

# Doprinos istraživanju slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva od 2001. do 2006.

KUI – 13/2007

Prispjelo 20. studenog 2006.

Prihvaćeno 20. prosinca 2006.

*I. Jerković\**

Zavod za organsku kemiju,  
Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu  
Teslina 10/V, 21000 Split, Hrvatska

U radu je prikazan doprinos istraživanju slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva u razdoblju 2001. – 2006. koji je ostvaren radom u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilište u Splitu. Identificirane su mnoge terpenke strukture, fenilpropanski derivati, kao i alifatski ugljikovodici, alkoholi, karbonili, masne kiseline i dr. Aglikoni oslobođeni enzimskom hidrolizom glikozida isparljivih spojeva bili su alifatski, fenilpropanski derivati, monoterpene, seskviterpeni i dr. Nadalje, sintetizirani su glukozidi čestih monoterpenkih i alifatskih alkohola, te fenola (Koenigs-Knorr-ova glukozilacija, izravna glukozilacija uz  $\text{FeCl}_3$ , enzimska kondenzacija i transglukozilacija iz celobioze).

Ključne riječi: *Eterična ulja, glikozidno vezani isparljivi spojevi, sinteza O-glikozida, GC-MS*

## Uvod

Eteričnim uljima se pripisuje "ekološka uloga" u biljnim interakcijama, kao i u interakcijama biljka-životinja. U kemotaksonomiji analiza specifičnog kemijskog sastava eteričnih ulja pomaže sustavnoj klasifikaciji biljnog carstva (određivanje kemotipova). Zbog korisnih svojstava, ugodnog mirisa, antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti predmet su interesa kozmetičke, prehrambene, farmaceutske industrije i dr. Ne osvrćući se na podjelu prema funkcijskim skupinama komponente eteričnih ulja dijele se na terpene, fenilpropanske derivate i ostale spojeve.<sup>1</sup> Biogenetski prekursor svih terpena je 3-izopentenil-pirofosfat (3-IPP). Najčešći biogenetski put 3-IPP je preko mevalonske kiseline<sup>2</sup> iako 3-IPP može nastati i na druge načine, npr. preko deoksilulozafosfatnog puta.<sup>3</sup> Osim eteričnih ulja u aromatičnim biljkama, isparljivi spojevi odgovorni su za blaži miris nearomatičnog bilja, plodova voća i povrća.<sup>4</sup> To su uglavnom alifatski spojevi nastali katabolizmom masnih kiselina.

Jedan dio prirodnih isparljivih spojeva vezan je u obliku glikozida. Različiti rezultati istraživanja ne dopuštaju pripisivanje točno određenog djelovanja ovih spojeva u biljkama, kao što se na primjer smatralo da sudjeluju u metabolizmu eteričnih ulja.<sup>5</sup> Ovi glikozidi kao neisparljivi spojevi nemaju miris. Oslobođaju mirisne spojeve tek kada se hidroliziraju ili piroliziraju do isparljivih mirisnih aglikona. Osobito se  $\beta$ -D-glukozidi mogu lako razgraditi (za sada *in vitro*) u metabolizmu nekoliko kožnih mikroflora,<sup>6,7</sup> te mogu osloboditi isparljive spojeve, što sugerira korisnost ovih spojeva u kozmetici kao prekursora mirisa s alternativno trajnijim učinkom. Posljednjih petnaestak godina ovi glikozidi se

pokušavaju biotehnološki iskoristiti kao prekursori arome koji hidrolizom mogu pojačati aromu namirnica. Naime, hidroliza monoterpil-glikozida za vrijeme fermentacije vina je djelomična, dok većina početnih glikozida ostaje nepromijenjena i nakon završetka fermentacije. Uporabom različitih enzima (npr.  $\beta$ -glukozidaze,  $\alpha$ -arabinofuranozidaze,  $\alpha$ -ramnopiranozidaze) moguće je provesti hidrolizu *in vitro*, s velikom selektivnošću prema različitim glikozidima<sup>8</sup> i tako obogatiti aromu vina, ali i voćnog soka. Poznato je da aroma crnog čaja nastaje enzimskom hidrolizom neisparljivih prekursora iz svježih listova tijekom prerade čaja, a osobito fermentacije. Dakle, ovi su spojevi predmet interesa prehrambene industrije, a osobito industrije vina, voćnih sokova i duhana. Alkil-glikozidi (osobito s većim alifatskim lancem), posebna grupa glikozida hlapljivih spojeva, su neionski, površinski aktivni i biorazgradivi spojevi, pa mogu poslužiti u proizvodnji biorazgradivih detergenata i emulgatora. Danas je poznato preko 200 različitih aglikonskih struktura.<sup>9</sup> Dije se prema ugljikovom skeletu na alifatske alkohole, alkilfenole, fenilpropanske derivate,  $\text{C}_{13}$ -norizoprenoide, monoterpene i seskviterpene. Većina aglikona koristi hidroksilnu skupinu za glikozidnu vezu eterskog tipa. Kiseline mogu formirati estere s ugljikohidratima, aldehidi acetale ili poluacetale. Ugljikohidrati uključeni u strukture glikozida isparljivih spojeva mogu se podijeliti u dvije velike skupine monosaharida (osobito glukoza) i disaharida, dok su trisaharidi i acilirani ugljikohidrati rjeđi.<sup>9</sup> O-glikozidna veza između ugljikohidratnog donora i neugljikohidratnog akceptora, u živim organizmima, nastaje reakcijom prijenosa šećernog ostatka povezanog energijom bogatom vezom s koenzimom (najčešće uridin-difosfatom, UDP).<sup>10</sup> Energijom bogati derivati saharida služe kao donori glikozilne grupe. Dakle, sredstvo za glukozilaciju je uridin-difosfosaharid (npr. UDP-glukoza). Glukoza od UDP-glukoze se može lako prenositi na nukleofilne reaktante, prije svega na spojeve s hidroksilnim funkcijskim skupinama.

\* Rad je izložen na XX. Jubilarnom hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 26. 2.–1. 3. 2007. Za istraživanja opisana u ovom radu I. Jerković je dobio nagradu "Leopold Ružička" HKD za 2005. godinu.

U ovom preglednom radu prikazan je pregled istraživanja slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva koja su provedena u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu (2001. – 2006.), koja se nastavljaju na prethodni pregledni članak<sup>11</sup> iz 2001. Istraživanja obuhvaćaju izolaciju i određivanje kemijskog sastava slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva iz različitih biljaka, te sintezu čestih glukozida isparljivih spojeva i njihovu karakterizaciju (u obliku tetraacetata glukozida) vezanim sustavom GC-MS.

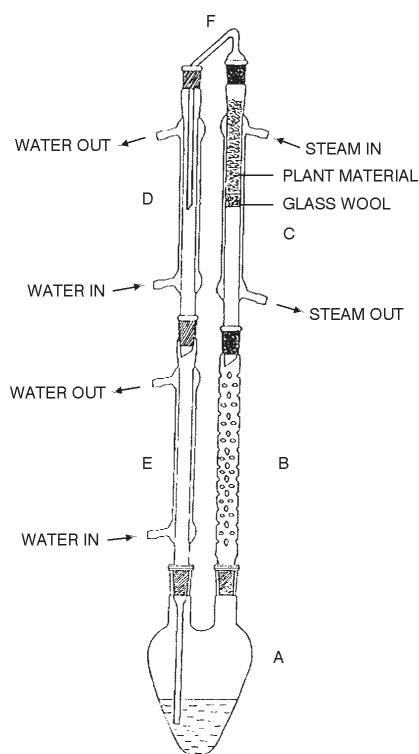
## Slobodni isparljivi spojevi

### Izolacija isparljivih spojeva

Izolacija eteričnih ulja provedena je destilacijskim metodama (osobito hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru te simultana destilacija-ekstrakcija u aparaturi po Likens-Nickersonu).

