

**UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ODSEK ZA HEMIJU**

Milan Dekić

**FITOHEMIJSKO ISPITIVANJE ODABRANIH BILJNIH VRSTA
FAMILIJA GERANIACEAE I BRASSICACEAE**

– Doktorska disertacija –

Niš, 2011.

**UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ODSEK ZA HEMIJU**

**FITOHEMIJSKO ISPITIVANJE ODABRANIH BILJNIH VRSTA
FAMILIJA GERANIACEAE I BRASSICACEAE**

– Doktorska disertacija –

**Mentor:
Dr Niko Radulović**

**Kandidat:
Mr Milan Dekić**

Niš, 2011.

Istraživanje prezentovano u ovoj doktorskoj disertaciji urađeno je u laboratoriji za organsku analizu i sintezu Odseka za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru dr Niku Raduloviću, docentu Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koji je predložio temu i rukovodio izradom ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Radosavu Paliću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koji je omogućio realizaciju ovog rada i, naravno, svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta (ev. br. 172061), finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милан С. Декић
Ментор, МН:	Нико Радуловић
Наслов рада, НР:	Фитохемијско испитивање одобраних биљних врста фамилија Geraniaceae и Brassicaceae
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски и енглески
Земља публиковања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2011.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	10 поглавља, 282 стране, 10 слика, 18 табела, 25 шема, 79 прилога
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Geranium</i> , <i>Erodium</i> , <i>Erysimum diffusum</i> , <i>Hornungia petraea</i> , етарско уље, аутолизат, деградациони производи глукозинолата, 4-изотиоцијанатобутанска киселина, синтеза, антимикробна активност
УДК	581.8 : 582.751.2 581.8 : 633.42
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:	Извршена је детаљна хемијска анализа етарских уља врста <i>Geranium macrorrhizum</i> , <i>G. sanguineum</i> , <i>G. robertianum</i> , <i>G. columbinum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. purpureum</i> , <i>G. phaeum</i> , <i>Erodium ciconium</i> , <i>E. cicutarium</i> и <i>E. absinthoides</i> (Geraniaceae) и аутолизата врста <i>Erysimum diffusum</i> и <i>Hornungia petraea</i> (Brassicaceae). GC-MS анализом аутолизата утврђено је присуство неколико деградационих производа глукозинолата, који су идентификовани спектралном карактеризацијом (IR, NMR, MS) и ко-инјекцијом синтетисаних једињења са аутолизатима. У аутолизату врсте <i>E. diffusum</i> је утврђено присуство 4-изотиоцијанатобутанске киселине као новог природног деградационог производа глукозинолата. Експериментално је доказано да метил-естар ове киселине се може сматрати артефактом изоловања а не нативним природним метаболитом. Тестирање антимикробне активности етарских уља и синтетисаних једињења је показало изражено и селективно дејство етарских уља врсте <i>G. macrorrhizum</i> према Грам-позитивној бактерији <i>Bacillus subtilis</i> , са MIC вредношћу реда величине 1 µg/ml и изражено бактерицидално дејство 4-изотиоцијанатобутанске киселине према важном људском патогеном микроорганизму <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC=MBC=10 µg/ml).
------------	---

Датум прихватања теме, ДП:	24.01.2011.
Датум одбране, ДО:	28.04.2011.
Чланови комисије, КО:	Председник: Проф. др Радосав Палић Члан: Проф. др Зоран Марковић Члан, ментор: Доц. др Нико Радуловић



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	monograph
Type of record, TR:	textual / graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	Milan S. Dekić
Mentor, MN:	Niko Radulović
Title, TI:	Phytochemical study of selected taxa belonging to Geraniaceae and Brassicaceae plant families
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2011
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD:	10 chapters, 282 pages, 18 tables, 10 pictures, 25 schemes, 79 appendixes
Scientific field, SF:	chemistry
Scientific discipline, SD:	organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW:	<i>Geranium, Erodium, Erysimum diffusum, Hornungia petraea</i> , essential oil, autolysate, glucosinolate degradation products, 4-isothiocyanatobutanoic acid, synthesis, antimicrobial activity
UC	581.8 : 582.751.2 581.8 : 633.42
Holding data, HD:	library
Note, N:	
Abstract, AB:	Detailed chemical analyses of <i>Geranium macrorrhizum</i> , <i>G. sanguineum</i> , <i>G. robertianum</i> , <i>G. columbinum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. purpureum</i> , <i>G. phaeum</i> , <i>Erodium ciconium</i> , <i>E. cicutarium</i> and <i>E. absinthoides</i> (Geraniaceae) essential oils and <i>Erysimum diffusum</i> and <i>Hornungia petraea</i> (Brassicaceae) autolysates were performed using GC and GC-MS techniques. Analyses of autolysates revealed the presence of several glucosinolate degradation products. The mentioned compounds were identified by means of synthesis, spectral characterization (IR, NMR and MS) and GC co-injection of the synthetic compounds with the autolysates. A GC-MS analysis of <i>E. diffusum</i> glucosinolate autolysis products led to the identification of a new mustard oil constituent—4-isothiocyanatobutanoic acid. According to experimental proof arrived at in this study, methyl ester of this acid can be regarded as an artefact of the isolation procedure and not a native plant metabolite. The isolated oils and synthesized compounds were assayed for antimicrobial activity. The assays pointed out to the very high and selective activity of <i>G. macrorrhizum</i> oils against <i>Bacillus subtilis</i> having a minimum inhibitory concentration with the order of value of 1 µg/ml, while 4-isothiocyanatobutanoic acid demonstrated significant activity against important human pathogen, <i>S. aureus</i> (ATCC 6538), with both MIC and MBC values of 10 µg/ml.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	24.01.2011.
Defended on, DE:	28.04.2011.
Defended Board, DB:	President: Prof. dr Radosav Palić Member: Prof. dr Zoran Marković Member, Mentor: Doc. dr Niko Radulović

SKRAĆENICE

Ala	alanin (<i>eng.</i> alanine)
AMDIS	automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara (<i>eng.</i> automated mass spectral deconvolution and identification system)
Boc ₂ O	di- <i>terc</i> -butil-dikarbonat (<i>eng.</i> di-tert-butyl dicarbonate)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilikil)trifluoroacetamid (<i>eng.</i> <i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
CDC	jedinjenja nastala razgradnjom karotenoida (<i>eng.</i> carotenoid derived compounds)
CFU	jedinica mere broja živih mikroorganizama date po ml rastvora (<i>eng.</i> colony-forming unit)
DABCO	1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktan (<i>eng.</i> 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid (<i>eng.</i> <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide)
DEAE	dietilaminoetyl-celuloza (<i>eng.</i> diethylaminoethyl cellulose)
DMAP	4-dimetilaminopiridin (<i>eng.</i> 4-dimethylaminopyridine)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilmelanamid (<i>eng.</i> dimethylformamide)
DMSO	dimetil-sulfoksid (<i>eng.</i> dimethylsulfoxide)
DNA	Dezoksiribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> deoxyribonucleic acid)
FAD	masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (<i>eng.</i> fatty acids and fatty acid-derived compounds)
FID	plameno-jonizaciona detekcija (<i>eng.</i> flame ionization detection)
FTIR	Furije-transformisana infracrvena spektroskopija (<i>eng.</i> Fourier-transformed infrared spectroscopy)
GC	gasna hromatografija (<i>eng.</i> gas chromatography)
GC-FID	gasna hromatografija-plameno-jonizaciona detekcija (<i>eng.</i> gas chromatography-flame ionization detection)
GC-MS	gasna hromatografija-masena spektrometrija (<i>eng.</i> gas chromatography-mass spectrometry)
GLC	gasno-tečna hromatografija (<i>eng.</i> gas-liquid chromatography)
HPLC	visoko (jako) efikasna tečna hromatografija (<i>eng.</i> high performance liquid chromatography)
HSAB	Pearson-ov principom tvrdih/mekih kiselina i baza (<i>eng.</i> hard soft acid base)
Ile	izoleucin (<i>eng.</i> isoleucine)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (<i>eng.</i> International organization for standardization)
ITC	izotiocijanati

LC-MS	tečna hromatografija-masena spektrometrija (<i>eng.</i> liquid chromatography-mass spectrometry)
Leu	leucin (<i>eng.</i> leucine)
M	mol/l
<i>m/z</i>	odnos masa/naelektrisanje
MBC	minimalna baktericidna koncentracija (<i>eng.</i> minimum bactericidal concentration)
Met	metionin (<i>eng.</i> methionine)
MFC	minimalna fungicidna koncentracija (<i>eng.</i> minimal fungicidal concentration)
MHA	(<i>eng.</i> Mueller Hinton agar)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (<i>eng.</i> minimal inhibitory concentration)
MS	masena spektrometrija (<i>eng.</i> mass spectrometry)
MSD	maseno-selektivni detektor (<i>eng.</i> mass selective detector)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (<i>eng.</i> nicotinamide adenine dinucleotide)
NCS	<i>N</i> -hlorsukcinimid (<i>eng.</i> <i>N</i> -chlorosuccinimide)
NIT	nitrili
NMR	nuklearna magnetna rezonanca (<i>eng.</i> nuclear magnetic resonance)
NNK	4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (<i>eng.</i> 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)
OTH	neklasifikovani konstituenti i konsituenti mogućeg antropogenog porekla
PAF	trombocit-aktivirajući faktor (<i>eng.</i> platelet-activating factor)
PAPS	fosfoadenozin-fosfosit (eng. phosphoadenosine-phosphosulfate)
PDA	krompir-dekstrozni agar (<i>eng.</i> potato-dextrose agar)
Ph ₃ P ili PPh ₃	trifenilfosfin (<i>eng.</i> triphenylphosphine)
Phe	fenilalanin (<i>eng.</i> phenylalanine)
PP	pirofosfatna (difosfatna) grupa (<i>eng.</i> pyrophosphate group)
qui	kvintet (<i>eng.</i> quintet)
rel. int.	relativni intenzitet
RI	retencioni indeks (<i>eng.</i> retention index)
R _t	retenciono vreme (<i>eng.</i> retention time)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SDA	sabouraud-dekstrozni agar (<i>eng.</i> sabouraud dextrose agar)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (<i>eng.</i> solid-phase extraction)
SSSR	Savez Sovjetskih Socijalističkih Republika
st	sobna temperatura
syn.	sinonim
t	triplet

TER	terpenoidi (<i>eng.</i> terpenoids)
THF	tetrahidrofuran
TIC	ukupni jonski hromatogram (<i>eng.</i> total ion chromatogram)
TIO	tiocijanati
TMCS	trimetilchlorsilan (<i>eng.</i> trimethylchlorosilane)
TMS	tetrametilsilan (<i>eng.</i> tetramethylsilane)
Trp	triptofan (<i>eng.</i> tryptophan)
T _t	tačka topljenja
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorid (<i>eng.</i> 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)
Tyr	tirozin (<i>eng.</i> tyrosine)
UDP-Glc	uridin-difosfat glukoza (<i>eng.</i> uridine diphosphate glucose)
Val	valin (<i>eng.</i> valine)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Ciljevi rada	6
3. Opšti deo	8
3.1. Sistematika familija Geraniaceae i Brassicaceae	9
3.1.1. Familija Geraniaceae J. St. Hill	9
3.1.1.1. Rod <i>Geranium</i> L. 1754	10
3.1.1.2. Rod <i>Erodium</i> L'Hérit 1787-88	10
3.1.2. Familija Brassicaceae Burn. 1835	11
3.1.2.1. Rod <i>Erysimum</i> L. 1754	12
3.1.2.2. Rod <i>Hornungia</i> Rchb. 1837	12
3.2. Ispitivanje vrsta familija Geraniaceae i Brassicaceae: tradicionalna upotreba, hemijski sastav, farmakološko dejstvo i primena	13
3.2.1. Familija Geraniaceae	13
3.2.1.1. <i>Geranium macrorrhizum</i> L. 1753	13
3.2.1.2. <i>Geranium sanguineum</i> L. 1753	14
3.2.1.3. <i>Geranium robertianum</i> L. 1753	15
3.2.1.4. <i>Geranium columbinum</i> L. 1753	16
3.2.1.5. <i>Geranium lucidum</i> L. 1753	16
3.2.1.6. <i>Geranium purpureum</i> Vill. 1875	16
3.2.1.7. <i>Geranium phaeum</i> L. 1753	17
3.2.1.8. <i>Erodium ciconium</i> (Jusl.) Ait. 1789	17
3.2.1.9. <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hérit 1789	17
3.2.1.10. <i>Erodium absinthoides</i> Willd. 1800	18
3.2.2. Familija Brassicaceae	19
3.2.2.1. <i>Erysimum diffusum</i> Ehrh. 1782	19
3.2.2.2. <i>Hornungia petraea</i> (L.) Rchb. 1837	20
3.3. Glukozinolati	30
3.3.1. Rasprostranjenost glukozinolata u biljnom svetu	31
3.3.2. Hemija glukozinolata	38
3.3.2.1. Tipovi glukozinolata	38
3.3.2.2. Sinteza glukozinolata	42
3.3.2.3. Biosinteza glukozinolata	43
3.3.3. Enzimska hidroliza glukozinolata	46
3.3.4. Sadržaj glukozinolata u biljkama	49
3.3.4.1. Posebne odlike indolskih glukozinolata	49
3.3.4.2. Anti-nutricionistički i goitrogeni efekti glukozinolata	50
3.3.4.3. Prirodni izotiocijanati van biljnog carstva	50
3.3.5. Biotička interakcija glukozinolata i izotiocijanata	50

3.3.6. Izolovanje i analiza glukozinolata.....	52
3.3.6.1. Raniji radovi na izolovanju i kristalizaciji	52
3.3.6.2. Stabilnost glukozinolata.....	53
3.3.6.3. Ekstrakcija glukozinolata.....	54
3.3.6.4. Izolovanje glukozinolata.....	54
3.3.6.5. Metode detekcije/određivanja.....	54
3.3.7. Glukozinolati/izotiocijanati – štite od kancera	56
3.3.8. Evolutivna veza glukozinolata i cijanogenih glukozida	59
3.4. Sinteza izotiocijanata	61
4. Eksperimentalni deo	73
4.1. Biljni materijal i priprema uzoraka	73
4.1.1. Biljni materijal	73
4.1.2. Obrada biljnog materijala	73
4.1.3. Izolovanje etarskih ulja.....	73
4.1.4. Autoliza glukozinolata	73
4.1.4.1. Izolovanje proizvoda hidrolize	73
4.1.4.2. Modifikovani postupak autolize glukozinolata.....	74
4.2. Metode razdvajanja i analize	76
4.2.1. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija	76
4.2.2. Infracrvena spektroskopija (FTIR)	76
4.2.3. Hromatografija na tankom sloju (TLC)	76
4.2.4. Tečna hromatografija pri srednjim pritiscima (MPLC)	76
4.2.5. Gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) i gasna hromatografija (GC)	76
4.2.5.1. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC/MS)	76
4.2.5.2. Identifikacija komponenata.....	77
4.3. Hemikalije i rastvarači	78
4.4. Izolovanje i sinteza jedinjenja.....	79
4.4.1. Izolovanje germakrona	79
4.4.2. Sinteza 4-izotiocianatobutanske kiseline	79
4.4.3. Sinteza benzil-izotiocijanata, tiocijanata i nitrila.....	80
4.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	86
4.5.1. Korišćeni mikroorganizmi	86
4.5.2. Testiranje <i>in vitro</i> antimikrobne aktivnosti.....	86
4.6. Statistička analiza podataka	88
5. Rezultati i diskusija	89
5.1. Fitohemijsko ispitivanje i mikrobiološka aktivnost odabranih vrsta iz familije Geraniaceae.....	90
5.1.1. Hemski sastav etarskih ulja i hemotaksonomija.....	90
5.1.1.1. Sastav etarskog ulja biljne vrste <i>Geranium macrorrhizum</i>	132
5.1.1.2. Sastav etarskog ulja biljne vrste <i>Geranium sanguineum</i>	134
5.1.1.3. Sastav etarskog ulja biljne vrste <i>Geranium robertianum</i>	134

5.1.1.4. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta <i>Geranium columbinum</i> i <i>Geranium lucidum</i>	135
5.1.1.5. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta <i>Geranium purpureum</i> i <i>Geranium phaeum</i>	136
5.1.1.6. Sastav etarskog ulja biljne vrste <i>Erodium cicutarium</i>	136
5.1.1.7. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta <i>Erodium ciconium</i> i <i>Erodium absinthoides</i>	137
5.1.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja odabranih biljnih vrsta rodova <i>Geranium</i> i <i>Erodium</i>	138
5.2. Fitohemijsko i mikrobiološko ispitivanje odabranih vrsta iz porodice Brassicaceae	149
5.2.1. Hemski sastav autolizata biljnih vrsta <i>Erysimum diffusum</i> i <i>Hornungia petraea</i> , hemotaksonomija i sinteza odabranih metabolita.....	149
5.2.1.1. Analiza autolizata biljne vrste <i>Erysimum diffusum</i> , identifikacija novog izotiocijanata – 4-izotiocianatobutanske kiseline	154
5.2.1.2. Analiza autolizata biljne vrste <i>Hornungia petraea</i> i sinteza izomernih metoksibenzil-izotiocijanata, tiocijanata i cijanida.....	157
5.2.2. Antimikrobna aktivnost sintetisanog jedinjenja, potencijalnog proizvoda hidrolize glukozinolata vrste <i>E. diffusum</i>	162
6. Izvod	164
7. Summary	168
8. Literatura	172
9. Prilozi	200
9.1. TIC Hromatogram etarskog ulja nadzemnog dela <i>G. macrorrhizum</i>	201
9.2. TIC Hromatogram etarskog ulja rizoma <i>G. macrorrhizum</i>	202
9.3. TIC Hromatogram izolovanog germakrona.....	203
9.4. MS spektar germakrona	204
9.5. IR spektar germakrona.....	205
9.6. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>G. sanguineum</i>	206
9.7. TIC Hromatogram etarskog ulja nadzemnih delova vrste <i>G. robetianum</i>	207
9.8. TIC Hromatogram etarskog ulja korena vrste <i>G. robetianum</i>	208
9.9. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>G. columbinum</i>	209
9.10. TIC Hromatogram etarskog ulja korena vrste <i>G. columbinum</i>	210
9.11. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>G. lucidum</i>	211
9.12. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>G. purpureum</i>	212
9.13. TIC Hromatogram etarskog ulja nadzemnog dela <i>G. phaeum</i>	213
9.14. TIC Hromatogram etarskog ulja nadzemnog dela <i>G. phaeum</i>	214
9.15. TIC Hromatogram etarskog ulja rizoma <i>G. phaeum</i>	215
9.16. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>Ero. cicutarium</i>	216
9.17. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>Ero. ciconium</i>	217
9.18. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>Ero. absinthoides</i>	218
9.19. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste <i>Ero. cicutarium</i>	219
9.20. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste <i>Ery. diffusum</i>	220
9.21. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta nadzemnog dela <i>Ery. diffusum</i>	221
9.22. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata korena <i>Ery. diffusum</i>	222

