

Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje glukozinolata u listu raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Marinović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:029987>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Iva Marinović

**RAZVOJ LC-MS/MS METODE ZA
ODREĐIVANJE
GLUKOZINOLATA U LISTU
RAŠTIKE (*Brassica oleracea* var.
acephala)**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za fenotipizaciju Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču pod komentorstvom dr. sc. Nikole Majora, v. znan. sur. te uz pomoć asistenta Tvrtka Karla Kovačevića, mag. ing. techn. aliment.

ZAHVALA

Zahvaljujem dr. sc. Nikoli Majoru, v. znan. sur., na stručnim savjetima, ukazanom povjerenju, ogromnom strpljenju, podršci, motivaciji i svakoj odgovorenoj poruci i pozivu, kao i Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču na pruženoj prilici i gostoprimstvu. Bio je užitak boraviti na Institutu i učiti od Vas!

Neizmjereno hvala izv. prof. dr. sc. Marini Krpan na mentorstvu i pruženoj prilici. Hvala Vam što ste uvijek tu za svoje studente, što nas motivirate, bodrite i nesebično dijelite Vaše znanje.

Hvala mojim prijateljima, posebice Luci, Nini, Jeleni, Leoni i Matteu, koji su mi uljepšali studiranje i obogatili moj život.

Posebno hvala mome Antoniu koji uvijek vjeruje u mene! Hvala ti što me svakodnevno motiviraš, ohrabruješ, nasmijavaš i činiš boljom.

Za kraj, najveće hvala mojoj obitelji, mojim najvećim osloncima; mami Nevenki, tati Ratku, sestri Matei i nećaku Leonu. Bez Vas ne bih bila tu gdje jesam! Volim Vas!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

RAZVOJ LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE GLUKOZINOLATA U LISTU RAŠTIKE
(*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Iva Marinović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213618

Sažetak: Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže sumpor, a u najvećoj su količini zastupljeni u vrstama iz porodice kupusnjača. Cilj ovoga rada bio je razviti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) za određivanje pojedinih glukozinolata te primijeniti istu na analizu glukozinolata u listu raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Identificirano je i kvantificirano 14 glukozinolata; osam alifatskih, tri indolna i tri aromatska glukozinolata u šest različitih primki raštike. Prosječna koncentracija ukupnih glukozinolata kretala se između 8741 mg/kg suhe tvari do 4771 mg/kg suhe tvari. Najzastupljeniji glukozinolati bili su glukoiiberin, glukobrasicin i sinigrin, dok su glukozinolati s najnižim zabilježenim koncentracijama bili glukotropeolin, epiprogoitrin i glukolimnantin.

Ključne riječi: LC-MS/MS, ciljane analize, ionizacija elektroraspršenjem, glukozinolati, *Brassica oleracea* var. *acephala*

Rad sadrži: 50 stranica, 26 slika, 8 tablica, 93 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Komentor: dr. sc. Nikola Major, v. znan. sur., Institut za poljoprivredu i turizam

Pomoć pri izradi: Tvrtko Karlo Kovačević, mag. ing. techn. aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Mirjana Hruškar (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (mentor)
3. dr. sc. Nikola Major, v. znan. sur. IPTPO (član)
4. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjenski član)

Datum obrane: 20. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

DEVELOPMENT OF LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF GLUCOSINOLATES IN
KALE LEAF (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Iva Marinović, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058213618

Abstract: Glucosinolates are sulfur-containing plant secondary metabolites that are mostly present in *Brassicaceae*. The aim of this study was to develop a method of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination of glucosinolates and apply it to the determination of glucosinolates in kale leaf (*Brassica oleracea* var. *acephala*). A total of 14 glucosinolates in six different kale accessions were quantified in this study, including eight aliphatic glucosinolates, three indolic glucosinolates and three aromatic glucosinolates. The average concentration of total glucosinolates ranged from 8741 mg/kg dry matter to 4771 mg/kg dry matter. The most abundant glucosinolates were glucoiberin, glucobrassicin and sinigrin, while glucosinolates with the lowest detected concentrations were glucotropaeolin, epiprogoitrin and glucolimnanthin.

Keywords: *LC-MS/MS, targeted analysis, electrospray ionization, glucosinolates, Brassica oleracea* var. *acephala*

Thesis contains: 50 pages, 26 figures, 8 tables, 93 references

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Marina Krpan, PhD, Associate professor

Co-mentor: Nikola Major, Senior Research Associate, Institute for Agriculture and Tourism

Technical support and assistance: Tvrtko Karlo Kovačević, mag. ing. techn. aliment.

Reviewers:

1. Mirjana Hruškar, PhD, Full professor (president)
2. Marina Krpan, PhD, Associate professor (mentor)
3. Nikola Major, PhD, Senior scientific associate, IPTPO (member)
4. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 20th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KUPUSNJAČE	2
2.2. RAŠTIKA (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>)	2
2.2.1. Nutritivna svojstva raštike	3
2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U RAŠTICI	4
2.3.1. Glukozinolati.....	5
2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI I SPEKTROMETRIJA MASA	10
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	11
2.4.2. Spektrometrija masa.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI I METODE	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Popis uređaja i opreme	17
3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE GLUKOZINOLATA LC-MS/MS METODOM	17
3.3. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA GLUKOZINOLATA	19
3.4. PRIPREMA RADNIH STANDARDNIH OTOPINA GLUKOZINOLATA	19
3.5. PRIPREMA MATIČNE OTOPINE GLUKOZINOLATA	19
3.6. PRIPREMA BAŽDARNE OTOPINE GLUKOZINOLATA	20
3.7. MJERENJE NA LC-MS/MS UREĐAJU	20
3.7.1. Kromatografska separacija.....	20
3.7.2. MS/MS detekcija.....	21
3.8. OBRADA PODATAKA	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. OPTIMIZIRANJE PARAMETARA LC-MS/MS	23
4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZINOLATA U RAZLIČITIM PRIMKAMA	24
4.2.3. Alifatski glukozinolati.....	25
4.2.2. Indolni glukozinolati	33
4.2.4. Ukupni glukozinolati.....	39
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina, vrste *acephala* iz porodice kupusnjača, poznatije kao kelj ili raštika, postale su vrlo popularne kao „superhrana“ zbog obilja „zdravih“ fitokemikalija, poput karotenoida, fenola, vitamina i glukozinolata te velike prilagodljivosti klimatskih uvjetima koji omogućuju njihov uzgoj diljem svijeta (Đulović i sur., 2023; Bauer i sur., 2022)

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže sumpor, a u najvećoj su količini zastupljeni u vrstama iz porodice kupusnjača. Ovisno o bočnom lancu, određenim aminokiselinom, glukozinolati se mogu grupirati u tri kemijske skupine; alifatski glukozinolati (derivati metionina), indolni glukozinolati (derivati triptofana) i aromatski glukozinolati (derivati tirozina i fenilalanina).

Za identifikaciju i kvantifikaciju koncentracije glukozinolata u kupusnjačama primjenjuju se različite analitičke tehnike kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, plinska kromatografija, kapilarna elektroforeza, međutim tehnika koja se najčešće primjenjuje pri kvantificiranju glukozinolata, te je ujedno i najpreciznija, je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa. Sprega tekućinske kromatografije i masene spektrometrije omogućuje brzu, jednostavnu, preciznu i osjetljivu analizu složenih bioloških uzoraka koji sadrže široki raspon kemijskih spojeva (Almushayti i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je razviti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrijom masa za određivanje pojedinih glukozinolata te primijeniti istu na analizu glukozinolata u listu raštike.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KUPUSNJAČE

Porodica *Brassicaceae*, kupusnjače ili krstašice, uključuje oko 341 rod i oko 3900 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta (Franzke i sur., 2011). Zahvaljujući dobroj prilagodbi različitim klimatskim uvjetima, različite su biljne vrste ove porodice od velikog gospodarskog značaja u cijelom svijetu, izuzev Antarktike (Šamec i sur., 2018). Porodica je prvenstveno zeljasta, a gotovo dvije trećine vrsta iz porodice kupusnjača su višegodišnje. Komercijalno najznačajniji rod ove porodice je rod *Brassica*, a povrtne kulture koje se najčešće uzgajaju pripadaju vrsti *Brassica oleracea* (Al Shehbaz i sur., 2006). Unutar vrste se, na temelju morfologije i razvojnih oblika, dijele u sedam glavnih kultiviranih skupina: kupus (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), cvjetača (*B. oleracea* L. var. *botrytis*), brokula (*B. oleracea* L. var. *italica*), prokulica (*B. oleracea* L. var. *gemmifera*), kelj ili raštika (*B. oleracea* L. var. *acephala*), kineska brokula (*B. oleracea* L. var. *alboglabra*) i korabica (*B. oleracea* L. var. *gongylodes*) (Rakow, 2004).

2.2. RAŠTIKA (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Raštika (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (slika 1). Potječe i tradicionalno se upotrebljava u mediteranskim zemljama, ali se tijekom zadnjeg desetljeća njena popularnost proširila diljem svijeta (Šamec i sur., 2019).



Slika 1. Prikaz raštike (Anonymus 1, 2021)

Karakteriziraju je listovi, koji ne tvore glavu, za razliku od drugog lisnatog povrća iz porodice *Brassicaceae* poput bijelog kupusa, prokulice i kineskog kupusa. Listovi su svjetlozelene do tamnozeleno boje, mesnati, prema bazi zaokruženi, te se nalaze na zadebljanim drškama kojima dijelom obuhvaćaju stabljiku. Tijekom druge godine, stvaraju se žuti cvjetovi skupljeni u

grozdaste cvatove (Lešić i sur., 2016). Tekstura lišća varira od finog do grubog ovisno o sorti. Razgranatog je i vretenastog korijena koji joj omogućava rast i razvoj u različitim vrstama tla. Raštika dobro podnosi stresore poput suše i visokih temperatura, no oni znatno utječu na akumulaciju biomase, nutritivnu kvalitetu te senzorske karakteristike same biljke (Thavarajah i sur., 2016).

Budući da komercijalno dostupno sjeme raštike nije dostupno, uzgoj karakterizira razmjena sjemena među malim proizvođačima kod kojih je prisutna selekcija bez pravog cilja. Takav način manipulacije dovodi do velike intra- i interpopulacijske varijabilnosti među hrvatskim populacijama raštike što rezultira različitim morfološkim karakteristikama listova (boja, oblik, intenzitet kovrčavosti, mjehuravost na rubu plojke) (Batelja i sur., 2009.).

2.2.1. Nutritivna svojstva raštike

Raštika je nutritivno bogato povrće koje osigurava ≥ 10 % preporučene dnevne doze esencijalnih nutrijenata. Sadrži značajne količine vitamina (A, B₁, B₂, B₆, C i E), folne kiseline, niacina, masti, esencijalnih mineralnih tvari, posebice kalija, kalcija, magnezija, željeza i bakra (tablica 1) (Thavarajah i sur., 2016; Acikgoz i Deveci, 2011;). Prema Becerra-Moreno i sur., (2014) konzumacija raštike osigurava više od 100 % preporučenog dnevnog unosa vitamina A i više od 40 % preporučenog dnevnog unosa vitamina C. Također, smatra se dobrim izvorom prebiotika poput monosaharida, disaharida, polisaharida i fruktooligosaharida koji djeluju antikancerogeno, protuupalno te potiču probavu (Khalid i sur., 2023).

Tablica 1. Nutritivni sastav raštike (FoodData Central, 2019)

SASTOJAK	Prosječna količina/100 g	Mjerna jedinica
Energija	60	kcal
Suha tvar	18,50	g
Voda	81,50	g
Proteini (ukupni)	4,70	g
Masne kiseline (ukupne)	0,92	g
Šećeri (ukupni)	10,90	g
Kalcij, Ca	0,22	g
Kalij, K	0,26	g

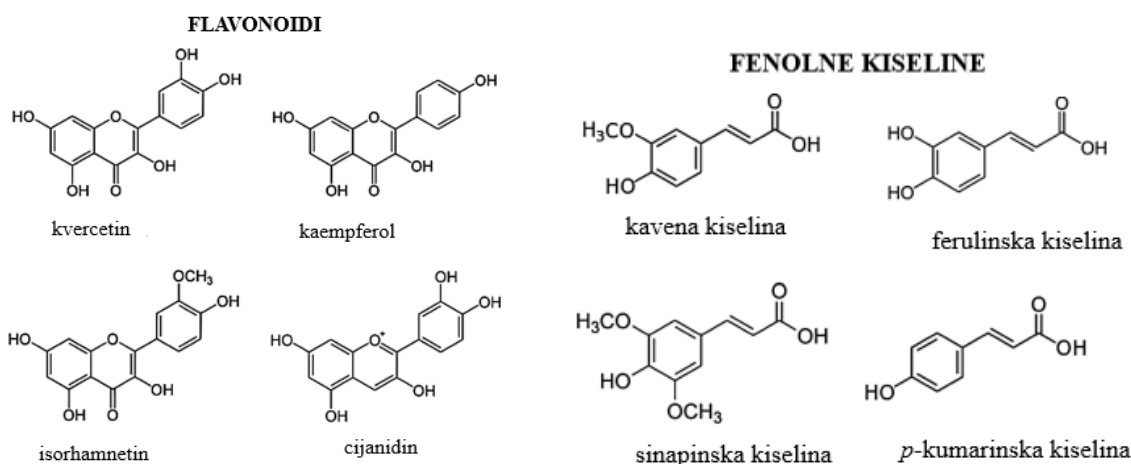
Tablica 1. Nutritivni sastav raštike – *nastavak*

Magnezij, Mg	20,00	mg
Željezo, Fe	2,00	mg
Vitamin C	169,00	mg
Niacin	2,80	mg
Riboflavin (vitamin B2)	0,29	mg
Folati (ukupni)	0,06	mg
Vitamin A	421,00	RAE*
Vitamin E	5,40	mg
Vitamin K	0,25	mg

*RAE (Retinol Activity Equivalent-ekvivalent aktivnosti retinola)

2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U RAŠTICI

Metaboliti su međuprodukti i produkti metabolizma. Opisuju se kao male molekule različitih funkcija u biljkama, uključujući strukturne, signalne, katalitičke, itd. Sekundarni biljni metaboliti su spojevi koji nemaju direktnu ulogu u osnovnim metaboličkim procesima, već djeluju kao zaštita biljke od abiotičkog stresa, biljojeda i mikrobnih patogena, kao signalne molekule (hormoni), a novija istraživanja pokazuju da upravo oni omogućuju biljci pravilan rast i razvoj (Yang i sur., 2018). Odgovorni su za okus i organoleptička svojstva te pridonose stvaranju boje. Zbog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje, sekundarni se biljni metaboliti nazivaju još i bioaktivnim spojevima, fitokemikalijama i nutraceuticima (Ribera i Zuñiga, 2012). Raštika sadrži mnogobrojne bioaktivne spojeve poput polifenola, karotenoida, produkata hidrolize glukozinolata i vitamine C i E koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost čime štite stanicu od slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva, a time sudjeluju u prevenciji kroničnih bolesti (Šamec i sur., 2019). Neki od najzastupljenijih bioaktivnih spojeva prikazani su na slici 2.

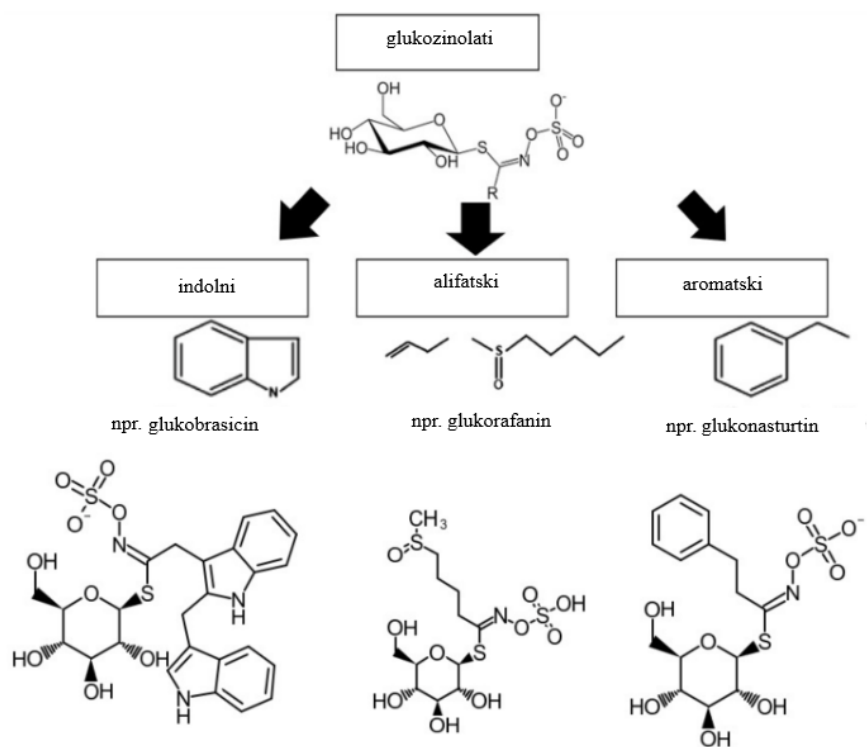


Slika 2. Prikaz najzastupljenijih bioaktivnih spojeva u raštici (prema Avato i Argentieri, 2015)

Zhou i Yu (2006) su u svome istraživanju mjerili antioksidacijski kapacitet 38 vrsta povrća, te se raštika, uz špinat, brokulu i rabarbaru, istaknula kao povrće s najvećim antioksidacijskim kapacitetom. Nadalje, u istraživanju Kural i sur. (2011), ekstrakti raštike pokazali su zaštitni učinak na oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) što ukazuje na zaštitnu ulogu raštike kod kardiovaskularnih bolesti.

