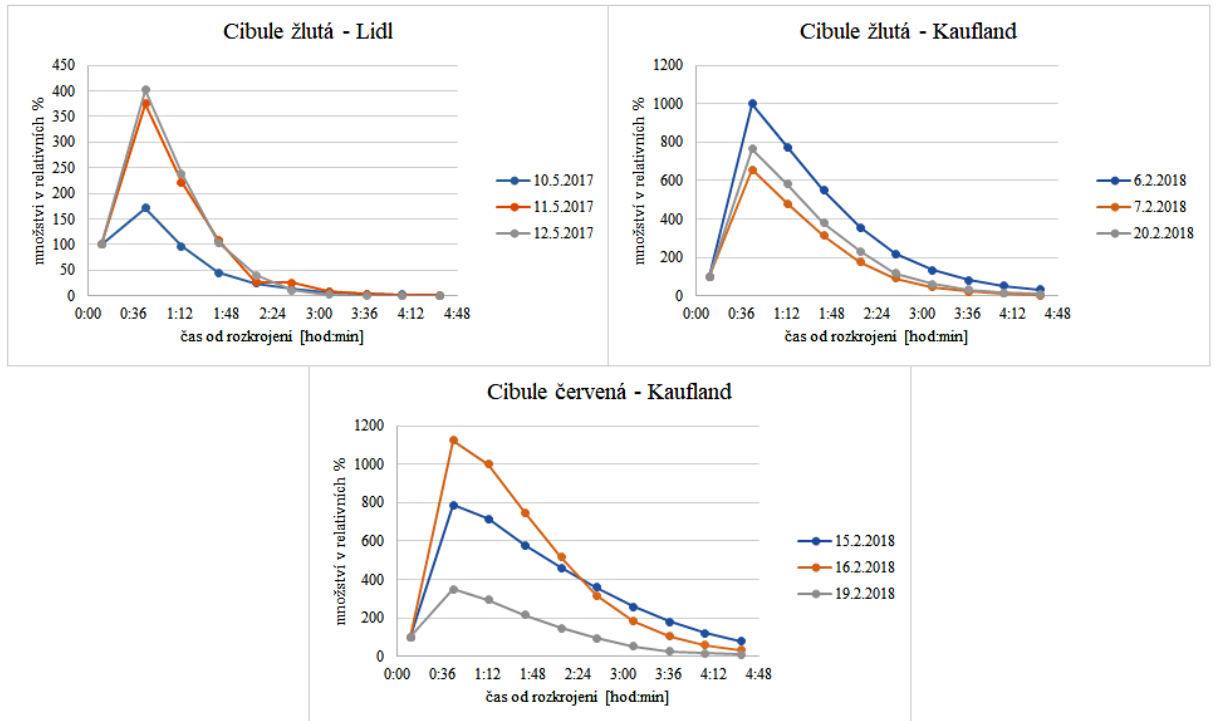
nad vzorkem během první minuty od rozkrojení cibule shodně uvádějí přítomnost především thiopropanal S-oxidu a také malé množství diprop(en)ylsulfidů. Po hodině od prvního rozkrojení byly v této studii přítomny produkty degradace thiopropanal S-oxidu, jako je 2-methyl-2-pentenal a různé (di)sulfidy, což se shoduje s našimi výsledky. Shoda s naší prací je také v relativním množství dipropyldisulfidu, kdy studie uvedla, že po 90 minutách je headspace nad cibulí nejbohatší právě na dipropyldisulfid. V této studii byly detekovány methylprop(en)ylsulfidy a vyskytovaly se poté, kdy bylo v headspace nad vzorkem přítomno velké množství diprop(en)ylsulfidů. To je v souladu s biochemickou transformací, kdy bylo prokázáno, že enzym alliináza preferuje prekurzory obsahující prop(en)yl, takže těkavé látky obsahující methylové skupiny se objeví později. Toto tvrzení naše studie potvrzuje, methylpropyldisulfid a (E)-1-methyl-2-(prop-1-en-1-yl)disulfid byly v největším množství ve druhém (45 minut od nakrájení) a třetím měření (75 minut od nakrájení). S touto diplomovou prací se studie rozchází v detekci tetrasulfidů, při našich experimentech nebyly nalezeny v žádném měření. Dále byl shodně nalezen dimethylthiofen a uvádějí, že tato sloučenina je produktem přeskupení di-1-propenyldisulfidu. Ve studii Järvenpää a kol. [54] byl také proveden pokus, kdy byla nakrájená cibule ponořena do vody a analyzována přímým SPME a HS-SPME nad vodným vzorkem. Bylo zjištěno, že celkové množství těkavých látek nalezených v headspace je vyšší než ve vodných vzorcích. Jediná sloučenina, která měla větší plochu píku při přímém SPME vzorkování, byl thiopropanal S-oxid, nicméně při headspace analýze čerstvé cibule se plocha píku asi 4krát zvětšila, což nasvědčuje tomu, že se tato látka uvolňuje na vzduchu rychleji než ve vodném vzorku. Thiopropanal S-oxid je stabilizován vyšší rozpustností a nižší těkavostí, což může být způsobeno vodíkovým spojením. Absence aldehydů v headspace vodných vzorků také podporuje toto vysvětlení. Tento experiment by mohl být vysvětlením, proč tolik neslžíme při krájení cibule, pokud si namočíme nůž do vody.

Propanthiol měl ve všech 3 vzorcích téměř totožný profil uvolňování po rozkrojení vzorku, viz obrázek 19. Během 45 minut se dostal na maximální koncentraci a poté začalo množství ubývat, v některých vzorcích se nacházel i po necelých 5 hodinách v detekovatelné koncentraci.



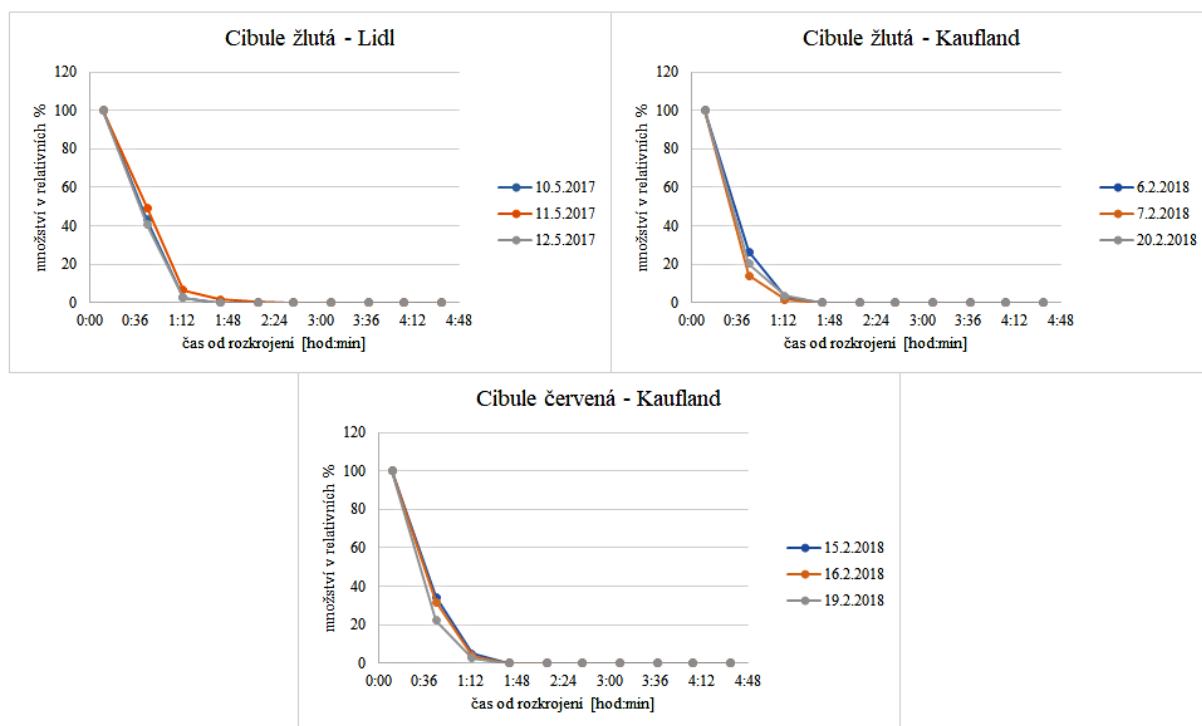
Obrázek 19: Závislost relativního množství uvolňovaného propanthiolu na čase

Dipropyldisulfid se do maxima své koncentrace v headspace prostoru nad krájenou cibulí dostal po 45 minutách od rozkrojení. Poté následoval prudký pokles a po cca 4 hodinách od rozkrojení klesla jeho koncentrace pod mez detekce, jak je znázorněno na obrázku 20.