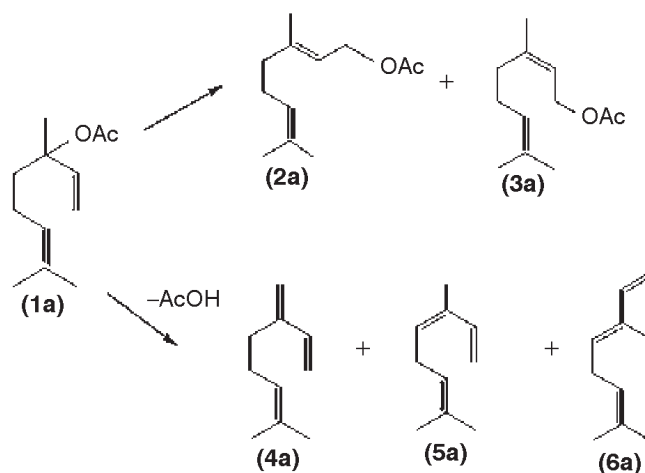
Za izolaciju termički nestabilnih eteričnih ulja razvijena je nova metoda koodestilacije s pregrijanim parama pentana.<sup>12</sup> Aparatura se sastoji od Claisenove tikvice A, Vigreuxove kolone B, grijača C, te hladila D i E, slika 1.

Biljni materijal i pare pentana griju se na 100 °C, a pregrijane pare pentana odnose isparljive spojeve iz biljnog materijala, te se hlade u hladilu D i E, dok se voda iz biljnoga materijala sakuplja u hladilu D (kao male kapljice). Metoda je testirana na eteričnim uljima *Mentha citrata* i *Salvia sclarea* koja sadrže nestabilni linalil-acetat (kao glavnu komponentu), koji u uvjetima hidrodestilacije hidrolizira u linalool, pregrađuje se alilnom pregradnjom u geranil-acetat i



Slika 1 – Aparatura za koodestilaciju eteričnih ulja pregrijanim parama organskih otapala

Fig. 1 – Apparatus for essential oil co-distillation by superheated vapour of organic solvents



Slika 2 – Alilna pregradnja linalil-acetata (1a) u geranil-acetat (2a) i neril-acetat (3a) te eliminacija uz nastanak  $\beta$ -mircena (4a), *cis*- $\beta$ -ocimena (5a) i *trans*- $\beta$ -ocimena (6a)

Fig. 2 – Allylic rearrangement of linalyl acetate (1a) into geranyl acetate (2a) and neryl acetate (3a), and elimination with formation of  $\beta$ -myrcene (4a), *cis*- $\beta$ -ocymene (5a) and *trans*- $\beta$ -ocymene (6a)

neril-acetat, a eliminacijom daje acikličke monoterpenске ugljikovodike, slika 2. U uvjetima hidrodestilacije moguće su i druge pregradnje linalil-acetata.<sup>13</sup>

Ova metoda omogućila je izolaciju monoterpena, ali i seskviterpena kao i hidrodestilacija. Međutim, za razliku od hidrodestilacije, nastanak artefakata je većim dijelom spriječen. Nadalje izolat ne sadrži neisparljive spojeve, kao u slučaju ekstrakcije s CO<sub>2</sub> ili organskim otapalima.

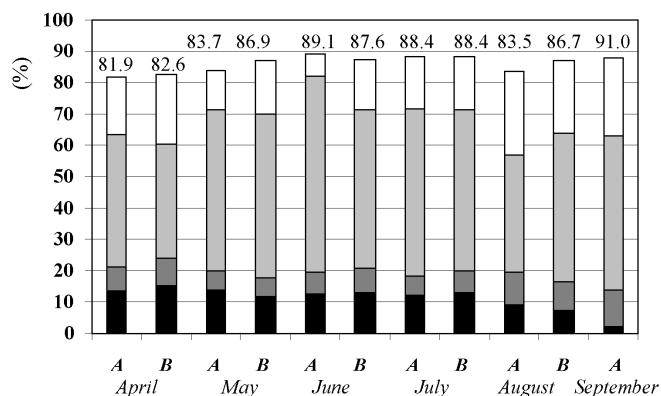
### Analiza isparljivih spojeva

Nakon izolacije, eterična ulja su izravno analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija mase (GC-MS). U mnogim slučajevima frakcioniranje složenijih ulja na ugljikovodičnu frakciju i frakciju spojeva s kisikom, pa GC-MS analiza frakcija, znatno je pridonijelo analizi ukupnog ulja. Ovo frakcioniranje je provedeno na mikrokoloni sa silikagelom primjenjujući pentan za eluiranje ugljikovodika, pa dietil-eter za eluiranje spojeva s kisikom. Na taj način izbjegava se kromatografsko preklapanje ugljikovodika i spojeva s kisikom. Identificirane su mnoge terpenске strukture, fenilpropanski derivati i ostali spojevi.

Monoterpeni timol (1) i karvakrol (2) identificirani su u eteričnom ulju mravinca (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), te je na osnovi njihovog omjera određen timol/karvakrol kemotip mravinca.<sup>14</sup> Sezonsko povećanje koncentracije timola praćeno je padom koncentracije karvakrola (i obrnuto, slika 3), što je dodatno potvrdilo međusobnu povezanost biosintetskih putova nastanka timola i karvakrola iz  $\gamma$ -terpinena (3) preko *p*-cimena (4), slika 4. Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da je istraženo ulje sličnog sastava kao i ulje grčkog mravinca, koje je poznato po najboljoj kvaliteti, a maseni udjel ulja u biljnom materijalu bitno se mijenja u ovisnosti o stupnju razvoja biljke.<sup>14</sup>

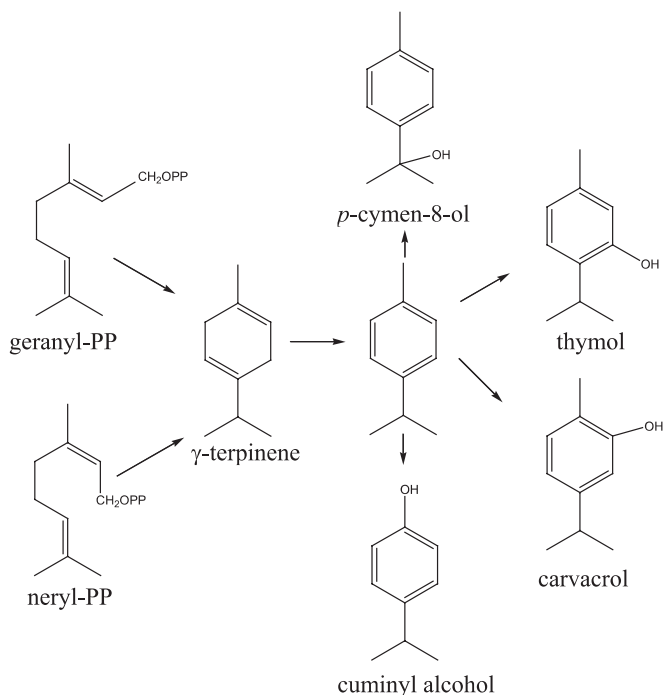
Uzorci eteričnog ulja sezonski sakupljanog pelina (*Artemisia absinthium* L.) iz Hrvatske (Dalmacija) pripadali su (Z)-epo-

ksiocimen (**5**) +  $\beta$ -tujonskom (**6**) kemotipu, dok su uzorci pelina iz Francuske (Provansa) pripadali (Z)-epoksioci-  
men + *cis*-krizantenil-acetatnom (**7**) kemotipu<sup>16</sup>. (Z)-epoksioci-  
men +  $\beta$ -tujonski kemotip je uobičajen s jakim antibakterij-  
skim i antigljivičnim djelovanjem. Stoga je antimikrobno te-  
stiranje provedeno na uzorcima ulja francuskog pelina, te  
je pokazalo da ulje inhibira rast kvasaca *Candida albicans* i  
*Saccharomices cerevisiae*.