2.3.1. Glukozinolati

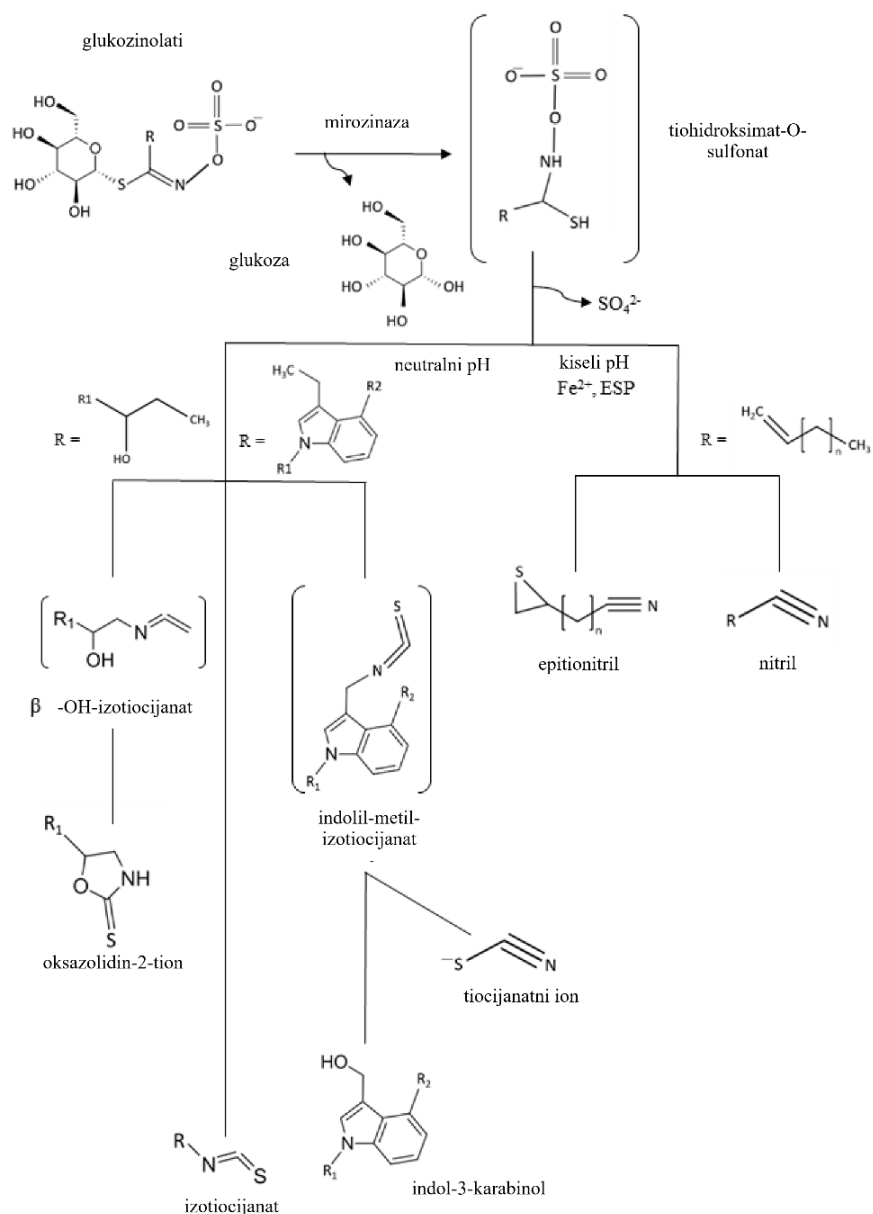
Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti široko rasprostranjeni u porodici *Brassicaceae*. Kemijski se definiraju se kao β -tioglukozid-N-hidroksisulfiti čiju osnovnu strukturu čini β -tioglukozid, u kojima je glikonski dio najčešće glukoza, dok aglikonski dio tj. bočni lanac potječe od aminokiseline, prekursora u njihovoj biosintezi (Halkier i Gershenzon, 2006). Do danas je identificirano oko 137 glukozinolata u biljkama koji se međusobno razlikuju po bočnom lancu koji je određen aminokiselinom (Blažević i sur., 2020), a dijele se na: alifatske (nastali iz metionina, izoleucina, leucina i valina) npr. glukorafanin, indolne (nastali iz triptofana) npr. glukobrasicin i aromatske (nastali iz tirozina i fenilalanina) npr. glukonasturtin čije su strukture detaljnije prikazane na slici 3 (Halkier i Gershenzon, 2006).



Slika 3. Podjela i primjeri glukozinolata (prema Kamal i sur., 2022)

2.3.1.1. Hidroliza glukozinolata

Glukozinolati su biološki inaktivni dok ne stupe u kontakt s enzimom mirozinazom, odgovornom za hidrolizu glukozinolata (del Carmen Martinez-Ballesta i Carvajal, 2015). Pri oštećenju tkiva različitim načinima prerade (procesu dezintegracije, termička obrada, rezanje) ili prilikom konzumacije (žvakanje), glukozinolati stupaju u kontakt s enzimom mirozinazom (tioglukozidaza) što rezultira njihovom hidrolizom i nastankom brojnih bioaktivnih spojeva kao što su izotiocijanati, cijanidi, oksazolidinoni, nitrili i dr. (slika 4) (Verhoeven i sur., 1997; de Vos i Blijleven, 1988;).



Slika 4. Shema hidrolize glukoziolata i prikaz produkata hidrolize (*prema Quirante-Moya i sur., 2020*)

U razgradnji glukoziolata, mirozinaza odcjepljuje glukozu, a s nestabilnog se aglukona (tiohidroksimat-O-sulfonat) eliminira sulfat *Lossen* pregradnjom. Koji će razgradni produkti nastati, izotiocijanati ili nitrili, ovisi o vrsti glukoziolata, načinu tretiranja biljke prije hidrolize i o pH; ukoliko je pH niži od 5, produkti razgradnje su nitrili, a ukoliko je pH 5-7, razgradni produkti su izotiocijanati (Holst i Williamson, 2004).

Većina je produkata hidrolize stabilna, međutim, indol glukoziolati, poput glukobrasicina, tvore nestabilne izotiocijanate koji podliježu daljnjoj hidrolizi te kao produkti razgradnje nastaju 3-indolacetonitril, 3-indolmetalon i 3,3'-diindolilmetan koji dalje kondenziraju u dimere,

trimere i tetramere (Holst i Williamson, 2004). U tablici 2 prikazani su glukozinolati koji su identificirani u porodici *Brassicaceae* kao i njihovi produkti hidrolize.

Tablica 2. Glukozinolati identificirani u porodici *Brassicaceae* i njihovi produkti hidrolize (Rosa i sur., 1997)

	Kemijski naziv	Trivijalni naziv	Produkt hidrolize
ALIFATSKI GLUKOZINOLATI	3-Metiltiopropil	Glukoibererin	Izotiocijanati, nitrili
	3-Metilsulfinilpropil	Glukoiberin	Izotiocijanati, nitrili
	2-Propenil	Sinigrin	Izotiocijanati, nitrili
	4-Metiltiobutil	Glukoerucin	Izotiocijanati, nitrili
	4-Metilsulfinilbutil	Glukorafanin	Izotiocijanati, nitrili
	3-Butenil	Glukonapin	Izotiocijanati, nitrili
	2-Hidroksi-3-butenil	Progoitrin	Oksazolidin-2- tion
	5-Metilsulfinilpentil	Glukoalisin	Izotiocijanati, nitrili
	4-Pentenil	Glukobrasicanapin	Izotiocijanati, nitrili
	2-Hidroksi-4-pentenil	Glukonapoleiferin	Oksazolidin-2- tion
AROMATSKI GLUKOZINOLATI	2-Feniletil	Glukonasturtin	Izotiocijanati
	2-Hidroksi-2-feniletil	Glukobarbarin	Izotiocijanati
	Benzil	Glukotropeolin	Izotiocijanati
	<i>p</i> -Hidroksibenzil	Glukosinalbin	Izotiocijanati
INDOLNI GLUKOZINOLATI	3-Indolilmetil	Glukobrasicin	Indol-3-karabinol
	4-Hidroksi-3-indolilmetil	4-Hidroksiglukobrasicin	Tiocijanat
	4-Metoksi-3-indolilmetil	4-Metoksiglukobrasicin	Auksini
	1-Metoksi-3-indolilmetil	Neoglukobrasicin	Fitoaleksini

2.3.1.2. Uloga glukozinolata kod biljaka

Kao jedna od primarnih uloga glukozinolata u biljaka ističe se obrana biljaka od fitopatogena i insekata (Agerbirk i sur., 2018). Uvjeti okoliša poput svjetla, nutritivnog statusa biljke, mehaničkog oštećenja, itd. uzrokuju promjene u sastavu glukozinolata (Radojčić Redovniković

i sur., 2008). Prema Holst i Williamsonu (2004), koncentracije glukozinolata razlikuju se među vrstama i kultivarima; unutar iste biljke, koncentracije glukozinolata u cvjetovima i sjemenkama veće su nego u vegetativnim organima biljke.

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti posjeduju biocidnu aktivnosti i pokazuju toksično djelovanje na patogene koji se prenose tlom u biljku (Lord i sur., 2011). Mehanizam inhibitornog djelovanja temelji se na nakupljanju glukozinolata čime poboljšavaju sposobnost preživljavanja biljke (Radojčić Redovniković i sur., 2008).

Osim biotičkog stresa, promjene u koncentraciji glukozinolata zabilježene su i pri izloženosti biljke abiotičkom stresu (del Carmen Martinez-Ballesta i sur., 2013). S obzirom na promjene u njihovom sastavu tijekom suše, smatra se da sudjeluju u osmotskoj prilagodbi biljke (López-Berenguer i sur., 2008). Istraživanja na kineskom kupusu pokazala su da sušom izazvana akumulacija glukozinolata u listu direktno i indirektno utječe na zatvaranje stome, čime se sprječava gubitak vode (Eom i sur., 2018).

2.3.1.4. Utjecaj glukozinolata i njihovih produkata razgradnje na zdravlje

Istraživanje Fimmognaria i sur. (2012) pokazalo je da glukozinolati i njihovi razgradni produkti pozitivno utječu na kardiovaskularne i neurološke bolesti, astmu, dijabetes i kolesterol. Izotiocijanati, kao jedni od glavnih produkata razgradnje glukozinolata u kupusnjačama, posjeduju antikancerogeno djelovanje, budući da djeluju kao detoksikanti u kancerogenzi te potiču apoptozu (Arumugam i Razis, 2018). Učinkovitost izotiocijanata u prevenciji tumora uključuje njihovu sposobnost inhibicije proliferacije stanica regulacijom proteina, npr. ciklina, uključenih u regulaciju staničnog ciklusa te sposobnost inhibicije polimerizacije tubulina (Traka i Mithen, 2009.)

Sulforafan, prisutan u brokulama, kupusu, raštici i prokulicama, smatra se kao jedan od najvrjednijih produkata razgradnje glukozinolata. Djeluje kao induktor enzima faze II biotransformacija te smanjuje oksidacijski stres i oštećenje stanica (Guerrero-Beltrán i sur., 2012). Štoviše, pokazalo se da sulforafan ispoljava svoj kemopreventivni učinak kao antagonist aril ugljikovodik receptora koji djeluje kao citosolni faktor transkripcije uključen u nekolicinu staničnih procesa (Guerrero-Beltrán i sur., 2012). Prema Xiong i sur. (2020), sulforafan sprječava aterosklerozu modulacijom oksidativnog stresa, smanjuje hipertrofiju i fibrozu (Ma i sur., 2018) te djeluje kardioprotektivno na aritmiju (Pereyra i sur., 2020) i plućnu hipertenziju (Kang i sur., 2020).

Indol-3-karabinol, produkt razgradnje glukobrasicina, se zbog svojih bioloških svojstava

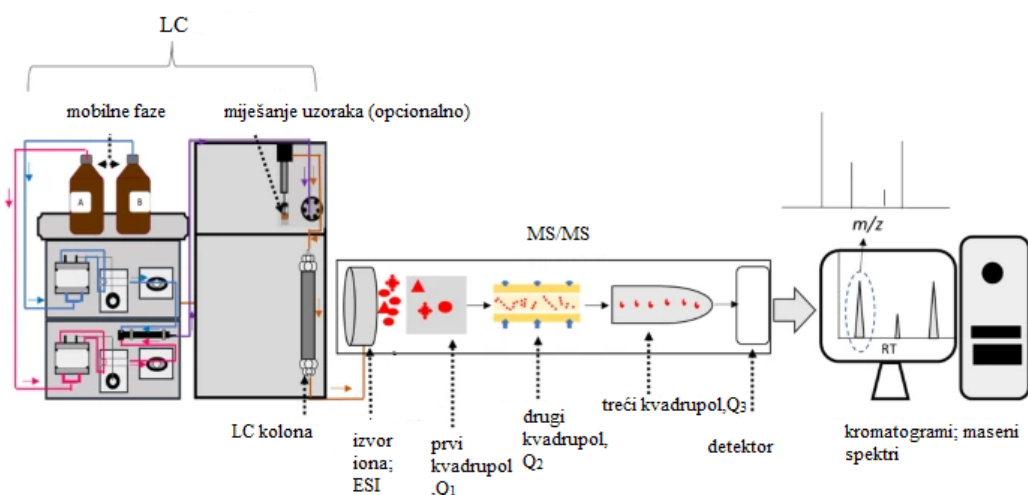
pokazao učinkovitim pri smanjenju raka prostate i dojke (Jahangir i sur., 2009). Osim kemopreventivnih učinaka, pokazao je i pozitivne učinke na pretilost, dijabetes i kardiološke bolesti (Licznarska i Baer-Dubowska, 2016).

Iako pokazuju mnogobrojne zdravstvene benefite, tijekom protekla tri desetljeća ističe se i toksični profil glukozinolata i izotiocijanata (Donkin i sur., 1995). Visok sadržaj goitrina uzrokovao je biokemijsku i morfološku hipotireozu kod muških albino štakora (Mondal i Chandra, 2019). Prema istraživanju Prieto i sur. (2019), ističe se povezanost nitrila i progoitrina s anemijom i oštećenjem gušterače.

2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI I SPEKTROMETRIJA MASA

Sprega tekućinska kromatografija - spektrometrija masa je (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*, LC-MS) visokoselektivna i osjetljiva analitička tehnika korištena u kliničkim i istraživačkim laboratorijima u poljima kao što su proteomika, metabolomika i analiza malih molekula (Rifai i sur., 2018). Na slici 5 prikazan je shematski prikaz LC-MS/MS sustava.

Tekućinska kromatografija, u usporedbi s drugim separacijskim tehnikama, pruža izravno određivanje glukozinolata bez prethodne derivatizacije ili desulfatacije (konverzija u desulfoglukozinolate) te se stoga sprega LC-MS široko primjenjuje pri identifikaciji i kvantifikaciji pojedinačnih glukozinolata u biljkama (Tian i sur., 2005).



Slika 5. LC-MS/MS sustav (prema Dewi i sur., 2023)

2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je analitička tehnika koja služi za razdvajanje sastojaka iz uzorka na temelju različitosti njihove raspodjele između mobilne i stacionarne faze. Sastojci smjese koji se razdvajaju raspodjeljuju se između dviju faza: nepokretne (engl. *stationary phase*) i pokretne faze (engl. *mobile phase*) (Lutteroti, 2014).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography, HPLC*) je kromatografska tehnika korištena za separaciju i određivanje analita u različitim uzorcima. Kao mobilna faza koristi se tekućina, većinom smjesa otapala, dok je stacionarna faza čvrsta te se sastoji od punila vrlo malih čestica smještenih u čeličnoj koloni. Princip rada tekućinske kromatografije zasniva se na protoku mobilne faze pod visokim tlakom (do 400 bara) kroz kolonu djelovanjem pumpe. Spojevi koji se separiraju putuju kroz kolonu ovisno o njihovom afinitetu prema stacionarnoj fazi – oni spojevi koji imaju veći afinitet prema stacionarnoj fazi putuju sporije, dok spojevi s većim afinitetom putuju brže (Vidushi i sur., 2017).

HPLC metode mogu se, s obzirom na tip stacionarne faze, podijeliti na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju reverznih faza. Stacionarna faza kromatografije normalnih faza najčešće je vrlo polarna, dok je mobilna faza relativno nepolarna. Jačanjem interakcija mobilne faze sa stacionarnom, manja je interakcija stacionarna faze i analita čime se ostvaruje niža retencija analita. Ističu kako je najčešće korištena stacionarna faza silika gel, a mobilne faze heksan i metilen klorid. Kod kromatografije obrnutih faza, stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza je relativno polarno otapalo (npr. smjesa voda-metanol, voda-acetonitril). Kromatografija obrnutih faza djeluje na principu hidrofobnih interakcija – povećavanjem nepolarne površine analita, vrijeme zadržavanja se povećava (Skoog i sur., 2013). Najčešće korištene stacionarne faze jesu kolone s oktadecilsilnim skupinama (ODS) C18 koje ukazuju na lanac od 18 ugljikovih atoma povezanih s česticama silika gela (Sneha Lakshmi, 2015).

Ovisno o načinu eluiranja, koriste se izokratno i gradijentno eluiranje. Izokratno eluiranje podrazumijeva konstantnu i jednoliku cirkulaciju mobilne faze tijekom cijelog procesa separacije. Kod gradijentnog eluiranja, sastav mobilne faze se mijenja s vremenom procesa (Skoog i sur., 2013).

2.4.1.1. Dijelovi uređaja

HPLC instrumentacija obično se sastoji od osam osnovnih komponenti: spremnika mobilne

faze/spremnika otapala, visokotlačne pumpe, sustava za injektiranje uzorka, kolone, pećnice, detektora, spojnih cijevi i spojnica te uređaja za prikupljanje i obradu podataka (LaCourse i LaCourse, 2023).