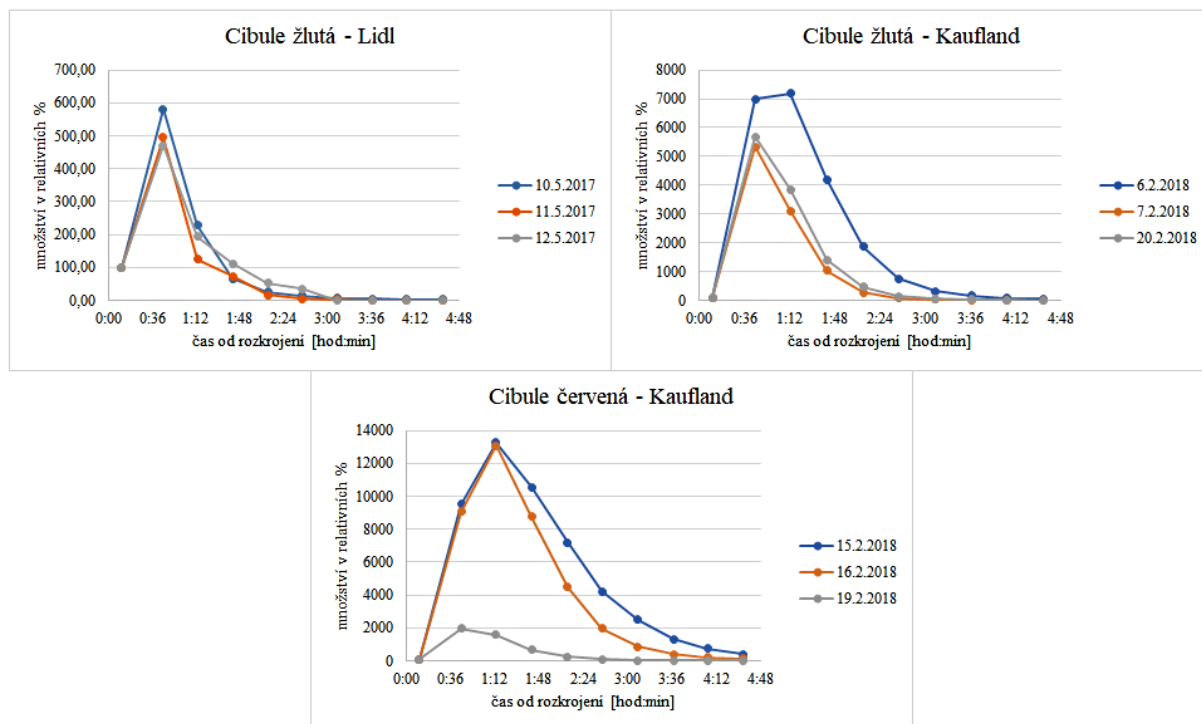
Obrázek 20: Závislost relativního množství uvolňovaného dipropyldisulfidu na čase

Sloučenina 1-((E)-prop-1-en-1-yl)-2-((Z)-prop-1-en-1-yl)disulfid měla jako jediná svoje maximum v prvním měření každé sekvence, tedy v prvních 10 minutách od nakrájení. Jeho koncentrace ve druhém měření prudce klesla, ve třetím a čtvrtém měření bylo množství této látky pod mezí detekce. Profil uvolňování 1-((E)-prop-1-en-1-yl)-2-((Z)-prop-1-en-1-yl)disulfidu je zobrazen na obrázku 21.



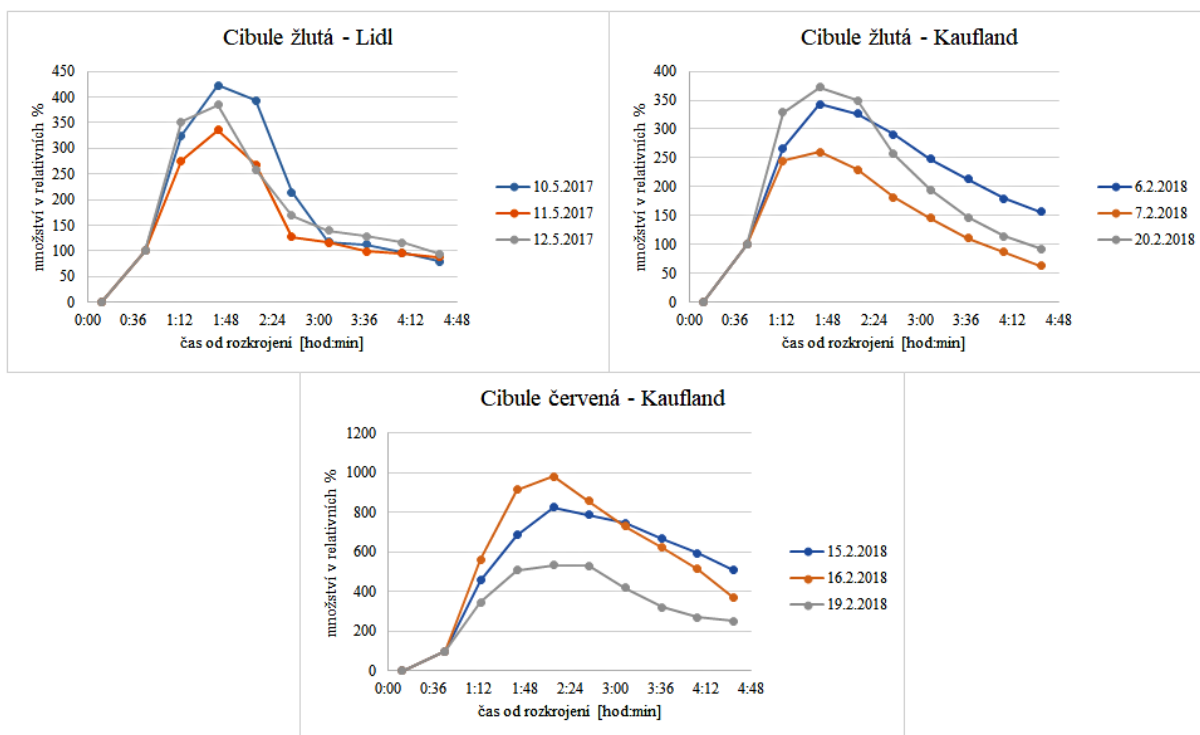
Obrázek 21: Závislost relativního množství uvolňovaného 1-((E)-Prop-1-en-1-yl)-2-((Z)-prop-1-en-1-yl)disulfidu na čase

Závislost uvolňování dipropyltrisulfidu ze vzorku po nakrájení je zobrazena na obrázku 22, a je patrné, že se v některých měřeních poněkud liší. Ve žluté cibuli z Lidlu byl detekován již v prvním měření každé sekvence, zatímco ve žluté a červené cibuli z Kauflandu se v prvních měřeních na chromatogramu pík této látky vůbec nenacházel. Ve žluté cibuli měl svojí maximální koncentraci po 45 minutách od rozkrojení, která pak postupně klesala, zatímco v červené cibuli bylo nalezeno maximální množství až ve třetím měření, tedy po hodině a čtvrt od rozkrojení vzorku cibule.