9.23. MS spektar 4-izotiocijanatobutanske kiseline	223
9.24. TIC Hromatogram autolizata korena <i>Ery. diffusum</i> : reakcija sa diazometanom.....	224
9.25. MS spektar metil-estra 4-izotiocijanatobutanske kiseline	225
9.26. TIC Hromatogram sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline	226
9.27. MS spektar 4-izotiocijanatobutanske kiseline	227
9.28. ^1H NMR spektar sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline.....	228
9.29. ^{13}C NMR spektar sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline.....	229
9.30. TIC Hromatogram koinjekcije sintetisanog jedinjenja 156 sa autolizatom korena <i>E. diffusum</i>	230
9.31. TIC Hromatogram autolizata korena <i>E. diffusum</i> dobijenog po modifikovanoj proceduri	231
9.32. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste <i>H. petraea</i>	232
9.33. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste <i>H. petraea</i>	233
9.34; 9.35. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzaldehida.....	234
9.36; 9.37. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 3-metoksibenzaldehida.....	235
9.38; 9.39. TIC Hromatogram, MS i IR spektar smeše (<i>Z</i>)- i (<i>E</i>)-oksim 2-metoksibenzaldehida.....	236
9.40; 9.41. TIC Hromatogram, MS i IR spektar smeše (<i>Z</i>)- i (<i>E</i>)-oksim 3-metoksibenzaldehida.....	241
9.42; 9.43. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-amina	242
9.44; 9.45. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-amina	244
9.46; 9.47. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-izotiocijanata	246
9.48; 9.49. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 3-metoksibenzil-izotiocijanata	247
9.50; 9.51. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 4-metoksibenzil-izotiocijanata	250
9.52; 9.53. 9.54; 9.55. TIC Hromatogram, MS, IR, ^1H i ^{13}C NMR spektar benzil-izotiocijanata.....	252
9.56; 9.57. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-alkohola	256
9.58; 9.59. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-hlorida.....	258
9.60; 9.61. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 3-metoksibenzil-hlorida.....	260
9.62; 9.63. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 4-metoksibenzil-hlorida.....	262
9.64; 9.65. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksibenzil-tiocijanata	264
9.66; 9.67. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 3-metoksibenzil-tiocijanata	266
9.68; 9.69. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 4-metoksibenzil-tiocijanata	268
9.70; 9.71. TIC Hromatogram, MS i IR spektar benzil-tiocijanata	270
9.72; 9.73. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 2-metoksifenil-acetonitrila	272
9.74; 9.75. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 3-metoksifenil-acetonitrila	274
9.76; 9.77. TIC Hromatogram, MS i IR spektar 4-metoksifenil-acetonitrila	276
9.78; 9.79. TIC Hromatogram, MS i IR spektar fenil-acetonitrila	278
10. Biografija	280

U V O D

Lekovite biljke su oduvek imale značajno mesto u medicinskoj praksi. Najranije zabeleženi podaci mnogih naroda (npr. starih Egipćana, Sumeraca, Asiraca, Grka, Kineza i Indijaca) govore o korišćenju biljaka u terapijske svrhe od strane čoveka. Ispitivanjem hemijskih, bioloških i farmakoloških osobina prirodnih proizvoda korišćenih u tradicionalnoj medicini širom sveta dobijeni su mnogi terapeutski agensi koji se danas koriste u modernoj, konvencionalnoj medicini: morfin iz opijuma (*Papaver somniferum*) se koristi kao analgetik, digitoksin i ostali glikozidi naprstka izolovanih iz *Digitalis* spp. koriste se za lečenje bolesti srca, taksol iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) za lečenje kancera, kinin izolovan iz kore kininovog drveta (*Cinchona* spp.) za lečenje malarije, aspirin iz kore vrbe (*Salix* spp.) kao analgetik, antipiretik i antiinflamatorik, kofein iz kafe (*Coffea arabica*) – stimulans (Heinrich et al., 2004).

Tretman biljnim ekstraktima, pa zatim jedinjenjima izolovanim iz prirodnih izvora, kao i neorganskim jedinjenjima, je dugi niz godina predstavljao nezamenljivi i gotovo jedini dostupni (poznati) vid lečenja (Chadwick & Marsh, 1990). Transformacija prirodnih jedinjenja izolovanih iz biljaka u sintetske derivate i sinteza analoga započinje početkom XIX veka sa razvojem farmaceutske industrije i farmaceutske hemije. Sa napredkom sintetičke hemije, naročito sredinom XX veka, sinteza i proizvodnja lekova uzima maha – sintetski analozi i potpuno „sintetički“ molekuli u sve većoj meri zamenuju „prirodne“ lekove. Farmaceutske kompanije usmeruju svoja istraživanja i razvojne budžete ka dobijanju sintetičkih jedinjenja, dok razvoj kombinatorne hemije i računskog pristupa u dizajniranju novih lekova (eng. computational drug design) dodatno umanjuju interesovanje za prirodnim proizvodima kao potencijalnim izvorima novih lekova (Raskin et al., 2002).

Poslednjih godina XX veka je evidentan rast popularnosti herbalne i homeopatske medicine u svetu, interesovanja za organskom („zdravom“) hranom i prirodnom kozmetikom. Razlog popularizacije „prirodnih“ proizvoda je moguća nebezbednost i toksičnost novosintetisanih jedinjenja po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Popularnost prirodnih proizvoda se može pripisati i uviđanju da su fitohemikalije „bezbednije“ po zdravlje zbog viševekovnog korišćenja istih od strane čoveka, tj. ko-evolucije biljaka i ljudi. Danas je na tržištu prisutan veliki broj proizvoda koji sadrže aktivne biljne sastojke – fitofarmaceutski proizvodi ostvaruju oko 50% od ukupnog prometa na tržištu farmaceutskih proizvoda (Raskin et al., 2002; Lalli, 2005).

Biljka se može smatrati kompleksnom biosintetskom laboratorijom. Oružje odbrambenog sistema biljaka od biljojeda, drugih predatora, mikroba i virusnih infekcija čine brojna bioaktivna jedinjenja koje biljka sintetiše. Nakon više od 100 godina farmaceutskog istraživanja, samo trećina danas poznatih bolesti se može efikasno lečiti danas dostupnim lekovima. Činjenica, koja se ne sme ignorisati je da brojna biološki aktivna jedinjenja koje biljke poseduju su odabrana, razvijena i

usavršena evolucijom u toku mnogo dužeg perioda nego što su to uradile ili to mogu uraditi farmaceutske kompanije (Raskin et al., 2002).

Zbog čega nam trebaju lekovi biljnog porekla? Paradigma zapadne medicine XX veka je nastojanje da se kompleksne bolesti leče „jednim molekulom“. Mana ovog pristupa se pojavila relativno skoro kada je otpornost na antimikrobne i antitumorske lekove postala evidentna. Multifaktorijalna priroda određenih kompleksnih bolesti ukazuje na to da se mora pristupiti lečenju kombinacijom terapeutskih agenasa. Nasuprot pristupu lečenja „jednim molekulom“, tradicionalna medicina istočnih naroda oduvek je smatrala da je kompleksne bolesti najbolje lečiti kombinacijom botaničkih i nebotaničkih lekova koje je neophodno prilagoditi pacijentu i stadijumu bolesti. U tradicionalnoj kineskoj i Ajurvedskoj medicini je ovaj pristup najrazvijeniji, gde se ističe sinergistički efekat različitih komponenata kompleksnih medicinskih smeša. Očigledno je da su biljke razvile sličnu strategiju u odbrani od patogena, koji predstavljaju glavni uzrok njihovog oboljevanja i smrti. Oslanjanje na jedan antibiotik koji bi zaustavio patogene verovatno bi predstavljalo evoluciono samoubistvo biljne vrste zbog brzog razvoja rezistentnosti patogena. Iako je veoma slabo ispitana, poznata je sposobnost biljaka da biosintetišu strukturno i funkcionalno različita antimikrobna jedinjenja koja deluju zajedno radi prevencije razvoja rezistentnosti patogena – *Berberis fremontii* sintetiše antimikrobne berberinske alkaloide i 5'-metoksihidnokarpin, „multidrug-resistant pump“* inhibitor, jedinjenje koje izrazito pojačava dejstvo berberina (Stermitz et al., 2000; Ball et al., 2006). Interakcija između različitih komponenata, takođe, može imati uticaja na optimalni terapijski efekat biljnih ekstrakata – glavni aktivni sastojak ekstrakta korena *Tripterygium wilfordii* (koristi se u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje reumatoidnog artritisa), triptolid, ima toksično dejstvo ukoliko se ne uzima sa ostalim sastojcima ekstrakta, što sugerise da ostale, neidentifikovane komponente istog umanjuju toksičnost i, moguće, povećavaju efikasnost (Su et al., 1990; Tao et al., 2001; Tao et al., 2002). Na osnovu ovih činjenica može se zaključiti da ukoliko se pri lečenju određenih bolesti koriste fitoagensi, manja je mogućnost od pojave rezistentnosti zbog zajedničkog i sinergističkog dejstva više različitih bioaktivnih jedinjenja biljaka (Raskin et al., 2002; Lalli, 2005).

Iz gore navedenih razloga, poslednjih nekoliko decenija, sprovedena su brojna istraživanja aromatičnih, lekovitih i ostalih biljaka sa ciljem razvoja novih, prirodnih formulacija i aditiva za prehrambenu, kozmetičku, farmaceutsku ili neku drugu primenu. Dok se većina pomenutih istraživanja odnosi na „u narodu“ poznate biljne vrste, postoji vrlo malo podataka o biljnim vrstama koje se ne koriste u kulinarstvu i narodnoj medicini. Važnost istraživanja usmerenih u tom pravcu se može videti iz činjenica da čak 75% jedinjenja koja se danas koristi u medicinske svrhe je biljnog porekla, a četvrtina od njih se još uvek izoluje iz biljne droge (Duke, 1990; Newman, 2007). Ispitivanje ovih biljnih vrsta naročito može biti interesantno ako se uzme u obzir,

* „Multidrug resistance“ refluxi pumpe predstavljaju univerzalni mehanizam kojim se ćelije mikroba štite od prirodnih i sintetičkih antibiotika. Odgovorne su za razvoj rezistentnosti mikroba na antibiotike.

gore pomenuti, rast popularnosti komplementarne i alternativne medicine u svetu poslednjih godina i trend rasta upotrebe prirodnih proizvoda za prevenciju i lečenje brojnih oboljenja (Golbeck-Wood et al., 1996; Eisenberg et al., 1998; Fisher and Ward, 1994; Thomas et al., 2001; Mainardi et al., 2009). Od oko 250 000 biljnih vrsta na Zemlji, mali procenat je hemijski, biološki i fiziološki ispitani; do danas, 119 jedinjenja biljnog porekla se koristi kao lekovi, koja se izoluju iz samo 90 biljnih vrsta (Chadwick & Marsh, 1990; Lalli, 2005).

Familija Geraniaceae obuhvata oko 600 evropskih i vanevropskih vrsta, podeljenih u 11 rodova (Janković, 1973). U Srbiji su zastupljena samo 2 roda: *Geranium* L. i *Erodium* L'Hérit. Rod *Geranium* obuhvata oko 250 vrsta – više- ili jednogodišnjih zeljastih biljaka, od kojih u Srbiji raste devetnaest. Biljke ovog roda često se koriste kao ukrasne i medonosne, a zbog brojnih farmakoloških svojstava i kao lekovite biljke u tradicionalnoj medicini mnogih naroda (Hegi, 1906; Feijão, 1954; Jordanov, 1973; Usher, 1974; Font-Quer, 1981; Tucakov, 1990; Chalchat et al., 2002; Lis-Balchin, 2002; Bnouham, 2002; Ploetz, 2004; Redžić, 2007). Podaci o hemijskom ispitivanju vrsta roda *Geranium*, izuzimajući dobro ispitani *G. macrorrhizum*, su veoma oskudni i odnose se na izolovanje i/ili identifikaciju flavonoida (Ivancheva et al., 1989, 1999, 2000; Proestos, 2006), tanina (Ivancheva et al., 1996, Mavlyanov et al., 1994, 1997), masnih kiselina (Tsevegsuren et al., 2004) i terpenoida (Chalchat et al., 2002). Rod *Erodium* čini preko 50 vrsta, od kojih u Srbiji rastu samo dve. Prema literaturnim podacima, isparljivi sekundarni metaboliti biljnih vrsta *G. purpureum* Vill., *G. columbinum* L., *G. lucidum* L., *G. sanguineum* L., *Erodium absinthoides* Willd. i *Erodium ciconium* (Jusl.) Ait. (syn. *G. ciconium* Jusl.) do sada nisu ispitivani. Etarsko ulje vrste *Erodium cicutarium* (L.) L'Hérit. (syn. *G. cicutarium* L.), u Srbiji poznatoj kao „živa trava“, do sada nije ispitivano. Neka isparljiva jedinjenja ove biljne vrste su identifikovana tokom ispitivanja heksanskog ekstrakta (Lis-Balchin, 1993).

Familija Brassicaceae (Krstašice, porodica kupusa) obuhvata oko 3000 vrsta rasprostranjenih u celom svetu (Jovanović-Dunjić et al., 1972). Među Krstašicama se nalaze mnoge vrste koje čovek koristi kao značajan izvor hrane, npr. kupus, rotkva, slačica, ren, brokoli, keleraba, karfiol i dr. (Hemo)taksonomski važna karakteristika familije Brassicaceae i nekoliko srodnih familija (Tropaeolaceae) je prisustvo glukozinolata u njihovim tkivima (Al-Shehbaz & Al-Shammary, 1987). Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka i predstavljaju hemijski stabilne tioglukozide, a u biljnom tkivu su prostorno odvojeni od mirozinaza, enzima koji vrše hidrolizu ovih jedinjenja. Do sada je poznato oko 200 glukozinolata, od kojih je većina detektovana/izolovana iz vrsta familije Brassicaceae (Fahey, 2001; Clarke, 2010). Povređivanjem biljnog tkiva dolazi do kontakta ovih biljnih metabolita sa hidrolitičkim enzimom mirozinaza, pri čemu nastaju proizvodi njihove degradacije – izotiocjanati, tiocijanati, nitrili itd. Poznato je da su degradacioni proizvodi glukozinolata, a naročito izotiocjanati, biološki aktivni (Vaughn & Berhow, 2005). Nekoliko njih pokazuje biocidalnu aktivnost prema biljkama, insektima, bakterijama i gljivicama, dok neki od

njih imaju značajnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja (Vaughn, 1999; Fahey, 2001). Naime, poslednjih godina je dokazano da „prirodni“ izotiocijanati smanjuju rizik od nastanka kancera (Zhang & Talalay, 1994). Izotiocijanati iz kupusa, karfiola, kelja, a naročito brokolija, takođe, imaju značajan protektivni efekat od kancera (Matusheski et al., 2001; Bennett et al., 2004), zbog čega je značaj konzumiranja ovog povrća još veći. Glukozinolati i proizvodi njihove degradacije su nosioci organoleptičkih svojstava, odnosno mirisa i ukusa pomenutog povrća (Daxenbichler et al., 1991).

Erysimum diffusum Ehrh. je dvogodišnja ili višegodišnja biljka koja se koristi u narodnoj medicini i farmaceutskoj industriji za dobijanje preparata „erizida“. Ova biljna vrsta je najintenzivnije proučavana tokom 60- i 70-tih godina prošlog veka, što je rezultiralo izolovanjem/identifikacijom kardenolida (iz ove biljne vrste je po prvi put izolovan steroidni glikozid erizimozid (Turova, 1964)), sterola (Umarova, Maslennikova & Abubakirov, 1977), fosfolipida (Tadzhibaev, Mukhamedova & Akramov, 1977), flavonoida i masnih kiselina (Dolya, 1973; Fursa et al., 1984), dok se samo jedna publikacija odnosi na glukozinolate (glukoiberin i glukoheirolin), koji su detektovani u semenu ove biljne vrste (Fahey, 2001).

Hornungia petraea (L.) Rchb. (syn. *Hutchinsia petraea* (L.) R.Br.) je jedina biljna vrsta roda *Hornungia* koja je zastupljena u Srbiji. Izuvez dve publikacije koje se odnose na ispitivanje glukozinolata/izotiocijanata u biljnoj vrsti *Hutchinsia alpina* (L.) R.Br. (Kjær, 1953; Bennett et al., 2004), nema nikakvih podataka o fitohemijском ispitivanju vrsta ovog roda.