Prema LaCourse i LaCourse (2023), visokotlačne pumpe mogu raditi pri tlakovima od 100 do 1000 bara. Svrha visokotlačne pumpe je isporuka preciznog, točnog, ponovljivog i konstantnog protoka mobilne faze bez pulsiranja u kolonu. Trenutno se primjenjuju tri različite izvedbe HPLC pumpi: pumpe konstantnog tlaka, povratne pumpe i tip štrcaljke na vijak. Većina komercijalno dostupnih visokotlačnih pumpi dizajnirana je na principu klipne pumpe. Kod klipne pumpe s jednostrukom glavom, spremnik s otapalom isporučuje mobilnu fazu u kolonu pola ciklusa rada pumpe, dok u drugoj polovici ciklusa puni spremnik s otapalom. Klipne pumpe s dvostrukom glavom rade istovremeno, stoga mobilna faza teče kroz kolonu cijelo vrijeme čime se smanjuje pulsiranje.

LaCourse i LaCourse (2023) ističu kako ograničavajući faktor HPLC sustava leži u ponovljivosti sustava za unošenje uzorka. Injektor se koristi za unošenje uzorka u HPLC-u bez pada tlaka. Injektiranje se vrši putem automatskog injektora (engl. *autosampler*) s ventilom i petljom (engl. *loop*). Kada je ventil u položaju za punjenje, petlja se puni pri atmosferskom tlaku. Okretanjem ventila iz položaja za punjenje u položaj za injektiranje, petlja uzorka se spaja na visokotlačni protok mobilne faze, a uzorak se unosi u kolonu. Korištenjem autoinjektora omogućuje se kontinuirana obrada uzoraka istovremeno kao i poboljšana ponovljivost injektiranja.

Kolona je dio HPLC u kojoj se odvija separacija molekula analita. Uglavnom su izrađene od nehrđajućeg čelika zbog visokih tlakova korištenih u sustavu. Veličina kolone kreće se između 10-30 cm duljine i 4-10 mm unutarnjeg promjera. Uobičajene veličine čestica kojim se pune kolone su 3, 5 i 10 μm . Kako bi se toplinski osjetljivi uzorci održavali na konstantnim temperaturama prije, za vrijeme i nakon analize te omogućila dobra ponovljivost retencijskih vremena, kolone se ugrađuju u pećnice (LaCourse i LaCourse, 2023).

Detektor odvaja komponente analita njegovim prolaskom kroz kolonu, detektira promjene i šalje podatke računalu u obliku električnog signala koji je proporcionalan svojstvima mobilne faze i otopljenih tvari. Postoje različite izvedbe detektora – UV/Vis detektor, detektor indeksa loma, foto-diodni detektor (DAD), detektor električne vodljivosti (ECD), maseni detektor (MS) itd. Karakteristike koje detektor mora imati jesu visoka osjetljivost, stabilnost, linearnost, kratko vrijeme odziva, pouzdanost i jednostavnost korištenja (LaCourse i LaCourse, 2023).

2.4.2. Spektrometrija masa

Masena spektrometrija smatra se najčešće korištenom potvrdnom analitičkom metodom, a intenzivno se koristi u mikrobiologiji, kliničkoj dijagnostici, forenzici, analizi hrane i okoliša, itd. Razlog široke primjene spektrometrije masa i njezinog uspjeha očituje se u osjetljivost metode (mogućnost detekcije niskih koncentracija npr. zagađivača ili metabolita), selektivnosti (mogućnost razlikovanja spojeva s vrlo sličnim strukturama), robusnosti i mogućnosti identifikacije i kvantifikacije novih spojeva (Bjarnholt i sur., 2014). Princip spektrometrije masa temelji se na razdvajanju iona u plinskoj fazi pod visokim vakuumom uslijed djelovanja električnog ili magnetskog polja, a detekcija razdvojenih iona vrši se prema omjeru mase i naboja (m/z) (Butorac i sur., 2013).

2.4.2.1. Dijelovi uređaja

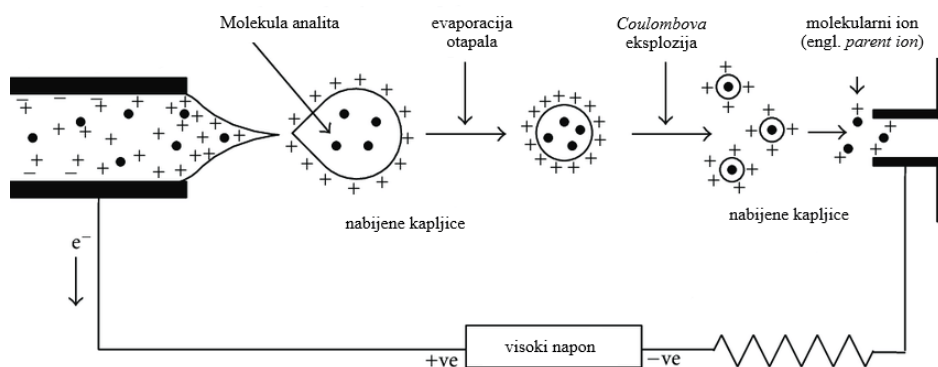
Maseni spektrometar čine sustav za unošenje uzorka, ionizator, analizator mase i detektor. Molekule analita prvo se uvode u ionizator, gdje se ioniziraju kako bi dobile pozitivne ili negativne naboje. Ioni zatim putuju kroz analizator mase i stižu do različitih dijelova detektora ovisno o omjeru mase i naboja (m/z). Nakon što ioni stupe u kontakt s detektorom, računalni sustav generira signale i bilježi ih. Softver prikazuje signale grafički, kao maseni spektar, koji prikazuje relativnu zastupljenost signala prema njihovom omjeru masa i naboja (m/z) (Ho i sur., 2003).

2.4.2.2. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI)

Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*, *ESI*) je jedna od najzastupljenijih tehnika ionizacije u spregnutom sustavu LC-MS gdje služi kao međuspoj (engl. *interface*) koji otparava tekuću fazu, ionizira molekule analita i uvodi ih u analizator spektrometra masa (Rechthaler i sur., 2007). ESI se smatra metodom tzv. *blage* ionizacije (engl. *soft ionisation*) budući da se malo energije predaje analitu, stoga je i stopa fragmentacije relativno niska što pogoduje polarnim analitima (peptidi, metaboliti, ksenobiotici) (Banerjee i Mazumdar, 2012). Ionizacija, ovisno o naponu na kapilari i kolizijskoj energiji, može biti pozitivna i negativna te se odvija pri atmosferskom tlaku (Cindrić i sur., 2009). Male molekule su većinom jednostruko nabijene ($M+H^+$, $M-H^-$ ili kao radikal kationi M^+), a velike molekule mogu ionizirati na više mjesta i tvoriti višestruko nabijene analite (Balogh, 2009).

Ionizacija se odvija u struji dušika pri optimalnoj temperaturi iznad 100 °C ulaskom pokretne

faze i analita u ionizator kroz kapilaru koja je ujedno i elektroda pod visokim naponom (2-5 kV). Generira se maglica visoko nabijenih kapljica analita istog polariteta kao i kapilarni napon. Kolizijska ćelija privlači nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Djelovanjem povišene temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu) otapalo otparava, nabijene kapljice analita se kontinuirano smanjuju, a površinski se naboj povećava. Konačno, smanjenjem iona na površini kapljica, sile *Coulombova* odbijanja postaju veće od sila napetosti površine, što rezultira *Coulombovom* eksplozijom i stvaranjem manjih kapljica većeg omjera mase i naboja. Proces se kontinuirano ponavlja sve dok ne nastanu nanokapljice koje predstavljaju ionizirani analit u plinskoj fazi (Ho i sur., 2003, Willoughby i sur., 1997;). Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem (prema Banerjee i Mazumdar, 2012)

2.4.2.3. Trostruki kvadrupolni maseni spektrometar (*QqQ*)

Trostruki kvadrupolni maseni spektrometar je tandem spektrometrije masa sastavljen od tri kvadrupola spojena u seriji. Prvi (Q_1) i treći kvadrupol (Q_3) služe kao maseni filtri, a srednji (Q_2) služi kao kolizijska ćelija za kontroliranu fragmentaciju iona (sudarna stanica) (Saitman, 2019). Ionizacijom nastali molekularni ioni (engl. *parent ion* ili *precursor ion*) ulaze u prvi kvadrupol (Q_1) gdje se filtriraju ioni određenog omjera mase i naboja (m/z). Filtirani ioni ulaze u drugi kvadrupol (Q_2) i sudaraju se s molekulama inertnog plina (dušik, argon, helij) što rezultira fragmentacijom iona na dva ili više fragmenata (engl. *daughter ion* ili *product ion*). Produkt ioni ulaze u treći kvadrupol (Q_3) te se, na način kao i u prvom masenom filtru, filtriraju fragmenti određenog omjera mase i naboja (m/z) (Saitman, 2019).

Za razliku od jednostrukog kvadrupola, prisutnost triju kvadrupola čini spektrometar selektivnijim, smanjuje signalni šum, omogućuje širi linearni raspon kvantifikacije, bolju

točnost i ponovljivost (López-Fernández i sur., 2020). Također, jedna od najvažnijih karakteristika trostrukog kvadrupola je sposobnost praćenja višestrukih tranzicija (MRM) (Curtasu i Nørskov, 2023) što je detaljnije opisano u potpoglavlju 1.4.2.6.

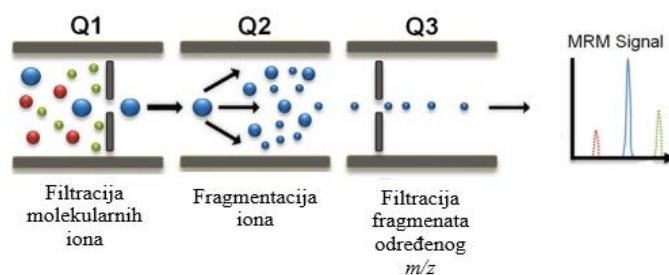
1.4.2.5. Ciljane analize

Ciljane analize (engl. *targeted analysis*) identificiraju i kvantificiraju unaprijed definirane kategorije poznatih kemijski karakteriziranih i biokemijski označenih metabolita u uzorku (Amer i sur., 2023). U ciljanim analizama kvantifikacija se vrši na osnovu referentnih standarda, a kako bi se postigle niske granice detekcije i kvantifikacije, uzorak se podvrgava frakcioniranju i pročišćavanju. Glavni nedostatak ciljanih analiza je nedostupnost standarda metabolita od interesa (Shulaev, 2006).

1.4.2.6. Praćenje višestrukih tranzicija (MRM)

Praćenje višestrukih tranzicija (engl. *multiple reaction monitoring, MRM*) način je skeniranja više različitih prekursor-produkt ionskih parova u jednoj analizi (Fu i sur., 2019) jedinstven za trostruki kvadrupolni spektar masa (Kuzyuk i sur., 2009). Pripada ciljanim analizama te zahtijeva poznavanje molekularne mase analita te ciljanih fragmenata iona koji nastaju kao posljedica sudara iona analita s molekulama inertnog plina (engl. *Collision Induced Dissociation, CID*) (Gregov i sur., 2003).

Prvi kvadrupol (Q_1) propušta samo ciljani omjer mase i naboja (m/z) prekursor iona, a treći kvadrupol (Q_3) ciljani omjer mase i naboja (m/z) produkt iona čime se omogućuje precizna i osjetljiva kvantifikacija malih molekula analita (<1000 Da) u kompleksnom matriksu. Višestruki prijelazi mase (MRM prijelazi), specifični za određeni spoj, mogu se pratiti uzastopno stoga se veliki broj spojeva može analizirati istovremeno (slika 7). Optimizacija kolizijskih energija za svaki ciljani spoj rezultira najboljom osjetljivošću i specifičnošću (Chalfant i Del Poeta, 2011).



Slika 7. Shematski prikaz trostrukog kvadrupolnog spektrometra masa korištenog pri praćenju višestrukih tranzicija (prema Boja i Rodriguez, 2011)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Kemikalije

U tablici 3 prikazan je popis kemikalija, a u tablici 4 popis analitičkih standarda korištenih u ovome istraživanju.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Metanol (MeOH) HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	≥ 99,9 %	VWR Chemicals
Octena kiselina (H₃CCOOH) HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	≥ 99 %	
Voda HiPerSolv CHROMANORM® za LC-MS	LC-MS čistoća	

Tablica 4. Popis korištenih analitičkih standarda

Naziv analitičkog standarda	Proizvođač
Epiprogoitrin	Extrasynthese, Lyon, Francuska
Sinigrin	
Glukobrasicin	
Glukoiberin	
Glukonapin	
Glukonasturtin	
Progoitrin	
Glukotropaeolin	
Glukolimnantin	

Tablica 4. Popis korištenih analitičkih standarda - *nastavak*

4-Metoksiglukobrasicin	Extrasynthese, Lyon, Francuska
Neoglukobrasicin	

3.1.2. Popis uređaja i opreme

Kako bi se mogli pripremiti reagensi i uzorci te u konačnici provesti analize potrebni su uređaji i oprema prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Popis korištenih uređaja i opreme

Vrsta uređaja	Proizvođač i model uređaja	
Liofilizator	Labogene ScanVac CoolSafe 95-15 Pro, Allerød, Danska	
Ultra centrifugalni mlin	Retsch ZM 200, Haan, Njemačka	
Analitička vaga	Shimadzu AUW220D, Kyoto, Japan	
Kuglični homogenizator	Bead Ruptor Elite, Omni International, SAD	
Vortex homogenizator	Biosan SIA Vortex V-1 plus, Riga, Latvija	
Centrifuga	Domel Centric 350, Železniki, Slovenia	
Maseni QQQ (trostruki kvadrupol) detektor	Shimadzu LCMS 8045, Kyoto, Japan	
UPLC	Pumpa	Shimadzu Nexera LC-40DX3, Kyoto, Japan
	Automatski uzorkivač (autosampler)	Shimadzu Nexera SIL-40CX3, Kyoto, Japan
	Pećnica za kolonu	Shimadzu Nexera CTO-40C, Kyoto, Japan
	Upravljačka jedinica	Shimadzu Nexera SCL-40, Kyoto, Japan

3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE GLUKOZINOLATA LC-MS/MS METODOM

Raštika korištena u ovom istraživanju kultivirana je tijekom 2022. godine na pokusnom imanju Instituta za poljoprivredu i turizam (N 45°13'20.30", E 13°36'6.49") te je dio *ex situ* kolekcije

Nacionalnog programa očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj kroz Nacionalnu banku biljnih gena. Uzorci raštike korišteni u ovome istraživanju prikazani su na slici 8.

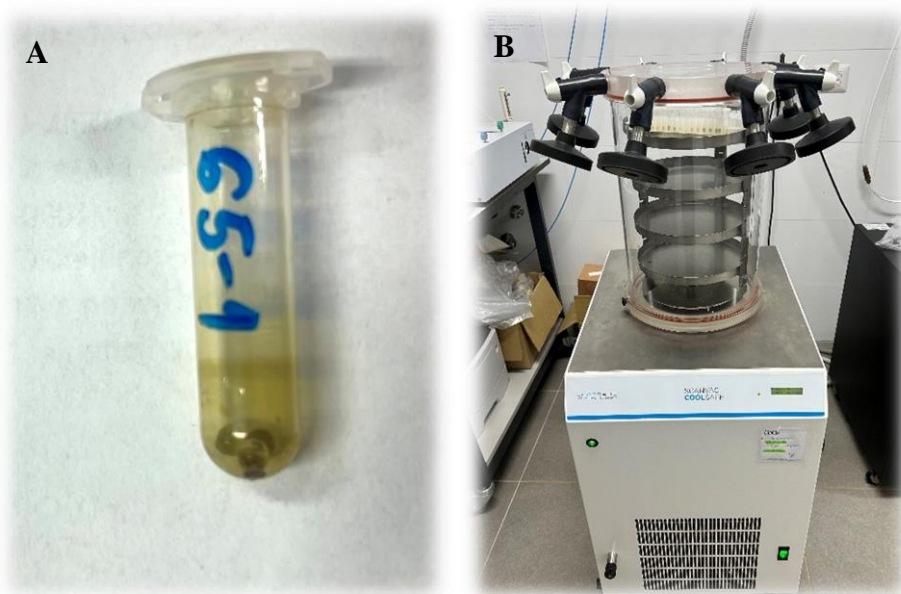
Srednji listovi raštike ubrani su u fazi tehnološke zrelosti te su, odmah nakon berbe, smrznuti u tekućem dušiku i liofilizirani (Labogene ScanVac CoolSafe 95-15 Pro). Liofilizator korišten u ovome istraživanju prikazan je na slici 9B. Po završetku postupka liofilizacije, uzorci su samljeveni na veličinu čestica 0,2 mm (Retsch ZM 200), pohranjeni u polipropilenske epruvete i skladišteni na tamnom i suhom mjestu.



Slika 8. Prikaz uzoraka raštike (a) IPT399 i (b) IPT403 (Major i sur., 2020)

Priprema ekstrakta uzorka rađena je prema metodi koju su objavili Bauer i sur. (2022) uz modifikacije. Izvagano je $0,015 \pm 0,001$ g prethodno liofiliziranih i samljevenih uzoraka lista raštike koji su preneseni u mikro tube od 2 mL. Uzorcima je, zatim, dodano 300 μ L hladne deionizirane vode za rehidraciju te su uzorci homogenizirani na kugličnom homogenizatoru (1 min, 2 ciklusa, 5,5 m/s) kako bi se razorila stanična struktura. Uzorcima je dodano 1200 μ L metanola (MeOH) radi inaktivacije enzima te su uzorci ponovno homogenizirani na kugličnom homogenizatoru (1 min, 2 ciklusa, 5,5 m/s). Nakon razaranja stanične strukture, uzorci su centrifugirani na 16.000xg u trajanju od 10 minuta. Iz supernatanta dobivenog centrifugiranjem, alikvot od 300 μ L prenesen je u mikro tube od 2 mL s probušnim čepom i liofiliziran pri tlaku od 8 mbara kako bi se uklonilo otapalo. Nakon evaporacije otapala u liofilizatoru (slika 9A), analit u alikvotu je rekonstituiran sa 600 μ L mobilne faze A ($MF_A = \text{voda} + 0,1 \% \text{ octena}$

kiselina). Mikrotube s rekonstituiranim analitom su vorteksirane i centrifugirane na 16000xg u trajanju od 10 minuta, te je rekonstituirani analit, u konačnici, filtriran u vijale za HPLC.