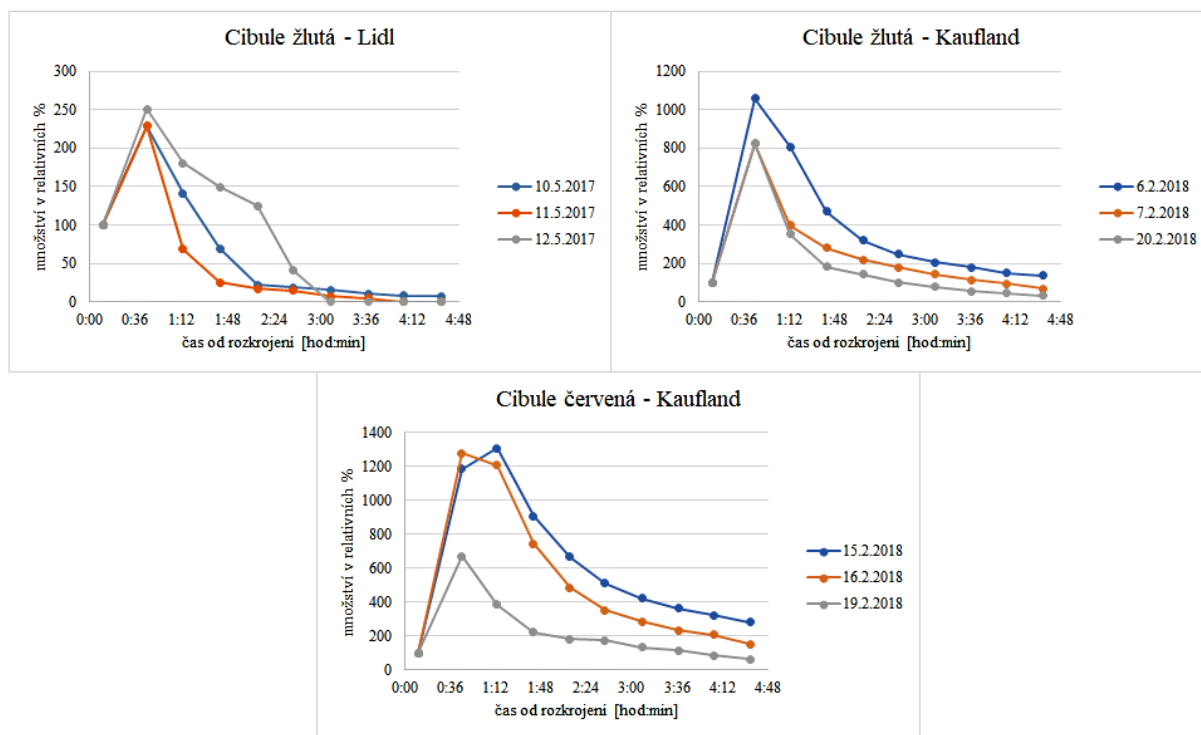
Obrázek 22: Závislost relativního množství uvolňovaného dipropyltrisulfidu na čase

(Z)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfid měl ve všech 3 vzorcích téměř shodný průběh uvolňování, což je vidět na obrázku 23. V prvním měření každé sekvence byla u této látky koncentrace pod mezí detekce, potom následuje postupný nárůst uvolňovaného množství, které dosáhlo maxima po hodině a tři čtvrtě. Množství této sloučeniny se jako jediné i po 4 hodinách od rozkrojení cibule pohybovalo kolem 100 % prvního detekovaného množství a ani po 4,5 hodinách nekleslo pod tuto mez.



Obrázek 23: Závislost relativního množství uvolňovaného (Z)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu na čase

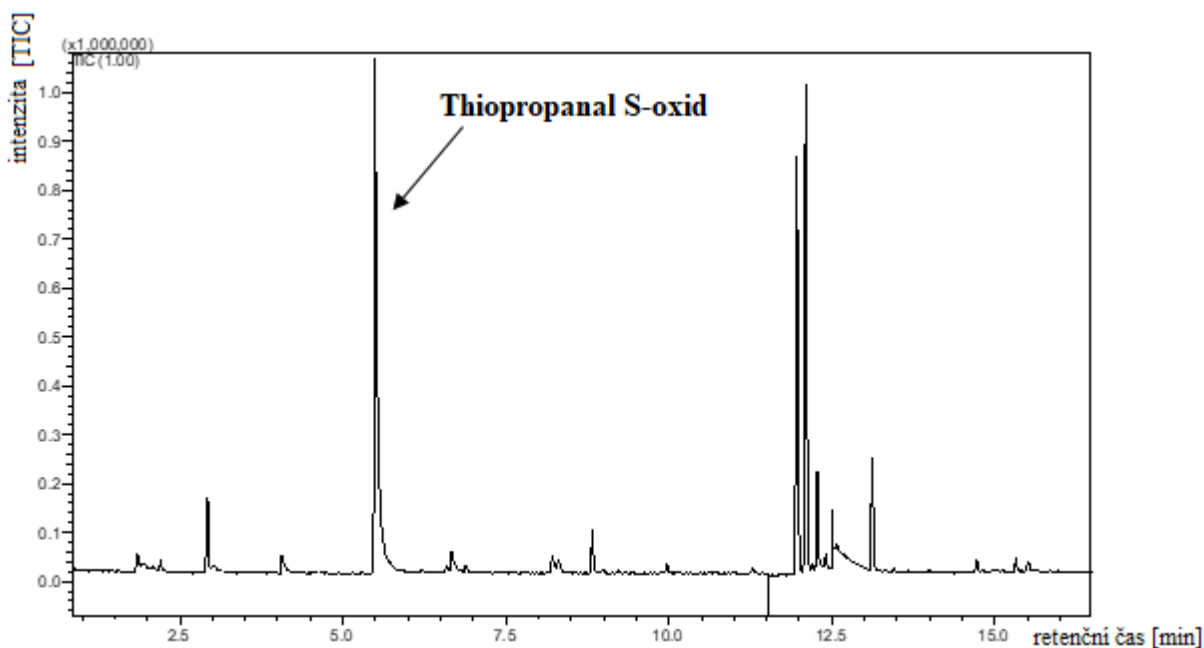
Průběh uvolňování (E)-1-(prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu není zcela jednotných pro všechna měření. U vzorku žluté cibule došlo po cca 3 hodinách k poklesu množství až pod mez detekce, zatímco ve vzorku žluté a červené cibule z Kauflandu se i po 4,5 hodinách od rozkrojení byla nalezená malá koncentrace této látky. První minuty od rozkrojení jsou u všech vzorků prakticky totožné, pouze relativní množství se liší. Závislost uvolňování (E)-1-(prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu v čase od rozkrojení cibule je zobrazeno na obrázku 24.



Obrázek 24: Závislost relativního množství uvolňovaného (E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfidu na čase

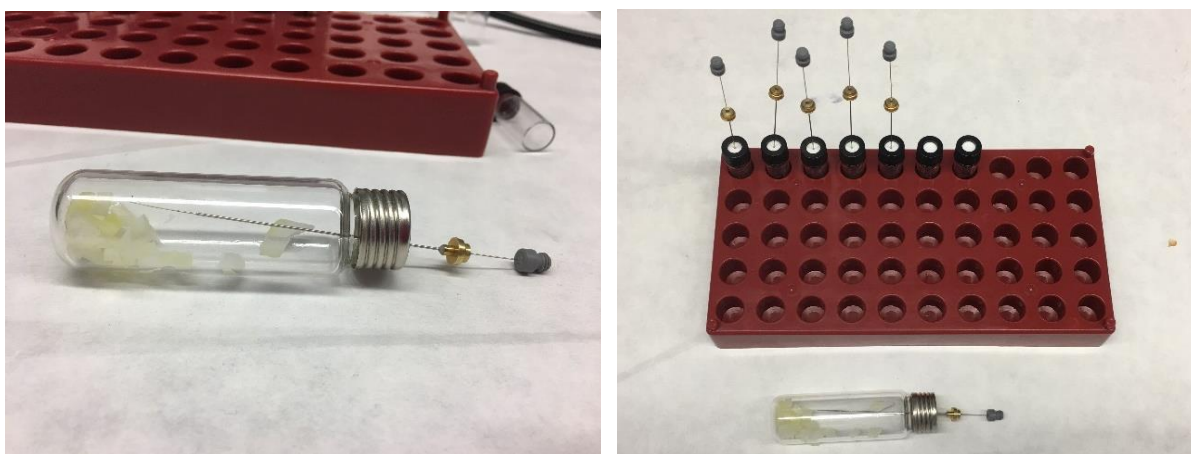
3.1.2. Thiopropanal S-oxid

Nejzajímavější sloučeninou v cibuli je thiopropanal S-oxid. Dle studie [67], kde pracovníci používali olej extrahovaný z cibule a tuto látku stanovovali pomocí tenkovrstvé chromatografie, dosáhne jeho koncentrace maxima během 2 minut od narušení buněčné tkáně a poté dochází k rychlému úbytku. Toto tvrzení naše studie zpočátku potvrdila, kdy při rozkrájení cibule a okamžité SPME extrakci, která trvala 10 minut, byl v každé sekvenci při první chromatografické analýze nalezen pík odpovídající právě thiopropanal S-oxidu, zatímco v následujících analýzách se již nenacházel. Chromatogram s píkem odpovídajícím thiopropanal S-oxidu je na obrázku 25.