U opštem delu je predstavljena sistematika rodova i nižih taksonomske kategorije u okviru kojih se svrstavaju ispitivani taksoni (rođovi *Geranium* i *Erodium* familije Geraniaceae, zatim rođovi *Erysimum* i *Hornungia* familije Brassicaceae), tradicionalna upotreba, kao i dosadašnja fitohemijска и biološка ispitivanja ispitivanih taksona. U daljem tekstu su istaknute osnovne informacije vezane za glukozinolate, grupu sekundarnih metabolita karakterističnih za familiju Brassicaceae i još neke srođne familije, a kojima pripada izvestan broj jedinjenja čija je identifikacija jedan od ciljeva ove disertacije. U nastavku opšteg dela objedinjena je, sistematizovana i navedena većina metoda za sintezu izotiocijanata, jedinjenja koja nastaju razgradnjom glukozinolata. Nakon opšteg, sledi eksperimentalni deo, u kome su date osnovne informacije o korišćenim uzorcima i njihovoј obradi, metodama razdvajanja i analize i izvršenim sintezama jedinjenja. U narednom poglavljju su prezentovani i diskutovani rezultati. Zatim slede izvodi na srpskom i engleskom jeziku, citirana literatura, prilog i biografija sa bibliografijom.

CILJEVI RADA

Imajući sve prethodno u vidu, za ciljeve ove doktorske disertacije postavljeno je ispitivanje biljnih vrsta: *G. macrorrhizum*, *G. sanguineum*, *G. robertianum*, *G. columbinum*, *G. lucidum*, *G. purpureum*, *G. phaeum*, *Erodium absinthoides*, *Erodium ciconium*, *Erodium cicutarium*, *Erysimum diffusum* i *H. petraea*, a obuhvata sledeće:

- Izolovanje i detaljna analiza hemijskog sastava etarskih ulja ili autolizata navedenih biljnih vrsta,
- Sinteza/izolovanje odabranih sekundarnih metabolita pomenutih biljnih vrsta,
- Spektroskopska i strukturna karakterizacija izolovanih i/ili sintetisanih sekundarnih metabolita
- Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti odabranih etarskih ulja i čistih jedinjenja

Predviđena ispitivanja su sprovedena korišćenjem sledećih metoda:

Dobijanje etarskih ulja: hidrodestilacija po Clevenger-u,

Dobijanje autolizata: hidroliza endogenom mirozinazom (mehaničkim povređivanjem) bez izolovanja glukozinolata

Analiza: gasna hromatografija (GC-FID) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS),

Izolovanje: „dry-column flash“ hromatografija i tečna hromatografija pod srednjim pritiscima (MPLC),

Mikrobiološka aktivnost: disk difuzioni metod, mikrodilucionna metoda po preporukama NCCLS-a,

Spektroskopska i strukturna karakterizacija: nuklearna magnetna spektroskopija ugljenika i vodonika (^1H i ^{13}C NMR), infracrvena spektroskopija (IR) i masena spektrometrija (MS).

OPŠTI DEO

3.1. SISTEMATIKA FAMILIJA GERANIACEAE I BRASSICACEAE

3.1.1. FAMILIJA GERANIACEAE J. ST. HILL.

Familija Geraniaceae J. St. Hill. (familija Zdravaca) obuhvata oko 600 evropskih i vanevropskih vrsta, raspoređenih u 11 rodova*. Uglavnom su to višegodišnje, ređe jednogodišnje biljke ili polužbunovi, koje rastu na svim kontinentima izuzev Antarktika. Prema „Flori SR Srbije“, familija Geraniaceae je u Srbiji zastupljena sa samo dva roda: *Geranium* L. i *Erodium* L'Hérit (Janković, 1973).

Taksoni koji se trenutno klasificuju u rodove *Pelargonium* i *Erodium*, prvo su bili uključeni u rod *Geranium* od strane Linnaeus-a. Od 1789. godine, na predlog C. L'Héritier-a, izdvojeni su iz roda *Geranium*, tj. razmatraju se kao zasebni rodovi (<http://www.succulent-plant.com/families/geraniaceae.html>). I pored toga, *Pelargonium* vrste su zadržale stari naziv, pa su i danas poznate kao „geranijumi“, koje su, sa nekoliko vrsta roda *Geranium*, veoma cenejene ornamentalne biljke u hortikulturi, pa se iz tog razloga u velikoj meri i kultivisu.

U Tabeli 3.1. je dato filogenetsko stablo rodova *Geranium* i *Erodium*.

Tabela 3.1. Filogenetsko stablo[†] rodova *Geranium* i *Erodium*

Taksonomske kategorije	Taksomi
<i>Regnum – Carstvo</i>	<i>Plantae</i> Haeckel, 1866–Biljke
<i>Subregnum – Podcarstvo</i>	<i>Viridaeplantae</i> Cavalier-Smith, 1981–Zelene biljke
<i>Phylum – Odeljak</i>	<i>Tracheophyta</i> Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998–Vaskularne biljke
<i>Subphylum – Pododeljak</i>	<i>Euphylophytina</i>
<i>Infraphylum –</i>	<i>Radiatopses</i> Kenrick & Crane, 1997
<i>Classis – Klasa</i>	<i>Magnoliopsida</i> Brongniart, 1843–Dikotiledone biljke
<i>Subclassis – Podklasa</i>	<i>Rosidae</i> Takhtajan, 1967
<i>Ordo – Red</i>	<i>Geraniales</i> Dumortier, 1829
<i>Familia – Familija</i>	<i>Geraniaceae</i> A.L. de Jussieu, 1789
<i>Tribus – Pleme</i>	<i>Geranieae</i> (Adans., 1763 ex A.L. de Jussieu, 1789) Sweet, 1820
<i>Genus – Rod</i>	<i>Geranium</i> C. Linnaeus, 1753 <i>Erodium</i> L'Hérit., 1787-88

* Prema drugim izvorima rod čini oko 800 vrsta (Gayoso-De-Lucio et al., 2008;
http://www.nsf.gov/awardsearch/showAward.do?AwardNumber=0717372&WT.z_pims_id=503285TVL).

[†] Systema Naturae 2000 (<http://sn2000.taxonomy.nl/>).

3.1.1.1. Rod *Geranium*^{*} L. 1754

Rod *Geranium* obuhvata oko 250 vrsta[†] – više- ili jednogodišnjih zeljastih biljaka, retko poluzbunova ili žbunova. Vrste ovog roda naseljavaju umerenu zonu pretežno severne hemisfere, dok je u tropskim oblastima rod zastavljen samo u planinskim područjima. Na teritoriji Srbije raste devetnaest vrsta, sistematizovanih u veći broj nižih taksonomske kategorije (Janković, 1973):

1. *G. phaeum* L. 1753
2. *G. villosum* Ten. 1811-15 (syn. *G. brutium* Gasp.; *G. molle* var. *pseudograndiflorum* Vis. 1850/52; *G. molle* var. *macropetalum* Boiss. 1867)
3. *G. molle* L. 1753 (syn. *G. argentum* Luce 1832)
4. *G. divaricatum* Ehrh. 1792
5. *G. pyrenaicum* Burm. 1759
6. *G. bohemicum* Torn. 1756
7. *G. pusillum* Burm. 1759
8. *G. dissectum* Jusl. 1755 (syn. *G. malvaefolium* Baumg. 1866)
9. *G. striatum* Jusl. 1755
10. *G. sanguineum* L. 1753 (syn. *G. grandiflorum* Gilib. 1785)
11. *G. sylvaticum* L. 1753 (syn. *G. alpestre* Schur 1859; *G. coeruleo-purpureum* Gilib. 1785; *G. purpureo-ceruleum* Ldhb. 1824; *G. angulatum* Curt.; *G. albiflorum* Kosch. 1898)
12. *G. asphodeloides* Burm. 1759
 - ssp. *nemorosum* (Ten.) Fritsch (syn. *G. nemorosum* Ten.; *G. fasciculatum* Panč.)
 - ssp. *tauricum* (Rupr.) Fritsch (syn. *G. t.* Rupr.; *G. orientale* Mill; *G. a.* var. *genuinum* Boiss.)
13. *G. palustre* Torn. 1756
14. *G. nodosum* L. 1753 (syn. *G. duplicatum* Kit.; *G. striatum* var. *freyeri* Griseb.)
15. *G. columbinum* L. 1753 (syn. *G. roseo-coeruleum* Gilib. 1785)
16. *G. macrorrhizum* L. 1753
17. *G. lucidum* L. 1753
18. *G. purpureum* Vill. 1875 (syn. *G. robertianum* var. *purpureum* (Vill.) DC. 1805)
19. *G. robertianum* L. 1753 (syn. *G. foetidum* Gilib. 1785; *Robertianum nostrum* Goldb. 1817)

3.1.1.2. Rod *Erodium*[‡] L'Hérit 1787-88

Rod *Erodium* čini preko 50 vrsta[§], od kojih je većina (preko 40) rasprostranjena u Mediteranskom području. Jednogodišnje su ili dvogodišnje zeljaste biljke, ređe

^{*} Od grčkog *geranos* = ždral, zbog izgleda ploda koji je sličan njegovom kljunu.

[†] Prema drugom izvoru rod čini više od 300 vrsta (Barra et al., 2006; Tsevegsuren et al., 2005).

[‡] Od grčkog *erodios* = čaplja, zbog sličnosti ploda sa kljunom čaplje.

[§] Prema drugom izvoru rod čini više oko 60 vrsta (Sharawy & Badr, 2008).

višegodišnje zeljaste biljke ili polužbunovi. Prema „Flori SR Srbije“ (Janković, 1973), u Srbiji rastu samo dve vrste:

1. *E. ciconium* (Jusl.) Ait. 1789 (syn. *Geranium ciconium* Jusl. 1755)
2. *E. cicutarium* (L.) L, Herit. 1789 (syn. *Geranium cicutarium* L. 1753)

3.1. 2. FAMILIJA BRASSICACEAE BURN. 1835 (SYN. CRUCIFERAEE B. JUSS. 1759)

Brassicaceae (Krstašice, porodica kupusa) su najčešće jedno-, dvo- ili višegodišnje zeljaste biljke, ređe polužbunovi ili žbunovi. Krstašice obuhvataju oko 3000 vrsta* rasprostranjenih u celom svetu. Česte su na severnoj hemisferi, u oblasti Mediterana, u zapadnoj i severnoj Aziji. Mnogi rodovi predstavljaju kosmopolite, dok su neki ograničeni na geografski veoma uzane oblasti. Najveći broj vrsta se nalazi u borealnim, vantarpskim oblastima, gde se javljaju mnogi endemični monotipski rodovi ili rodovi sa malim brojem vrsta (Jovanović-Dunjić *et al.*, 1972; Živanović & Pavlović, 1999). Krstašice naseljavaju najraznovrsnija staništa, a u planinama dopiru do gornje granice prostiranja vegetacije.

U flori Srbije zabeležen je 51 rod iz familije Brassicaceae (Jovanović-Dunjić *et al.*, 1972). U Tabeli 3.2. je prikazano filogenetsko stablo rodova *Erysimum* i *Hornungia*.

Tabela 3.2. Filogenetsko stablo† rodova *Erysimum* i *Hornungia*

Taksonomske kategorije	Taksoni
<i>Regnum – Carstvo</i>	<i>Plantae</i> Haeckel, 1866–Biljke
<i>Subregnum – Podcarstvo</i>	<i>Viridaeplantae</i> Cavalier-Smith, 1981–Zelene biljke
<i>Phylum – Odeljak</i>	<i>Tracheophyta</i> Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998–Vaskularne biljke
<i>Subphylum – Pododeljak</i>	<i>Euphylophytina</i>
<i>Infraphylum</i>	<i>Radiatopses</i> Kenrick & Crane, 1997
<i>Classis – Klasa</i>	<i>Magnoliopsida</i> Brongniart, 1843–Dikotiledone biljke
<i>Subclassis – Podklasa</i>	<i>Rosidae</i> Takhtajan, 1967
<i>Ordo – Red</i>	<i>Brassicales</i> Bromhead, 1838
<i>Familia – Familija</i>	<i>Cruciferae</i> A.L. de Jussieu, 1789
<i>Tribus – Pleme</i>	<i>Camelineae</i>
<i>Genus – Rod</i>	<i>Erysimum</i> C. Linnaeus, 1753 <i>Hornungia</i> Bernhardi, 1840

3.1.2.1. Rod *Erysimum* L. 1754

Rod *Erysimum* obuhvata 125 vrsta‡ jedno- ili višegodišnjih biljaka, rasprostranjenih u Evropi, severnoj Africi, zapadnoj i centralnoj Aziji i Severnoj Americi. U flori Srbije zastupljeno je 10 vrsta (Nikolić, 1972):

* Prema drugim izvorima, familija obuhvata 3709 (Warwick *et al.*, 2006), odnosno 3710 vrsta i 338 rodova (Beilstein *et al.*, 2008).

† Systema Naturae 2000 (<http://sn2000.taxonomy.nl/>).

‡ Prema drugom izvoru, rod čini oko 180 vrsta (Rollins, 1993; Al-Shehbaz, 1988).

1. *E. sylvestre* (Crantz) Scop. 1772 (syn. *Cheiranthus sylvestre* Cr. 1762; *E. cheiranthus* Pers. 1806; *E. sylvestre* ssp. *cheiranthus* (Pers.) Schinz u Thell. 1921)
 - ssp. *sylvestre*
 - ssp. *cheiranthus* (Pers.) Schinz u Thell. 1921 (syn. *Erysimum cheiranthus* Pers. 1806)
 - f. *cheiranthus*
 - f. *clusianum* (Rchb.) Hayek 1925 (syn. *E. cheiranthoides* var. *clusianum* Rchb.)
 - ssp. *linearifolium* (Tsch.) Hayek 1925 (syn. *E. linearifolium* Tausch. 1831; *E. sylvestre* var. *linearifolium* Beck. 1916)
2. *E. comatum* Panč. 1874 (syn. *E. crepidifolium* var. *angustifolium* Gris. 1825)
3. *E. helveticum* (Jacq.) DC. 1805 (syn. *E. sylvestre* var. *helveticum* Beck 1916)
4. *E. diffusum* Ehrh. 1782 (syn. *E. canescens* Roth. 1796)
 - var. *diffusum*
 - var. *australe* (Gay.) Hayek 1823
5. *E. crepidifolium* Reichr. 1823
6. *E. odoratum* Ehrh. 1792 (syn. *E. erysimoides* (L.) Fritsch 1907; *E. pannonicum* Cr. 1762)
 - var. *odoratum*
 - var. *carnolicum* (Doll.) Beck 1916 (syn. *E. carniolicum* Doll.)
7. *E. pectinatum* Bory et Chaub. 1832 (syn. *E. kümmmerlei* Jav. 1915)
8. *E. hieracifolium* L. 1755 (syn. *E. strictum* Gaertn. Meyer et Schreb. 1800)
9. *E. repandum* L. 1753
10. *E. cheiranthoides* L. 1753

3.1.2.2. Rod *Hornungia** Rchb. 1837

Rod *Hornungia* obuhvata oko 10 vrsta rasprostranjenih u Evropi, zapadnoj Aziji i severnoj Africi. Jedna vrsta se javlja u Australiji, južnoj i severnoj Africi. U Srbiji je zastupljena samo jedna vrsta (Jovanović-Dunjić et al., 1972):

1. *H. petraea* (L.) Rchb. 1837 (syn. *Hutchinsia petraea* (L.) R. Br. 1812; *Lepidium petraeum* L. 1753)

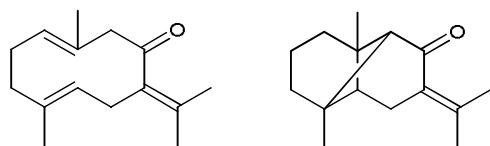
* Po nemačkom floristu i apotekaru iz XIX veka – Hornungu.

3.2. ISPITIVANJE VRSTA FAMILIJA GERANIACEAE I BRASSICACEAE: TRADICIONALNA UPOTREBA, HEMIJSKI SASTAV, FARMAKOLOŠKO DEJSTVO I PRIMENA

3.2.1. FAMILIJA GERANIACEAE

3.2.1.1. *Geranium macrorrhizum* L. 1753

Ova višegodišnja biljka, u narodu poznata kao zdravac (*eng. wild geranium; Slika 3.4*), raste uglavnom u brdsko-planinskim područjima, a često se gaji kao baštenska biljka. Rasprostranjena je u južnoj Evropi, naročito na Balkanskom poluostrvu, dok je naturalizovana u severnoj i centralnoj Evropi (Janković, 1973). Sa aspekta ekonomije, najvažnija je biljna vrsta roda *Geranium* zbog aromatičnih i lekovitih svojstava, a značajna je i kao medonosna biljka. Od davnina poznat po svojoj lekovitosti, zdravac je veoma cenjen u tradicionalnoj medicini srpskog naroda i ostalih naroda Balkana; koristi se za lečenje stomačnih tegoba (Tucakov, 1990; Redžić, 2007) i kao afrodizijak (Hegi, 1906; Usher, 1974). Ova biljka predstavlja simbol zdravlja u tradicionalnoj kulturi Srba i Bugara (Lis-Balchin, 2002; Chalchat *et al.*, 2002; Ploetz *et al.*, 2004).



Slika 3.1. Germakron (levo) i germazon (desno), seskviterpenski ketoni po prvi put izolovani iz biljne vrste *G. macrorrhizum* (Ognyanov *et al.*, 1958; Tsankova & Ognyanov, 1976)

Dosadašnja fitohemijska ispitivanja ove biljne vrste sprovedena su uglavnom tokom 70- i 80-tih godina prošlog veka i ukazala su na prisustvo, odnosno identifikaciju, na prvom mestu, tanina (Kostecka-Madalska *et al.*, 1965; Halas *et al.*, 1991; Ivancheva *et al.*, 1992; Kalemba *et al.*, 1992), kojim je ova biljna vrsta bogata, zatim flavonoida (Ognyanov *et al.*, 1972, 1975; Nakashima *et al.*, 1973; Ivancheva *et al.*, 1976, 1989, 1992; Kalemba *et al.*, 1992; Miliauskas *et al.*, 2004), fenolnih kiselina (Kalemba *et al.*, 1992) i terpenoida, odnosno etarskih ulja (Tsankova *et al.*, 1972, 1977; Hodisan *et al.*, 1982; Chalchat *et al.*, 2002) u nadzemnom delu biljke. Etarsko ulje je bogato oksigenovanim terpenoidom germakronom, a izolovani su i seskviterpenski ketoni izogermakron i germazon (Ognyanov *et al.*, 1963; Tsankova *et al.*, 1976, 1977; Bozhkova *et al.*, 1984) (Slika 3.1.). Isparljivi sastojci podzemnih delova biljke, tj. rizoma ranije nisu ispitivani. Ispitivanja biološke aktivnosti nadzemnog dela ove biljne vrste pokazala su da ekstrakti ispoljavaju izrazito antimikrobitno, hipotenzivno, spazmolitično, astringentno, kardiotonično, antioksidantno, kapilarno i sedativno

dejstvo (Rainova et al., 1968; Ivancheva et al., 1976, 1992; Manolov et al., 1977, 1980; Miliauskas et al., 2004).