Slika 3 – Maseni udjeli (%) četiri glavne komponente u ukup-  
nom eteričnom ulju iz sezonski sakupljanog *O. vulgare* ssp. *hirtum*:  
A – svježi biljni materijal, B – suhi biljni materijal; ■ –  $\gamma$ -terpinen,  
■ – *p*-cimen, ■ – timol, □ – karvakrol

Fig. 3 – Mass fractions (%) of four main components in total  
essential oil from seasonally collected *O. vulgare* ssp. *hirtum*: A –  
fresh oregano, B – dried oregano; ■ –  $\gamma$ -terpinene, ■ – *p*-cymene,  
■ – thymol, □ – carvacrol



Slika 4 – Predložena shema biosinteze aromatskih monoterpe-  
na (Croteau)<sup>15</sup>

Fig. 4 – Proposed scheme for biosynthesis of aromatic mono-  
terpenes (Croteau)<sup>15</sup>

Budući da je zakonski ograničena uporaba biljaka i pro-  
dukata s tujonom, bilo je korisno s analitičkog i fitokemij-  
skog gledišta karakterizirati eterično ulje biljnog materijala  
*Artemisia vulgaris* L. S obzirom da su poznate varijacije u sa-  
stavu ovog ulja ovisno o geografskom podrijetlu, analizirana  
su ulja iz Hrvatske (Dalmacija) i Francuske (Provansa) saku-  
pljana u četiri različita stadija:<sup>17</sup> vegetativni, pupoljci, cva-  
tovi i sjemenje. Usporedba je pokazala kvalitativnu sličnost,  
ali primjetnu kvantitativnu razliku među uzorcima. Glavne  
komponente ulja iz Francuske su bile borneol (**8**), 1,8-ci-  
neol (**9**), artemisia-ke-ton (**10**), kamfor (**11**),  $\beta$ -tujon i dr.,  
dok su ulja iz Hrvatske uglavnom sadržavala *trans*-krizant-  
enil-acetat (**12**),  $\beta$ -tujon, 1,8-cineol i dr.

Promjene masenog udjela i sastava eteričnog ulja listova,  
cvatova i plodova mirte (*Myrtus communis* L.) s područja  
otoka Visa su praćene tijekom jednogodišnjeg vegetativnog  
ciklusa.<sup>18</sup> Maseni udjel i sastav ulja mirte ovisi o dijelu biljke  
i terminu sakupljanja. Mirtenil-acetat (**13**), 1,8-cineol + li-  
monen (**14**), linalool (**15**) i  $\alpha$ -pinen (**16**) su bili prevlada-  
vajući terpeni u ulju lista od mirte. Ove komponente su ta-  
kođer detektirane u cvatovima, ali s različitim proporcija-  
ma. Ulja ploda i cvatova uvijek su sadržavala manje lina-  
loola u odnosu na ulje listova. Rezultati su pokazali da ulja  
listova pripadaju kemotipu linalool > 6 %, a mirtenil-acetat  
> 14 %. Ulje mirte interesantno je zbog antimikrobne ak-  
tivnosti, a rabi se u parfumerijskoj i prehrambenoj industriji  
(liker).

Listovi biljke *Micromeria juliana* L. služe kao začim umjesto  
kadulje. Eterično ulje ove biljke nije bilo detaljno analizira-  
no za razliku od drugih vrsta *Micromeria*. Provedeno istraži-  
vanje<sup>19</sup> je pokazalo da su važni terpeni ugljikovodici ovog  
ulja  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -kariofilen (**17**) i  $\alpha$ -gurjunen (**18**). Glavni  
oksidirani terpeni su bili linalool sa *cis*- i *trans*-oksidima i  
borneol. Rezultati su ukazali na postojanje razlika sa sasta-  
vom ulja *M. juliana* grčkog podrijetla.

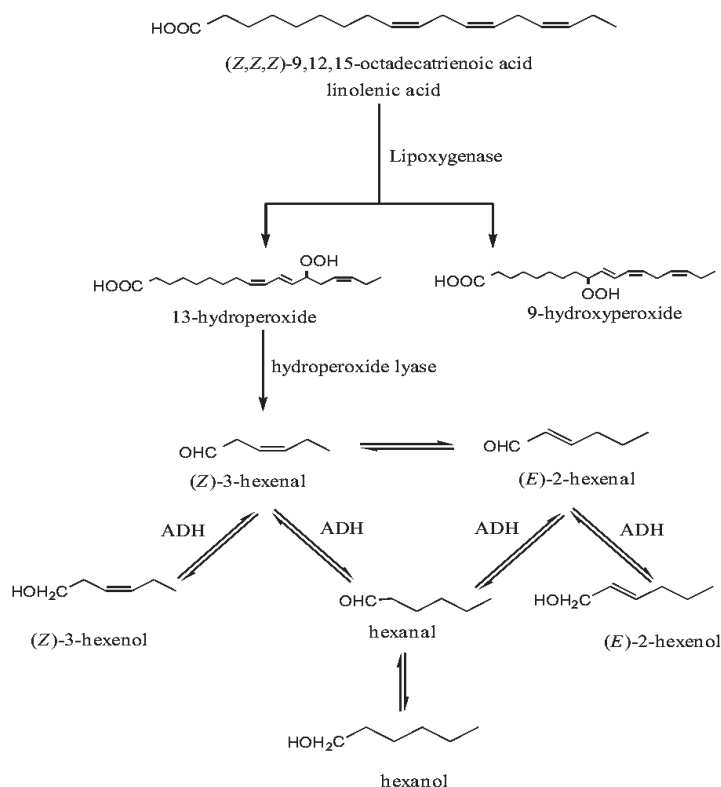
Eterično ulje smilja (*Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don) je  
frakcionirano na terpensku (ugljikovodičnu) i terpenoidnu  
frakciju (spojevi s kisikom) radi određivanja kemijskog sa-  
stava i antimikrobne aktivnosti.<sup>20</sup> Glavni ugljikovodici u ulju  
bili su  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -cedren (**19**), aromadendren (**20**),  $\beta$ -ka-  
riofilen i limonen, dok su glavni oksidirani spojevi bili neril-  
acetat (**21**), 2-metilcikloheksil-pentanoat (**22**), 2-metil-  
cikloheksil-oktanoat (**23**) i geranil-acetat (**24**). Testiranje  
antimikrobne aktivnosti na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*  
*coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans* pokazalo  
je kako eterično ulje i terpenoidna frakcija pokazuju snažni-  
je antibakterijsko djelovanje u odnosu na terpensku frakci-  
ju, osobito na *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.

Eterična ulja iglica i drva sekvoje (*Sequoiadendron gigan-  
teum* (Lindl.) Buchh.) uglavnom su sadržavala monoterpe-  
ne, osobito  $\alpha$ -pinen.<sup>21</sup>

Isparljivi spojevi svježih i sušenih pupoljaka topole (*Populus  
nigra* L.) uglavnom su bili seskviterpenski alkoholi  $\alpha$ - i  $\beta$ -eu-  
desmol (**25**),  $\gamma$ -selinen (**26**),  $\delta$ -kadinen (**27**) i dr.<sup>22</sup> U uzorci-  
ma su identificirani sljedeći semiterpeni: 2-metilbut-3-en-  
-2-ol, 3-metilbutan-1-ol, (*E*)-2-metilbut-2-en-1-ol i (*E*)-2-  
metilbut-2-enska kiselina. Esteri semiterpenskih alkohola i  
*cis/trans*-ferulične kiseline, izoferulične i kava-kiseline su  
prethodno pronađeni u ekstraktima vrste *P. nigra*.