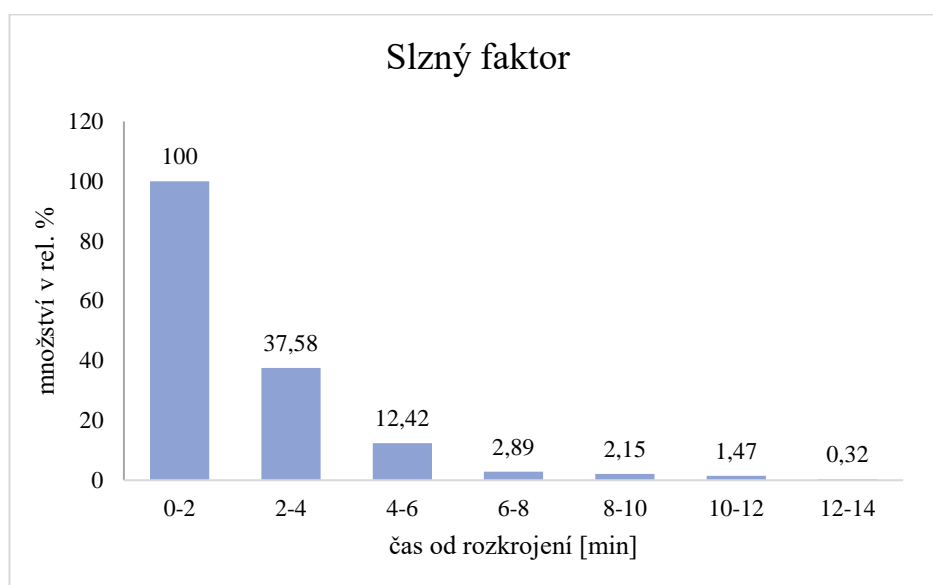
Obrázek 25: Chromatogram vzorku cibule při první analýze

Z tohoto důvodu část experimentů byla zaměřena pouze na tuto sloučeninu a její uvolňování. Pomocí 7 extrakčních vláken byl extrahován thiopropanal S-oxid v prvních minutách jeho uvolňování. Vlákná byla před provedením pokusu kondicionována po dobu 20 minut při teplotě 250 °C. Byly provedeny dvě sekvence analýz. Při první sekvenci byla doba extrakce 2 minuty na jedno SPME vlákno až do 14 minut od prvního rozkrojení vzorku cibule. Při druhé se doba extrakce zkrátila, a to na půl minuty, aby byl zjištěn co nejpřesnější průběh uvolňování při prvních dvou minutách. Analýzy extraktů byly provedeny pomocí plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem. Doba analýzy byla 12 minut. Experimentální uspořádání při extrakcích je na obrázku 26.

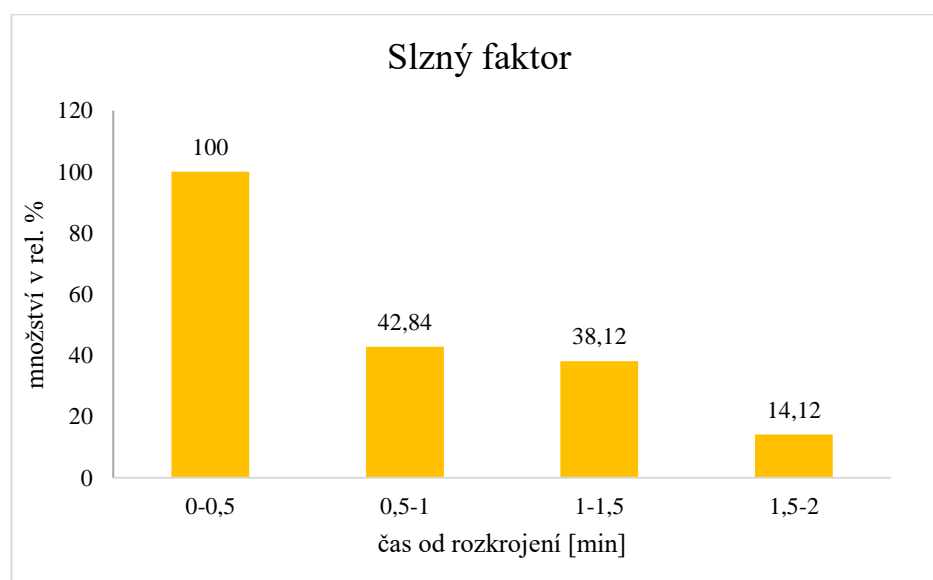


Obrázek 26: Experimentální uspořádání extrakce při sledování uvolňování slzného faktoru

Vyhodnocení dat proběhlo stejně jako při měření všech těkavých látek uvolňovaných z cibule, (viz stanovení propanalu, kapitola 3.1.1.). Grafické vyhodnocení uvolňování slzného faktoru při prvním experimentu je zobrazeno na obrázku 27, druhý experiment zaměřený na první 2 minuty uvolňování je na obrázku 28. Doba v grafech je počítána od prvního zasunutí vlákna do headspace nádoby s nakrájeným vzorkem, čas od prvního nakrájení a začátku první extrakce se pohyboval mezi 10-15 sekundami.



Obrázek 27: Graf znázorňující závislost množství uvolňovaného thiopropanal S-oxidu v závislosti na čase od rozkrojení cibule během prvních 14 minut



Obrázek 28: Graf znázorňující závislost množství uvolňovaného thiopropanal S-oxidu v závislosti na čase od rozkrojení cibule během prvních 2 minut

Z vyhodnocených dat lze prohlásit, že k maximálnímu uvolňování slzného faktoru (thiopropanal S-oxidu) dochází při první půl minutě od rozříznutí cibule, zatímco po 14 minutách je nalezeno už jen velmi malé množství. Experimentálně zjištěné výsledky nemohou být porovnány s publikovanými daty, jelikož v literárních zdrojích nebyla nalezena žádná podobná studie zaměřující se na kinetiku slzného faktoru.

3.2. Sledování antimikrobiální aktivity

Je známo, že cibule má značnou antimikrobiální aktivitu, proto i součástí této práce je studium antimikrobiálních vlastností cibulové šťávy. Pro obecný přehled bylo zvoleno základní spektrum 5 mikroorganismů (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*). Na základě studie [63] byly přidány další 2 mikroorganismy *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. *Arcobacter butzleri* byl do studie zařazen pro podobnost s *Helicobacterem pylori*, se kterým nebyla v našich podmínkách možnost pracovat, kvůli jeho nebezpečnosti a velkému potencionálnímu riziku nákazy. Použité kmeny mikroorganismů, včetně jejich popisu a barvení podle Grama, jsou uvedeny v tabulce 4. Pozitivní kontrola byla prováděna u každého mikroorganismu pomocí antibiotických disků, viz obrázek 29. Použitá antibiotika a průměry inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce 5.

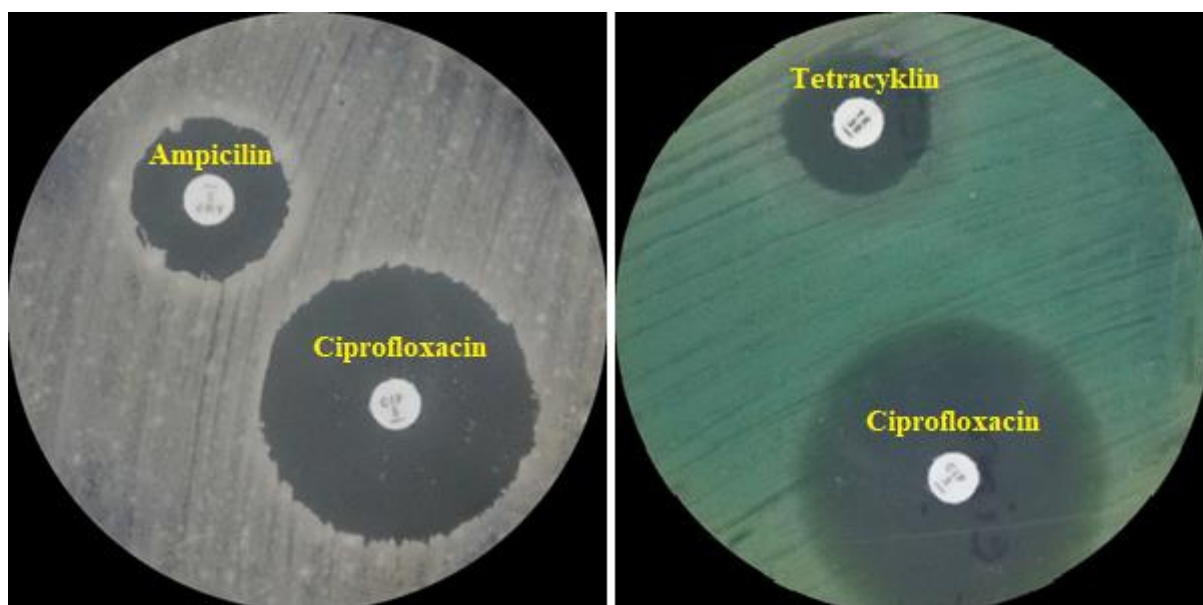
Tabulka 4: Popis použitých mikroorganismů pro sledování antimikrobiální aktivity cibule