Nadzemni delovi zdravca se koriste za proizvodnju etarskog ulja, u svetu poznatog pod nazivom „zdravetz oil“ i veoma cenjenog u parfimerijskoj industriji (Lis-Balchin, 2002). Herba se koristi i kao začin (Seidemann, 2005). Nedavno, imajući u vidu povećanu potražnju tržišta za što je moguće „prirodnjom“ hranom, Miliauskas i sar. (2006, 2007) su ispitivali nekoliko medicinskih i lekovitih biljaka sa ciljem pronalaženja novog, „prirodnog“ antioksidansa za potencijalnu primenu u prehrabenoj industriji. Zaključili su da ekstrakt lista zdravca pokazuje izrazitu antioksidantnu aktivnost, koja je slična ili čak veća od aktivnosti ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis*) i ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), koji se široko koriste u prehrabenoj i parfimerijskoj industriji kao antioksidansi. Iz ekstrakta zdravca, isti autori su izolovali 7 jedinjenja nosioca antioksidantne aktivnosti: galnu, elagičnu i 4-galoil-hinsku kiselinu, zatim flavonoid kvercetin i tri glikozida kvercetina (Miliauskas et al., 2004). Takođe, zbog izrazite antioksidantne aktivnosti, Venskutonis i sar. (2010) su ispitivali cito- i genotoksičnu aktivnost ekstrakata zdravca zbog potencijalne upotrebe ove biljne vrste kao funkcionalne hrane i/ili aditiva u prehrabenoj industriji. Nedavno je pokazano, u ispitivanju sprovedenom na miševima, da etanolni ekstrakt zdravca poseduje značajno imunostimulatorno dejstvo (Jurkstiene et al., 2007). Ekstrakt zdravca ulazi u sastav farmaceutskih preparata za prevenciju i lečenje infekcije izazvane bakterijom *Helicobacter pylori* i bolesti digestivnog trakta koje ona izaziva (Li et al., 2008), seksualne disfunkcije i neplodnosti (Miron et al., 2009), kao i za lečenje pojedinih bolesti usta (Hodisan et al., 1984).

Etarsko ulje i ostali ekstrakti zdravca privukli su malo pažnje istraživača i tržišta zbog visoke cene istih, koje su posledica nedovoljne količine biljnog materijala, tj. ograničenja na samonikle populacije zdravca. Poslednjih godina, komercijalna dostupnost ulja zdravca pruža nove mogućnosti za istraživanje i moguću primenu istog. Komercijalno etarsko ulje zdravca se proizvodi u Bugarskoj u količini od svega nekoliko desetina ili stotina kilograma godišnje. Zbog novih zakona koji se odnose na zaštitu prirodnog biodiverziteta, ionako male količine zdravca postaju nedostupne. Iz tih razloga se počelo sa kultivisanjem ove biljne vrste (Lis-Balchin, 2002).

3.2.1.2. *Geranium sanguineum* L. 1753

Ova višegodišnja zeljasta biljka sa čvornovatim rizomom, u narodu poznata kao devičko oko ili zdravinjak (eng. bloody cranesbill; Slika 3.4), ima široki areal rasprostranjenosti i raste u najvećem delu Evrope. Na Balkanskom poluotoku je široko rasprostranjena (Janković, 1973). Kao ornamentalna biljka, zdravinjak je naturalizovan gotovo svuda. Ova biljna vrsta je cenjena u tradicionalnoj medicini mnogih naroda zbog svojih farmakoloških svojstava; u bugarskoj narodnoj medicini se koristi za lečenje eruptivnih kožnih oboljenja i kao dezinficijens; takođe se koristi u ublažavanju svraba (pruritus), kod lečenja ogrebotina i lezija kože (Jordanov et al., 1973), zatim kao

sredstvo za ublažavanje tegoba kod malignih bolesti hematopoeznih organa (Lis-Balchin, 2002). U narodnoj veterinarskoj medicini Italijana, ova biljna vrsta se koristi u lečenju dijareje (Gastaldo et al., 1978).

Sa fitohemijskog aspekta, ovaj takson je veoma malo ispitana. U naučnoj literaturi mogu se naći radovi koji se odnose na ispitivanje/identifikaciju tanina, fenolnih kiselina, flavonoida, fenil-propanoida, antocijana, proantocijana (Ivancheva et al., 1996, 1999, 2000; Mavlyanov et al., 1994, 1997; Serkedjieva et al., 1998; Fodorea et al., 2004; Leucuta et al., 2005; Pantev et al., 2006) i masnih kiselina* (Tsevegsuren et al., 2004) ovog taksona. Isparljivi sekundarni metaboliti biljne vrste *G. sanguineum* ranije nisu ispitivani.

Nedavno je utvrđeno da ekstrakt ove biljke pokazuje značajanu *in vitro* i *in vivo* antiviralnu aktivnost – inhibira replikaciju virusa gripe tipa A i B (Serkedjieva et al., 1998, 2003, 2005, 2007, 2008, 2009; Toshkova et al., 2004; Pantev et al., 2006) i herpes simplex virusa tipa 1 i 2 (Serkedjieva et al., 1992, 1999). Ekstrakt ove biljke, zajedno sa ε-aminokapronskom kiselinom ima sinergističko inhibitorno dejstvo na replikaciju virusa gripe tipa A; ispitivanje je sprovedeno na čelijskim kulturama i miševima (Serkedjieva et al., 2010a). Isti ekstrakt sa enzimom superoksid-dismutaza, izolovanim iz gljivice *Humicula lutea*, takođe, ima sinergističko inhibitorno dejstvo na virus gripe tipa A (H3N2) (Serkedjieva et al., 2010b). Sinergistički efekat na inhibiciju virusa influence tipa A (H7N1) ekstrakt pokazuje i sa antiviralnim lekom rimantadinom (trg. naziv Flumadine®) (Serkedjieva et al., 2005). Osim antiviralne aktivnosti, ekstrakt ove biljke pokazuje antioksidantnu i antiradikalnu aktivnost zbog značajnog sadržaja polifenola (Sokmen et al., 2005; Murzakhmetova et al., 2008). Antibakterijska i antifungalna aktivnost do sada nije ispitana.

3.2.1.3. *Geranium robertianum* L. 1753

Pod naravnim nazivom živa trava (*eng. herb robert*; Slika 3.4) postoji više vrsta biljaka (*Erodium ciconium*, *E. cicutarium*), pa je neophodno obratiti pažnju, pored narodnog, i na latinski naziv taksona. Jednogodišnja je ili zimujuća jednogodišnja zeljasta biljka jakog, karakterističnog mirisa, koja raste gotovo u čitavoj Evropi, većem delu Azije, Africi, Severnoj i Južnoj Americi. Na Balkanskom poluostrvu i u Srbiji široko je rasprostranjena (Janković, 1973). Ova vrsta se već vekovima koristi u tradicionalnoj medicini kao sredstvo za zaceljivanje rana, zatim zbog (navodnog) antiinflamatornog, antikancerogenog, adstringentnog i hemostatičkog dejstva (Feijão, 1954; Font-Quer, 1981; Amaral et al., 2009); u tradicionalnoj medicini Maroka, živa trava se koristi zbog hipoglikemičnih i antispazmičnih svojstava, zatim u lečenju kancera i kao tonik (oporavak i jačanje organizma) (Bnouham et al., 2002); u narodnoj medicini Izraela, oblasti Golanske visoravni i Zapadne obale koristi se u tretmanu

* U semenu ove biljne vrste utvrđeno je prisustvo petroselinske (6-oktadecenske) (34,4–48,4%) i vernolinske (epoksi-*cis*-9-oktadecenske) kiseline (21,4–32,6%). Do ovog otkrića se verovalo da je petroselinska kiselina hemotaksonomski marker nekoliko filogenetski bliskih familija reda Umbelliflorae, gde predstavlja najzastupljeniju masnu kiselinu u semenu taksona familija Apiaceae i Araliaceae.

povišenog holesterola (Said et al., 2002); meksička i egipatska tradicionalna medicina ovu biljku koriste za lečenje diabetesa tipa II (Trevino et al., 2010).

Dosadašnje fitohemijsko ispitivanje uglavnom se odnosi na fenolne kiseline i flavonoide (Kartnig & Bucar-Stachel, 1991; Ivancheva & Bourzeix, 1999; Ivancheva & Petrova, 2000; Kobakhidze et al., 2004; Katalinić et al., 2006; Amaral et al., 2009). Publikovan je samo jednom rad koji se odnosi na ispitivanje etarskog ulja izolovanog iz nadzemnih delova ove vrste (Pedro et al., 1992).

Utvrđeno je da ekstrakt ove biljke ispoljava značajno antioksidantno dejstvo, prvenstveno zbog sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida (Katalinić et al., 2006; Amaral et al., 2009). Etarsko ulje žive trave pokazuje i antimikrobno dejstvo (Shelz et al., 2006). Vodeći se podatkom o tradicionalnoj upotebi u lečenju diabetesa tipa II, Eskander i sar. (1995) su potvrdili hipoglikemijsko dejstvo ove biljne vrste.

3.2.1.4. *Geranium columbinum* L. 1753

U narodu poznata kao golubija noge ili krvavac (*eng. long-stalk crane's-bill*; Slika 3.4), ova biljna vrsta raste u čitavom Sredozemlju, u većem delu Evrope i Azije; vrlo je rasprostranjena na Balkanskom poluostrvu (Janković, 1973). Nedavno je ispitano dejstvo etanolnog ekstrakta ove biljne vrste na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*, gde je pomenuti ekstrakt ispoljio izvesno bakteriostatsko dejstvo (Quave et al., 2008). Fitohemijski je ova biljna vrsta veoma slabo ispitana – Ivancheva i Bourzeix (1999) su odredili ukupan sadržaj katehina i proantocijanidina; Ivancheva i Petrova (2000) su ispitale flavonoidne aglikone ove i još deset vrsta roda *Geranium* i njihov značaj sa hemotaksonomskog aspekta.

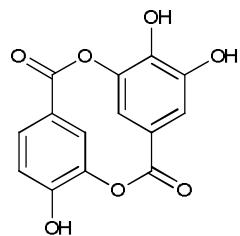
3.2.1.5. *Geranium lucidum* L. 1753

Ilja crvena (*eng. shining crane's-bill*; Slika 3.4) je jednogodišnja biljka rasprostranjena u atlantskoj, srednjoj i istočnoj Evropi, Mediteranu, Maloj i Srednjoj Aziji. Na Balkanskom poluostrvu i Srbiji je, takođe, široko rasprostranjena biljna vrsta (Janković, 1973). I ova vrsta je, takođe, veoma slabo ispitana – izolovani su i identifikovani flavonoidi (Ivancheva & Wollenweber, 1989; Ivacheva & Petrova, 2000) i tanin geraniin (Haddock et al., 1982). Utvrđeno je da ekstrakt ove biljke pokazuje kontraceptivno dejstvo kod pacova (Prakash, 1986).

3.2.1.6. *Geranium purpureum* Vill. 1875

Jednogodišnja biljka (*eng. little robin*; Slika 3.4) rasprostranjena u mediteranskom i submediteranskom području; na Balkanskom poluostrvu, takođe, široko rasprostranjena (Janković, 1973). U naučnoj literaturi gotovo da nema podataka o ovoj biljnoj vrsti. Sa fitohemijskog aspekta, jedino ispitivanje sprovedeno je od strane Proestos-a i sar. (2006), koji su ispitali ukupni ideo flavonoida i fenolnih kiselina u nekoliko uzoraka grčkih aromatičnih biljaka, izvršili njihovu identifikaciju i ispitali

antimikrobnu i antioksidantnu aktivnost metanolnih ekstrakata. Među ispitanim biljnim vrstama, ekstrakt biljke *G. purpureum* je imao najveći sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina i, očekivano, najjaču antimikrobnu i antioksidantnu aktivnost.



3.2.1.7. *Geranium phaeum* L. 1753

Geranium phaeum ili zdravinjak (eng. dusky cranesbill; Slika 3.4) višegodišnja je, isključivo evropska vrsta, rasprostranjena u srednjoj i južnoj Evropi, kao i na Balkanskom poluostrvu (Janković, 1973). U naučnoj literaturi postoji vrlo malo podataka o ovoj biljnoj vrsti. Nedavno je ispitana sastav etarskog ulja iz nadzemnog dela ove biljke (Chalchat et al., 2002). Metanolno-vodeni ekstrakt ove biljke pokazuje *in vitro* inhibitornu aktivnost na enzim HIV-1 reversna transkriptaza HIV virusa (Mlinarić et al., 2000). Leifertova i sar. (1976) su identifikovali fenolna jedinjenja, aminokiseline, slobodne i glikozidno vezane šećere i tanine prisutne u ovoj biljci. Utvrđeno je i prisustvo pojedinih flavonoida (Fuzi & Racz, 1959; Boutard & Lebreton, 1975) i tanina (Bate-Smith, 1972).

Slika 3.2. Novi depsid, erodiol, izolovan iz nadzemnog dela *E. cicutarium* (Fecka & Cisowski, 2005)

3.2.1.8. *Erodium ciconium* (Jusl.) Ait. 1789

Jednogodišnja zeljasta biljka, u narodu poznata kao živa trava ili rodin kljun (eng. common stork's bill, longbeaked stork's bill; Slika 3.4), rasprostranjena je u Srednjoj Evropi, Sredozemlju, na Balkanskom poluostrvu, Maloj i srednjoj Aziji i na Kavkazu (Janković, 1973). Quave i sar. (2008) su ispitali antibakterijsko dejstvo ekstrakta ove biljne vrste, zajedno sa biljnim vrstama koje se koriste u tradicionalnoj medicini Italijana na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*. Pomenuti ekstrakt nije ispoljio značajno bakteriostatsko dejstvo. Nedavno je u istraživanju sprovedenom od strane Sharawy-ja i Abdelfattah-a (2008) analiziran profil proteina iz semena ove vrste metodom elektroforeze u okviru studije filogenije roda *Erodium*. Fecka i sar. (2001) su identifikovali nekoliko polifenolnih jedinjenja, tanina i flavonoida iz ekstrakta *E. ciconium* (Fecka i Cisowski, 2002). Isparljivi sekundarni metaboliti taksona roda *Erodium* ispitani su samo u slučaju vrste *E. moschatum* (Carpino et al., 2004).

3.2.1.9. *Erodium cicutarium* (L.) L'Hérit 1789

Jedno- do dvogodišnja, ređe višegodišnja zeljasta biljka sa istim narodnim imenom kao i prethodna vrsta, živa trava (eng. redstem stork's bill, redstem filaree; Slika 3.4), prvobitno rasprostranjena samo u Mediteranskom području, južnoj i atlantskoj Evropi i Aziji umerenog pojasa, danas je prenešena i rasprostranjena na svim kontinentima.

Nikitina (2007) je odredila ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i ukupnih polifenola u ekstraktu ove biljke. Sharawy i Abdelfattah (2008) su, radi

utvrđivanja filogenije roda *Erodium*, analizirali profil proteina u semenu ove vrste. Fecka i saradnici (2001) su iz ekstrakta ove biljne vrste izolovali i identifikovali brevifolin-karboksilnu kiselinu, brevifolin, elagičnu kiselinu, metil-estar galne kiseline, galnu i protokatehinsku kiselinu, zatim elagitanine, galotanine i flavonoidne glikozide (Fecka & Cisowski, 2002). Iz ove biljne vrste izolovan je i okarakterisan novi depsid erodiol (Slika 3.2.), geraniin, didehidrogeraniin, korilagin, 3-*O*-galoil-šikimska kiselina, glikozid metil-estra galne kiseline, rutin, hiperin, kvercetin 3-*O*-(6"-*O*-galoil)-glikozid, izokvercitrin, prosta fenolna jedinjenja (Fecka & Cisowski, 2005) i antocijani (Medrano et al., 1978). Isparljivi sekundarni metaboliti ove vrste nisu ispitivani, sa izuzetkom jedne publikacije koja se odnosi na ispitivanje hemijskog sastava heksanskog ekstrakta (Lis-Balchin, 1993).

Primenom ispitivanja citotoksične aktivnosti, ekstrakt *E. cicutarium* je pokazao značajno inhibitorno dejstvo na ćelijsku kulturu tumorskih, epitelnih ćelija cerviksa i netoksičnost na nekancerozne ćelije (Donaldson et al., 2004). Ekstrakt ove biljke ispoljava antiviralno dejstvo na herpes virus tipa I (Zielinska-Jencylyk et al., 1987), slabo antiviralno dejstvo na virus „newcastle“ (Zielinska-Jencylyk et al., 1988) i antioksidantno dejstvo (Sroka et al., 1994). Vodeći se podatkom o upotrebi u tradicionalnoj medicini, Lis-Balchin i Hart (1994) su utvrdili da ekstrakt pokazuje spazmogenu aktivnost i zaključili da su komponente etarskog ulja nesumnjivo odgovorne za ispoljeno dejstvo.

3.2.1.10. *Erodium absinthoides* Willd. 1800

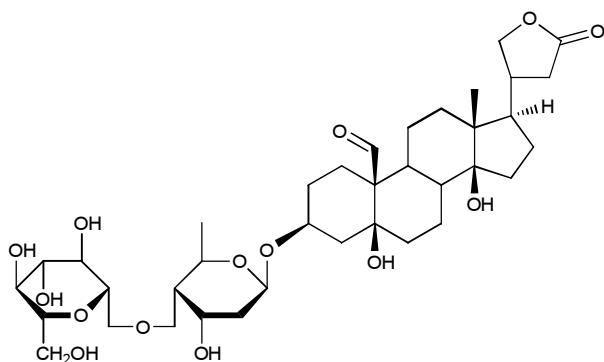
Erodium absinthoides (Slika 3.4) je višegodišnja biljka nativna za jugoistočnu Evropu (Petrova & Kozuharov, 1979). U naučnoj literaturi ne postoje podaci o fitohemijskom, biološkom, niti o farmakološkom ispitivanju vezanom za ovaj takson.