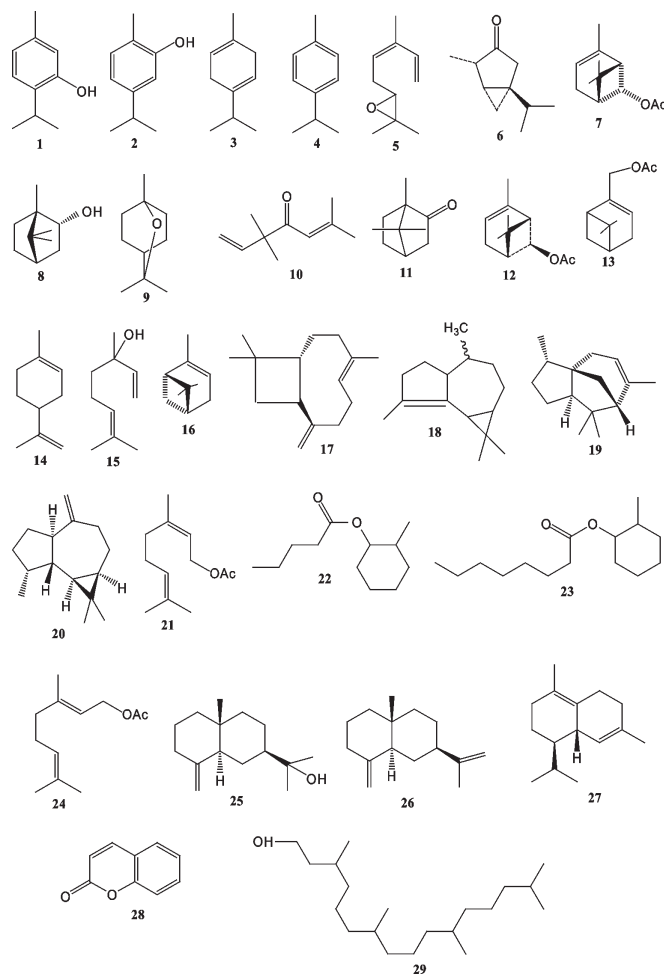
Za razliku od prethodnih biljnih uzoraka, uzorci pajasena i rašeljke ne sadrže terpene kao glavne isparljive spojeve, a njihov kemijski sastav je po prvi puta analiziran. Glavne komponente isparljivih spojeva pajasena<sup>23</sup> (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle) bili su alifatski C<sub>6</sub>-spojevi (alkoholi, aldehidi, kiseline, esteri), uz seskviterpenske ugljikovodike (kariofilen, humulen, kadinen, kalaren), oksidirane monoterpene (linalool, geraniol,  $\alpha$ -terpineol) i dr. Alifatski hlapljivi spojevi (alkoholi, karbonili, esteri) potječu iz katabolizma masnih kiselina. Te vrste reakcija uključuju lipoksigenaze, hidroksidperoksid-liaze, alkohol-dehidrogenaze i druge enzime. C<sub>6</sub>-alkoholi i aldehidi mogu potjecati od linolenske kiseline ((Z,Z,Z)-oktadeka-9,12,15-trienske kiseline) i linolne kiseline ((Z,Z)-oktadeka-9,12-dienske kiseline). Enzimski razgradnja 13-hidroperoksida vodi nastanku (Z)-heks-3-enala i drugih spojeva. Djelovanjem enzima ili neenzimski (Z)-3-dvostruka veza u aldehydima se obično izomerizira u konjugiranu (E)-2-dvostruku vezu. Ovi spojevi se mogu reducirati do (Z)-heks-3-en-1-ola, (E)-heks-2-en-1-ola, heksanala i heksanola djelovanjem alkohol-dehidrogenaze (ADH), prema shemi na slici 5.

Isparljivi spojevi cvatova, listova, kore i drva rašeljke (*Prunus mahaleb* L.) izolirani su parnom destilacijom.<sup>24</sup> Alifatski ugljikovodici, alkoholi, karbonili, masne kiseline, terpeni, C<sub>13</sub>-norizoprenoidi i fenilpropanski derivati su identificirani. Kumarin (**28**) je bio glavna komponenta isparljivih spojeva kore. Heksadekanska kiselina bila je glavna komponenta u drvu, a također je pronađena u listovima i kori. Alkani he-neikosani i oktakosani su identificirani kao glavni spojevi u cva-



Slika 5 – Shema nastanka nižih alifatskih spojeva iz linolenske kiseline

Fig. 5 – Scheme of the lower aliphatic compounds generation from linolenic acid



Slika 6 – Identificirane strukture glavnih isparljivih spojeva

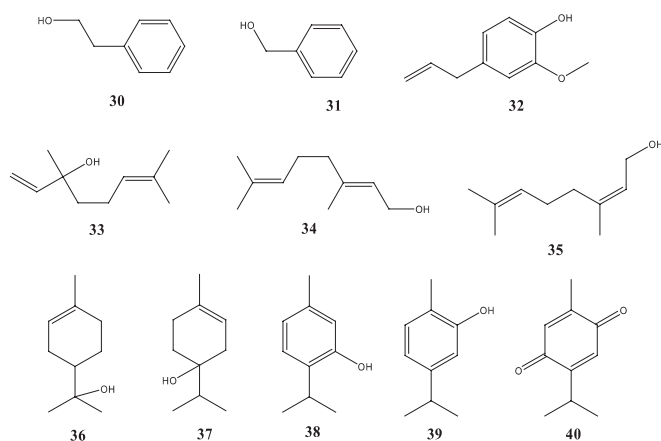
Fig. 6 – Identified structures of the main volatile compounds

tovima, dok je eikosani detektiran u drvu. Fitol (**29**) je pronađen u listovima. Dodekanska, tetradekanska i linolna kiselina bile su u svim uzorcima među glavnim komponentama.

## Glikozidno vezani isparljivi spojevi

Glikozidno vezani isparljivi spojevi izolirani su iz biljnog materijala *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*, *Mentha aquatica* L. i *Mentha longifolia* L. ekstrakcijom ključalom vodom ili etil-acetatom.<sup>25–27</sup> Ekstrakti su pročišćeni taloženjem s etanolom, dodatkom NH<sub>3</sub> u aps. etanolni ekstrakt i kromatografijom na stupcu silikagela. Glikozidna frakcija je uparena do suha, otopljena u citratnom puferu (pH 5,5), te je otopina ekstrahirana pentanom do negativnog dokaza (GC-MS) na postojanje isparljivih spojeva. Zatim je provedena hidroliza  $\beta$ -glukozidazom 48 h na 37 °C. Oslobođeni aglikoni su ekstrahirani pentanom, te su nakon koncentriranja analizirani (GC-MS). Identificirani alifatski alkoholi, 2-feniletanol (**30**), benzil-alkohol (**31**), eugenol (**32**), linalool (**33**), geraniol (**34**), nerol (**35**),  $\alpha$ -terpineol (**36**), terpinen-4-ol (**37**), timol (**38**), karvakrol (**39**) i dr. mogu se smatrati uobičajenima u aglikonskoj frakciji biljaka porodice *Lamiaceae*. Glavni isparljivi aglikon mravinca<sup>25</sup> bio je timokinon (**40**), a on može biti povezan na glukozu slično kao i naftokinon. Naftokinon

se može javiti u glikozidnom obliku kao hidrojuglon- $\beta$ -D-glukopiranozid. Tako je vjerojatno timokinol (5-izopropil-2-metil-1,4-hidrokinon) glikozidno vezani aglikon koji se oksidira u timokinon za vrijeme enzimske hidrolize. Eugenol i drugi *p*-hidroksifenilpropanski aglikoni se mogu povezati s biogeneom lignina preko sustava prekosidaza – vodik peroksid. Alifatski spojevi-aglikoni potječu od katabolizma masnih kiselina, a aromatski isparljivi spojevi-aglikoni (alkoholi, kiseline, karbonili) potječu od katabolizma cimetne kiseline. U biogenezi glikozida glukoza iz UDP-glukoze može se lako prenositi na nukleofilne reaktante, prije svega na spojeve s hidroksilnim funkcijskim skupinama, pri čemu nastaje O-glukozidna veza.