Slika 9. (A) Prikaz analita nakon evaporacije otapala u liofilizatoru, (B) Liofilizator Labogene ScanVac CoolSafe 95-15 Pro (*vlastita fotografija*)

3.3. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA GLUKOZINOLATA

Standardne otopine pripremaju se vaganjem 1-1,5 mg standarda u mikro tube od 2 mL i otapanjem u istom volumenu 80 %-tnog metanola čime se dobivaju standardne otopine masene koncentracije 1 g/L.

3.4. PRIPREMA RADNIH STANDARDNIH OTOPINA GLUKOZINOLATA

Radne standardne otopine pripremljene su razrjeđivanjem standardne otopine glukozinolata. Kako bi se napravile radne standardne otopine masene koncentracije 100 mg/L, potrebno je uzeti 100 μ L standardne otopine i prenijeti je u mikro tube od 2 mL te razrijediti s 900 μ L 80 %-tnog metanola. Po završetku, pripremljenu radnu standardnu otopinu potrebno prenijeti u vijale od 1,5 mL.

3.5. PRIPREMA MATIČNE OTOPINE GLUKOZINOLATA

Matična otopina je otopina dobivena miješanjem kombiniranih radnih standarda u kojoj je svaki radni standard razrijeđen 40x. Ukoliko je ukupni volumen 200 μ L, potrebno je uzeti 5 μ L svakog standarda čime je svaki standard u otopini razrijeđen 40x.

3.6. PRIPREMA BAŽDARNE OTOPINE GLUKOZINOLATA

Otopine za pripremu baždarnog dijagrama pripremljene su iz matične otopine tako da je u posebne vijale otpipetiran točan volumen pripremljene matične otopine kako bi se dobilo razrijeđenje 1x/10x/100x/1000x u volumenu 200 µL. Otopine se pripremaju na način prikazan u tablici 6.

Tablica 6. Priprema baždarne otopine

Razrjeđenje	Volumen matične otopine (MO) + volumen ultračiste vode
10x	20 µL (1x MO) + 180 µL 80 %-tnog MeOH
100x	20 µL (10x MO) + 180 µL 80 %-tnog MeOH
1000x	20 µL (100x MO) + 180 µL 80 %-tnog MeOH

3.7. MJERENJE NA LC-MS/MS UREĐAJU

Analiza glukozinolata provedena je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti obrnutih faza primjenom instrumenta UHPLC (Shimadzu Nexera X3, Kyoto, Japan) opremljenim pumpom, automatskim uzorkivačem i kolonskom pećnicom u sprezi s masenim spektrometrom s trostrukim (QQQ) kvadrupolom (Shimadzu LCMS 8045, Kyoto, Japan) opremljenim s elektrosprej raspršivačem (ESI). Kvantitativna analiza podataka izvršena je pomoću softvera LabSolutions.

3.7.1. Kromatografska separacija

Separacija je provedena primjenom Poroshell 120 EC-C18 kolone, dimenzija 2,1 x 150 mm, 2,7 µm s pretkolonom dimenzije 2,1 x 5 mm (Agilent Technologies, SAD) gdje se mobilna faza sastojala od 0,1 %-tne otopine octene kiseline u vodi LCMS čistoće (mobilna faza A) i 0,1 %-tne otopine octene kiseline u metanolu LCMS čistoće (mobilna faza B) te sljedeći gradijent:

- od 0 min do 1 min; 98 % A (2 % B),
- od 1 min do 16 min; od 98 % A do 40 % A (od 2 % B do 60 % B),
- od 16 min do 21 min; od 40 % A do 0 % A (od 60 % B do 100 % B),
- od 21 min do 24 min; 0 % A (100 % B),
- od 24 min do 25 min; od 0 % A do 98 % A (od 100 % B do 2 % B),

- od 25 min do 30 min; 98 % A (2 % B) (Major i sur., 2022).

3.7.2. MS/MS detekcija

Cjelokupni spektri masa te MS/MS spektri pojedinog analita snimljeni su uvođenjem otopine analitičkog standarda poznate molekulske mase u spektrometar masa. Eksperimenti su provedeni u negativnoj ionizaciji. Snimanje cjelokupnog spektra masa pojedinog analita provedeno je s ciljem prikupljanja barem jednog iona prekursora te optimalnog napona, a snimanje MS/MS spektra kako bi se prikupile fragmentacije pojedinog iona. Provjera prekursor iona i iona produkata provedena je uspoređivanjem s literaturnim podacima (Liang i sur., 2022; Hooshmand i Fomsgaard, 2021; Gratacós-Cubarsí i sur., 2010). Kako bi se utvrdili uvjeti pri kojima se postiže najjači signal MS/MS tranzicija pojedinog spoja, produkt ioni su snimani pri različitim energijama kolizije te je tranzicija s jačim odzivom izabrana za kvantifikaciju, a druga kao potvrdni ion spoja od interesa. Na slici 10 prikazan je UHPLC uređaj (Shimadzu Nexera) u sprezi s masenim spektrometrom s trostrukim (QQQ) kvadrupolom (Shimadzu LCMS 8045, Kyoto, Japan) korišten u ovome istraživanju.



Slika 10. UHPLC uređaj Shimadzu Nexera u sprezi s masenim spektrometrom s trostrukim (QQQ) kvadrupolom Shimadzu LCMS 8045, Kyoto, Japan (*vlastita fotografija*)

3.8. OBRADA PODATAKA

Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike, čime je izračunata srednja vrijednost i standardna pogreška, korištenjem programa Microsoft Excel 2019. Statistički značajne razlike koncentracije glukozinolata između pojedinih primki utvrđene su analizom varijance (ANOVA). Na rezultatima koji su pokazali statistički značajne razlike među analiziranim grupama proveden je Fischer-ov LSD (engl. *Least Significant Difference*) *post hoc* test. LSD testom utvrđena je najmanja signifikantna razlika ($p \leq 0,05$) između testiranih grupa u udjelu glukozinolata. Za ANOVA i Fischer *post hoc* testove korišten je program Statistica v. 13.4 (StatSoft Ltd., Tulsa, OK, SAD).

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu provedena je optimizacija parametara LC-MS/MS za određivanje glukozinolata te je ista primijenjena za identifikaciju i kvantifikaciju osam alifatskih, tri indolna i tri aromatska glukozinolata u listu raštike u šest različitih primki. Rezultati provedenih analiza prikazani su tablično (tablica 7 i tablica 8) i grafički (od slike 11 do slike 26).

4.1. OPTIMIZIRANJE PARAMETARA LC-MS/MS

Molekulski ioni glukozinolata određeni su izravnim uvođenjem standardne otopine u maseni detektor. Za svaki analit snimljeni su maseni spektri u negativnom ESI načinu te su najintenzivniji ioni u MS spektru fragmentirani uz optimizaciju energije sudara za dobivanje najstabilnijeg i najintenzivnijeg fragment iona. Optimalne energije sudara za svaki pojedini ion određene su mijenjanjem energije sudara u MRM načinu. Uvidom u maseni spektar fragmenta svakog analita, određen je najveći odziv koji predstavlja kvantitativni prijelaz te potvrdni, odnosno kvalitativni prijelaz. Prikaz optimiziranih MRM prijelaza prikazan je u tablici 7. Nakon optimizacije prijelaza, svaki standard je pušten na kolonu kako bi se utvrdila njihova retencijska vremena.

Tablica 7. Parametri za određivanje odabranih glukozinolata veznim sustavom LC-MS/MS praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija

SPOJ	Kemijska formula	Retencijsko vrijeme (min)	Prekursor ion M-H (m/z)	Produkt ion (m/z)
Glukomalkomiin	$C_{17}H_{23}NO_{11}S_2$	1,25	480,00	196,00
Glukosativin	$C_{11}H_{21}NO_9S_3$	1,26	406,00	96,90
Glukoiberin	$C_{11}H_{21}NO_{10}S_3$	1,90	422,10	96,90
Glukoheirolin	$C_{11}H_{21}NO_{11}S_3$	2,07	438,00	96,90
Progoitrin	$C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$	2,37	388,10	96,90
Sinigrin	$C_{10}H_{17}NO_9S_2$	2,58	358,00	96,90
Epiprogoitrin	$C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$	2,88	388,10	96,90
Glukonapin	$C_{11}H_{19}NO_9S_2$	4,83	372,10	96,95
Glukotropeolin	$C_{14}H_{19}NO_9S_2$	7,27	408,10	96,90

Tablica 7. Parametri za određivanje odabranih glukozinolata veznim sustavom LC-MS/MS praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija - *nastavak*

Neoglukobrasicin	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	11,97	477,05	96,90
Glukobrasicin	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₉ S ₂	8,24	477,05	96,90
Glukolimnantin	C ₁₅ H ₂₁ NO ₁₀ S ₂	8,52	438,10	96,90
Glukonasturtiin	C ₁₅ H ₂₁ NO ₉ S ₂	9,42	422,05	96,90
4-Metoksiglukobrasicin	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	10,52	477,05	97,00

4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZINOLATA U RAZLIČITIM PRIMKAMA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata za svaki uzorak (N=3). Korištena je jednosmjerna analiza varijance kako bi se usporedile količine glukozinolata između primki. Kako bi se odredile signifikantne razlike između primki korišten je Fischerov LSD post hoc test. Analiza varijance pokazala je da postoje statistički značajne razlike u sadržaju svih analiziranih glukozinolata u istraživanim primkama raštike (tablica 8).

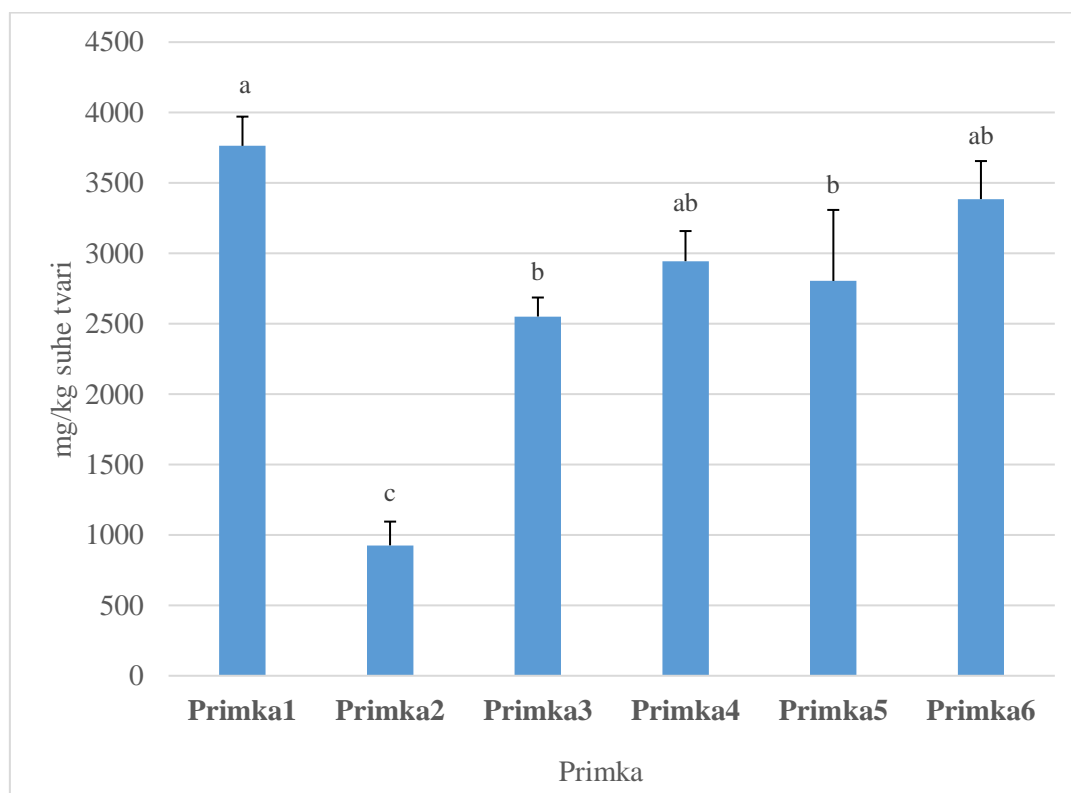
Tablica 8. Dobivene p-vrijednosti za svaki spoj korištenjem jednosmjerne analize varijance

	SPOJ	p-vrijednost
ALIFATSKI GLUKOZINOLATI	Glukoiberin	0,000202
	Sinigrin	0,000051
	Progoitrin	0,000005
	Glukosativin	0,011832
	Glukonapin	0,000000
	Glukomalkomin	0,000057
	Glukoheirolin	0,000287
	Epiprogoitrin	0,000001
INDOLNI GLUKOZINOLATI	Glukobrasicin	0,003422
	Neoglukobrasicin	0,000223
	4-Metoksiglukobrasicin	0,000702

Tablica 8. Dobivene p-vrijednosti za svaki spoj korištenjem jednosmjerne analize varijance-
nastavak

AROMATSKI GLUKOZINOLATI	Glukonasturtin	0,000049
	Glukotropeolin	0,000000
	Glukolimnantin	0,001657
UKUPNI GLUKOZINOLATI		0,000091

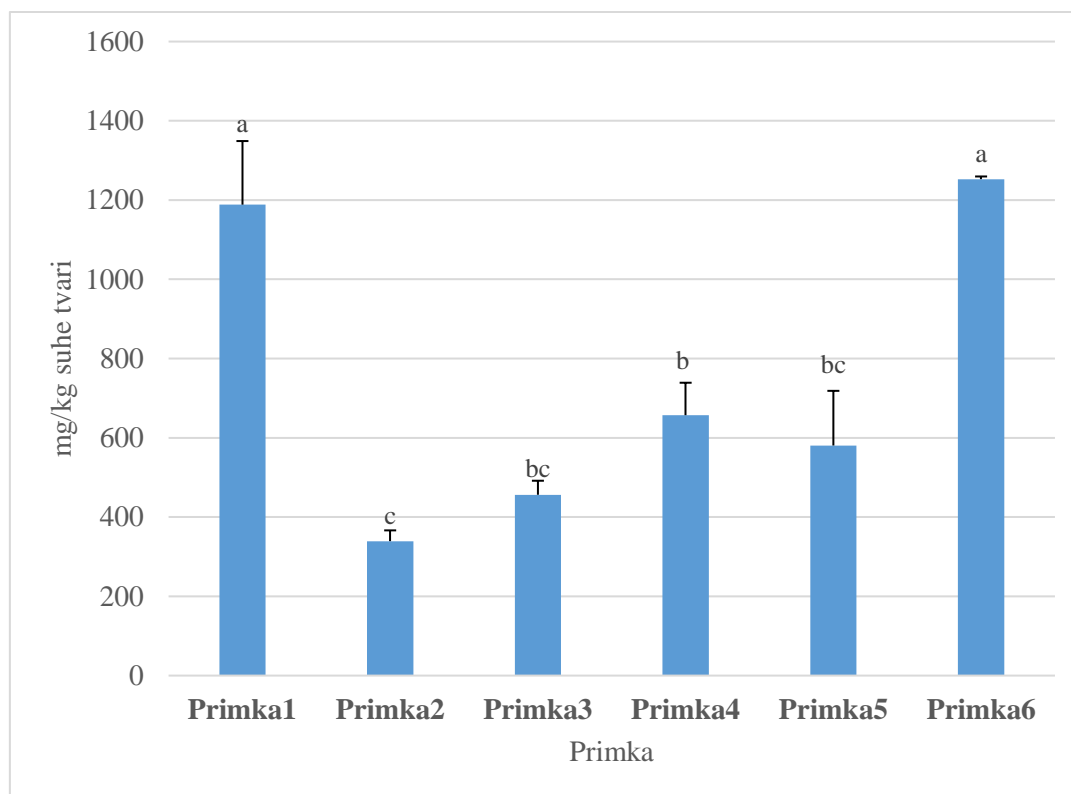
4.2.3. Alifatski glukozinolati



Slika 11. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukoiberina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška izračunata iz tri biološke repetitije

U ovome istraživanju, prosječna se koncentracija glukoiberina u primkama kretala od 3764 mg/kg suhe tvari do 926 mg/kg suhe tvari, te je ujedno i glukozinolat s najvećom detektiranom koncentracijom u usporedbi s drugim analiziranim glukozinolatima. U istraživanju Šamec i sur. (2022) sadržaj glukoiberina u raštici je također viši u odnosu na ostale detektirane glukozinolati, te se kreće od 1666 mg/kg suhe tvari prema 1323 mg/kg suhe tvari, što je donja granica rezultata ovoga istraživanja.

Sa slike 11, koja prikazuje analizu varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukoiberina, može se zaključiti kako je primka 2 imala značajno nižu količinu glukoiberina (926 mg/kg suhe tvari) u odnosu na ostale primke. Primka 1 je imala značajno višu koncentraciju glukoiberina (3764 mg/kg suhe tvari) u odnosu na primke 3 (2804 mg/kg suhe tvari) i 5 (2551 mg/kg suhe tvari), dok su primke 4 (2944 mg/kg suhe tvari) i 6 (3385 mg/kg suhe tvari) imale usporedivu koncentraciju glukoiberina s primkom 1 (3764 mg/kg suhe tvari).