3.2.2. FAMILIJA BRASSICACEAE

Krstašice (Brassicaceae) predstavljaju jednu od deset ekonomski najvažnijih biljnih familija (Rich, 1991). Među Krstašicama se nalaze mnoge vrste koje čovek koristi kao značajan izvor hrane; to je najčešće povrće, koje ima veliku hranljivu vrednost, npr. kupus, rotkva, slačica, ren, brokoli, keleraba, karfiol i dr. Ulje i gorke materije koje se često koriste u industrijske i medicinske svrhe, poseduju neke vrste iz rodova *Brassica*, *Sinapis*, *Raphanus*, *Camelina*, *Cochlearia* i dr. Mnoge vrste Krstašica koriste se od davnina kao ukrasne biljke (rodovi *Aethionema*, *Iberis*, *Crambe*, *Cheiranthus*, *Erysimum*, *Hesperis*, *Alyssum* i mnogi drugi). (Hemo)taksonomski važna karakteristika familije Brassicaceae i nekoliko srodnih familija je prisustvo glukozinolata u njihovim tkivima (Odeljak 2.2.3) (Al-Shehbaz & Al-Shammary, 1987).

3.2.2.1. *Erysimum diffusum* Ehrh. 1782

Erysimum diffusum (eng. diffuse wallflower, alpine hedge-mustard; Slika 3.4) je dvo- ili višegodišnja biljka, rasprostranjena u Evropi, Turskoj, Kavkazu, Jermeniji, južnim delovima bivšeg SSSR-a. Koristi se u narodnoj medicini i farmaceutskoj industriji za dobijanje preparata „erizida“. Seme *E. diffusum* sadrži oko 8% kardiotoničnih glikozida (Khodzhaev et al., 1975), odakle je po prvi put izolovan steroidni glikozid erizimozid (Slika 3.3.; Maslennikova et al., 1961; Turova, 1964). Ova biljna vrsta je najintenzivnije proučavana tokom 60- i 70-tih godina prošlog veka, što je rezultiralo izolovanjem/identifikacijom kardenolida, odnosno kardenolidnih glikozida (Abubakirov, 1964; Maslennikova et al., 1967; Navruzova, 1973; Buchvarov, 1979),



Slika 3.3. Steroidni glikozid erizimozid, izolovan iz semena *E. diffusum* (Maslennikova et al., 1961; Turova, 1964).

sterola (Umarova et al., 1977), fosfolipida (Tadzhibaev et al., 1977), flavonoida (flavonoidnih glikozida) i masnih kiselina (Clair et al., 1963; Dolya, 1973; Fursa et al., 1984). Samo jedna publikacija se odnosi na ispitivanje glukozinolata (glukoiberin i glukoheirolin, Slika 3.6, str. 32), koji su detektovani u semenu ove biljne vrste (Fahey, 2001).

3.2.2.2. *Hornungia petraea* (L.) Rchb. 1837

Hornungia petraea je jednogodišnja biljka rasprostranjena u Evropi, Maloj Aziji i severnoj Africi (Slika 3.4). Jedina vrsta roda *Hornungia* koja je zastupljena u Srbiji, gde raste na dva lokaliteta, u okolini Niša (Sv. Petka, Bela Palanka) i na Kosovu i Metohiji (kod Ostrovice, Sušica) (Jovanović-Dunjić et al., 1972). Sem dve publikacije koje se odnose na ispitivanje glukozinolata/izotiocijanata u biljnoj vrsti *Hutchinsia alpina*, nema podataka o fitohemijskom ispitivanju taksona roda *Hornungia*, odnosno *Hutchinsia*. Naime, ispitivanjem biljne vrste *H. alpina* (vrsta sroдna sa *H. petraea*) utvrđeno je prisustvo β -fenetil-izotiocijanata i još jednog, neidentifikovanog izotiocijanata u semenu (Kjær, 1953). Korišćenjem LC-MS metode analize nehidrolizovanih glukozinolata, Bennett i saradnici (2004) su nedavno identifikovali nekoliko aromatičnih glukozinolata (benzil-, 3-hidroksibenzil-, 4-hidroksibenzil-, 2-metoksibenzil- i 3-metoksibenzilglukozinolati) u semenu iste biljne vrste (*H. alpina*).



Slika 3.4. Izgled (cveta, lista i ploda) biljnih vrsta *Geranium macrorrhizum* (gore) i *Geranium sanguineum* (dole)



Slika 3.4. (Nastavak) Izgled (cveta, lista i ploda) biljnih vrsta *Geranium robertianum* (gore) i *Geranium columbinum* (dole)



Slika 3.4. (Nastavak) Izgled (cveta, lista i ploda) biljnih vrsta *Geranium lucidum* (gore) i *Geranium purpureum* (dole)



Slika 3.4. (Nastavak) Izgled (cveta, lista i ploda) biljnih vrsta *Geranium phaeum* (gore) i *Erodium ciconium* (dole)



Slika 3.4. (Nastavak) Izgled (cveta, lista, ploda i korena) biljne vrste *Erodium cicutarium* (gore); izgled (cveta, lista i ploda) biljne vrste *Erodium absinthoides* (dole)



Slika 3.4. (Nastavak) Izgled (cveta, lista i ploda) biljnih vrsta *Erysimum diffusum* (gore) i *Hornungia petraea* (dole)



Slika 3.5. Crteži biljnih vrsta *Geranium macrorrhizum* (gore levo), *Geranium sanguineum* (gore desno), *Geranium robertianum* (dole levo) i *Geranium columbinum* (dole desno)



Slika 3.5. (nastavak) Crteži biljnih vrsta *Geranium lucidum* (gore levo), *Geranium purpureum* (dole levo) i *Geranium phaeum* (desno)



Slika 3.5. (nastavak) Crteži biljnih vrsta *Erodium cicutarium* (gore levo), *Erodium ciconium* (gore desno), *Erysimum diffusum* (dole levo) i *Hornungia petraea* (dole desno)

3.3. GLUKOZINOLATI

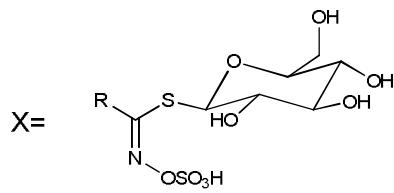
Prva zapažanja o jedinstvenim svojstvima glukozinolata i izotiocijanata zabeležena su na početku XVII veka kao rezultat nastojanja da se objasni poreklo oštrog ukusa slačice. Otkriće, prva saznanja o glukozinolatima i učešće enzima mirozinaza (β -tioglukozidaza) u konverziji glukozinolata u izotiocijanate bili su tema zanimljivog pionirskog revijalnog članka Challenger-a (1959). Glukozinolati poznati pod trivijalnim imenima sinigrin (2-propeniol- ili alil-glukozinolat, **107**) i sinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat, **23**) izolovani su još 30-tih godina XIX veka iz crne (*Brassica nigra*), odnosno bele (*Sinapis alba*) slačice (Tabela 3.4)*. Prvu opštu, iako netačnu strukturu gukozinolata krajem XIX veka predložio je Gadamer (1897), koji je pogrešno zaključio da je bočni lanac povezan sa atomom azota –NCS grupe. Uprkos određenim poteškoćama, predložena struktura je prihvaćena i verovalo se da je tačna, sve dok Ettlinger i Lundeen (1956a) nisu istakli da se Gadamer-ovom strukturom ne mogu objasniti određena svojstva glukozinolata, pri čemu su predložili novu, ispravnu strukturu i opisali prvi hemijsku sintezu glukozinolata (Ettlinger & Lundeen, 1957). Poslednja nedoumica vezana za opštu strukturu bila je geometrijska izomerija oko C=N veze, za koju je kristalografskom analizom za sinigrin utvrđeno da je Z- (ili anti-) (Slika 3.6; Marsh & Waser, 1970). Glukozinolati su β -tioglukozid-N-hidroksi-sulfati (takođe su poznati i kao (Z)-(ili *cis*)-N-hidroksiiminosulfatni estri ili *S*-glukopiranozil-tiohidroksimati), sa bočnim lancem (R) i D-glukopiranoznim prstenom vezanim preko sumpora. Poslednjih 40 godina sprovedena su brojna istraživanja glukozinolata sa različitim aspekata. Publikovan je niz revijalnih članaka koji se odnose na hemiju i biologiju glukozinolata (npr. Kjær, 1961, 1974; Ettlinger & Kjær, 1968; Kjær & Olesen Larsen, 1973, 1976; Underhill et al., 1973; Underhill, 1980; Fenwick et al., 1983; Chew, 1988; Duncan & Milne, 1989; Brown & Morra, 1997; Halkier, 1999; Mithen et al., 2000) i njihovu distribuciju/nalaženje u biljkama (Rodman, 1981, Holst & Williamson; 2004; Cartea & Velasco, 2008). Revijalni članci sa nešto specifičnijom temom odnose se na indolske glukozide (McDanell et al., 1988), glukozinolate kultivisanih biljaka, prvenstveno povrća iz roda *Brassica* (Stoewsand, 1995; Rosa et al., 1997), glukozinolate familije Brassicaceae (Kjær, 1976), zatim jedinjenja iz brokolija sa nutraceutičkim svojstvima (Moreno et al., 2006), gensku uslovljenošć biosinteze sekundarnih metabolita vrste *Arabidopsis thaliana* (Haughn et al., 1991), dijetalnu ulogu glukozinolata (Anilakumar et al., 2006), ulogu glukozinolata u odnosima između biljaka i insekata (Zukalova et al., 2002), biologiju i biohemiju ovih jedinjenja (Halkier & Gershenson, 2006), bio-protectivno dejstvo (Vig et al., 2009) i značaj za zdravlje čoveka (Cartea & Velasco, 2008; Traka & Mithen, 2009), dok se mnoge druge publikacije odnose na glukozinolate u okviru pojedinih familija ili na specifične aspekte biologije glukozinolata.

*Treba imati na umu da nisu svim glukozinolatima dodeljena trivijalna imena. Na Slici 3.6, date strukture su grupisane prema strukturnoj sličnosti, odnosno skeletu.

3.3.1. RASPROSTRANJENOST GLUKOZINOLATA U BILJNOM SVETU

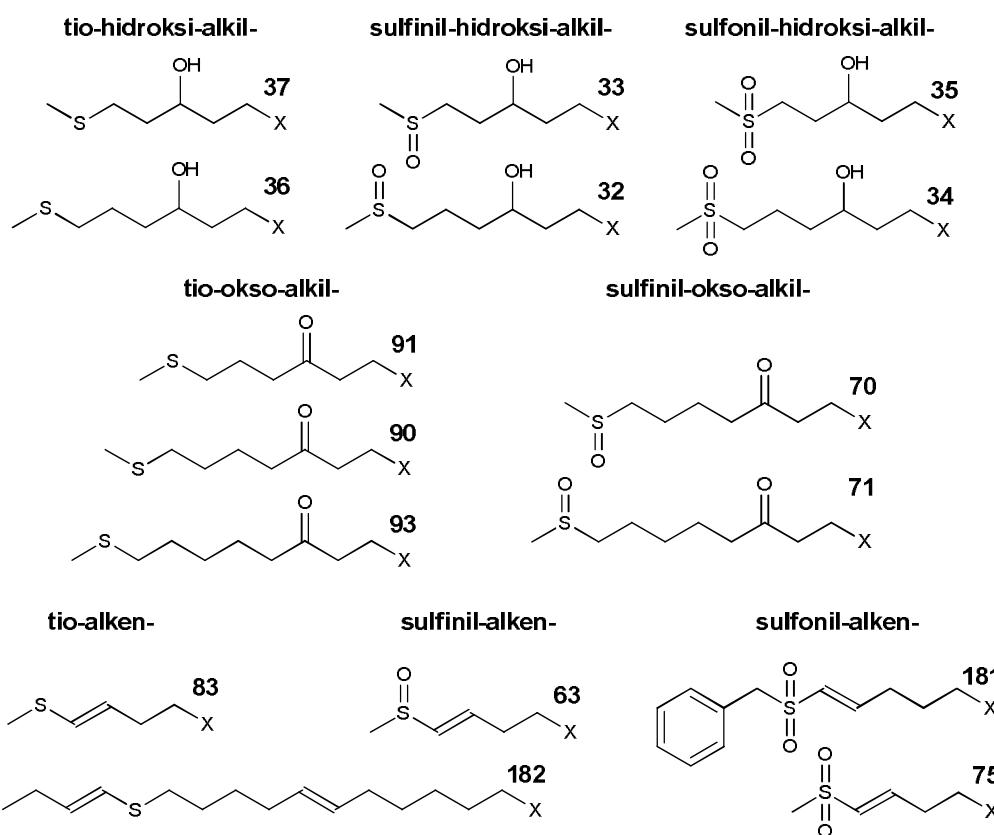
Danas postoji puno podataka u literaturi o glukozinolatima u okviru familije Brassicaceae, koju čini više od 350 rodova sa 3000 vrsta. Nekoliko stotina krucifera koje su do danas ispitane sadrže, tj. sintetišu glukozinolate (Kjær, 1976). Među taksonima familije Brassicaceae, rod *Brassica*^{*} sadrži veliki broj vrsta konzumiranih od strane ljudi. Glukozinolati ovog roda obrađeni su u revijalnim člancima od strane Kjæra (1974, 1976), Fenwick-a i saradnika (1983), Chew-a (1988), McDanell-a i saradnika (1988), Duncan-a i Milne-a (1989), Stoewsand-a (1995) i Rosa-e i saradnika (1997). Glukozinolati nipošto nisu ograničeni na Krstašice; utvrđeno je prisustvo jednog ili više glukozinolata kod najmanje 500 vrsta van familije Brassicaceae. Većina taksona koji sadrže glukozinolate nalaze se u okviru familija Brassicaceae, Capparaceae i Caricaceae, od ukupno šesnaest familija, navedenih u Tabeli 3.3, u okviru kojih je utvrđeno prisustvo ovih jedinjenja (Rodman, 1981). Sposobnost biosinteze glukozinolata korišćena je, uspešno, kao taksonomski važan marker u rešavanju filogenetskih problema vezanih za ove taksone (Rodman, 1981, 1991a,b; Mithen et al., 1987a; Rodman et al., 1993), npr. prisustvo metil-glukozinolata, koji nije pronađen kod Brassicaceae vrsta, karakteristično je za srodne Capparaceae vrste. Glukozinolati sa glikozilovanom R-grupom javljaju se samo u okviru Resedaceae i Moringaceae. Iako je ideja o specifičnosti pojave pojedinih glukozinolata kod različitih taksona intrigantna, ovaj pristup nije naročito razrađen. Rodman (1981) je početkom 1980-tih zastupao mišljenje da je taksonomska distribucija glukozinolata prilično dobro poznata i da će se iznenađujuća otkrića vezana za glukozinolate verovatno pojaviti kod manje istraženih taksona familija iz tropskih oblasti. Na primer, Euphorbiaceae, velika familija koja je prvenstveno zastupljena u toplijim krajevima, bila je tada i još uvek je jedina familija kod koje taksoni svih rodova, sem jednog (*Drypetes*, syn. *Putranjiva*), imaju mogućnost biosinteze glukozinolata i mirozinaze. Međutim, veoma mali broj taksona ove familije je ispitano na prisustvo glukozinolata od ukupno ca. 5000 vrsta, koliko se procenjuje da čini ovu familiju.

^{*}Rod *Brassica* je jedan od oko 350 rodova koliko ih ima u familiji Brassicaceae, koja je, sa druge strane, jedna od 16 familija viših biljaka čiji taksoni sadrže glukozinolate.