Slika 7 – Česte identificirane aglikonske strukture

Fig. 7 – Identified ubiquitous aglycone structures

Maseni udjel glikozidno vezanih isparljivih spojeva bio je višestruko manji od masenog udjela eteričnih ulja. Usporedbom slobodnih i glikozidno vezanih isparljivih spojeva utvrđena je samo djelomična sličnost u kemijskog sastavu, što djelomično podržava Svendsenovu hipotezu<sup>28</sup> kako se glikozidno vezani hlapljivi spojevi pojavljuju neovisno o eteričnom ulju.

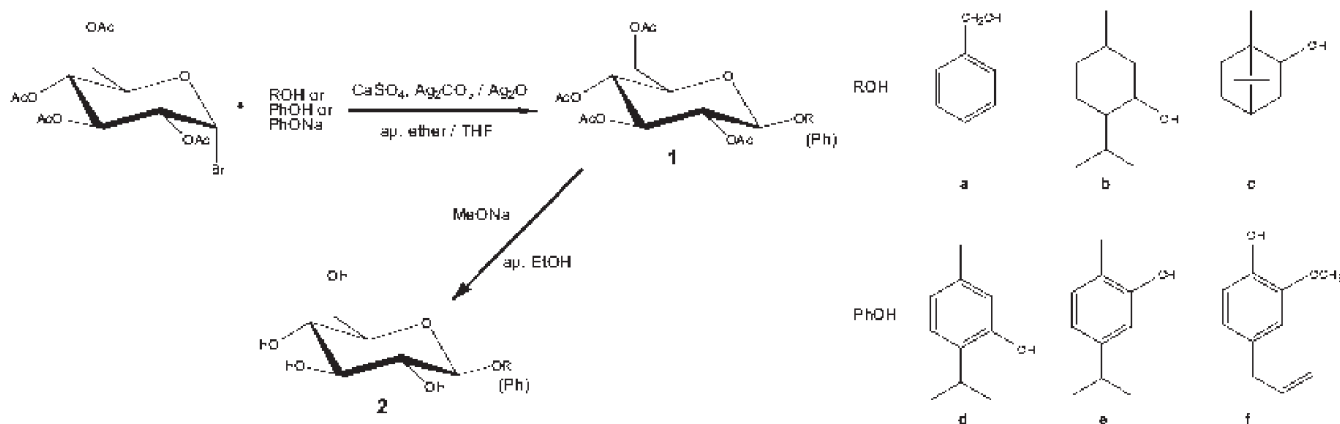
## Sinteza glikozida isparljivih spojeva

Česti glikozidi isparljivih spojeva pripremljeni su kemijskom i enzimskom sintezom, radi bolje karakterizacije.<sup>29</sup> Prirodni  $\beta$ -glukopiranozidi benzil-alkohola, ( $\pm$ )-mentola, (+)-borneola, timola, karvakrola i eugenola sintetizirani su po Koenigs-Knorr-Zemplénovoj metodi<sup>30</sup> (iskorištenje: 19,5–52,2 %-tno), slika 8.

Njihova  $\beta$ -glukopiranozna struktura određena je jednodimenzijском i dvodimenzijском homo- i heteronuklearnom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR-spektroskopijom na temelju specifičnih kemijskih pomaka, te konstanti sprege spinova H-H i C-H.  $\beta$ -konfiguracija dodatno je potvrđena hidrolizom  $\beta$ -glukozidazom. Tetraacetil- $\beta$ -glukopiranozidi, kao intermedijari, analizirani su sustavom GC-MS, slika 9. Za mentil-glukozid podaci NMR su pokazali da postoje dva  $\beta$ -dijastereomera, budući da je u sintezi uporabljen ( $\pm$ )-mentol. GC-MS analiza tetraacetata mentil-glukozida je to također potvrdila. Dijastereomerni tetraacetati  $\beta$ -glukozida ( $\pm$ )-mentola bili su dobro odijeljeni na koloni HP-101, slika 10. Spektri masa tetraacetata glukozida uspoređeni su međusobno i sa spektrima svojih aglikona.

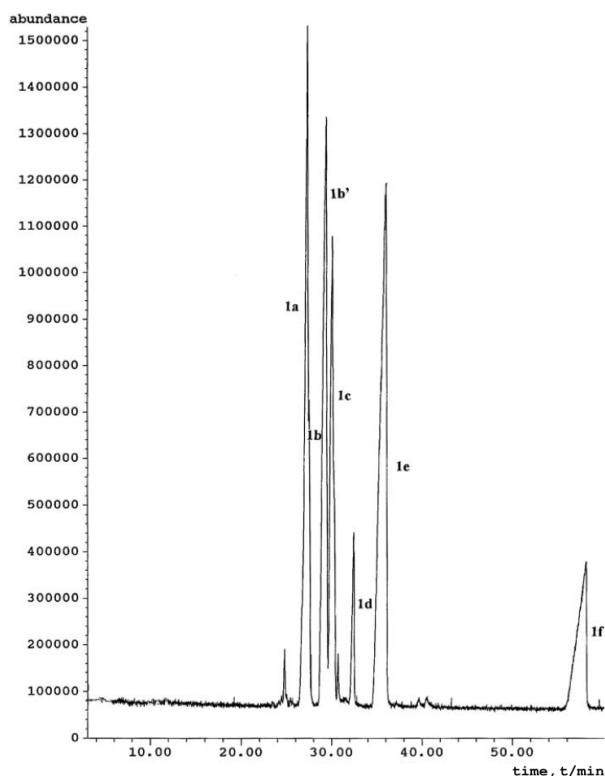
$\beta$ -D-glukopiranozidi pentan-1-ola, ( $\pm$ )-pentan-2-ola, heksan-1-ola, oktan-1-ola, benzil-alkohola, 2-feniletanola, ( $\pm$ )-2-fenil-propan-1-ola, 3-fenil-propan-1-ola, geraniola i nerola sintetizirani su reverznom hidrolizom i transglukozilacijom odgovarajućih alkohola rabeći  $\beta$ -glukozidazu iz badema.<sup>29,32</sup> Reakcija je provedena u acetonitrilu s acetatnim puferom (volumni omjer  $\psi = 9:1$ ), s iskorištenjem  $\gamma = 14,4\text{--}45,0\%$ , slika 11.

Transglukozilacija i reverzna hidroliza nisu bile enantioselektivne. Produkti su karakterizirani GC-MS-analizom pripremljenih tetraacetilglukozida. Fragmentni ioni karakteristični za aglukonski dio nalaze se u svim spektrima masa, pored fragmenata dobivenih iz acetilirane glukoze, slika 12. Acetilirani glukozidi su odjeljivi na koloni HP-101 (čak i dijastereomerni tetraacetyl- $\alpha$ -glukozidi enantiomernih alkohola).