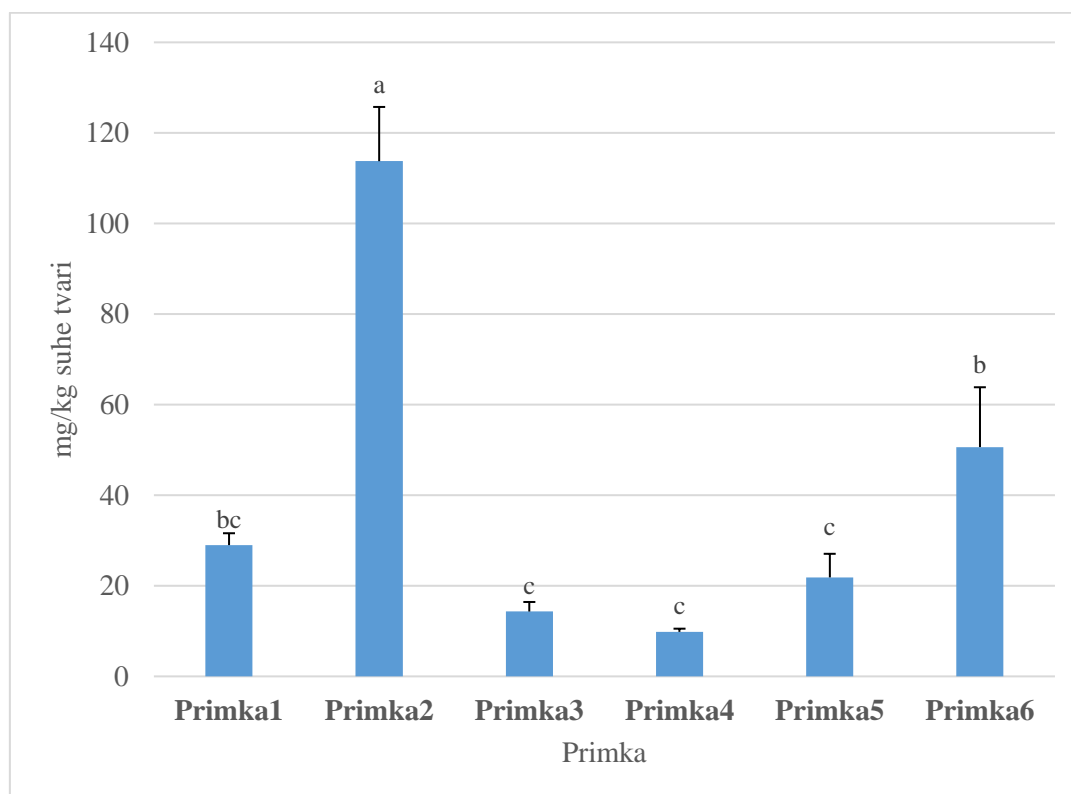


Slika 12. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije sinigrina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

U istraživanju Park i sur. (2014), sinigrin je istaknut kao glukozinolat najzastupljeniji u kupusu, cvjetači i kelju što u skladu s rezultatima ovog istraživanja, budući da je sinigrin detektiran kao treći najzastupljeniji glukozinolat. Prosječna koncentracija sinigrina u primkama kretala se od 1253 mg/kg suhe tvari do najniže vrijednosti 339 mg/kg suhe tvari u primci. Vrijednosti navedene u istraživanju Wu i Pehrsson (2021), gdje sadržaj sinigrina varira od 990 mg/kg suhe tvari prema 711 mg/kg suhe tvari, odgovaraju gornjim vrijednostima ovoga istraživanja. Također, vrijednosti ovoga istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja Kim i sur. (2018),

gdje je sinigrin varirao između 2 $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari prema 1,75 $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari, iako su rezultati izraženi u $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari.

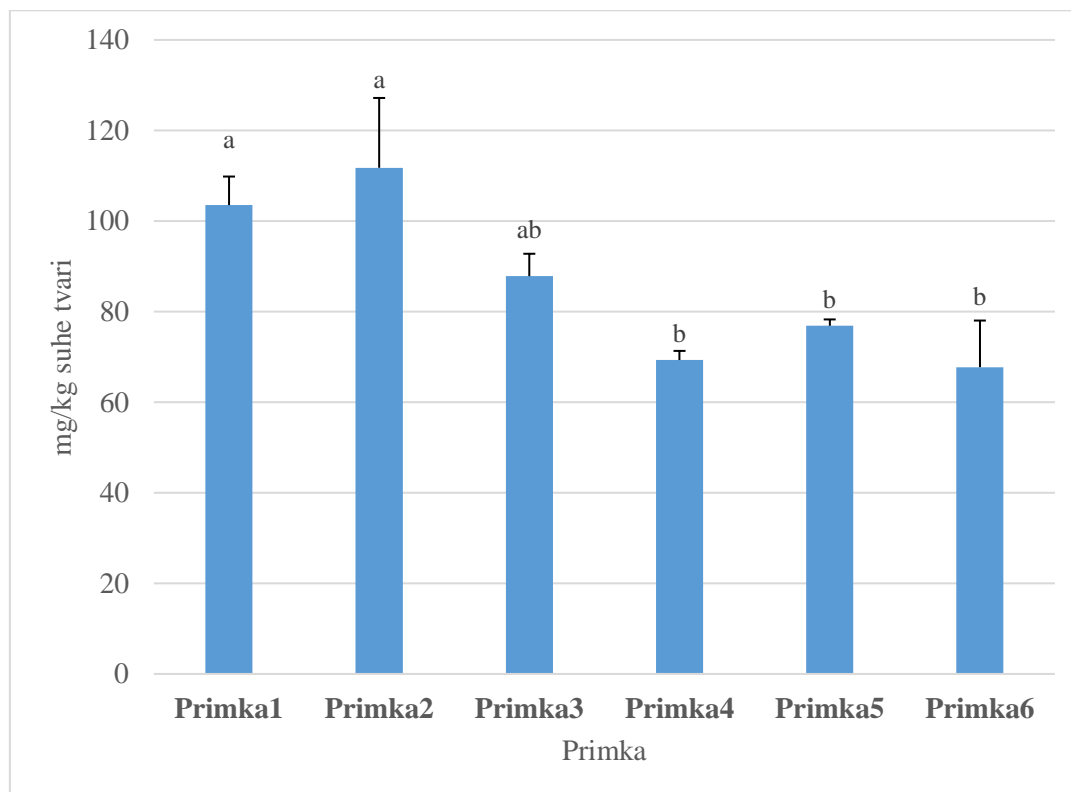
Na slici 12 je vidljivo kako su koncentracije sinigrina u primci 3 (456 mg/kg suhe tvari) i primci 5 (581 mg/kg suhe tvari) usporedive s koncentracijama sinigrina u primci 4 (657 mg/kg suhe tvari), odnosno u primci 2 (339 mg/kg suhe tvari).



Slika 13. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije progoitrina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Slika 13 prikazuje kako se, u prosjeku, koncentracija progoitrina kretala između 114 mg/kg suhe tvari do 10 mg/kg suhe tvari. Analiza varijance (slika 13) prikazuje značajno višu koncentraciju progoitrina u primci 2 (114 mg/kg suhe tvari) u usporedbi s ostalim primkama. Također, prema slici 17 može se zaključiti kako ne postoje značajne razlike u koncentraciji progoitrina u primci 1 (29 mg/kg suhe tvari), u odnosu na primke 3 (14 mg/kg suhe tvari), 4 (14 mg/kg suhe tvari) i 5 (22 mg/kg suhe tvari). U istraživanju Hwang i sur. (2019) gdje su promatrane koncentracije glukozinolata različitih vrsta roda *Brassica*, prosječne vrijednosti progoitrina su u cvjetači i kineskom kupusu bile u skladu s donjom granicom rezultata ovoga

istraživanja, naspram brokule čija je vrijednost progoitrina bila znatno veća u usporedbi s dobivenim rezultatima. S druge strane, u istraživanju Đulović i sur. (2023), progoitrin nije detektiran u listu raštike, kao ni u cvijetu ni korijenu.

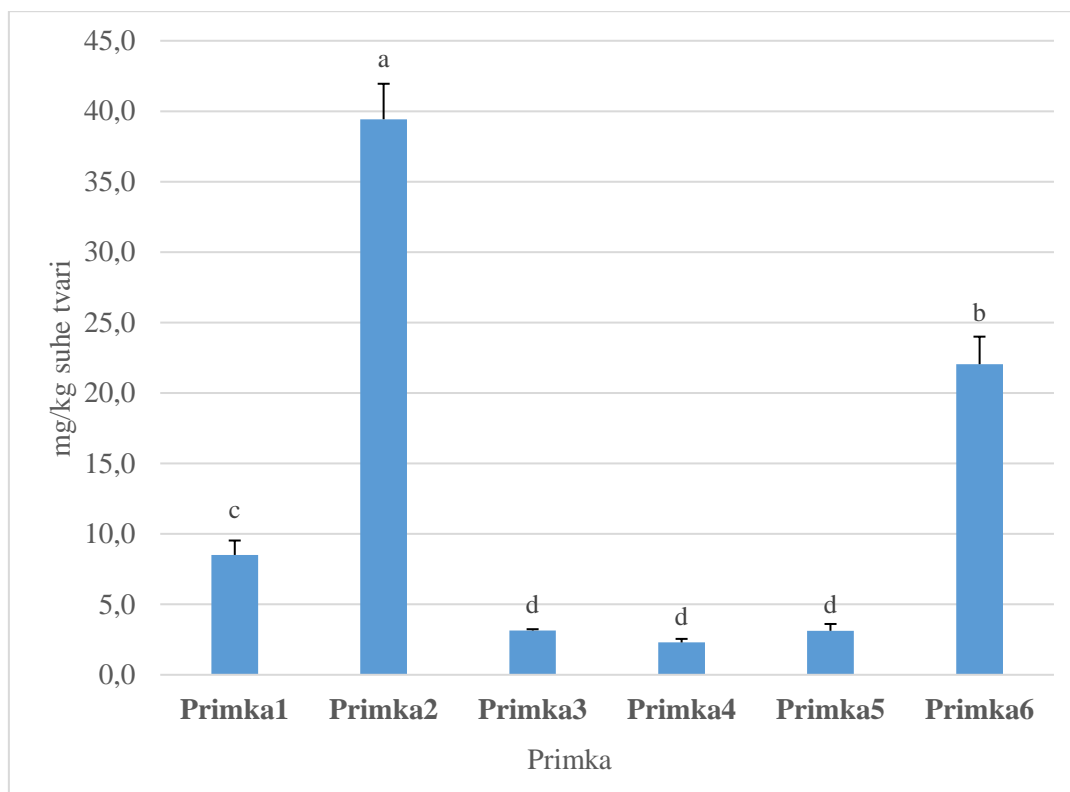


Slika 14. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukosativina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Promatrajući sliku 14, može se zaključiti da su se prosječne koncentracije u primkama kretale od 104 mg/kg suhe tvari u primci 2 do 68 mg/kg suhe tvari u primci 6. Gornje vrijednosti glukosativina u ovome istraživanju tri su puta manje u usporedbi s prosječnom vrijednosti istraživanja Liang i sur. (2018) gdje je sadržaj glukosativina u kupusu iznosio 319 mg/kg suhe tvari, dok su donje vrijednost ovoga istraživanja tri puta veće u odnosu na prosječni sadržaj glukosativina u rotkvici u istome istraživanju. Glukosativin je glavni glukozinolat u rikuli (*Eruca sativa* L.) (Fechner i sur., 2018), te je u istraživanju Liang i sur. (2018) detektirano i do 200 puta više glukosativina u rikuli odnosu na ostale kupusnjače, naspram kineskog kupusa, ljekovite potočarke i brokule gdje glukosativin nije uopće detektiran.

Analizom varijance, kako prikazuje slika 14, vidljivo je da su primke 1 (104 mg/kg suhe tvari) i

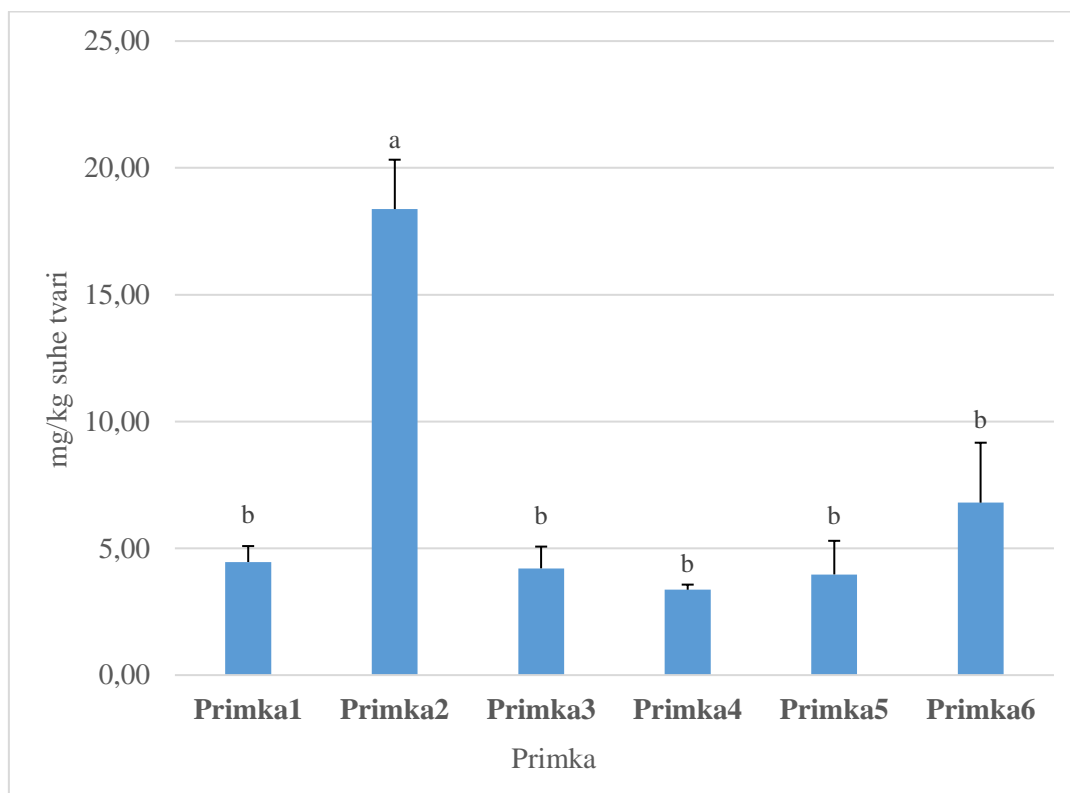
2 (112 mg/kg suhe tvari) imale značajno višu koncentraciju glukosativina u odnosu na primke 4 (69 mg/kg suhe tvari), primke 5 (77 mg/kg suhe tvari) i 6 (68 mg/kg suhe tvari).



Slika 15. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukonapina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repetitije

Količina glukonapina unutar primki je, u prosjeku, varirala od 39,4 mg/kg suhe tvari do 17 puta manje vrijednosti 2,3 mg/kg suhe tvari u primci 4. Najviša detektirana koncentracija glukonapina dobivena u ovome istraživanju, gotovo je četiri puta manja u usporedbi s najvećom koncentracijom navedenoj u istraživanju Wu i Pehrsson (2021) gdje je iznosila 147 mg/kg suhe tvari. Međutim, dobiveni su rezultati u skladu s rezultatima određivanja glukonapina u brokuli koje su proveli Jo i sur. (2022), kao i rezultatima određivanja glukonapina u kelju koje su proveli Kapusta-Duch i sur. (2016), iako su rezultate izrazili u $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari, pri čemu rezultati variraju između 1,98 do 0,03 $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari u brokuli, odnosno 0,04 $\mu\text{mol/g}$ suhe tvari u kelju.

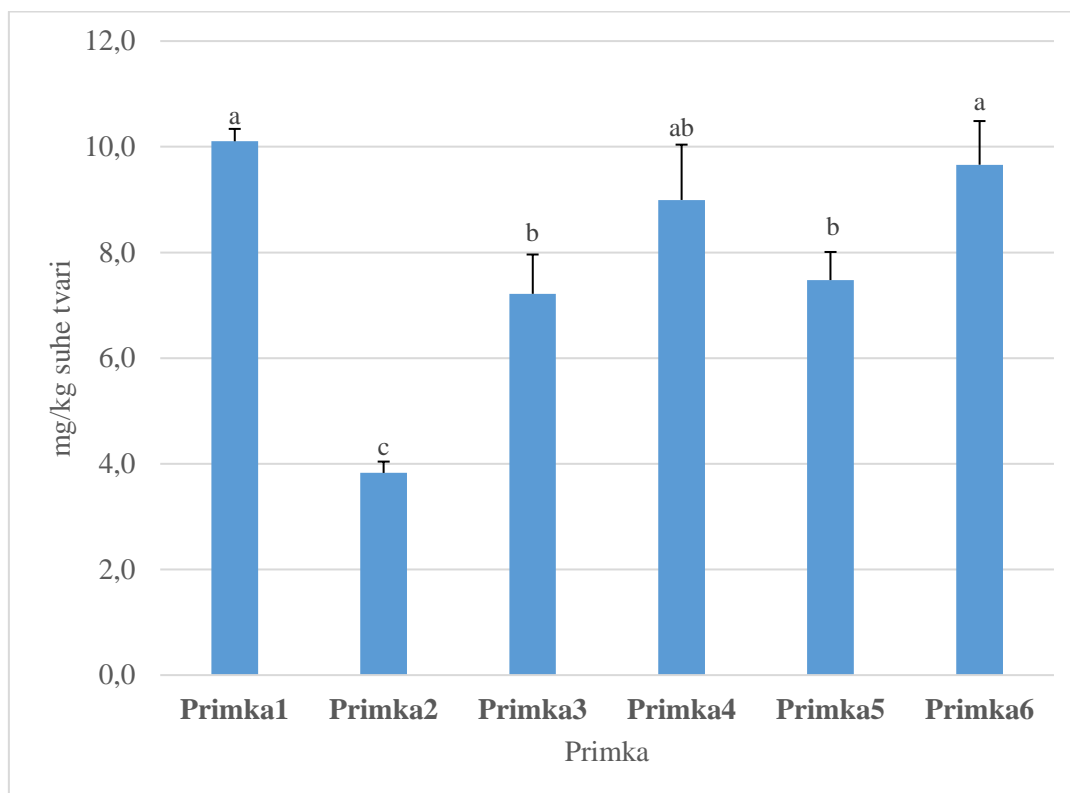
Analizom varijance prikazanoj na slici 15 vidljivo je kako je primka 2 imala značajno višu koncentraciju glukonapina u odnosu na ostale primke.