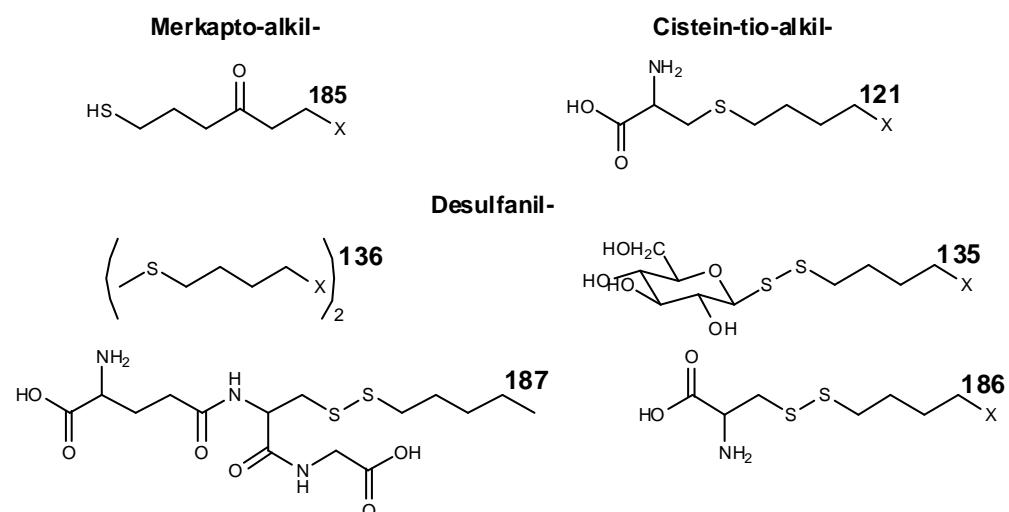
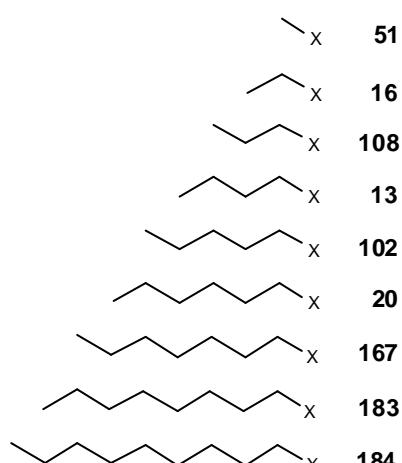
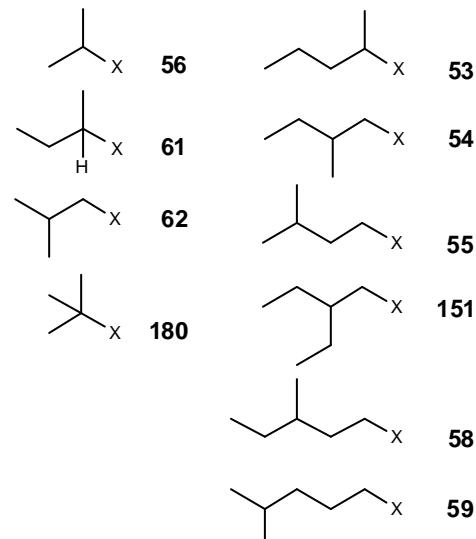
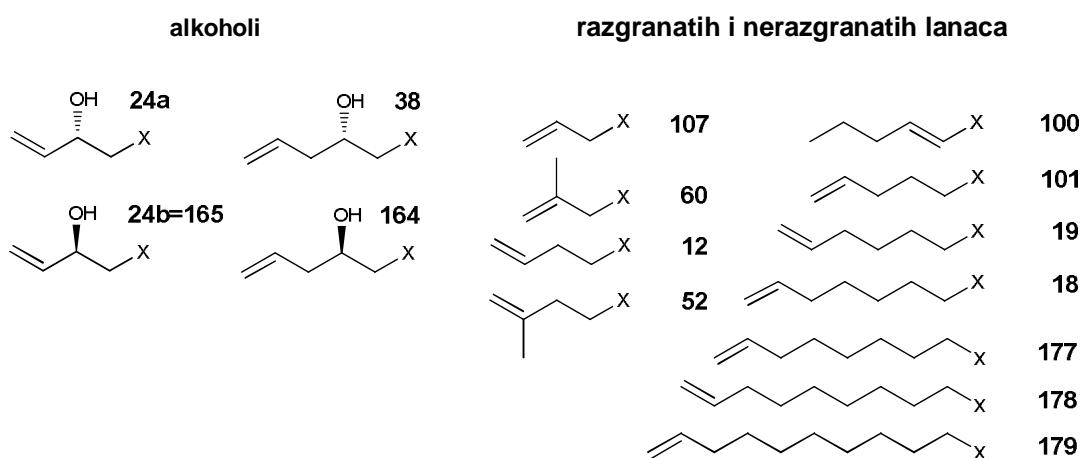
A: Glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu (Alkiltioalkil-glukozinolati)

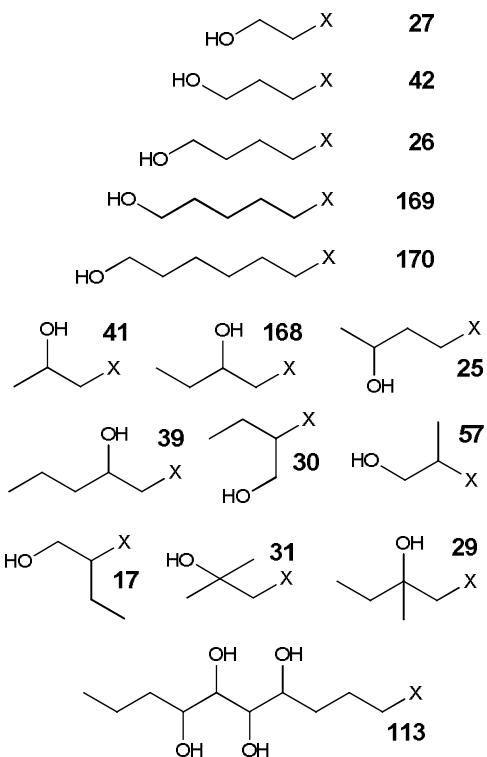
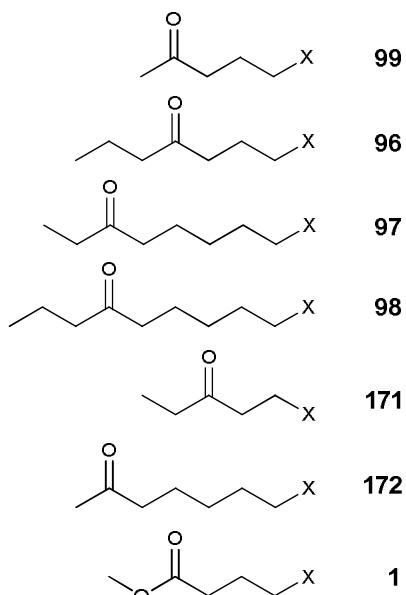
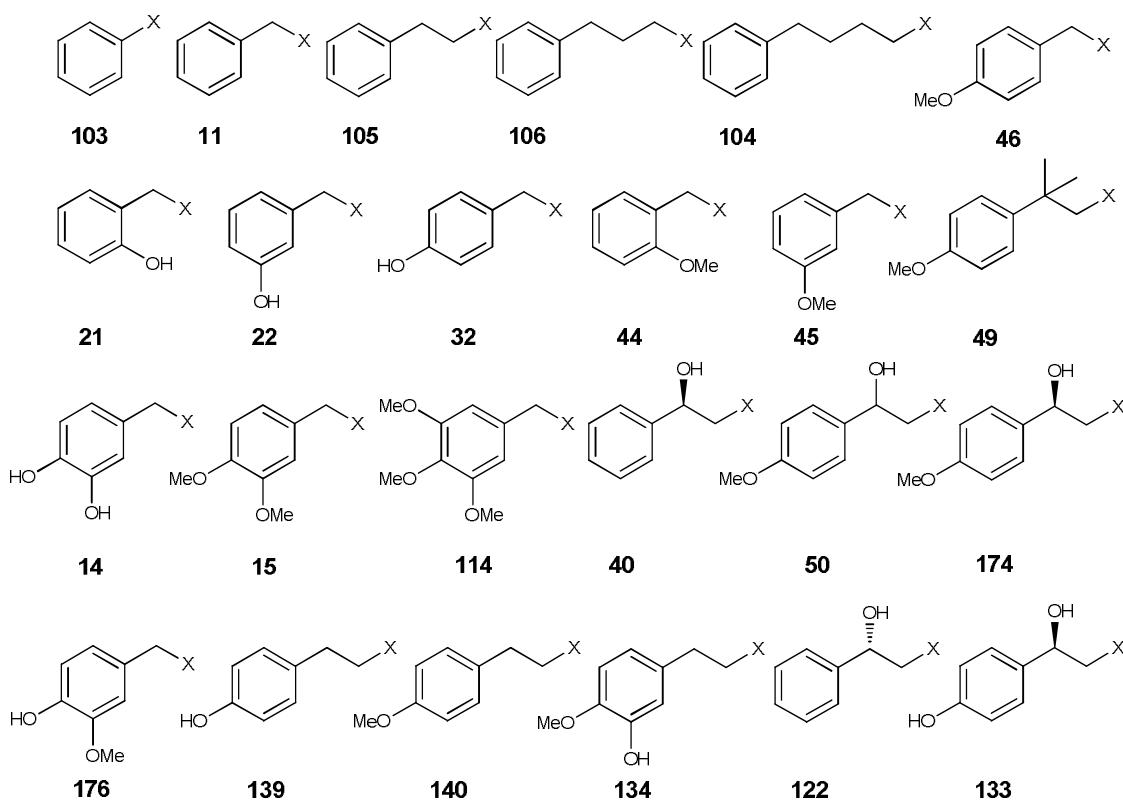
n	metil-tio-alkil-	metil-sulfinil-alkil-	metil-sulfonil-alkil-
	$\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{-X}$	$\text{CH}_3\text{SO}(\text{CH}_2)_n\text{-X}$	$\text{CH}_3\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{-X}$
2	86	124	-
3	95	73	82
4	84	64	76
5	94	72	81
6	88	67	78
7	87	66	166
8	92	69	80
9	89	68	79
10	85	65	77
11	-	74	-
12	-	63	-



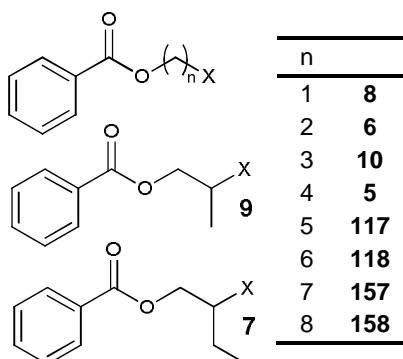
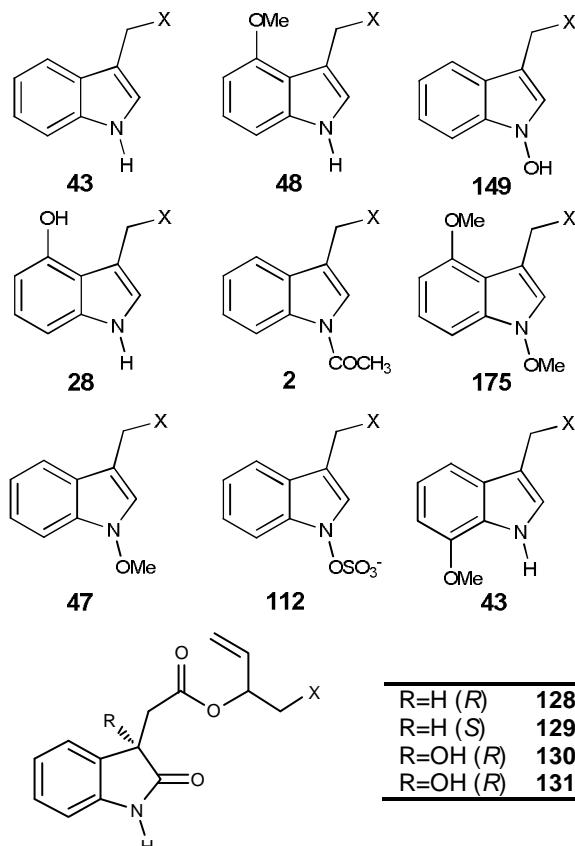
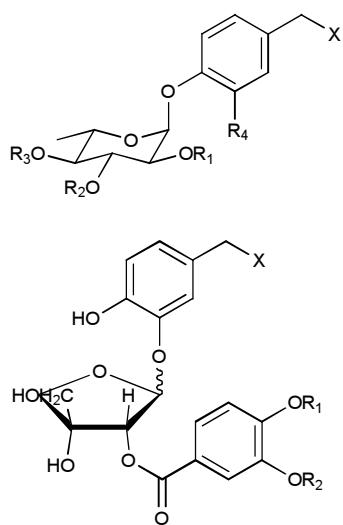
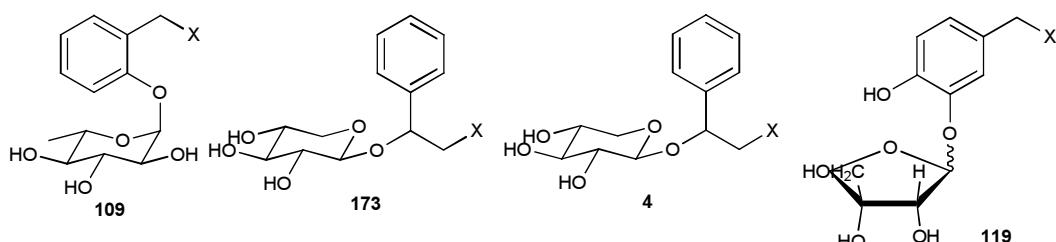
Slika 3.6. Strukturalna klasifikacija glukozinolata (Fahey et al., 2001; Clarke, 2010). Struktura glukobrasicin-sulfata (112) izolovanog iz vrste *Isatis tinctoria* (Elliott & Stowe, 1970) i acetil-derivata glukobrasicina (2), izolovanog iz *Tovaria pendula* (Schraudolf & Bauerle, 1986) se smatra nepotpuno određenom (McDanell et al., 1988).

(nastavak na sledećoj strani)

A: Glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu (Alkiltioalkil-glukozinolati)**B: Alifatični glukozinolati, nerazgranatih bočnih lanaca****C: Alifatični glukozinolati, razgranatih bočnih lanaca****D: Olefinski glukozinolati****Slika 3.6. (Nastavak)**

E: Alifatični, razgranati i nerazgranati alkoholi**F: Alifatični ketoni i estri****G: Aromatični glukozinolati**

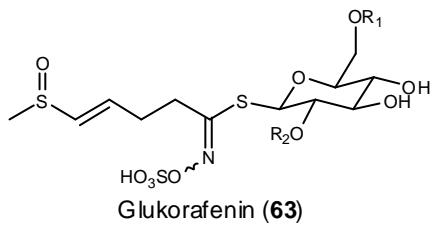
Slika 3.6. (Nastavak)

H: α -Hidroksialkil- (Benzoati)**I: Indolski glukozinolati****J: Glikozilovani**

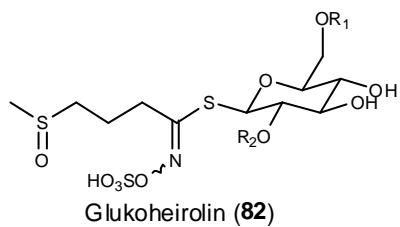
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Struktura
acetil-	H	H	H	3
H	H	H	H	110
H	H	H	OH	137
H	acetil-	H	H	161
H	H	acetil-	H	162

R ₁	R ₂	Struktura
H	H	138
H	CH ₃	156
CH ₃	H	155
CH ₃	CH ₃	120

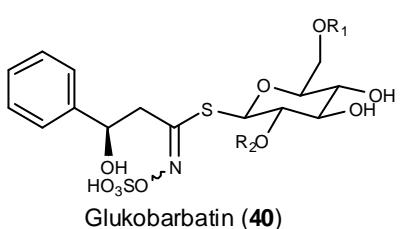
Slika 3.6. (Nastavak)

K: Cimetni glukozinolati

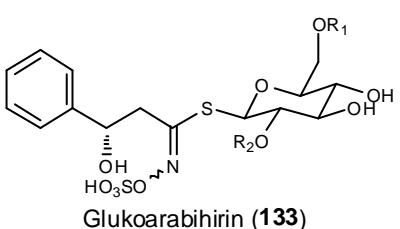
R ₁	R ₂	Struktura
H	H	63
Sinapoil-	H	111
H	Sinapoil-	141
Sinapoil-	Sinapoil-	142
Cinamoil-	H	145



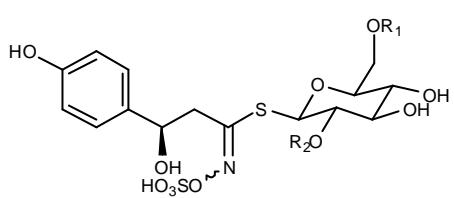
R ₁	R ₂	Struktura
H	H	82
Sinapoil-	H	143



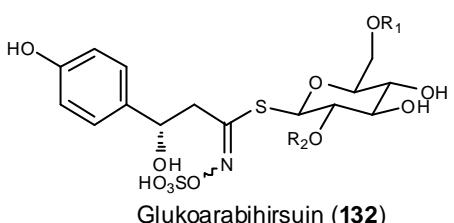
R ₁	R ₂	Struktura
H	H	40
Cinamoil-	H	144
Izoferuloil-	H	147
H	Izoferuloil-	146
Izoferuloil-	Izoferuloil-	148



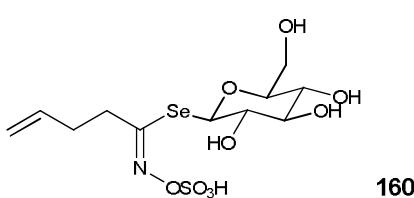
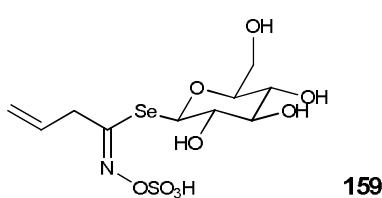
R ₁	R ₂	Struktura
H	H	133
Izoferuloil-	H	153
H	Izoferuloil-	152
Izoferuloil-	Izoferuloil-	154



R ₁	R ₂	Struktura
H	H	188
Izoferuloil-	H	189
H	Izoferuloil-	190
Izoferuloil-	Izoferuloil-	

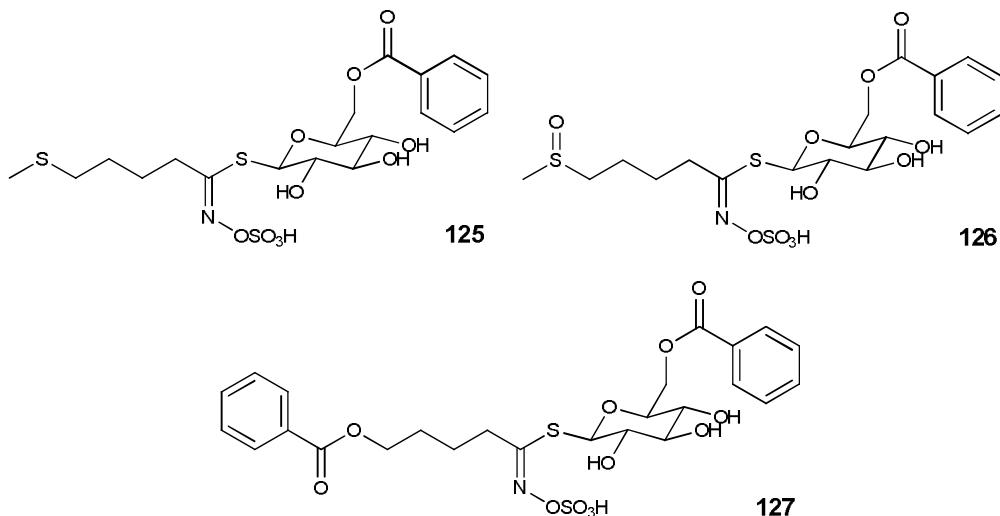


R ₁	R ₂	Struktura
H	H	132
Izoferuloil-	H	191
H	Izoferuloil-	192
Izoferuloil-	Izoferuloil-	193