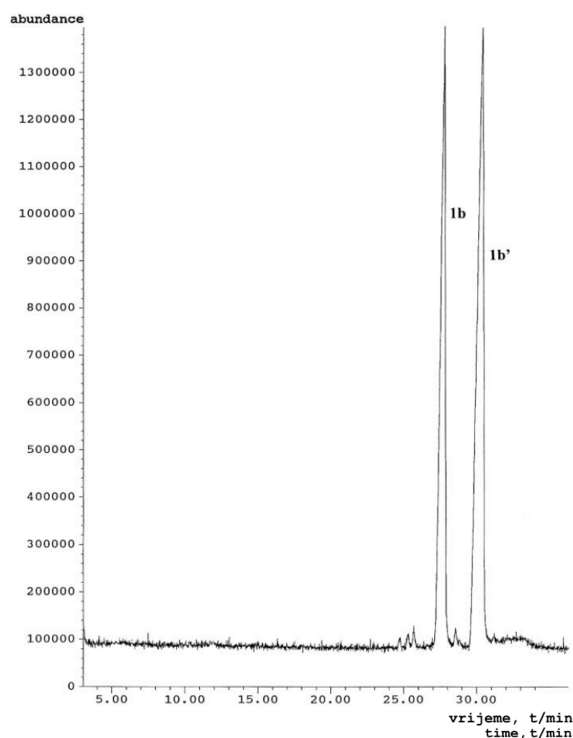
Slika 8 – Koenigs-Knorr metoda sinteze tetraacetyl- $\beta$ -glukopiranozida benzil-alkohola (**1a**), ( $\pm$ )-mentola (**1b** i **1b'**), (+)-borneola (**1c**), timola (**1d**), karvakrola (**1e**) i eugenola (**1f**). Odgovarajući glukopiranozidi (**2a–2f**) se dobiju nakon deacetiliranja prema Zemplénovoj metodi

Fig. 8 – Koenigs-Knorr method for the synthesis of tetraacetyl- $\beta$ -glucopyranosides of benzyl alcohol (**1a**), ( $\pm$ )-menthol (**1b** and **1b'**), (+)-borneol (**1c**), thymol (**1d**), carvacrol (**1e**) and eugenol (**1f**). Corresponding glucopyranosides (**2a–2f**) are obtained after deacetylation according to the Zemplén method



Slika 9 – Kromatogram ukupne ionske struje tetraacetata glukozida na koloni HP-101 (simboli na ovoj slici su jednaki kao na slici 8)

Fig. 9 – Total ion chromatogram of glucoside tetraacetates on the HP-101 column (the symbols in this figure are identical to those in Fig. 8)



Slika 10 – Plinski kromatogram i spektri masa diastereomernih tetraacetata mentil-β-glukozida dobiveni iz (±)-mentola: **1b**, (+) ili (–)-mentil-β-glukozid tetraacetat; **1b'**, (–) ili (+)-mentil-β-glukozid tetraacetat

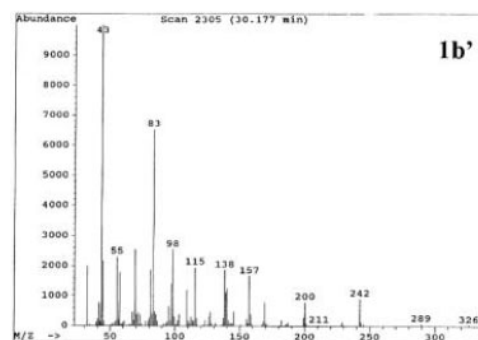
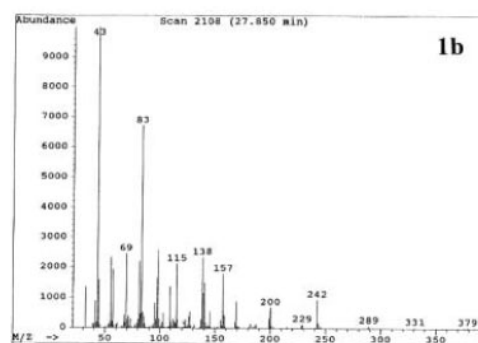
Fig. 10 – Gas chromatogram and mass spectra of diastereomeric menthyl-β-glucoside tetraacetates obtained from (±)-menthol: **1b**, (+) or (–)-menthyl-β-glucoside tetraacetate; **1b'**, (–) or (+)-menthyl-β-glucoside tetraacetate

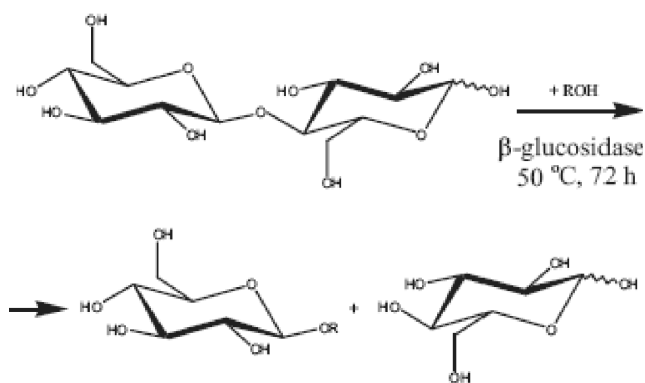
O-glukozilacija pentan-1-ola, oktan-1-ola, 2-feniletanola, benzil-alkohola, (±)-pentan-2-ola i (±)-mentola u 1,4-dioksanu, rabeći bezvodni FeCl<sub>3</sub>, dala je odgovarajuće glukofuranozide kao glavne i glukopiranozide kao sporedne produkte s ukupnim prinosima 20–52 %, slika 13.

Praktične prednosti GC-MS za karakterizaciju pripremljenih glukofuranozida u žarištu ovoga rada.<sup>33</sup> Spektri tetraacetata glukofuranozida sadrže karakteristične signale glukona (acetilirane glukoze) zajedno s fragmentima aglukonskoga dijela, slika 14. Interval praćenja masa bio je 50–600 masenih jedinica, tako da je acetil-ion bio isključen iz spektrara, što je olakšalo razlikovanje glukofuranozidnih od glukopiranozidnih tetraacetata.

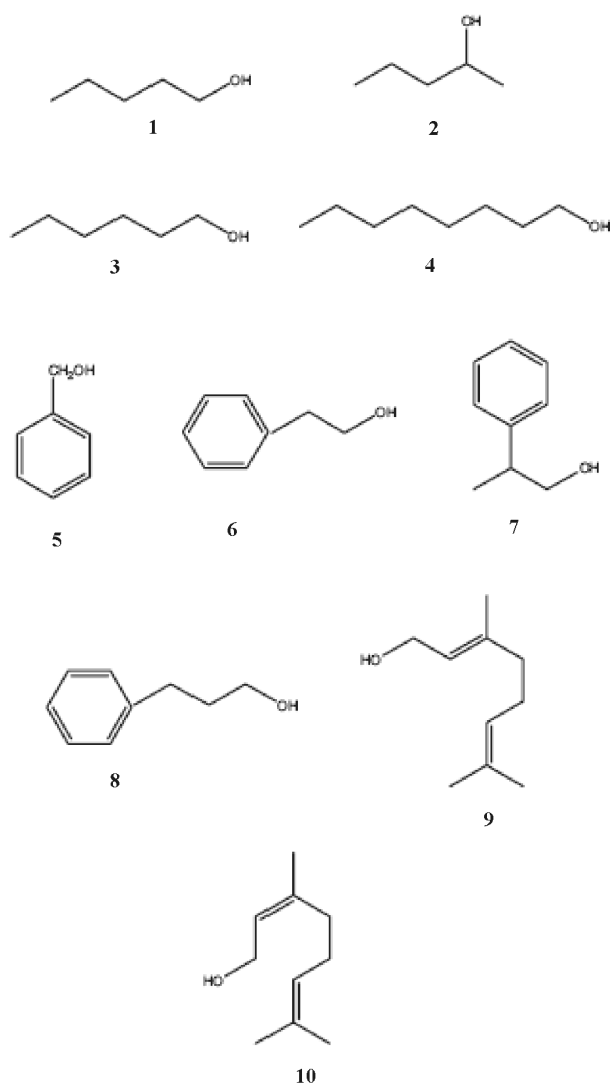
## Zaključak

Identificirani kemotipovi mravinca, pelina i mirte pridonose istraživanju bioraznolikosti aromatičnih biljaka, kao i proučavanje do sada neistraženih ili nedovoljno istraženih biljnih vrsta (mikromerija, sekvoja, pajasen, topola, rašeljka i dr.). Razvijena nova metoda kodelacije omogućuje izolaciju nestabilnih isparljivih spojeva bez stvaranja artefakata. Glikozidno vezani isparljivi spojevi pokazali su djelomičnu sličnost s kemijskim sastavom slobodnih isparljivih spojeva, što samo djelomično potvrđuje hipotezu o njihovoj uključenosti u biogenezu eteričnih ulja. Radi potpunije karakterizacije, uspješno su sintetizirani uobičajeni glikozidi isparljivih spojeva kemijskim i enzimskim metodama. Glukozilacija nije bila enantioselektivna za racemične glu-