Mikroorganismus	Popis	Barvení podle Grama
<i>Arcobacter butzleri</i>	CCUG 30484	negativní
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2215	pozitivní
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 2215	pozitivní
<i>Candida albicans</i>	CCM 8215	pozitivní
<i>Enterococcus faecalis</i>	klinický izolát NPK, bez čísla	pozitivní
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954	negativní
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	negativní
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223	pozitivní

Tabulka 5: Velikost inhičních zón u použitých antibiotik

	Antibiotikum - šířka zóny [mm]				
	Ciprofloxacin	Ampicilin	Clindamycin	Tetracyklin	Fluconazol
<i>Arcobacter butzleri</i>	x	x	11,5	20,5	x
<i>Bacillus cereus</i>	35	20	x	x	x
<i>Bacillus subtilis</i>	26	7	x	x	x
<i>Candida albicans</i>	x	x	x	x	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	21	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	36	0	x	x	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36	x	x	19	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	34	x	x	23	x

Pozn.: symbol x znamená, že u daného mikroorganismu nebylo provedeno testování na antibiotikum



Obrázek 29: Pozitivní kontrola pomocí antibiotických disků u kmene *B. subtilis* (vlevo) a *Ps. aeruginosa* (vpravo)

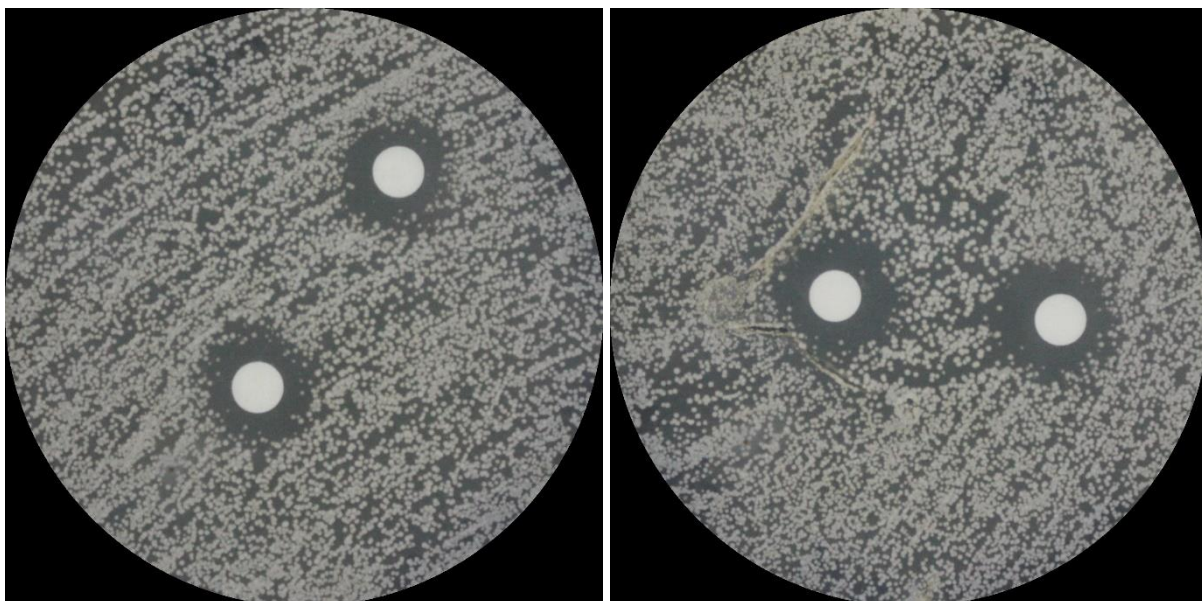
3.2.1. Disková difúzní metoda

Výsledky experimentu, kde byla použita disková difúzní metoda, jsou shrnuty v tabulce 6. Šířka zón je uvedena včetně použitého disku, který měl průměr 6 mm.

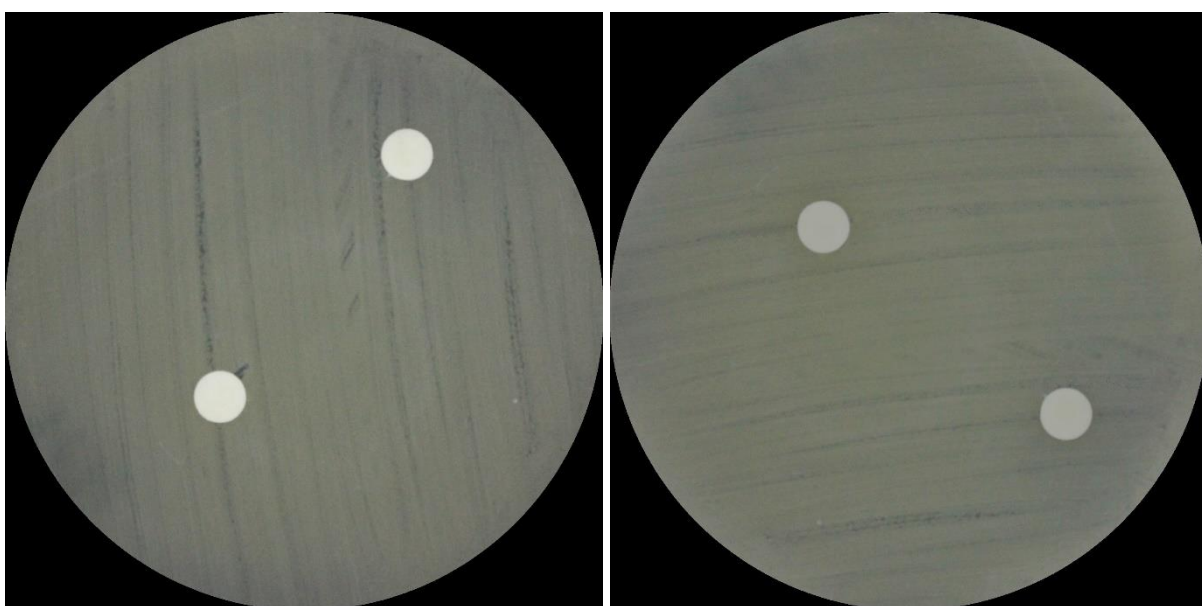
Tabulka 6: Velikost inhibičních zón vzorků cibule při využití diskové difúzní metody

Mikroorganismus	Šířka inhibičních zón [mm]	
	žlutá cibule	červená cibule
<i>Arcobacter butzleri</i>	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Candida albicans</i>	11 ± 0,8	14,3 ± 1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0
<i>Escherichia Coli</i>	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že při použití diskové difúzní metody v našich experimentálních podmínkách nemá cibulová šťáva inhibiční účinky na většinu mikroorganismů. Jediné inhibiční zóny se objevily u kvasinky, kde u červené cibule byla inhibiční zóna větší než u žluté, což potvrzují i informace z literatury [2; 5], kde je uvedeno, že větší antimikrobiální účinky má červená cibule. Počet studií pracujících s čerstvou cibulovou šťávou je omezený, proto budou dále uvedeny i ty studie, které pracovaly s cibulí zpracovanou jinými metodami. Na obrázku 30 je viditelná inhibiční zóna kmene *C. albicans* jak u vzorku žluté, tak i červené cibule, zatímco na obrázku 31 nemá *E. coli* patrnou žádnou inhibiční zónu v obou vzorcích.