L: Seleno-glukozinolati

Slika 3.6. (Nastavak)

M: Benzoilni glukozinolati



Slika 3.6. (*Nastavak*)

Tabela 3.3. Familije kod kojih je utvrđeno prisustvo glukozinolata*

Familija	Klasa glukozinolata	Glukozinolati
Bataceae	I	28, 43
Brassicaceae	A–J	1, 5–20, 22–26, 28–48, 50, 51, 53–69, 72–84, 86–89, 91–95, 99–107, 111, 112, 114
Bretschneideraceae	E, G	14, 31
Capparaceae	A, B, C, D, E, F, G, I	12, 13, 23, 24, 28, 29, 43, 47, 48, 51, 52, 54, 56, 73, 96–98, 107, 108
Caricaceae	G	11
Euphorbiaceae	C, E	26, 29, 56
Gyrostemonaceae	C	61, 62
Limnanthaceae	E, G	31, 45
Moringaceae	C, E, G, J	3, 11, 23, 31, 56, 61, 62, 110
Pentadiplandraceae	G	11, 49
Phytolaccaceae	C, E, G	11, 22, 23, 29, 61
Pittosporaceae	G	23
Resedaceae	E, G, I, J	4, 11, 21–23, 31, 40, 43, 47, 105, 109
Salvadoraceae	C, G	11, 23, 56
Tovariaceae	C	2, 11, 43, 47, 56
Tropaeolaceae	B, C, E, G	11, 16, 23, 31, 46, 56, 61, 62

*Tabelom je obuhvaćeno 120 glukozinolata, koliko je bilo poznato do 2001. godine (Fahey et al., 2001)

3.3.2. HEMIJA GLUKOZINOLATA

3.3.2.1. Tipovi glukozinolata

Oko 200 glukozinolata, koliko ih je do sada poznato, deli zajedničku strukturu koja se sastoji od β -D-glukopiranognog ostatka povezanog preko atoma sumpora sa (Z)-N-hidroksiminosulfatnim estrom i R bočnim lancem (Slika 3.6) koji nastaje najčešće iz jedne od osam aminokiselina. Glukozinolati se mogu klasifikovati prema aminokiselinskom prekursoru i prema tipu modifikacije R-grupe, tj. prema strukturnoj sličnosti. Jedinjenja dobijena iz Ala, Leu, Ile, Met ili Val pripadaju alifatičnim glukozinolatima; glukozinolati koji su izvedeni iz Phe ili Tyr klasifikuju se kao aromatični, dok oni izvedeni iz Trp nazivaju se indolski glukozinolati. Većina glukozinolata nastaje naknadnom modifikacijom aminokiselinskih prekursora, odnosno bočnih R-grupa, a naročito veliki broj glukozinolata nastaje brojnim metaboličkim transformacijama metionina kao aminokiselinskog prekursora ovih jedinjenja. Pomenute transformacije uključuju produžavanje R-grupe metilenskim grupama (homologizaciju), hidroksilovanje, O-metilovanje, uvođenje nezasićenja, glikozilovanje i/ili acilovanje.

Do 2001. godine bilo je poznato oko 120 glukozinolata (Tabela 3.4; Fahey et al., 2001). U istraživanjima sprovedenim od 2001. godine, kada je publikovan revijalni članak koji je sumirao do tada poznate glukozinolate, njih 120, identifikovan je izvestan broj novih glukozinolata, pa se broj poznatih struktura povećao i sada iznosi oko 200 (Bennett et al., 2004; Bellotas et al., 2007, Clarke, 2010).

Tabela 3.4. Nomenklatura i trivijalna imena glukozinolata identifikovanih kod viših biljaka. Tabelom je obuhvaćeno 120 glukozinolata, koliko je bilo poznato do 2001. godine (Fahey et al., 2001)

R. br. ^a	Klasa ^b	Glukozinolat	
		Hemijski naziv	Trivijalni naziv
A	B	C	D
1	F	3-Metoksikarbonilpropil-	Glukoeripestrin
2	I	1-Acetyl-indol-3-ilmetil-	1-Acetyl-glukobrasicin
3	J	4-(4'-O-Acetyl- α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-	
4	J	2-(α -L-Arabinopiranoziloksi)-2-feniletil-	
5	H	4-(Benzoiloksi)butil-	
6	H	2-(Benzoiloksi)etil-	
7	H	2-Benzoiloksi-1-etiletil-	Glukobenzsisastricin
8	H	Benzoiloksimetil-	
9	H	2-Benzoiloksi-1-metiletil-	Glukobenzosisimbrin
10	H	3-(Benzoiloksi)propil-	Glukomalkomiin
11	G	Benzil-	Glukotropaeolin
12	D	3-Butenil-	Glukonapin
13	B	Butil-	
14	G	3,4-Dihidroksibenzil-	Glukomatronalin

Tabela 3.4. (Nastavak)

A	B	C	D
15	G	3,4-Dimetoksobenzil-	
16	B	Etil-	Glukolepidiin
17	E	1-Etil-2-hidroksietil-	Glukosisaustricin
18	D	6-Heptenil-	
19	D	5-Heksenil-	
20	B	Heksil-	
21	G	2-Hidroksibenzil-	
22	G	3-Hidroksibenzil-	Glukolepigramin
23	G	4-Hidroksibenzil-	(Gluko)sinalbin
24a	D	(2R)-2-Hidroksi-3-butenil-	Progoitrin
24b	D	(2S)-2-Hidroksi-3-butenil-	Epiprogoitrin
25	E	3-Hidroksibutil-	
26	E	4-Hidroksibutil-	
27	E	2-Hidroksietil-	
28	I	4-Hidroksiindol-3-ilmetil-	4-Hidroksiglukobasicin
29	E	2-Hidroksi-2-metilbutil-	Glukokleomin
30	E	1-(Hidroksimetil)propil-	
31	E	2-Hidroksi-2-metilpropil-	Glukokonringiin
32	A	3-Hidroksi-6-(metilsulfinil)heksil-	
33	A	3-Hidroksi-5-(metilsulfinil)pentil-	
34	A	3-Hidroksi-6-(metilsulfonil)heksil-	
35	A	3-Hidroksi-5-(metilsulfonil)pentil-	
36	A	3-Hidroksi-6-(metiltio)heksil-	
37	A	3-Hidroksi-5-(metiltio)pentil-	
38	D	2-Hidroksi-4-petenil-	(Gluko)napoleiferin
39	E	2-Hidroksipentil-	
40	G	(2R)-Hidroksi-2-feniletil-	Glukobarbarin
41	E	2-Hidroksipropil-	
42	E	3-Hidroksipropil-	
43	I	Indol-3-ilmetil-	Glukobasicin
44	G	2-Metoksibenzil-	
45	G	3-Metoksibenzil-	Glukolimnantin
46	G	4-Metoksibenzil-	Glukoaubrietin
47	I	1-Metoksiindol-3-ilmetil-	Neoglukobasicin
48	I	4-Metoksiindol-3-ilmetil-	4-Metoksiglukobasicin
49	G	2-(4-Metoksifenil)-2,2-dimetiletil [ili 2,2-dimetil-2-(4-metoksifenil)etil]-	
50	G	2-(4-Metoksifenil)-2-hidroksietil [ili 2-hidroksi-2-(4-metoksifeniletil)]-	
51	B	Metil-	Glukokaparin
52	D	3-Metil-3-butenil-	
53	C	1-Metilbutil-	
54	C	2-Metilbutil-	

Tabela 3.4. (Nastavak)

A	B	C	D
55	C	3-Metilbutil-	
56	C	1-Metiletil-	Glukoputranjivin, isopropil-
57	E	1-Metil-2-hidroksietil-	Glukosisimbrin
58	C	3-Metilpentil-	
59	C	4-Metilpentil-	
60	D	2-Metil-2-propenil-	
61	C	1-Metilpropil-	Glukokohlearin, Glukojiabutin, <i>sec</i> -butil-, 2-butil-
62	C	2-Metilpropil-	Isobutil
63	A	4-Metilsulfinil-3-butenil-	Glukorafenin
64	A	4-(Metilsulfinil)butil-	Glukorafanin
65	A	10-(Metilsulfinil)decil-	Glukokamelinin
66	A	7-(Metilsulfinil)heptil-	Glukoibarin
67	A	6-(Metilsulfinil)heksil-	Glukohesperin
68	A	9-(Metilsulfinil)nonil-	Glukoarabin
69	A	8-(Metilsulfinil)oktil-	Glukohirsutin
70	A	7-Metilsulfinil-3-oksoheptil-	
71	A	8-Metilsulfinil-3-oksooctil-	
72	A	5-(Metilsulfinil)pentil-	Glukoalisin
73	A	3-(Metilsulfinil)propil-	Glukoiberin
74	A	11-(Metilsulfinil)undecil-	
75	A	4-Metilsulfonil-3-butenil-	
76	A	4-(Metilsulfonil)butil-	Glukoerisolin
77	A	10-(Metilsulfonil)decil-	
78	A	6-(Metilsulfonil)heksil-	
79	A	9-(Metilsulfonil)nonil-	
80	A	8-(Metilsulfonil)oktil-	
81	A	5-(Metilsulfonil)pentil-	
82	A	3-(Metilsulfonil)propil-	Glukoheirolin
83	A	4-Metiltio-3-butenil-	Dehidroerucin
84	A	4-(Metiltio)butil-	Glukoerucin
85	A	10-(Metiltio)decil-	
86	A	2-(Metiltio)etil-	Glukoviorilin
87	A	7-(Metiltio)heptil-	
88	A	6-(Metiltio)heksil-	Glukoleskverelin
89	A	9-(Metiltio)nonil-	
90	A	7-Metiltio-3-oksoheptil-	
91	A	6-Metiltio-3-oksoheksil-	
92	A	8-(Metiltio)oktil-	
93	A	8-Metiltio-3-oksooktil-	
94	A	5-(Metiltio)pentil-	Glukoberteroin
95	A	3-(Metiltio)propil-	Glukoiberverin

Tabela 3.4. (Nastavak)

A	B	C	D
96	F	4-Oksheptil	Glukokapangulin; glukopangulin
97	F	5-Oksheptil	Glukonorkapasalin
98	F	5-Oksooktil-	Glukokapasalin
99	F	4-Oksopentil- ili 3-(Metilkarbonil)propil-	
100	D	1-Pentenil-	
101	D	4-Pentenil-	Glukobrasikanapin
102	B	Pentil-	
103	G	Fenil-	
104	G	4-Fenilbutil-	
105	G	2-Feniletil-	Glukonasturtiin; fenetil-
106	G	3-Fenilpropil-	
107	D	2-Propenil-	Sinigrin, alil-
108	B	Propil	
109	J	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-	
110	J	4-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-	
111	J	4-Metilsulfinitbut-3-enil-6-sinapoil- β -D-1-tioglukozid	
112	I	1-Sulfo-indol-3-ilmetil-	Glukobasicin-1-sulfat
113	E	4,5,6,7-Tetrahidrooksidesicil-	
114	G	3,4,5-Trimetoksibenzil-	
115^c		,izo“-Heptil-	
116^c		,izo“-Heksil-	
117	H	5-(Benzoiloksi)pentil-	
118	H	6-(Benzoiloksi)heksil-	
119^d		3-O-Apiozilglukomatronalin	
120^d		3-O-Apiosilglukomatronalin 3,4-dimetoksibenzoil estar	

^aNavedenim brojevima su označene strukture koje se navode u tekstu; ^bKlasifikacija glukozinolata na osnovu strukturne sličnosti (pogledati Sliku 3.6); ^cStrukture nisu okarakterisane u potpunosti (Grob & Matile, 1980); ^dIdentifikacija ovih jedinjenja navedena u publikaciji Larsen-a i sar. (1992) kao samostalno prethodno nepublikovani rezultati.

Najviše su proučavani alifatični, ω -metiltioalkil, aromatični i heterociklični (npr. indolski) glukozinolati, a tipičan primer su oni identifikovani kod povrća roda *Brassica* (npr. jedinjenja **12**, **23**, **24**, **38**, **43**, **47**, **56**, **61**, **63**, **64**, **72**, **73**, **84**, **94**, **95**, **100**, **101**, **105**, **107**, Tabela 3.4 i Slika 3.6). Bočne lance glukozinolata, međutim, karakteriše raznolikost hemijskih struktura. Jedan način za klasifikaciju ovih jedinjenja je prema strukturnoj sličnosti na: alkil-, aromatične, benzoatne, indolske, višestruko glikozilovane i glukozinolate sa sumporom u bočnom lancu (Slika 3.6). Najbrojniji glukozinolati su oni koji sadrže nerazgranate ili račvaste ugljovodončne nizove. Mnoga od tih jedinjenja, zatim, sadrže dvostruke veze (olefini), hidroksilne ili karbonilne grupe, ili kovalentno vezani sumpor različitog oksidacionog stanja. Najveća pojedinačna grupa (jedna trećina svih glukozinolata) sadrži atom sumpora različitog stanja oksidacije (npr. metil-, tioalkil-, metilsulfinitalkil- ili metilsulfonilalkil- grupa).

Mala grupa benzil-glukozinolata ima dodatni molekul šećera, ramnoze ili arabinoze, koji je glikozidno vezan za aromatični prsten. Funkcija tih šećera je nepoznata, međutim, intresantno je da su ovi glukozinolati prisutni u taksonima dve familije (Moringaceae i Resedaceae) u okviru kojih se nalaze određeni rodovi koji se široko koriste zbog svojih farmakoloških svojstava. U literaturi postoji, mada još uvek nepotvrđen podatak, da pentoza, apioza, može biti povezana za bočni lanac (R) hidroksibenzil-glukozinolata kod vrste *Hesperis matronalis* (Brassicaceae) (Larsen et al., 1992; Halkier, 1999). Pored toga, određen broj uobičajnih glukozinolata supstituisan je na tioglukozidnom jezgru sinapoil- i cinamoil-solima i estrima (Linscheid et al., 1980; Sakushima et al., 1995). Bjerg i Sørensen (1987) tvrde da cinamoil-derivati glukozinolata prevlađuju kod nekih biljaka, odnosno delova biljaka i predstavljaju hipotetičke strukture *p*-kumaroil-, kafeoil-, feruloil-, sinapoil- i izoferuloil-glukozinolata sa fenilpropenil-jezgrom, estarski vezanim za molekul *S*- β -glukoze na položajima C-2' i C-6'. Osim nekoliko izuzetaka, konfiguracija hiralnih centara određenog broja struktura datih na Slici 3.6 nije određena. U Tabeli 3.5 je dat pregled detektovanih/identifikovanih glukozinolata u taksonima rodova *Erysimum* i *Hornungia*.

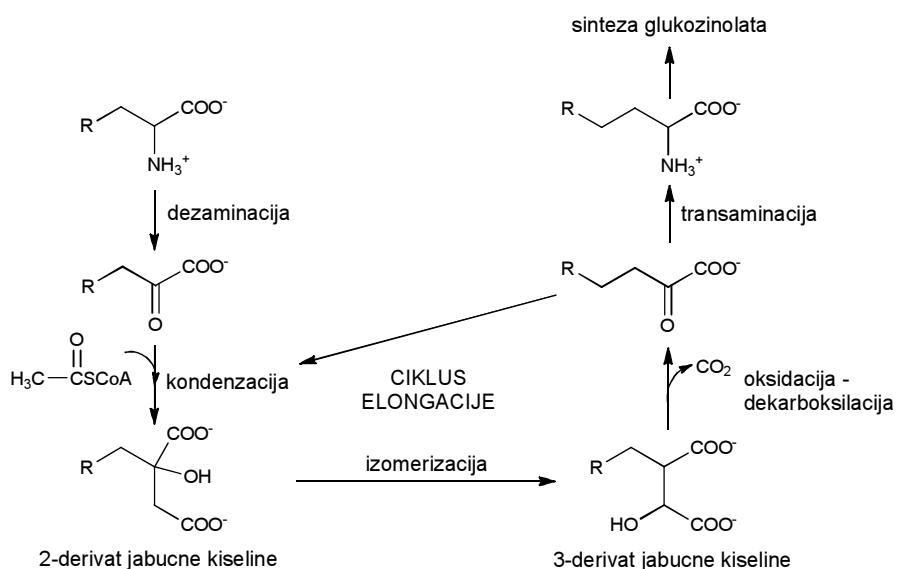
3.3.2.2. Sinteza glukozinolata

Iako su metode za sintezu brojnih glukozinolata (npr. benzil-, metil-, fenetil-, 2-propenil-, 3-butenil-) publikovane pre više od 40 godina (Ettlinger & Lundein, 1957; Benn, 1963, 1964a–c; Benn & Ettlinger, 1965; Benn & Yelland, 1967; Kjær & Jensen, 1968; Matsuo, 1968), ta jedinjenja nisu rutinski sintetisana, niti je njihova sinteza jednostavna. Nedavno su Rollin i saradnici (Viaud & Rollin, 1990; Viaud et al., 1992; Chevolleau et al., 1993; Gardrat et al., 1993) izvršili sintezu indolskih glukozinolata. Sinteza gramskih količina fenetil-glukozinolata opisana je 1980. godine (Gil & MacLeod, 1980e). Razvijena je sinteza, takođe, gramskih količina sinigrina (Abramski & Chmielewski, 1996) i miligramske količina etil-glukozinolata (Keller et al., 1984). Prva sinteza (miligramske količina) ω -metiltioalkil-glukozinolata, 2-metil-tioetil-, 3-metiltiopropil- i 4-metiltiobutil-glukozinolata opisana je od strane Mavratzotis-a i saradnika (1996). Sinteza α -glukozinolata (npr. anomera prirodnih fenil-, benzil-, 2-fenetil i indol-3-ilmetil-glukozinolata, kao i (*E*)-stiril-glukozinolata čije prisustvo u prirodi nije utvrđeno) opisana je od strane Blanc-Muesser-a i saradnika (1990). Ostali analozi (npr. deoksiglukotropeolini i 2-fluoro-2-deoksiglukotropeolini) sintetisani su da bi se utvrdila uloga hidroksilne grupe na C-2 ugljeniku za vezivanje glukozinolata i mirozinaze, ali i radi proučavanja mehanizma ove reakcije (Cottaz et al., 1996, 1997). Lazar i Rollin (1994) su sintetisali analog glukozinolata u kojem je anjonska OSO₃⁻ grupa zamenjena OPO₃²⁻ grupom, kako bi se pratila kinetika hidrolize katalizovane mirozinazom. Nedavno, Aucagne i saradnici (1999) su izvestili da je izvršena sinteza „C-glukotropeolina“, benzil-glukozinolata kod kojeg je tioglukozidni atom sumpora zamenjen ugljenikom. Rollin i saradnici (Blanc-Muesser et al., 1990; Josipa & Rollin, 1993a,b; Lazar & Rollin, 1994; Cottaz et al., 1996, 1997; Aucagne et al., 1999) su

razvili novi pristup sintezi prekursora glukozinolata kojim se mogao proširiti broj i vrsta dostupnih sintetičkih jedinjenja (Cassel et al., 1998). Glukorafanin, glukozinolat koji je najinteresantniji sa nutricionističke tačke gledišta, do sada još nije sintetisan, ali je sinteza smeše glukorafanina i sulforafana dobijena kontrolisanom oksidacijom glukoerucina (Iori et al., 1999), kao i serija sintetskih analoga sulforafana (Posner et al., 1994).