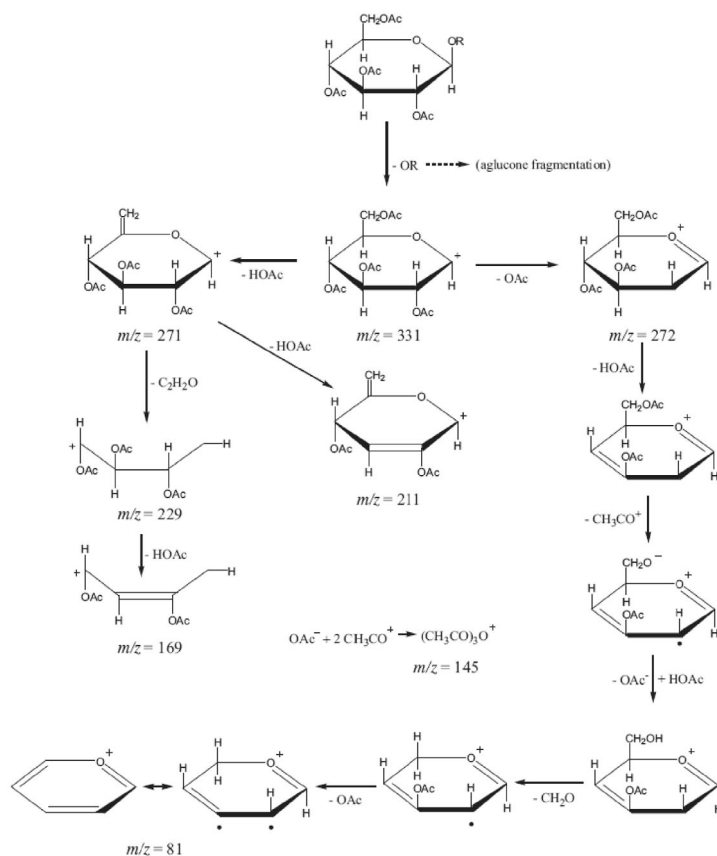


ROH



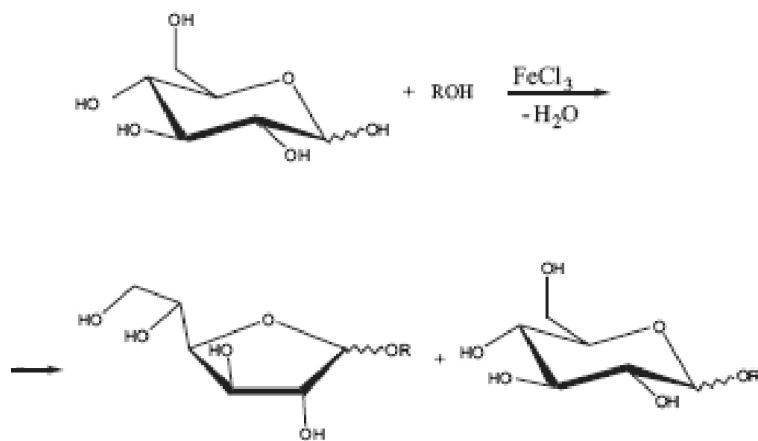
Slika 11 – Reakcija transglukozilacije celobioze s alifatskim alkoholima koristeći  $\beta$ -glukozidazu: pentan-1-ol (1); pentan-2-ol (2); heksan-1-ol (3); oktan-1-ol (4); benzil-alkohol (5); 2-feniletanol (6); 2-fenil-propan-1-ol (7); 3-fenil-propan-1-ol (8); geraniol (9); nerol (10)

Fig. 11 – Transglycosylation reaction of cellobiose with aliphatic alcohols using  $\beta$ -glucosidase: pentan-1-ol (1); pentan-2-ol (2); hexan-1-ol (3); octan-1-ol (4); benzyl alcohol (5); 2-phenylethanol (6); 2-phenyl-propan-1-ol (7); 3-phenyl-propan-1-ol (8); geraniol (9); nerol (10)



Slika 12 – Fragmentacija tetraacetata  $\beta$ -D-glukopiranozida (70 eV) prema fragmentaciji  $\beta$ -D-glukopiranozida<sup>30</sup>

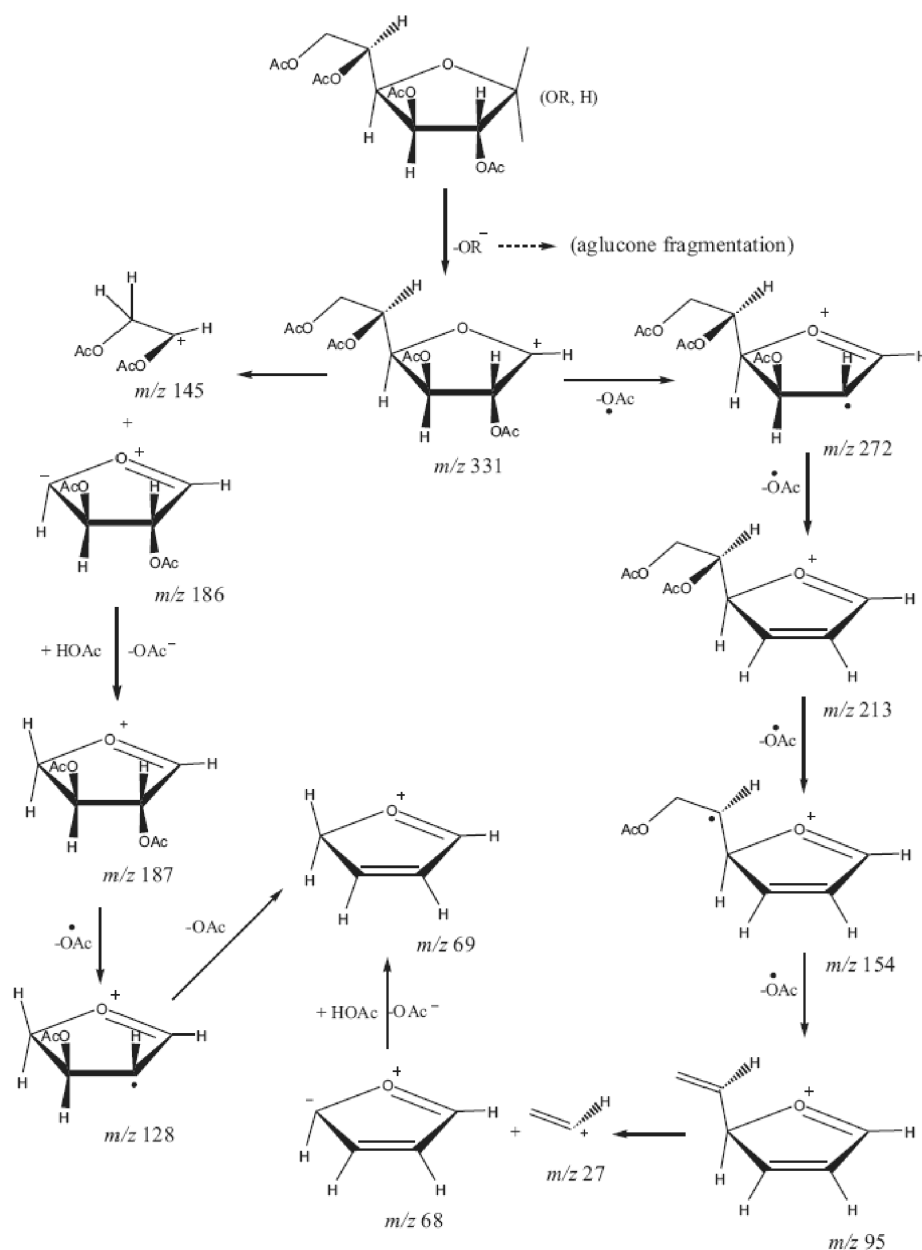
Fig. 12 – Fragmentation of  $\beta$ -D-glucopyranoside tetraacetates (70 eV), according to the fragmentation of  $\beta$ -D-glucopyranosides<sup>30</sup>



Slika 13 – Izravna glukoizilacija iz nezaštićene glukoze koristeći  $\text{FeCl}_3$

Fig. 13 – Direct glucosylation from unprotected glucose using  $\text{FeCl}_3$

kozi-akceptore, a dobiveni diastereomerni tetraacetati  $\beta$ -glukozida racemičnih alkohola odjeljuju se plinskom kromatografijom na nepolarnoj stacionarnoj fazi. Podrobna analiza tetraacetata svih pripremljenih glukozida isparljivih spojeva uspješno je provedena vezanim sustavom GC-MS.