Obrázek 30: Inhibiční zóna kmene *Candida albicans* u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo)



Obrázek 31: Kmen *E. coli* bez inhibiční zóny u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo)

Oprean a kol. [62] ve své studii použili diskovou difúzní metody při testování antimikrobiálních vlastností kapalného extraktu cibule proti *E. coli* a *S. aureus*. I přes rozdílné podmínky experimentu, kdy na disk aplikovali 20 μ l extraktu a mikroorganismy inkubovali 78 hodin, se s naší studií shodují, na Petriho misce s *E. coli* a *S. aureus* nebyla pozorována žádná inhibiční zóna. Benkeblia [68] při experimentu používal esenciální olej získaný parní

destilací vzorků různých odrůd cibule a v různých koncentracích dávkovaných na disk. Použil kmen *S. aureus*, na který měly esenciální oleje z různých druhů cibulí inhibiční účinky, se vzrůstající koncentrací vzrůstala šířka inhibiční zóny. Esenciální oleje jsou vysoce koncentrované směsi silic, z nichž řada má antimikrobiální účinky, pravděpodobně proto se v jeho experimentu objevily inhibiční zóny na rozdíl od naší studie. Chun-Lin a kol. [69] se s naší studií shodují ve 3 použitých mikroorganismech a to *E. coli*, *S. aureus* a *B. subtilis*. Na disk bylo dávkováno 100 µl esenciálního oleje o koncentraci 150 mg/ml. U všech mikroorganismů byla viditelná inhibiční zóna. Rozdílnost s naší studií je způsobena rozdílným zpracováním vzorku cibule. Santas a kol. [70] testovali antimikrobiální vlastnosti lyofilizovaných vzorků cibule extrahovaných ethylacetátem. Pracovníci používali kmeny *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Nepřítomnost inhibiční zóny u kmenu *E. coli* a *Ps. aeruginosa* se shoduje s naší studií. Mimoto byla uvedena pozitivní inhibice u kmenů *S. aureus* a *B. cereus* a naopak chyběla inhibiční zóna u kvasinky, což nekoreluje s naší studií. Nepřítomnost inhibiční zóny u kmene *C. albicans* je možné zdůvodnit tím, že během extrakce a tepelné úpravy mohly být degradovány ty látky, které mají antimikrobiální účinky na tento kmen.

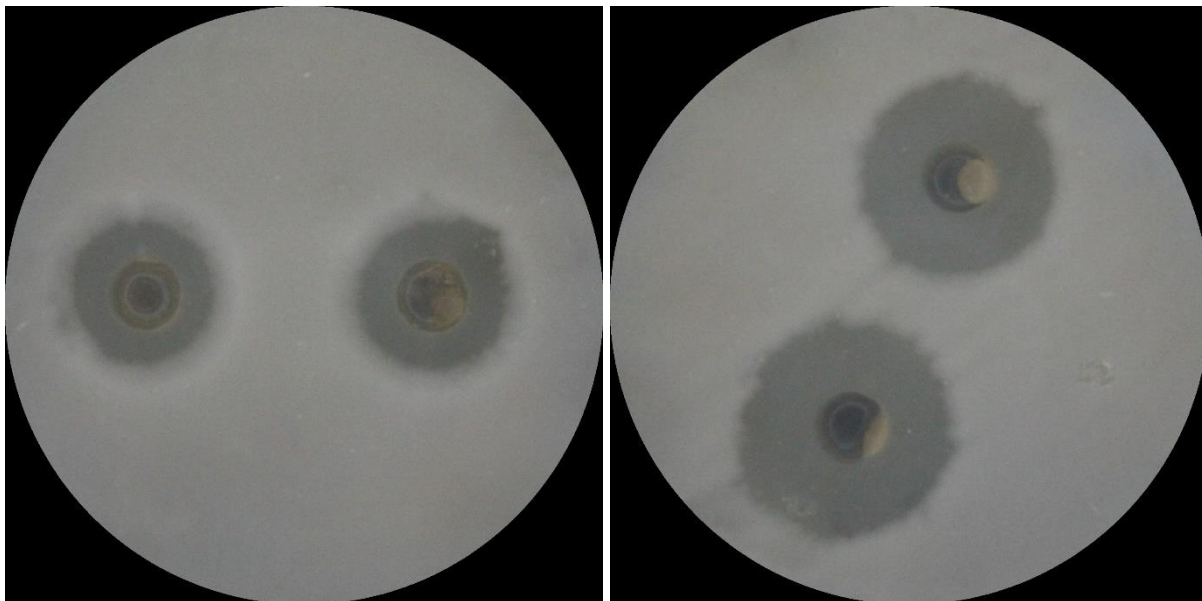
3.2.2. Jamková difúzní metoda

Výsledky experimentu, kde byla použita jamková difúzní metoda jsou uvedeny v tabulce 7. Šířka zón je uvedena včetně jamky, která měla průměr 10 mm.

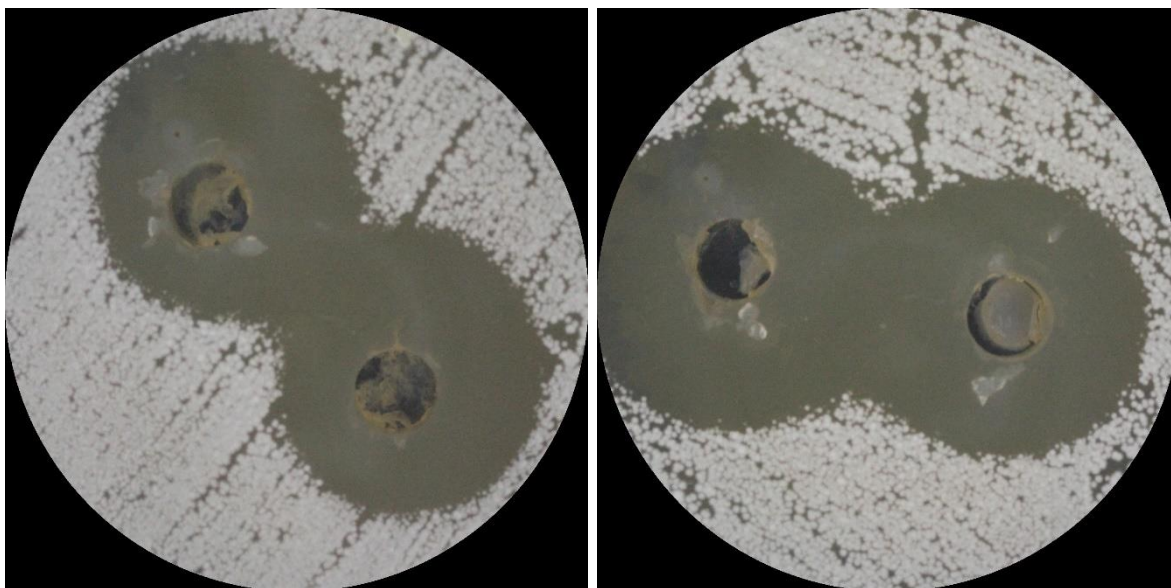
Tabulka7: Velikost inhibičních zón vzorků cibule při využití jamkové difúzní metody

Mikroorganismus	Šířka inhibičních zón [mm]	
	žlutá cibule	červená cibule
<i>Arcobacter butzleri</i>	18 ± 2	22,5 ± 2,4
<i>Bacillus cereus</i>	18,5 ± 0,6	24 ± 2,5
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Candida albicans</i>	34,8 ± 1,3	36,8 ± 2,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	18,3 ± 1	20,3 ± 0,5
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 ± 0,8	22 ± 0,8

Výsledky tohoto experimentu byly poněkud pestřejší než u diskové difúzní metody. U kmene *B. subtilis*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa* nebyly pozorovány žádné inhibiční zóny při testování šťávy z červené a žluté cibule. Na ostatní mikroorganismy měla šťáva inhibiční účinky. I touto metodou se potvrdilo, že červená cibule má vyšší antibakteriální aktivitu než žlutá, jak je zřetelně vidět na obrázku 32. Největší antimikrobiální účinky má cibulová šťáva bezpochyby na kmen *C. albicans*, kdy inhibiční zóny byly opravdu markantní, jak je viditelné na obrázku 33.



Obrázek 32: Inhibiční zóny kmene *B. cereus* při použití jamkové difúzní metody u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo)



Obrázek 33: Inhibiční zóny kmene *C. albicans* při použití jamkové difúzní metody u vzorku žluté cibule (vlevo) a červené cibule (vpravo)

Oprean a kol. [62] ve své studii používali také jamkovou difúzní metodou. Testovali kmeny *S.aureus* a *E. coli* a jako antimikrobiální látku použili tekutý extrakt z cibule. Pracovníci dané mikroorganismy inkubovali 48 hodin. S naší studií se shodují pouze ve výsledcích kmene *S. aureus*, kdy šířka inhibiční zóny byla prakticky totožná s velikostí inhibiční zóny v našem experimentu. V této studii vykazovala cibulová šťáva antimikrobiální účinky i na *E. coli*, což se s našimi výsledky neshoduje. Kivanç a kol. [63] zkoumali účinky čerstvé cibulové šťávy aplikované do jamky o průměru 8 mm. Kmeny testované v této studii shodně s naší studií jsou: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Výsledky experimentu se od naší práce liší, v této studii antimikrobiální účinky vykazovala cibulová šťáva pouze u kmenů *B.cereus*, *B.subtilis* a *E. faecalis*. Mishra a kol. [71] použili ve své studii kmeny *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* při testování vodného a alkoholického extraktu z krájené cibule. U všech mikroorganismů byly patrné inhibiční zóny různých šířek. Při extrakcích se získá větší koncentrace látek ve výsledných extraktech, proto byly v této studii pozorovány inhibiční účinky u všech testovaných mikroorganismů. Corzo-Martínez v literatuře [18] uvádí, že cibule na rozdíl od česneku není účinná proti gramnegativním bakteriím. Toto tvrzení naše studie vyvrací, při použití jamkové difúzní metody byla zřetelná inhibiční zóna u *Arcobactera butzleri*, což je gramnegativní kmen. Jamková difúzní metoda není příliš používaná při studiu antimikrobiálních aktivit, tudíž i studií využívajících tuto metodu není mnoho.