Slika 16. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukomalkomina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prema slici 16, vidljivo je kako se koncentracija glukomalkomiina kretala, u prosjeku, između 18,38 mg/kg suhe tvari do 3,37 mg/kg suhe tvari. Analiza varijance prikazana na slici 11 pokazuje kako je primka 2 (18,38 mg/kg suhe tvari) imala značajno višu razinu glukomalkomiina u odnosu na ostale primke.

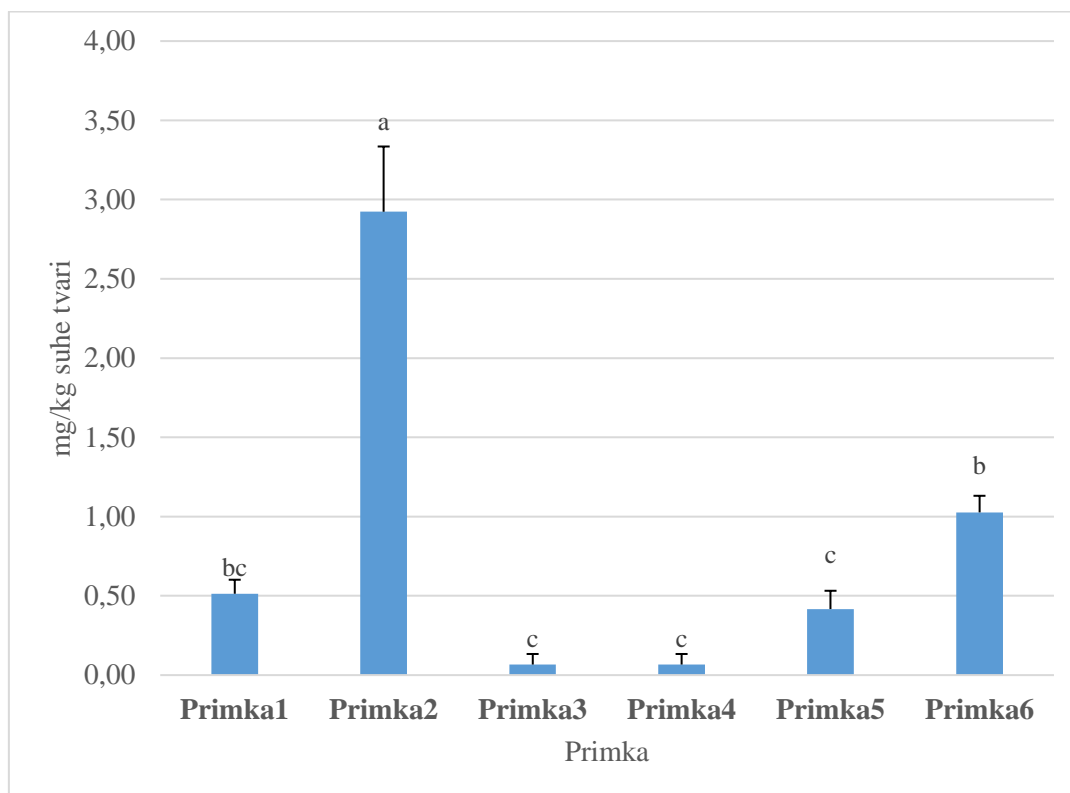
Glukomalkomin je glukozinolat koji se povezuje uz sjeme biljke *Arabidopsis thaliana* (talijin uročnjak) koja također spada u porodicu *Brassicaceae*. Ne postoje novija istraživanja o količini glukolimnathina u vrstama roda *Brassica*, osim u istraživanju Zalar iz 2010, gdje je, između ostalih identificiranih alifatskih glukozinolata, uspješno detektiran jedino glukomalkomin.



Slika 17. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukoheiolina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Koncentracija detektiranog glukoheiolina se, u prosjeku, kretala između 10,1 mg/kg suhe tvari u primci 1 do 3,8 mg/kg suhe tvari u primci 2. U istraživanju Liang i sur. (2018) glukoheiolin je detektiran jedino u kupusu, te se njegova vrijednost (4,5 mg/kg suhe tvari) slaže s donjim vrijednostima određenima u ovome istraživanju. Međutim, prema istome istraživanju Liang i sur. (2018) u ostalim kupusnjačama, poput rotkvice, rotkve, rikule, kineskog kupusa, brokule, cvjetače, itd. glukoheiolin nije uopće detektiran.

Analiza varijance na slici 17 prikazuje kako je primka 2 imala značajno nižu koncentraciju glukoheiolina (3,8 mg/kg suhe tvari) u odnosu na druge primke, te, također, kako je koncentracija glukoheiolina u primci 4 (9,0 mg/kg suhe tvari) usporediva s koncentracijom primkama 1 (10,1 mg/kg suhe tvari) i 6 (9,7 mg/kg suhe tvari) odnosno koncentracijom u primkama 3 (7,2 mg/kg suhe tvari) i 5 (7,5 mg/kg suhe tvari).

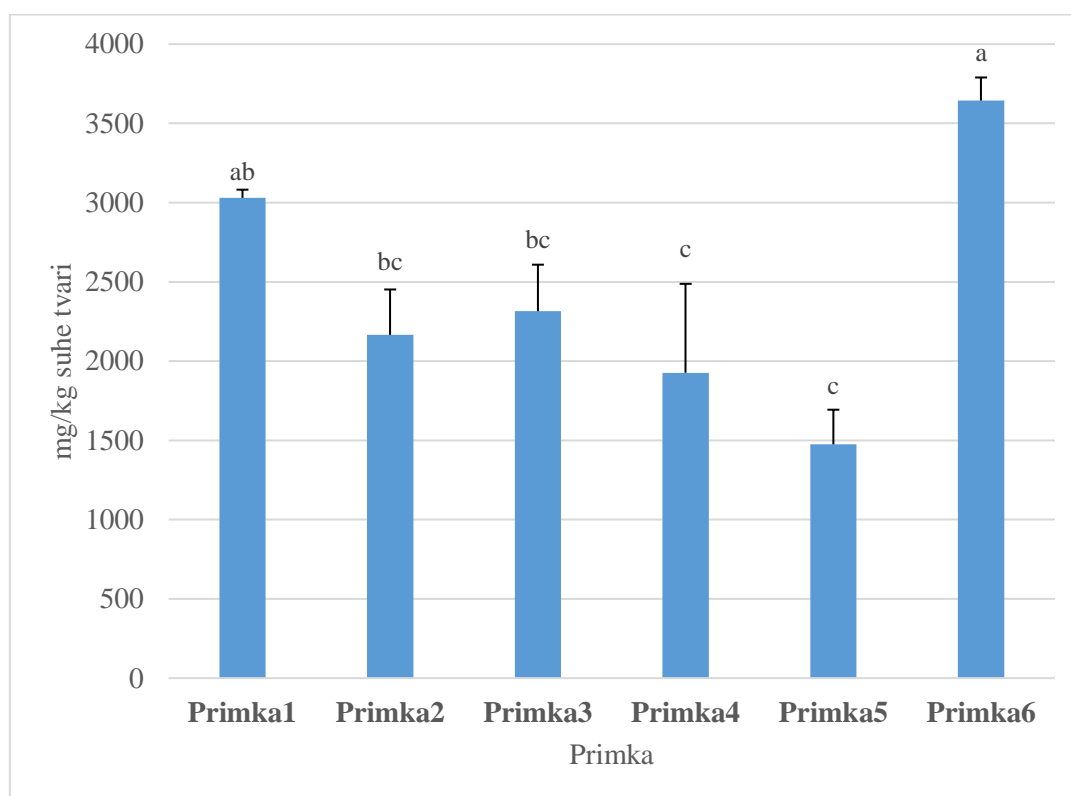


Slika 18. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije epiprogoitrina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječna koncentracija epiprogoitrina kretala između najveće vrijednosti u primci 2 (2,92 mg/kg suhe tvari) prema vrijednosti od 0,07 mg/kg suhe tvari u primkama 3 i 4 što nije u skladu istraživanjem Bhandari i sur. (2015) gdje je detektirani sadržaj epiprogoitrina u raštici iznosio 42,83 mg/kg suhe tvari, gotovo 25 puta više. U istome istraživanju, epiprogoitrin nije detektiran u cvjetači, niti rotkvi, što se slaže s istraživanjem Liang i sur. (2018) gdje, uz navedene kupusnjače, epiprogoitrin nije detektiran niti u rotkvici, rikuli, kineskom kupusu, cvjetači i brokuli. Signifikantno najviša koncentracija epiprogoitrina se, prema istraživanju Bhandari i sur. (2015), nalazila u kupusu te je iznosila 517,91 mg/kg suhe tvari.

Analizom varijance (slika 18) vidljivo je da je koncentracija epiprogoitrina bila značajno viša u primci 2 (2,92) u odnosu na ostale primke 2.

4.2.2. Indolni glukozinolati

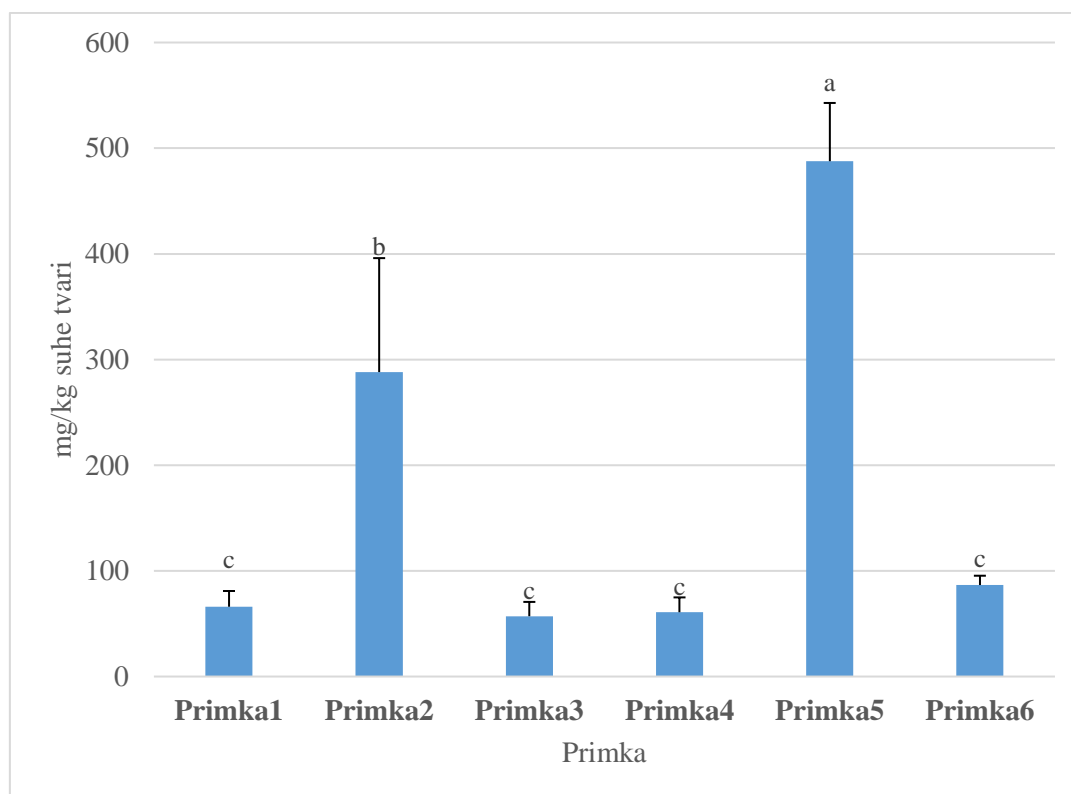


Slika 19. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukobrasicina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječna koncentracija glukobrasicina u primkama (slika 19) kretala se od 3644 mg/kg suhe tvari do 1475 mg/kg suhe tvari. Steindal i sur. (2015) su mjerili koncentraciju glukobrasicina u raštici, pri čemu se sadržaj glukobrasicina kretao od 3521 mg/kg suhe tvari prema 2962 mg/kg suhe tvari što je u skladu s dobivenim vrijednostima u ovome istraživanju. S druge strane, u istraživanju Park i sur. (2013) koncentracije glukobrasicina u brokuli pokazuje gotovo 3 puta višu koncentraciju (8759 mg/kg suhe tvari) u odnosu na količine u raštici, dobivene u istraživanju Steindal i sur. (2015). Charron i sur. (2005) uspoređivali su koncentracije glukobrasicina u različitim vrstama roda *Brassica*, te su zaključili kako je sadržaj glukobrasicina u raštici signifikantno niži u usporedbi s brokulom.

Analizom varijance koju prikazuje slika 19, detektirana je signifikantno niža koncentracija glukobrasicina kod primke 4 (1927 mg/kg suhe tvari) i primke 5 (1475 mg/kg suhe tvari) u odnosu na ostale primke. Također, vidljivo je i kako je primka 6 (3644 mg/kg suhe tvari) imala

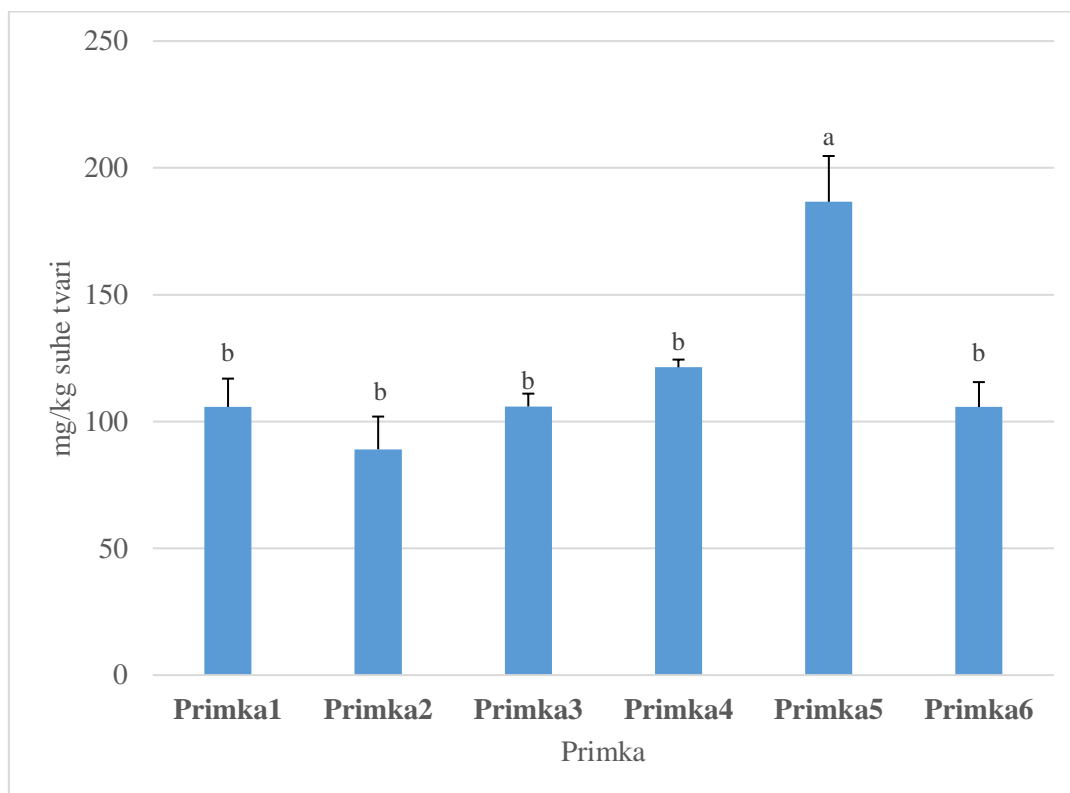
usporedivu količinu glukobrasicina u odnosu na primku 1 (3030 mg/kg suhe tvari).



Slika 20. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije neoglukobrasicina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječna detektirana koncentracija neoglukobrasicina kretala se od 488 mg/kg suhe tvari do 57 mg/kg suhe tvari što je zanemarivo niže u usporedbi s koncentracijom neoglukobrasicina u raštici navedenom u istraživanju Wu i Pehrsson (2021) gdje varira između 477 mg/kg prema 95 mg/kg suhe tvari. Uspoređivanjem koncentracije neoglukobrasicina u brokuli navedenoj u istraživanju Wu i Pehrsson (2021) gdje je iznosila 2174 mg/kg suhe tvari, s ovim istraživanjem, vidljivo je da je njegoja koncentracija gotovo 5 puta viša u brokuli nego u raštici, što također potvrđuje gore navedeno istraživanje Charrona i sur. (2005) o višoj koncentraciji glukobrasicina u brokuli u odnosu na raštiku, budući da se glukobrasicin i neoglukobrasicin razlikuju samo po kisikovom atomu.

Analizom varijance (slika 20), može se zaključiti kako je koncentracija neoglukobrasicina u primci 5 (488 mg/kg suhe tvari) bila značajno viša u odnosu na detektirane količine u ostalim primkama.