Slika 14 – Fragmentiranje tetraacetata glukofuranozida (70 eV) prema fragmentiranju glukopiranozida i dobivenim spektrima

Fig. 14 – Fragmentation of glucofuranoside tetraacetates (70 eV) according to the fragmentation of glucopyranosides and the obtained spectra

Dobiveni rezultati iskazuju doprinos istraživanju kemije isparljivih prirodnih spojeva, a svoju praktičnu primjenu imaju u botaničkoj kemotaksonomiji te prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji i dr.

#### ZAHVALA

Zahvaljujem se Ministarstvu znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatska (ranije Ministarstvo znanosti i tehnologije) na potpori u sklopu projekata 0011010 i 011003 te glavnim istraživačima dr. sc. Josipu Masteliću, izv. prof. (predstojniku Zavoda za organsku kemiju) i dr. sc. Mladenu Milošu, red. prof. (predstojniku Zavoda za biokemiju) s Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilište u Splitu.

#### Literatura References

1. E. Guenther, *The Essential Oils*, Vol. I, New York, 1964.
2. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, 1997. str. 152.
3. F. Rohdich, S. Hecht, A. Bacher, W. Eisenreich, *Pure Appl. Chem.* **75** (2003) 393.
4. P. Schreier, *Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles*, 52, Hüthig, New York, 1984. str. 72.
5. E. Stahl-Biskup, *Flavour Fragr. J.* **2** (1987) 75.
6. T. Ikemoto, B-I. Okabe, K. Mimura, T. Kitahara, *Flavour Fragr. J.* **17** (2002) 452.
7. T. Ikemoto, K. Mimura, T. Kitahara, *Flavour Fragr. J.* **18** (2003) 45.

8. O. Shoseyov, B. A. Bravdo, D. Siegel, A. Goldman, S., L. Shoseyov i R. Ikan, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990) 1387.
9. R. Ikan, *Naturally Occuring Glycosides*, John Wiley & Sons, New York, 1999, str. 235.
10. J. Mann, R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. B. Harborne, *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, Longman Group UK Limited, Harlow, 1994. str. 295.
11. J. Mastelić, M. Miloš, *Kem. Ind.* **50** (2001) 561.
12. J. Mastelić, I. Jerković, *Flavour. Fragr. J.* **18** (2003) 521.
13. J. Mastelić, M. Miloš, D. Kuštrak, *Croat. Chem. Acta* **73** (2000) 781.
14. I. Jerković, J. Mastelić, M. Miloš, *Int. J. Food Sci. Technol.* **36** (2001) 649.
15. R. Croteaux, *Biosynthesis of Isoprenic Compounds*, Vol. I, John Wiley & Sons, New York, 1981, str. 227.
16. F. Juteau, I. Jerković, V. Masotti, M. Miloš, J. Mastelić, J.-M. Bessiere, J. Viano, *Planta Med.* **69** (2003) 158.
17. I. Jerković, J. Mastelić, M. Miloš, F. Juteau, V. Masotti, J. Viano, *Flavour Fragr. J.* **18** (2003) 436.
18. I. Jerković, A. Radonić, I. Borčić, *J. Essent. Oil Res.* **14** (2002) 266.
19. J. Mastelić, I. Jerković, D. Kuštrak, *J. Essent. Oil Res.* **17** (2005) 516.
20. J. Mastelić, O. Politeo, I. Jerković, N. Radošević, *Chem. Nat. Compd.* **41** (2005) 35.
21. I. Jerković, J. Mastelić, M. Miloš, *J. Essent. Oil Res.* **15** (2003) 36.
22. I. Jerković, J. Mastelić, *Phytochem.* **63** (2003) 109.
23. J. Mastelić, I. Jerković, *Croat. Chem. Acta* **75** (2002) 189.
24. J. Mastelić, I. Jerković, M. Mesić, *Flavour Fragr. J.* **21** (2006) 306.
25. I. Jerković, J. Mastelić, M. Miloš, *Nahrung* **45** (2001) 47.
26. I. Jerković, J. Mastelić, *Croat. Chem. Acta* **74** (2001) 431.
27. J. Mastelić, I. Jerković, *Chem. Nat. Compd.* **38** (2002) 561.
28. Y. M. Merks, B. Svendsen, *J. Essent. Oil Res.* **2** (1990) 71.
29. I. Jerković, *Sinteza prirodnih glikozida hlapljivih spojeva i određivanje njihovih karakteristika*, Disertacija, Sveučilište u Splitu, Split 2004.
30. J. Mastelić, I. Jerković, M. Vinković, Z. Džolić, D. Vikić-Topić, *Croat. Chem. Acta* **77** (2004) 491.
31. K. E. A. Ishag, H. Jork, M. Zeppezauer, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **321** (1985) 331.
32. I. Jerković, J. Mastelić, *Croat. Chem. Acta* **77** (2004) 529.
33. I. Jerković, J. Mastelić, I. Blažević, M. Šindler-Kulyk, D. Vikić-Topić, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 313.

## SUMMARY

### Contribution to the Research of Free and Glycosidically Bound Volatiles from 2001 to 2006

I. Jerković

This review paper presents a contribution to the research of free and glycosidically bound volatiles in the 2001–2006 period obtained by work in the Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Croatia. Many terpene structures, phenylpropane derivatives (Fig. 6), as well as aliphatic hydrocarbons, alcohols, carbonyls, fatty acids and others were identified (Fig. 5). The chemotypes of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Artemisia absinthium* and *Myrtus communis* were determined and some uninvestigated or insufficiently investigated plants (*Micromeria juliana*, *Sequoia dendron giganteum*, *Populus nigra*, *Prunus mahaleb*, *Ailanthus altissima* and others) were analyzed. A newly developed method of co-distillation enabled isolation of unstable volatile compounds without formation of artefacts (Fig. 1).

The volatile aglycones liberated by enzymatic hydrolysis of the corresponding glycosides were aliphatic and phenylpropanoic derivatives, as well as monoterpenes, sesquiterpenes and others (Fig. 7). Only partial similarity was observed in the composition of volatile aglycones and corresponding free volatiles of the same plant.

Furthermore, glucosides of ubiquitous monoterpene and aliphatic alcohols and phenols were prepared by Koenigs-Knorr glucosylation (Fig. 8), by enzymatic condensation and transglucosidation from cellobiose (Fig. 11) and by direct glucosylation with  $\text{FeCl}_3$  (Fig. 13). The products were characterized by GC-MS analysis of prepared tetraacetyl glucosides. Fragment ion characteristics of the aglucone moiety were present in all mass spectra, along with the fragments obtained from acetylated glucose (Fig. 12 and Fig. 14). Acetylated glucosides were separable on the HP-101 column, Fig. 9 (even diastereomeric tetraacetyl  $\beta$ -glucosides of enantiomeric alcohols, Fig. 10).

Department of Organic Chemistry  
Faculty of Chemistry and Technology  
University of Split, N. Tesle 10/V, 21 000 Split, Croatia

Received November 20, 2006  
Accepted December 20, 2006