4. ZÁVĚR

Cílem práce bylo napsat literární rešerši o látkách uvolňujících se při krájení cibule, popsat metodiku mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem a pomocí ní následně zachytit a identifikovat těkavé látky uvolňované z rozkrojené cibule. Dále otestovat antimikrobiální vlastnosti cibulové šťávy na různé mikroorganismy.

V teoretické části jsou popsány těkavé látky uvolňující se z cibule, mezi které patří organosírné látky, ale také aldehydy a alkoholy. Dále jsou zmíněné netěkavé látky obsažené v cibuli, což jsou saponiny a flavonoidy. Jsou popsány různé biologické účinky cibule, které přináší zdravotní benefity pro konzumenty. Mezi hlavní zmiňované účinky se řadí antimikrobiální aktivita cibule. Teoretická část obsahuje i kapitoly zabývající se instrumentálními metodami stanovení, jež zahrnují SPME extrakci, plynovou chromatografií, hmotnostní spektrometrií a také jejich spojení (SPME-GC-MS). Experimentální část byla rozdělena do dvou oddílů, první oddíl byl zaměřený pouze na těkavé látky uvolňované při krájení cibule, analyzované pomocí SPME-GC-MS. Po prvotních měřeních byly analytické podmínky optimalizovány a byly provedeny série měření na třech různých vzorcích cibule. Při sledování uvolňování slzného faktoru bylo zjištěno, že největší množství této látky se uvolní během první půl minuty od rozkrojení cibule. V dalších experimentech byly sledovány profily těkavých látek z parního prostoru nad rozkrájeným vzorkem. Byly detekovány především disulfidy a trisulfidy. Relativní množství těchto látek mělo povětšinou během první hodiny od rozkrojení stoupající charakter a poté začala koncentrace s časem klesat, někdy se dostala i pod detekovatelnou hladinu. Byly detekovány také píky propanalu a 1-propanolu a byla popsána jejich vzájemná přeměna. Ve druhém oddílu experimentální části byly zkoumány antimikrobiální účinky šťávy z čerstvě nastrouhané cibule. Celkem bylo testováno 8 mikroorganismů, pomocí diskové difúzní a jamkové difúzní metody. Jako zcela rezistentní proti cibulové šťávě se ukázaly *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis*, ostatní mikroorganismy vykazovaly inhibiční zóny při použití jamkové metody a *Candida albicans* jako jediná i při diskové difúzní metodě.

5. LITERATURA

- [1] SULERIA, H. A. R. et al. Onion: Nature Protection Against Physiological Threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, **55**(1), 50-66 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1080/10408398.2011.646364. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.646364>.
- [2] MALÝ, Ivan. *Pěstujeme cibuli, česnek, hrách a další cibulové a luskové zeleniny*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0635-0.
- [3] HARAGSIM, Oldřich. *Včelařské byliny*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2008. ISBN 978-80-247-6478-8.
- [4] ŠTĚPÁNKOVÁ, Jitka, Jindřich CHRTEK a Zdeněk KAPLAN. *Květena České republiky*. 1. vyd. Praha: Academia, 1988-2011. ISBN 978-80-200-1824-3.
- [5] ŠAPIRO D.K. a kol. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. 1. vyd. Praha: SZN, 1988. ISBN 5786004317.
- [6] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha: Eminent, 1994. ISBN 80-85876-02-7.
- [7] BAHRAM-PARVAR, M., L.T. LIM. Fresh-Cut Onion: A Review on Processing, Health Benefits, and Shelf-Life. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2018, **17**(2), 290-308 [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1111/1541-4337.12331. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12331>.
- [8] KAMATA, Y. et al. Changes in trans-S-1-Propenyl-l cysteine Sulfoxide and Related Sulfur-Containing Amino Acids during Onion Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2016, **64**(47), 9063-9071 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04073. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b04073>.
- [9] LIGUORI, L. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Five White Onion (*Allium cepa* L.) Landraces. *Journal of Food Quality* [online]. 2017, **2017**, 1-9

- [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1155/2017/6873651. ISSN 0146-9428. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/6873651/>.
- [10] GĪTIN, L. et al. Sulfur compounds identification and quantification from *Allium* spp. fresh leaves. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2014, **22**(4), 425-430 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.04.002. ISSN 10219498. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000544>.
- [11] KYUNG, K. H., Y. C. LEE. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*. *Food Reviews International* [online]. 2001, **17**(2), 183-198 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1081/FRI-100000268. ISSN 8755-9129. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100000268>
- [12] LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2015, **82**, 1-11 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.fct.2015.04.027. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515001441>.
- [13] AVICENNA COMPANY, SPOL. S. R. O. HERBÁLNÍ PŘÍPRAVKY [online]. [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/item/allium-cepa-cibule-kuchynska>.
- [14] LANZOTTI, Virginia. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1112**, 3-22 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.016. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305024064>
- [15] WHITAKER, J. R. Development of Flavor, Odor, and Pungency in Onion and Garlic. *Advances in Food Research* [online]. 1976, **22**, 73-133 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/S0065-2628(08)60337-7. ISBN 9780120164226. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065262808603377>.
- [16] NATIONAL ONION ASSOCIATION. *Onions - Phytochemical and Health Research* [online]. Greeley, Colorado, 2011, 1-24 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: <https://www.onions-usa.org/all-about-onions/onion-health-research>.

- [17] GRIFFITHS, G. et al. Onions-A global benefit to health. *Phytotherapy Research* [online]. 2002, **16**(7), 603-615 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1002/ptr.1222. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1222>.
- [18] CORZO-MARTÍNEZ, M., N. CORZO, M. VILLAMIEL. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2007, **18**(12), 609-625 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.07.011. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407002282>.
- [19] BISEN, S. P., M. EMERALD. Nutritional and Therapeutic Potential of Garlic and Onion (*Allium* sp.). *Current Nutrition & Food Science* [online]. 2016, **12**(3), 190-199 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.2174/1573401312666160608121954. ISSN 15734013. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4013&volume=12&issue=3&spage=190>.
- [20] SOTO, V.C., R.E. GONZÁLEZ, M.M. SANCE, C.R. GALMARINI. Organosulfur and phenolic content of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) and its relationship with antioxidant activity. *Acta Horticulturae* [online]. 2016, **1143**, 277-290 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1143.39. ISSN 0567-7572. Dostupné z: https://www.actahort.org/books/1143/1143_39.htm.
- [21] DE VRIES, J. H. et al. Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1998, **68**(1), 60-65 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1093/ajcn/68.1.60. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/68/1/60-65/4666041>
- [22] LANZOTTI, V. et al. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* [online]. 2012, **74**, 133-139 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.11.008. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942211004948>.
- [23] BOELEN, M. et al. Volatile flavor compounds from onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1971, **19**(5), 984-991 [cit. 2018-04-03]. DOI:

10.1021/jf60177a031. ISSN 0021-8561. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60177a031>.

- [24] BLOCK, Eric. The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1992, **31**(9), 1135-1178 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1002/anie.199211351. ISSN 0570-0833. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.199211351>.
- [25] KUBEC, R., E. DADÁKOVÁ. Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1212**, 154-157 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.024. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308017718>.
- [26] KUBEC, R., M. SVOBODOVÁ, J. VELÍŠEK. Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some *Allium* Species. Identification of a New Flavor Precursor: S-Ethylcysteine Sulfoxide (Ethiin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, **48**(2), 428-433 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1021/jf990938f. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990938f>.
- [27] FRITSCH, R.,M. KEUSGEN. Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (*Alliaceae*). *Phytochemistry* [online]. 2006, **67**(11), 1127-1135 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.03.006. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206001518>.
- [28] RAMIREZ, D. A. et al. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2017, **61**, 4-19 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.09.012. ISSN 08891575. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157516301624>.
- [29] STARKENMANN, C., Y. NICLASS, M. TROCCAZ. Nonvolatile S-Alk(en)ylthio-l-cysteine Derivatives in Fresh Onion (*Allium cepa* L. Cultivar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, **59**(17), 9457-9465 [cit. 2018-04-02].