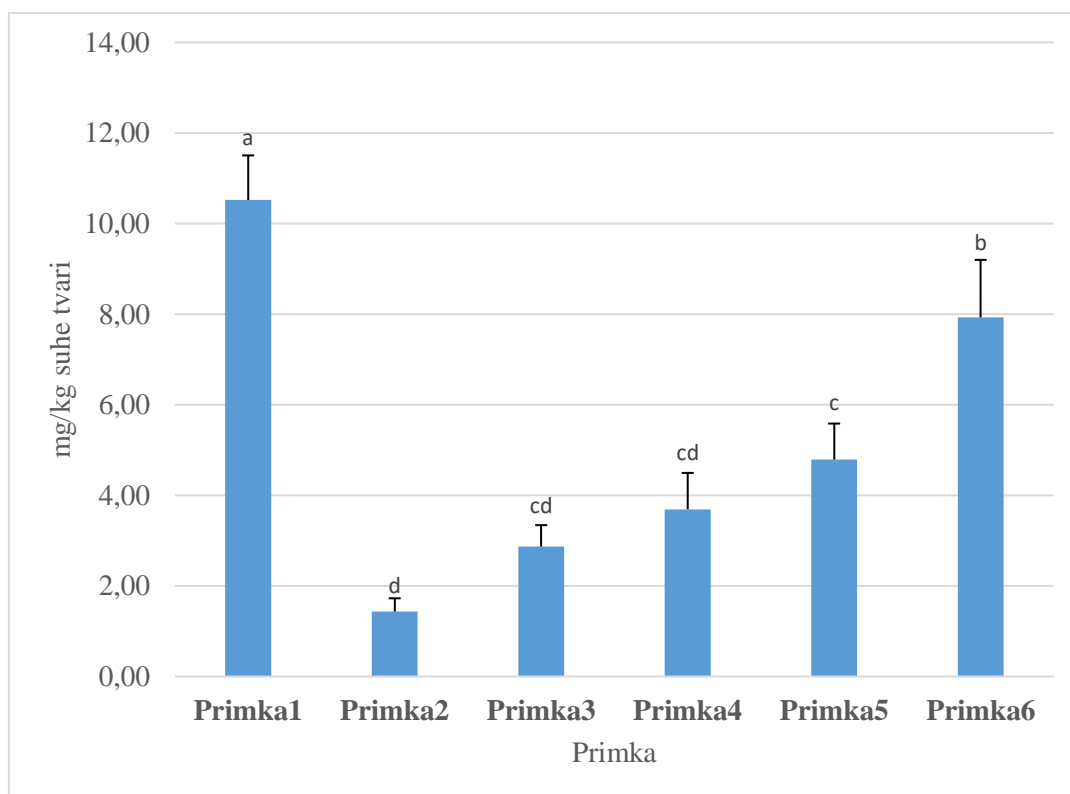


Slika 21. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije 4-metoxiglukobrasicina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Koncentracija detektiranog 4-metoxiglukobrasicina u primkama varirala je, u prosjeku, od 187 mg/kg suhe tvari u primci 5 do 89 mg/kg suhe tvari u primci 2. Prema istraživanju Đulović i sur. (2023), sadržaj 4-metoxiglukobrasicina u listu raštike iznosio je 1172 mg/kg suhe tvari, što je gotovo deset puta više u odnosu na najveću koncentraciju ovoga istraživanja. U istraživanju Liang i sur. (2018), koncentracija 4-metoxiglukobrasicina kod kupusnjača poput kineskog kupusa (3097 mg/kg suhe tvari), cvjetače (1338 mg/kg suhe tvari) i rotkvice (835 mg/kg suhe tvari) iznosi i od 10 do 30 puta više u odnosu na najvišu koncentraciju ovoga istraživanja.

Analizom varijance rezultata mjerenja količine 4-metoxiglukobrasicina (slika 21), može se zaključiti kako je količina u primci 5 (187 mg/kg suhe tvari) bila signifikantno viša u usporedbi s ostalim primkama.

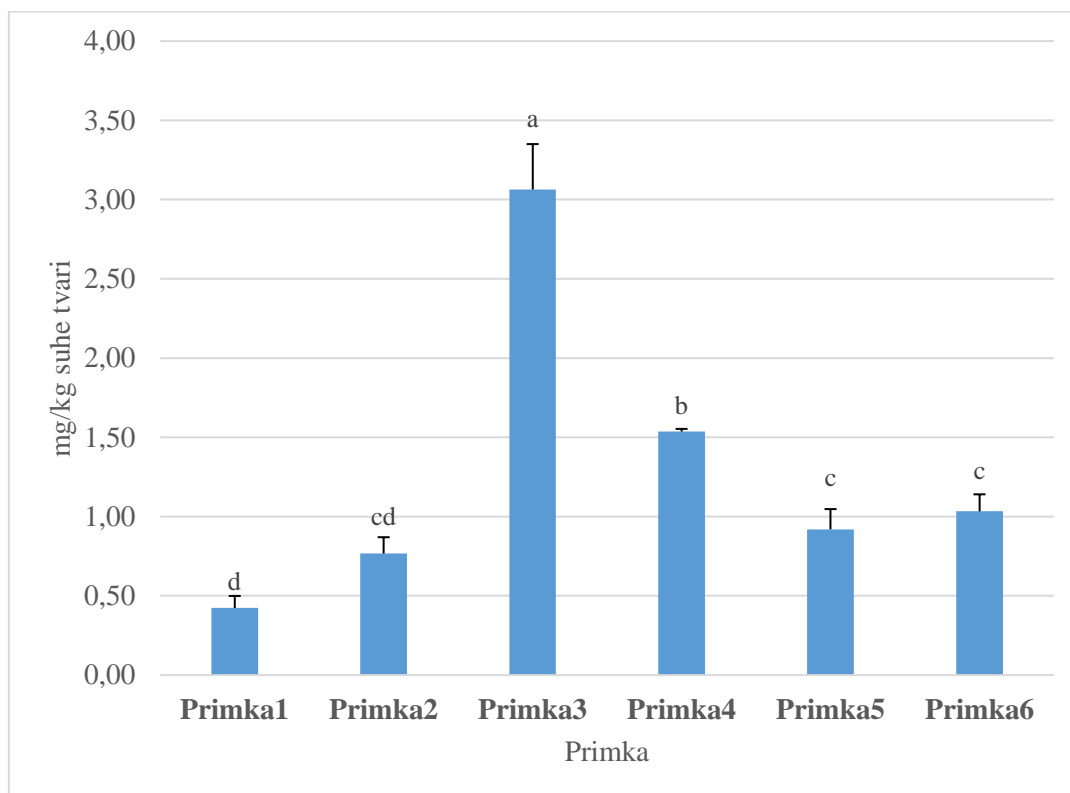
4.2.3. Aromatski glukozinolati



Slika 22. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukonasturtina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječna se koncentracija glukonasturtina u primkama kretala od 10,52 mg/kg do 1,43 mg/kg suhe tvari, čime se gornja granica koncentracije glukonasturtina u ovome istraživanju, podudara s najnižom detektiranom koncentracijom u brokuli u istraživanju Hwang i sur. (2019), naspram raštike, cvjetače i rokule gdje glukonasturtin nije uopće detektiran. Đulović i sur. (2023) također nisu detektirali glukonasturtin u listu raštike. S druge strane, prema Hwang i sur. (2019), količina glukonasturtina je u kineskom kupusu i kupusu do 2 puta veća od koncentracije u listu raštike zabilježene u ovome istraživanju.

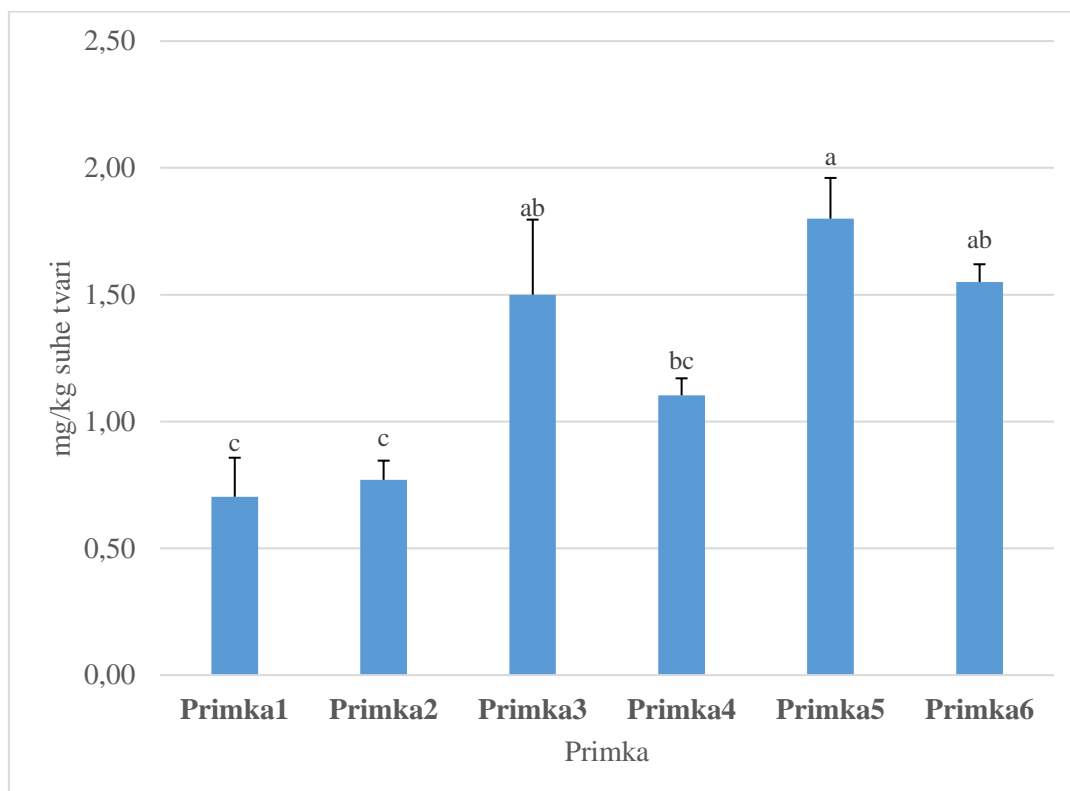
Analizom varijance (slika 22) može se zaključiti kao je primka 1 imala značajno višu količinu glukonasturtina u odnosu na ostale primke, dok su primke 3 i 4 (2,87 mg/kg suhe tvari, 3,69 mg/kg suhe tvari) imale usporedivu količinu glukonasturtina u odnosu na primke 2 (1,43 mg/kg suhe tvari) i 5 (4,79 mg/kg suhe tvari).



Slika 23. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukotropolina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Promatrajući sliku 23, može se zaključiti kako je prosječna koncentracija glukotropolina u primkama varirala u rasponu od 3,06 mg/suhe tvari u primci 3, prema najnižoj vrijednosti 0,42 mg/kg suhe tvari u primci 1. U istraživanju Liang i sur. (2018), koji su također kvantificirali glukozinolate LC-MS/MS metodom u 12 različitih kupusnjača, glukotropolin nije detektiran polovici istraživanih kupusnjača (u rikuli, ljekovitoj potočarki, rotkvici, rotkvi, kupusu i cvjetači), dok su koncentracije u kineskom kupusu (0,3 mg/kg suhe tvari) i brokuli (0,4 mg/kg suhe tvari) bile u skladu s donjim vrijednostima ovoga istraživanja.

Analizom varijance, utvrđeno je kako primka 3 ima značajno višu količinu glukotropolina u usporedbi s ostalim primkama, dok je primka 2 (0,77 mg/kg suhe tvari) imala usporedivu količinu s primkama 5 i 6 (0,92 mg/kg suhe tvari, 1,03 mg/kg suhe tvari), odnosno primkom 1 (0,42 mg/kg suhe tvari).

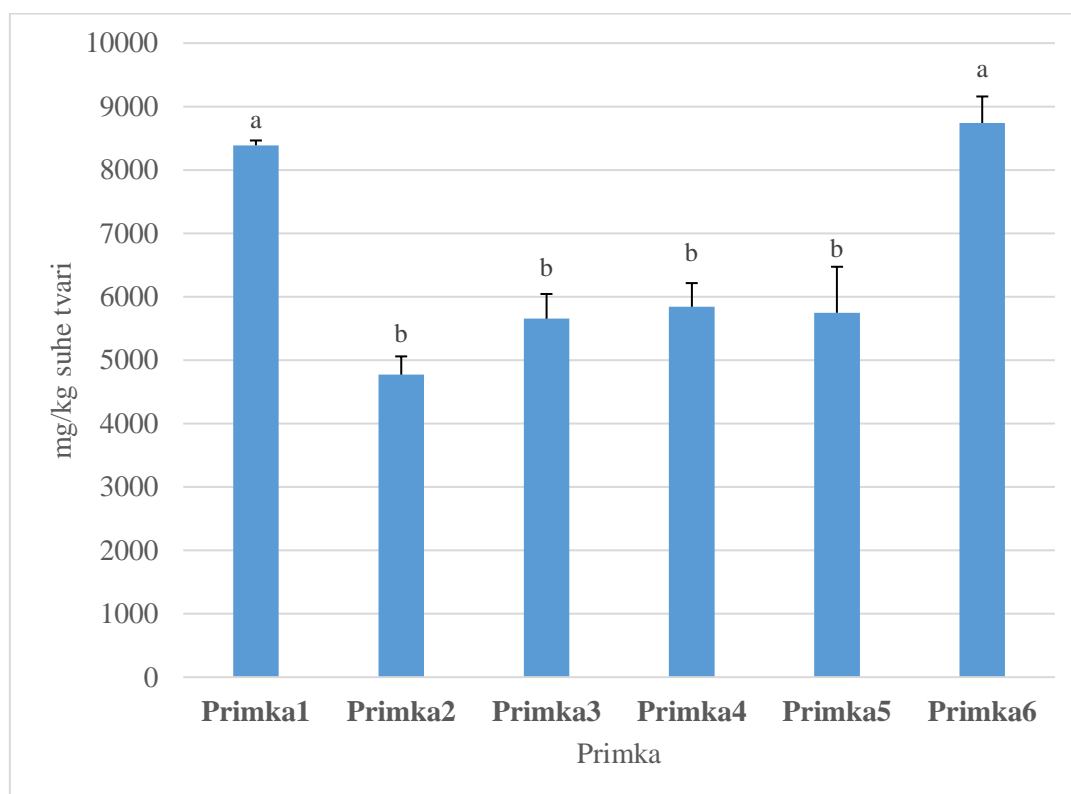


Slika 25. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije glukolimnantina LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječne koncentracije glukolimnantina su, u primkama, varirale od 1,80 mg/kg suhe tvari u primci 5 ka vrijednosti 0,70 mg/kg suhe tvari u primci 1. Ne postoji puno istraživanja o sadržaju glukolimnantina u vrstama roda *Brassica*, budući da se on povezuje uz vrste roda *Limnanthes*, odnosno uz biljku *Limnanthes alba* L. (limnanta bijela).

Analizom varijance (slika 25), vidljivo kako ne postoje značajne razlike u količini glukolimnantina između primke 5 (1,80 mg/kg suhe tvari) i primki 3(1,50 mg/kg suhe tvari) i 6 (1,55 mg/kg suhe tvari). Također, primka 4 (1,10) imala je usporedivu količinu s glukolimnantina s primkama 1 (0,70 mg/kg suhe tvari) i 2 (0,77 mg/kg suhe tvari).

4.2.4. Ukupni glukozinolati



Slika 26. Grafički prikaz analize varijance rezultata dobivenih mjerenjem prosječne količine ukupnih glukozinolata LC-MS/MS metodom; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška izračunata iz tri biološke repeticije

Prosječna koncentracija ukupnih glukozinolata (slika 26) kretala se između 8741 mg/kg suhe tvari u primci 6 prema 4771 mg/kg u primci 2. Također se, analizom varijance, može zaključiti kako su ukupni glukozinolati u primci 1 i 2 značajno viši u odnosu na ostale primke. Prema istraživanju Korus i sur. (2014) prosječna je koncentracija ukupnih glukozinolata, bila i 3 puta veća u odnosu na ovo istraživanje. S druge strane, u istraživanju Kapusta-Dutch i sur. iz 2016, prosječni sadržaj glukozinolata iznosio je 2250 mg/g suhe tvari što je dva puta manje nego u ovome istraživanju. Također, u istraživanju Đulović i sur. (2023), prosječna koncentracija ukupnih glukozinolata iznosila je 3525 mg/kg što je manje od donjih granica ovoga istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Optimiziranjem parametara LC-MS/MS metode uspješno je identificirano i kvantificirano osam alifatskih, tri indolna i tri aromatska glukozinolata u šest različitih primki raštike.
2. Prosječna koncentracija ukupnih glukozinolata kretala se između 8741 mg/kg suhe tvari do 4771 mg/kg suhe tvari. Sveukupno gledano, prosječne koncentracije ukupnih glukozinolata u primkama 1 i 6 bile su značajno veće od ostalih primki.
3. Najzastupljeniji glukozinolati u šest različitih primki raštike jesu glucoiberin, čije su se prosječne koncentracije kretale od 3764 mg/kg suhe tvari do 926 mg/kg suhe tvari, glukobrasicin, prosječnih koncentracija od 3644 mg/kg suhe tvari do 1475 mg/kg suhe tvari te sinigrin, prosječnih koncentracija od 1253 mg/kg suhe tvari do 339 mg/kg suhe tvari.
4. Glukozinolati s najnižim zabilježenim koncentracijama u šest različitih primki raštike jesu glukotropeolin, čije su se prosječne koncentracije kretale od 3,06 mg/kg suhe tvari do 0,42 mg/kg suhe tvari, epiprogoitrin, prosječnih koncentracija od 2,92 mg/kg suhe tvari do 0,07 mg/kg suhe tvari te glukolimnantin, prosječnih koncentracija od 1,80 mg/kg suhe tvari do 0,70 mg/kg suhe tvari.