DOI: 10.1021/jf202082f. ISSN 0021-8561. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf202082f>.

- [30] KREST, I., J. GLODEK, M. KEUSGEN. Cysteine Sulfoxides and Alliinase Activity of Some *Allium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, **48**(8), 3753-3760. DOI: 10.1021/jf990521+. Dostupné z <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990521%2B?journalCode=jafcau>.
- [31] NICASTRO, H. L., S. A. ROSS, J. A. MILNER. Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer Prevention Research* [online]. 2015, **8**(3), 181-189 [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0172. ISSN 1940-6207. Dostupné z: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0172>.
- [32] CAVAGNARO, P. F. et al. Effect of Cooking on Garlic (*Allium sativum* L.) Antiplatelet Activity and Thiosulfinates Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, **55**(4), 1280-1288 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1021/jf062587s. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf062587s>.
- [33] WALL, M., J. N. CORGAN. Relationship between pyruvate analysis and flavor perception for onion pungency determination. *HortScience*. 1992, **27**(9), 1029-1030.
- [34] HE, Q. et al. First insights into the mode of action of a “lachrymatory factor synthase” - Implications for the mechanism of lachrymator formation in *Petiveria Alliacea*, *Allium cepa* and *Nectaroscordum* species. *Phytochemistry* [online]. 2011, **72**(16), 1939-1946 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.07.013. ISSN 00319422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942211003402>.
- [35] EADY, C. C. et al. Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 2008, **147**(4), 2096-2106 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1104/pp.108.123273. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.123273>.
- [36] MARTÍN-LAGOS, R. A., M. F. O. SERRANO, M. D. RUIZ-LÓPEZ. Comparative study by gas chromatography-mass spectrometry of methods for the extraction of sulfur

- compounds in *Allium cepa* L. *Food Chemistry* [online]. 1992, **44**(4), 305-308 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/0308-8146(92)90055-7. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814692900557>.
- [37] SATO, F., K. MATSUI. Engineering the biosynthesis of low molecular weight metabolites for quality traits (essential nutrients, health-promoting phytochemicals, volatiles, and aroma compounds). *Plant Biotechnology and Agriculture* [online]. 2012, 443-461 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/B978-0-12-381466-1.00028-6. ISBN 9780123814661. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123814661000286>
- [38] BRODNITZ, M. H., J. V. PASCALE. Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1971, **19**(2), 269-272 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1021/jf60174a009. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60174a009>.
- [39] KATO, M. et al. Production and characterization of tearless and non-pungent onion. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1-9 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1038/srep23779. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep23779>.
- [40] ARNAULT, I., N. MONDY, F. CADOUX, J. AUGER. Possible interest of various sample transfer techniques for fast gas chromatography–mass spectrometric analysis of true onion volatiles. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **896**, 117-124 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00365-4. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300003654>.
- [41] BLOCK, E., H. Z. SHU. Onion essential oil chemistry. Cis-and trans-2-mercapto-3,4-dimethyl 2,3-dihydrothiophene from pyrolysis of bis(1-propenyl) disulfide. *Tetrahedron Letters* [online]. 1990, **31**(35), 4999-5002 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)97788-8. ISSN 00404039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900977888>.
- [42] MUNDAY, R., C. M. MUNDAY. Induction of Phase II Enzymes by Aliphatic Sulfides Derived from Garlic and Onions: An Overview. *Quinones and Quinone Enzymes, Part B* [online]. 2004, **382**, 449-456 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/S0076-6879(04)82024-

- X. ISBN 9780121827861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007668790482024X>.
- [43] BIANCHINI, F., H. VAINIO. *Allium* Vegetables and Organosulfur Compounds: Do They Help Prevent Cancer?. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2001, **109**(9), 893- [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.2307/3454989. ISSN 00916765. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/3454989?origin=crossref>.
- [44] XIAO, H., K. L. PARKIN. Antioxidant Functions of Selected *Allium* Thiosulfinates and S -Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, **50**(9), 2488-2493 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1021/jf011137r. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011137r>.
- [45] RAMOS, F. A. et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of Quercetin Oxidation Products from Yellow Onion (*Allium cepa*) Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(10), 3551-3557 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1021/jf060251c. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf060251c>.
- [46] LE MARCHAND, L. et al. Intake of Flavonoids and Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2000, **92**(2), 154-160 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1093/jnci/92.2.154. ISSN 0027-8874. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/jnci/article/2964983/Intake>.
- [47] SHIN, S., J. CHOI, X. LI. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **313**, 144-149 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.028. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306000779>.
- [48] WU, C. et al. Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5). *FEBS Journal* [online]. 2005, **272**(18), 4725-4740 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04888.x. ISSN 1742-464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2005.04888.x>.

- [49] NISHIMURA, H. et al. Antioxidative activity and ameliorative effects of memory impairment of sulfur-containing compounds in *Allium* species. *BioFactors* [online]. 2006, **26**(2), 135-146 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1002/biof.5520260204. ISSN 09516433. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.5520260204>.
- [50] PRAGST, Fritz. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **388**(7), 1393-1414 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1007/s00216-007-1289-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1289-9>.
- [51] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické Listy*. Praha: Sigma Aldrich, s.r.o., 2002, **96**, 827-852.
- [52] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [53] PAWLISZYN, J., S. PEDERSEN-BJERGAARD. Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2006, **44**(6), 291-307 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1093/chromsci/44.6.291. ISSN 0021-9665. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/44.6.291>.
- [54] JÄRVENPÄÄ, E. P., Z. ZHANG, R. HUOPALAHTI, J. W. KING. Determination of fresh onion (*Allium cepa* L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* [online]. 1998, **207**(1), 39-43 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1007/s002170050292. ISSN 1431-4649. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050292>.
- [55] KREMR, D. et al. Using headspace solid-phase microextraction for comparison of volatile sulphur compounds of fresh plants belonging to families Alliaceae and Brassicaceae. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, **52**(9), 5727-5735 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1007/s13197-014-1660-8. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1660-8>.

- [56] SMOLKOVÁ, Eva. *Analýza látek v plynném stavu*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991. ISBN 80-0300604-x.
- [57] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1987. ISBN 55-714-82
- [58] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- [59] MICHAL HOLČAPEK – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V ORGANICKÉ ANALÝZE [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: (http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf).
- [60] MICHAL HOLČAPEK – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V ORGANICKÉ ANALÝZE [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojenci_MS_separace.pdf.
- [61] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie: 2.díl*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [62] OPREAN R. et al. Antimicrobial activity and thiosulfinates profile of a formulation based on *Allium cepa* L. extract. *Open Chemistry* [online]. 2017, **15**(1), 175-181 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1515/chem-2017-0021. ISSN 2391-5420. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/chem.2017.15.issue-1/chem-2017-0021/chem-2017-0021.xml>.
- [63] KIVANC, M., B. KUNDUHOĞLU. Antimicrobial activity of fresh plant juice on the growth of bacteria and yeasts. *Turecko*, 1997, 1-7.
- [64] THE HUMAN METABOLOME [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB33713>.
- [65] NIST WEBBOOK CHEMIE [online]. [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.

- [66] COLINA-COCA, C. et al. Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS GC–MS). *Talanta* [online]. 2013, **103**, 137-144 [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.10.022. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914012008429>.
- [67] LUKES, T. M. Thin-layer chromatography of cysteine derivates of onion flavor compounds and the lacrimatory factor. *Journal of Food Science* [online]. 1971, **36**(4), 662-664 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1971.tb15155.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1971.tb15155.x>.
- [68] BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2004, **37**(2), 263-268 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.lwt.2003.09.001. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643803001671>.
- [69] YE, C., D. DAI, W. HU. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* [online]. 2013, **30**(1), 48-53 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.07.033. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351200429X>.
- [70] SANTAS, J., M. P. ALMAJANO, R. CARBÓ. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2010, **45**(2), 403-409 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02169.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2009.02169.x>.
- [71] MISHRA, N., R. RAI, C. E. HAYAT. Antimicrobial and antioxidant activity of spinach, onion and radish leaves. *Indo American Journal of Pharmaceutical sciences* [online]. 2017, **4**(10), 3536-3544 [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <https://zenodo.org/record/1004693#.WuR-NohubIU>