6. LITERATURA

1. Acikgoz FE, Deveci M (2011) Comparative analysis of vitamin C, crude protein, elemental nitrogen and mineral content of canola greens (*Brassica napus L.*) and kale (*Brassica oleracea var. acephala*). *Afr J Biotechnol* **10**,19385-19391. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.2275>
2. Agerbirk N, Matthes A, Erthmann PØ, Ugolini L, Cinti S, Lazaridi E i sur. (2018) Glucosinolate turnover in *Brassicales* species to an oxazolidin-2-one, formed via the 2-thione and without formation of thioamide. *Phytochemistry* **153**, 79-93. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.006>
3. Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA (2006) Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*): an overview. *Plant Syst Evol.* **259**, 89–120. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z>
4. Almushayti AY, Brandt K, Carroll MA, Scotter MJ (2021) Current analytical methods for determination of glucosinolates in vegetables and human tissues. *J Chromatogr A* **1643**, 462060. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462060>
5. Amer B, Deshpande RR, Bird SS (2023) Simultaneous Quantitation and Discovery (SQUAD) Analysis: Combining the Best of Targeted and Untargeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Metabolites* **13**, 648. <https://doi.org/10.3390/metabo13050648>.
6. Anonymus 1 (2021) Prikaz raštike <https://agrosavjet.com/kako-se-uzgaja-lisnati-kupus-ili-rastan/>. Pristupljeno 29. svibnja, 2023.
7. Arumugam A, Razis AFA (2018) Apoptosis as a mechanism of the cancer chemopreventive activity of glucosinolates: A review. *Asian Pac J Cancer P*, **19**, 1439. <https://doi.org/10.22034%2FAPJCP.2018.19.6.1439>
8. Avato P, Argentieri MP (2015) *Brassicaceae*: A rich source of health improving phytochemicals. *Phytochem Rev* **14**, 1019-1033. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9414-4>
9. Balogh MP (2009) What are Mass Spectrometers? How Do They Work? U: Balogh MP (ured.) The Mass Spectrometry Primer, Waters Corporation, North Carolina, str. 9-12.

10. Banerjee S, Mazumdar S (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International J Anal Chem chemistry*, 1-40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
11. Batelja K, Goreta Ban S, Žanić K, Miloš B, Dumičić G, Matotan Z(2009) Svojstva autohtonih populacija raštike (*Brassica oleraceae L. var. acephala*) hrvatskog priobalja. *Poljoprivreda* **15**, 8–14.
12. Bauer N, Tkalec M, Major N, Talanga Vasari A, Tokić M, Vitko i sur. (2022) Mechanisms of Kale (*Brassica oleracea var. acephala*) Tolerance to Individual and Combined Stresses of Drought and Elevated Temperature. *Int J Mo Sci* **23**, 11494. <https://doi.org/10.3390/ijms231911494>
13. Becerra-Moreno A, Alanís-Garza, PA, Mora-Nieves JL, Mora-Mora JP, Jacobo-Velázquez DA (2014) Kale: An excellent source of vitamin C, pro-vitamin A, lutein and glucosinolates. *CYTA J Food* **12**, 298-303. <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2013.850743>
14. Bjarnholt N, Li B, D'Alvise J, Janfelt C (2014) Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat prod rep* **31**, 818-837. <https://doi.org/10.1039/C3NP70100J>
15. Blažević I, Montaut S, Burčul F, Olsen CE, Burow M, Rollin P i sur. (2020) Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry* **169**, 112100. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
16. Boja ES, Rodriguez H (2011) The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med*, *31*(2), 61-71. <https://doi.org/10.3343%2Fkjl.2011.31.2.61>
17. Butorac A, Marić M, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Rimac Brnčić S, Bačun Družina V (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **8**, 90-101.
18. Chalfant C, Del Poeta M (2011) Sphingolipids as signaling and regulatory molecules, Springer Science & Business Media, Berlin.
19. Charron CS, Saxton AM, Sams CE (2005) Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate–myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *J Sci Food Agric* **85**, 671-681. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2031>

20. Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218-232.
21. Curtasu MV, Nørskov NP (2023) Comprehensive quantification of flavonoids and salicylic acid representative of *Salix* spp. using microLiquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry: the importance of drying procedures and extraction solvent when performing classical solid-liquid extraction. *J Chromatogr A* **8**, 464139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464139>
22. de Vos RH, Blijleven WG (1988) The effect of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-Forschung* **187**, 525-529. <https://doi.org/10.1007/bf01042383>
23. del Carmen Martínez-Ballesta M, Carvajal M (2015) Myrosinase in *Brassicaceae*: the most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochemistry Rev* **14**, 1045-1051. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-015-9430-4>
24. del Carmen Martínez-Ballesta M, Moreno DA, Carvajal M (2013) The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. *Int J Mol Sci* **14**, 11607-11625. <https://doi.org/10.3390%2Fijms140611607>
25. Dewi KR, Ismayati M, Solihat NN, Yuliana ND, Kusnandar F, Riantana H i sur. (2023) Advances and key considerations of liquid chromatography–mass spectrometry for porcine authentication in halal analysis. *J Anal Sci Technol* **14**, 13. <https://doi.org/10.1186/s40543-023-00376-3>
26. Donkin SG, Eiteman MA, Williams PL (1995) Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* **27**, 258.
27. Đulović A, Burčul F, Čikeš Čulić V, Rollin P, Blažević I (2023) Glucosinolates and Cytotoxic Activity of Collard Volatiles Obtained Using Microwave-Assisted Extraction. *Molecules* **28**, 1657. <https://doi.org/10.3390/molecules28041657>
28. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J (2009) Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Revs* **44**, 210-230. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920902717872>
29. Eom SH, Baek SA, Kim JK, Hyun TK (2018) Transcriptome analysis in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) provides the role of glucosinolate metabolism in response to drought stress. *Molecules* **23**, 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules23051186>

30. Fechner J, Kaufmann M, Herz C, Eisenschmidt D, Lamy E, Kroh i sur. (2018) The major glucosinolate hydrolysis product in rocket (*Eruca sativa L.*), sativin, is 1, 3-thiazepane-2-thione: Elucidation of structure, bioactivity, and stability compared to other rocket isothiocyanates. *Food Chem* **261**, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.023>
31. Fimognari C, Turrini E, Ferruzzi L, Lenzi M, Hrelia P (2012) Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat Res Rev Mutat Res* **750**, 107-131. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.001>
32. FoodData Central (2019) <https://frida.fooddata.dk/food/23?lang=en>. Pristupljeno 28. svibnja, 2023.
33. Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K (2011) Cabbage family affairs: the evolutionary history of *Brassicaceae*. *Trends Plant Sci* **16**, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.005>
34. Fu X, Anderson M, Wang Y, Zimring JC (2019) LC-MS/MS-MRM-based targeted metabolomics for quantitative analysis of polyunsaturated fatty acids and oxylipins. U: D'Alessandrio A (ured.) High-Throughput Metabolomics: Methods and Protocols, Humana New York, New York, str.107-120.
35. Gergov M, Ojanperä I, Vuori E (2003) Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J Chromatogr B Biomed Appl* **795**, 41-53. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00498-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00498-7)
36. Gratacós-Cubarsí M, Ribas-Agusti A, García-Regueiro JA, Castellari M (2010) Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea L. var. botrytis*. *Food Chem* **121**, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.081>
37. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI (2012) Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp and Toxicol Pathol* **64**, 503-508. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.11.005>
38. Halkier BA, Gershenzon, J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 303-333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>

39. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC i sur. (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.
40. Holst B, Williamson G (2004) A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* **21**, 425–47. <https://doi.org/10.1039/b204039p>
41. Hooshmand K, Fomsgaard IS (2022) Analytical Methods for Quantification and Identification of Intact Glucosinolates in *Arabidopsis* Roots Using LC-QqQ(LIT)-MS/MS. *Metabolites* **11**, 47. <https://doi.org/10.3390/metabo11010047>
42. Hwang IM, Park B, Dang YM, Kim SY, Seo HY (2019) Simultaneous direct determination of 15 glucosinolates in eight *Brassica* species by UHPLC-Q-Orbitrap-MS. *Food Chem* **282**, 127-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.036>
43. Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2009) Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **8**, 31-43. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00065.x>
44. Jo JS, Bhandari SR, Kang GH, Shin YK, Lee JG (2022) Selection of broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) on composition and content of glucosinolates and hydrolysates. *Sci Hortic* **298**, 110984. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110984>
45. Kamal RM, Abdull Razis AF, Mohd Sukri NS, Perimal EK, Ahmad H, Patrick R i sur. (2022) Beneficial Health Effects of Glucosinolates-Derived Isothiocyanates on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **27**, 624. <https://doi.org/10.3390/molecules27030624>
46. Kang Y, Zhang G, Huang EC, Huang J, Cai J, Cai L i sur. (2020) Sulforaphane prevents right ventricular injury and reduces pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol-Heart C* **318**, 853-866. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00321.2019>
47. Kapusta-Duch J, Kusznierevich B, Leszczyńska T, Borczak B (2016) Effect of cooking on the contents of glucosinolates and their degradation products in selected *Brassica* vegetables. *J Func Foods* **23**, 412-22. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.006>
48. Khalid W, Iqra Afzal F, Rahim MA, Abdul Rehman A, Faiz ul Rasul H, Arshad MS (2023) Industrial applications of kale (*Brassica oleracea var. sabellica*) as a functional ingredient: a review. *Int J Food Prop* **26**, 489-501. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2168011>

49. Kim CK, Seol YJ, Perumal S, Lee J, Waminal NE, Jayakodi M i sur. (2018) Re-exploration of U's triangle Brassica species based on chloroplast genomes and 45S nrDNA sequences. *Sci Rep* **8**, 7353. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25585-4>
50. Korus A, Słupski J, Gębczyński P, Banaś A (2014) Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of glucosinolates in kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*) leaves. *Food Sci Technol* **59**, 1003-1008. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.030>
51. Kural BV, Küçük N, Yücesan FB, Örem A (2011) Effects of kale (*Brassica oleracea L. var. acephala* DC) leaves extracts on the susceptibility of very low and low density lipoproteins to oxidation. *Indian J Biochem Biophys* **48**, 361-364.
52. Kuzyk MA, Smith D, Yang J, Cross TJ, Jackson AM, Hardie DB i sur. (2009) Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1860-1877. <https://doi.org/10.1074/mcp.m800540-mcp200>
53. LaCourse WR, LaCourse ME (2023) General instrumentation in HPLC. U: Fanali S, Chankvetadze B, Haddad P, Poole C, Riekkola MJ (ured.) *Liquid chromatography*, 3. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 67-73.
54. Lešić R, Borošić J, Buturac I, Herak Ćustić M, Poljak M, Romić D. (2016) *Povrćarstvo (Vegetable Crops)*, 3. izd., Zrnski d.d. Čakovec.
55. Liang X, Lee HW, Li Z, Lu Y, Zou L, Ong CN (2018) Simultaneous quantification of 22 glucosinolates in 12 *Brassicaceae* vegetables by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *ACS omega* **3**, 15546-53. <https://doi.org/10.1021%2Facsomega.8b01668>
56. Licznarska B, Baer-Dubowska W (2016) Indole-3-carbinol and its role in chronic diseases. U: Gupta SC, Prasad S, Aggarwal BB (ured.) *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, Springer, Cham, str. 131-154.
57. López-Berenguer C, Martínez-Ballesta MC, García-Viguera C, Carvajal M (2008) Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Sci* **174**, 321-328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.012>
58. López-Fernández O, Domínguez R, Pateiro M, Munekata PE, Rocchetti G, Lorenzo JM (2020) Determination of polyphenols using liquid chromatography–tandem mass

- spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants* **9**, 479. <https://doi.org/10.3390%2Fantiox9060479>
59. Lord JS, Lazzeri L, Atkinson HJ, Urwin PE (2011) Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. *J Agric Food Chem* **59**, 7882-7890. <https://doi.org/10.1021/jf200925k>
60. Luterotti S (2014) Uvod u kemijsku analizu, 7. izdanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 196-207, 218-220.
61. Ma T, Zhu D, Chen D, Zhang Q, Dong H, Wu W (2018) Sulforaphane, a natural isothiocyanate compound, improves cardiac function and remodeling by inhibiting oxidative stress and inflammation in a rabbit model of chronic heart failure. *Med Sci Monit* **24**, 1473. <https://doi.org/10.12659/msm.906123>
62. Major N, Perković J, Palčić I, Bažon I, Horvat I, Ban D i sur. (2022) The Phytochemical and Nutritional Composition of Shallot Species (*Allium × cornutum*, *Allium × proliferum* and *A. cepa* Aggregatum) Is Genetically and Environmentally Dependent. *Antioxidants* **11**,1547. <https://doi.org/10.3390/antiox11081547>
63. Major N, Prekalj B, Perković J, Ban D, Užila Z, Ban SG (2020) The Effect of Different Extraction Protocols on *Brassica oleracea a var. acephala* Antioxidant Activity, Bioactive Compounds, and Sugar Profile. *Plants* **9**, 1792. <https://doi.org/10.3390%2Fplants9121792>
64. Mondal C, Chandra AK (2019) Goitrogenic/antithyroidal potential of moringa leaves (*Moringa oleifera*) and spinach (*Spinacia oleracea*) of Indian origin on thyroid status in male albino rats. *Braz J Pharm Sci*, 55. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000218005>
65. Park S, Arasu MV, Jiang N, Choi SH, Lim YP, Park JT i sur. (2014) Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*). *Ind Crops and Prod* **60**, 8-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.037>
66. Park MH, Arasu MV, Park NY, Choi YJ, Lee SW, Al-Dhabi NA i sur. (2013) Variation of glucoraphanin and glucobrassicin: anticancer components in *Brassica* during processing. *Food Sci Technol* **33**, 624-631. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013000400005>

67. Rifai N, Horvath R, Wittwer CT, Hoofnagle A (2018) Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogen, Elsevier, Amsterdam.
68. Pereyra KV, Andrade DC, Toledo C, Schwarz KG., Uribe-Ojeda A, Ríos-Gallardo AP i sur. (2020) Dietary supplementation of a sulforaphane-enriched broccoli extract protects the heart from acute cardiac stress. *J Funct Foods* **75**, 104267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.104267>
69. Rosa EAS, Heaney RK, Fenwick GR, Portas CAM (1997) Glucosinolates in crop plants. *Hort Rev* **19**, 99–215. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470650622.ch3>
70. Prieto MA, López CJ, Simal-Gandara J (2019) Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv Food Nutr* **90**, 305-350. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.008>
71. Quirante-Moya S, García-Ibañez P, Quirante-Moya F, Villaño D, Moreno DA (2020) The role of brassica bioactives on human health: are we studying it the right way? *Molecules* **25**, 1591. <https://doi.org/10.3390/molecules25071591>
72. Radojčić Redovniković I, Glivetić T, Delonga K, Vorkapić-Furač J (2008) Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum biologorum* **110**, 297-309.
73. Rakow G (2004) Species origin and economic importance of *Brassica* in biotechnology. U: Pua EC, Douglas CJ (ur.) Brassica, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
74. Rechthaler J, Rizzi A, Allmaier G (2007) A one-way hydrophobic surface foil as sample support for MALDI and off -line CZE/ MALDI mass spectrometry: An alternati ve for low and high molecular mass compounds. *Int J Mass Spec* **268**, 131-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2007.07.010>
75. Ribera AE, Zuñiga G (2012) Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *Jour Soil Sci Plant Nutr* **12**, 893-911. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012005000040>.
76. Saitman A (2019) Overview of analytical methods in drugs of abuse analysis: gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry and related methods. U: Dasgupta A (ured.) Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing, 2. izd., Academic Press, Texas, str. 157-171
77. Shulaev V (2006) Metabolomics technology and bioinformatics. *Breif bioinformatics* **7**, 128 -139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl012>

78. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2013) Fundamentals of analytical chemistry, 9. izd., Cengage Learning, Boston.
79. Sneha Lakshmi RP (2015) A review on chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC) and its functions. *J Pharm Anal* **4**, 1-15.
80. Šamec D, Urlič B, Salopek-Sondi B (2019) Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Criti Rev Food Sci Nutr* **59**, 2411- 2422. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400>
81. Šamec D, Ljubej V, Redovniković IR, Fistanić S, Salopek-Sondi B (2022) Low temperatures affect the physiological status and phytochemical content of flat leaf kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) sprouts. *Foods* **11**, 264. <https://doi.org/10.3390/foods11030264>
82. Thavarajah D, Thavarajah P, Abare A, Basnagala S, Lacher C, Smith P i sur. (2016) Mineral micronutrient and prebiotic carbohydrate profiles of USA-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *J Food Compos Anal* **52**, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.07.003>
83. Tian Q, Rosselot RA, Schwartz SJ (2005) Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **343**, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.045>
84. Traka M, Mithen R (2009.) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* **8**, 269-282. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-008-9103-7>
85. Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Bio Interact* **103**, 79-129. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(96\)03745-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(96)03745-3)
86. Vidushi Y, Meenakshi B, Bharkatiya M (2017) A review on HPLC method development and validation. *Res J Life Sci, Bioinform, Pharm Chem Sci* **2**, 178. <https://doi.org/10.26479/2017.0206.12>
87. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S. (1997) A Global View of LC-MS, Global View Publishing, Pittsburg.
88. Wu X, Pehrsson PR (2021) Current knowledge and challenges on the development of a dietary glucosinolate database in the United States. *Curr Dev Nutr* **5**, 102. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab102>

89. Xiong Q, Tian X, Li W, Chen L, Zhou M, Xu C i sur. (2020) Sulforaphane alleviates methamphetamine-induced oxidative damage and apoptosis via the Nrf2-mediated pathway in vitro and in vivo. *Food Agr Immunol* **31**, 859-880. <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2020.1784099>
90. Yang L, Wen K-S, Ruan X, Zhao Y-X, Wei F, Wang Q (2018) Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules* **23**, 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
91. Zalar A. Resistance of Arabidopsis thaliana seeds exposed to monochromatic and simulated solar polychromatic UV radiation: preparation for the EXPOSE space missions to the International Space Station (ISS) (doktorski rad), Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, Guyancourt.
92. Zhang Y, Talalay P (1998) Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes. *Cancer Res* **58**, 4632-4639.
93. Zhou K, Yu L (2006) Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT-Food Sci Technol* **39**, 1155-1162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.015>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Iva Marinović izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Iva Marinović
Vlastoručni potpis