3.3.2.3. Biosinteza glukozinolata

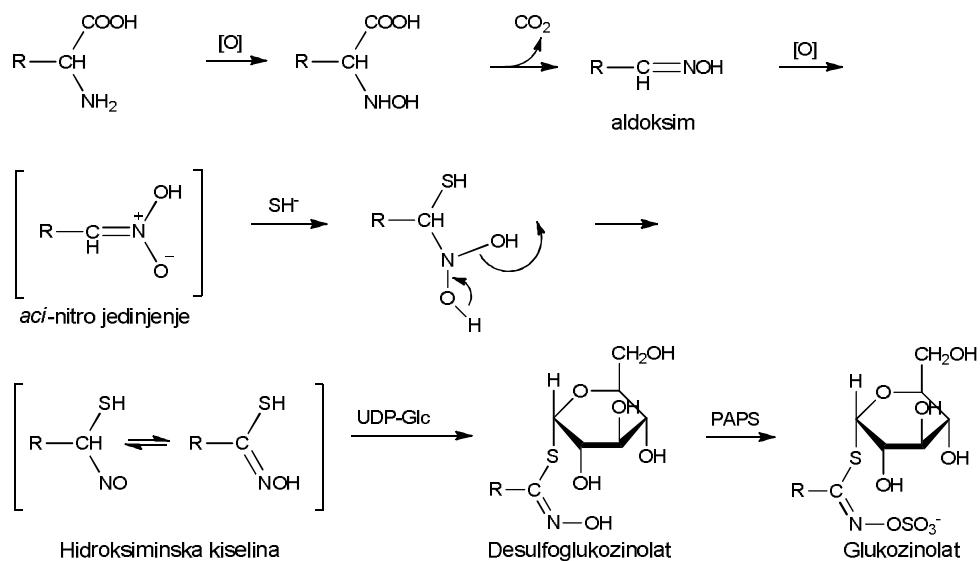
Većina onoga što se zna o biosintezi glukozinolata temelji se na ispitivanju Underhill-a i saradnika (Underhill et al., 1973) i skorijih genetičkih ispitivanja Mitchena i saradnika (Dawson et al., 1993; Magrath & Mithen, 1993; Magrath et al., 1993, 1994; Parkin et al., 1994; Mithen et al., 1995b; Toroser et al., 1995; Giamoustaris & Mithen, 1996). Rezultati ovih istraživanja pružaju čvrste dokaze da se elongacija bočnih lanaca aminokiselina (npr. homolozi α -aminokiselina koji nastaju iz uobičajnih aminokiselina adicijom acetata (acetil-CoA) na α -keto-kiselinsku karboksilnu grupu; Šema 3.1), dešava pre S-glikozidacije, dok do modifikacije bočnih lanaca (npr. uvođenje nezasićenja, hidroksilovanje) najverovatnije dolazi nakon vezivanja glikozidnog ostatka. Početni korak u biosintezi glukozinolata je, kao i kod cijanogenih glikozida, N-hidroksilovanje prekursora aminokiselina, za kojom sledi dekarboksilacija u aldoksim. Ukratko, opšte prihvaćen model biosinteze glukozinolata uključuje tri glavna koraka: (a) elongacija bočnog lanca (Šema 3.1), (b) vezivanje glikozidnog ostatka (Šema 3.2) i (c) modifikacija bočnog lanca (Šema 3.3).



Šema 3.1. Ciklus elongacije bočnog lanca aminokiselina u biosintezi glukozinolata. Ilustracija prvog stepena elongacije. Tri osnovna koraka su: (i) kondenzacija sa acetil-SCoA, (ii) izomerizacija i (iii) oksidacija-dekarboksilacija (Halkier & Gershenson, 2006).

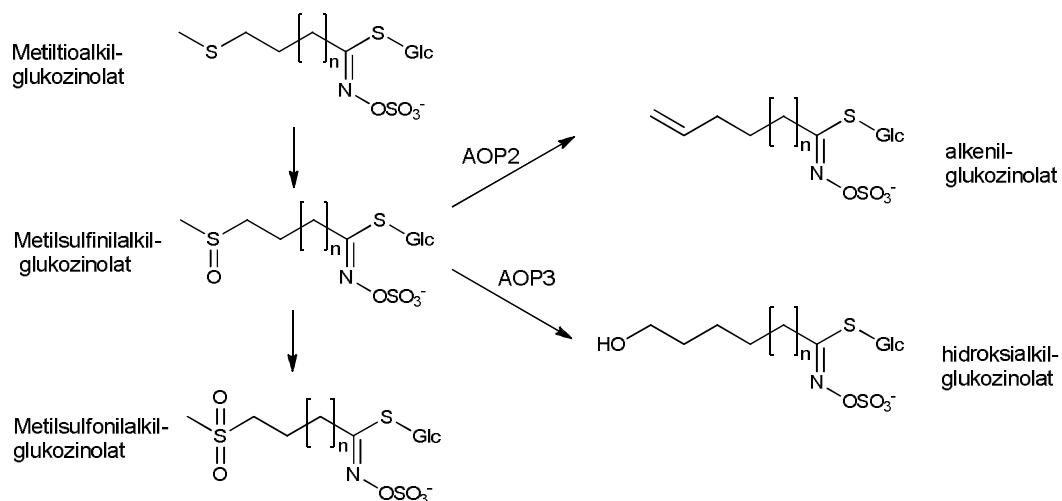
Prvi dokazi o elongaciji lanca kod alifatičnih glukozinolata dobijeni su pre gotovo 50 godina inkorporacijom radioizotopa ugljenika u glukozinolate rena, salate-

potočnice i vodenog rena koji su tretirani ^{14}C -aminom i ^{14}C -acetatom (Underhill et al., 1962.; Chisholm & Wetter, 1964).



Šema 3.2. Biosinteza glukozinolata (Fahey et al., 2001)

Kasnija ispitivanja vrsta *Arabidopsis thaliana* i *Brassica napus* odnose se na genetsku određenost varijacije dužine bočnog lanca glukozinolata. Ova studija je dovela do mapiranja određenog broja „*Gsl-elong*“ lokusa, alelskih varijacija za koje se pretpostavlja da određuju dužinu lanaca kod glukozinolata (Magrath et al., 1994; Mithen & Campos, 1996).



Šema 3.3. Neke od uobičajenih sekundarnih, oksidativnih transformacija metioninskih glukozinolata. AOP2 i AOP3* predstavljaju dioksigenaze koje katalizuju reakcije ovog tipa kod *Arabidopsis* vrsta. Identifikovani su glukozinolati sa ugljovodoničnim lancima različitih dužina (Slika 3.6): za metiltioalkil i metilsulfonilalkil-, n=1–10; za metilsulfinitialkil-, n=1–12; za alkenil-, n =1–8 (Halkier & Gershenson, 2006).

* α -ketoglutarat-zavisne dioksigenaze (AOP2 i AOP3) katalizuju konverziju metilsulfinitialkil- u alkenil-, odnosno hidroksialkil-glukozinolate (Kliebenstein et al., 2001, 2005).

Vezivanje glikozidnog ostatka je inicirano konverzijom proteinskih aminokiselina (npr. alanin, metionin, valin, leucin ili izoleucin za alifatične, fenilalanin ili tirozin za aromatične i triptofan za indolske glukozinolate) ili aminokiselina prođenih lanaca (npr. mnogi prekursori alifatičnih glukozinolata kao što su homometionin, dihomo-metionin, trihomo-metionin) do aldoksima (Kjær & Olesen Larsen, 1973, 1976; Halkier & Du, 1997; Halkier, 1999; Mithen et al., 2000). Tek je nedavno dobijen uverljiv dokaz – citohrom P450 katalizuje konverziju aminokiselina u aldoksime, proces za koji je dugo poznato da je neophodan, takođe, biljkama koje sintetišu cijanogene glikozide (Hull et al., 2000; Wittstock & Halkier, 2000). Biosintetski koraci nakon formiranja aldoksima, najverovatnije, uključuju konverziju u tiohidroksiminsku kiselinu, uvođenje tioglukozidnog sumpora iz cisteina, S-glukozil-transfer sa UDP-glukoze (UDP-Glc ili UDPG) i sulfonovanje visoko-energetskim sulfatnim donorom 3'-fosfo-adenozin-5'-fosfatosulfatom (PAPS) (Underhill, 1980; Haughn et al., 1991; Reed et al., 1993; Bennett et al., 1993, 1995; GrootWassink et al., 1994; Halkier & Du, 1997; Du & Halkier, 1998; Witzak, 1999; Halkier, 1999; Mithen et al., 2000). Ne postoje biohemski dokazi za predložene intermedijere između aldoksima i tiohidroksiminske kiseline, niti je izvršeno prečišćavanje ili karakterizacija enzima uključenih u ove procese. S-glukozidacija tiohidroksiminske kiseline u desulfoglukozinolat katalizovana je enzimom UDPG: tiohidroksimat glukoziltransferaza. Ovaj enzim je izolovan i prečišćen iz vrsta *Brassica napus*, *B. juncea*, *B. oleracea* i *Arabidopsis thaliana* (Jain et al., 1990b; Reed et al., 1993; GrootWassink et al., 1994; Guo & Poulton, 1994). Oba enzima izolovana iz *B. oleracea* i *B. napus* imaju visoku specifičnost na supstrat-tiohidroksimat, ali i veoma malu specifičnost kada je u pitanju bočni lanac strukture. Poslednji korak u formiranju glukozinolata je sulfonovanje desulfoglukozinolata. Ova reakcija je katalizovana enzimom 3'-fosfoadenozin 5'-fosfatosulfat (PAPS): desulfoglukozinolat sulfotransferaza. I ovaj enzim je izolovan, prečišćen i okarakterisan, ali je izuzetno nestabilan i ima veoma varijabilnu specifičnost prema supstratu (Glendening & Poulton, 1988; Jain et al., 1990a).

Tačan mehanizam modifikacije bočnog lanca glukozinolata predstavlja polje sa puno nagadanja, a malo eksperimentalnog rada. Prepostavlja se da inicijalna oksidacija sumpora na bočnom lancu metionina i njegovih homologa daje veliki broj metilsulfinit- i metilsulfonil-glukozinolata. Istraživačka grupa Mithen-a je predložila model modifikacije bočnog lanca alifatičnih- i alkiltioalkil-glukozinolata na temelju alelnih varijacija tri lokusa: *Gsl-oxid*, *Gsl-alk* i *Gsl-oh*, što rezultuje oksidacijom (metiltio-grupa), uvođenjem nezasićenja (iz alkil- u alkenil- bočni lanac), odnosno hidrosilovanjem (alkenil-grupa) (Parkin et al., 1994; Mithen et al., 1995b; Giamoustaris & Mithen, 1996). Verovatno se slični procesi hidrosilovanja, uvođenja nezasićenja i oksidacije dešavaju i kod račvastih bočnih lanaca, aromatičnih i indolskih glukozinolata, s obzirom da ova jedinjenja predstavljaju grupu koji je strukturno veoma slična alifatičnim glukozinolatima, izuzimajući desetak aromatičnih i indolskih glukozinolata koji su jednostruko ili višestruko metoksilovani. Takođe je

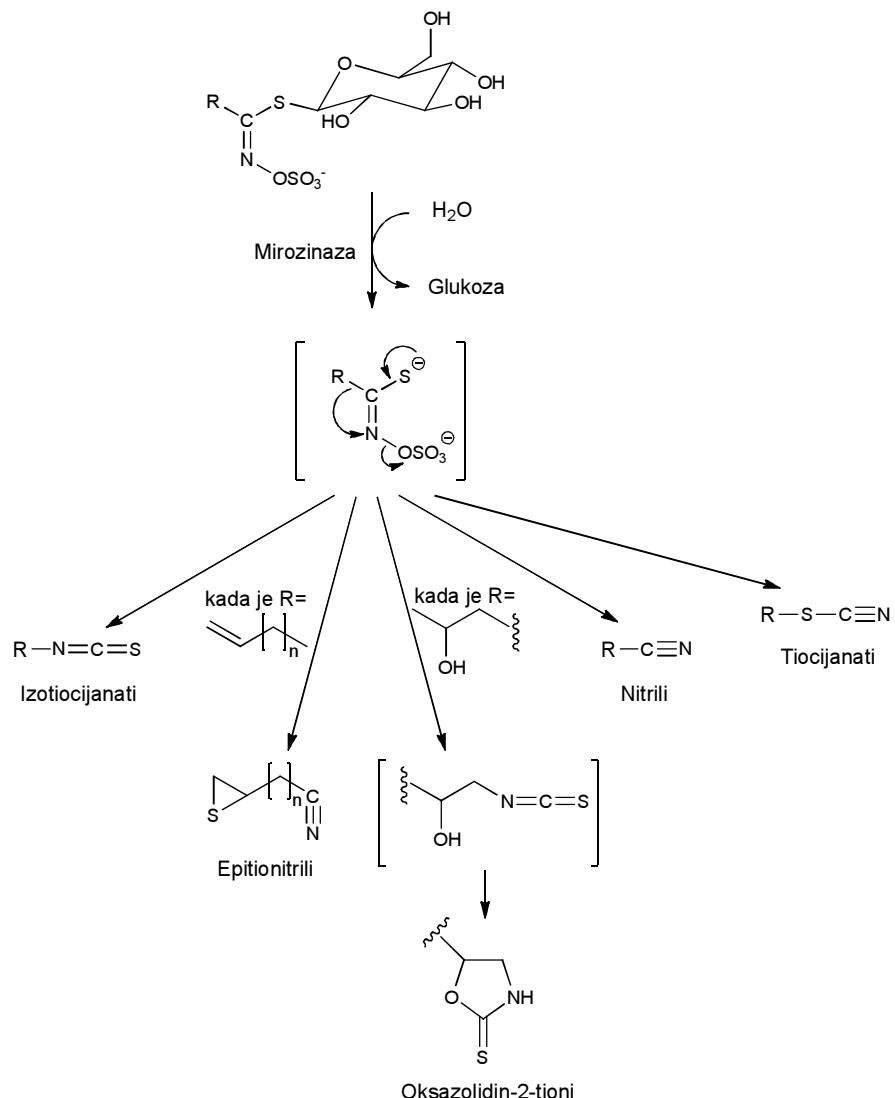
prepostavljeno da benzoiloksialkil-glukozinolati nastaju kombinacijom hidroksialkil-glukozinolata sa benzoevom kiselinom (Mithen et al., 2000).

3.3.3. ENZIMSKA HIDROLIZA GLUKOZINOLATA

Glukozinolati su vrlo stabilni prekursori izotiocianata rastvorljivi u vodi i obično su u svežim biljkama prisutni u većoj količini u odnosu na izotiocianate. Ekstrakcija glukozinolata pod strogo kontrolisanim uslovima kojima se obezbeđuje iscrpljenje biljnog materijala, a izbegava hidrolitičko dejstvo mirozinaza pokazala je da neke biljke sadrže gotovo isključivo glukozinolate, a ne i izotiocianate (Fahey et al., 1997). Mehaničkim povređivanjem biljke, žvakanjem svežih biljaka (npr. povrća) ili povređivanjem biljnog tkiva uzrokovanih nagnjećenjem ili mržnjenjem u toku kultivisanja, berbe, transporta i obrade (Bones & Rossiter, 1996; Rosa et al., 1997) dolazi do hidrolize relativno nereaktivnih glukozinolata do izotiocianata (Bones & Rossiter, 1996; Rosa et al., 1997). Ovo oštećenje tkiva oslobađa enzim mirozinazu (EC 3.2.3.1), glikoprotein koji koegzistira sa glukozinolatima, ali je fizički odvojen od njih. Dugo se mislilo da je ovaj enzim lokalizovan u specijalizovanim „mirozinskim“ celijama (Bones & Iversen, 1985; Bones et al., 1991; Drozdowska et al., 1992).

Mnoštvo histoloških i imunohemiskih dokaza (Luthy & Matile, 1984; Lenman et al., 1990; Bones, 1990; Bones et al., 1991; Höglund et al., 1991; Bones & Rossiter, 1996), međutim, upućuje na to da je ovaj enzim obično lokalizovan unutar vodenih vakuola. S obzirom da je prisutan u zrelom, neaktivnom semenu, ostaje nerešeno pitanje o lokalizaciji enzima u tim organima.

Pre nekoliko godina mirozinaza je sekvencionirana (Xue et al., 1992; Henrissat et al., 1995; Rask et al., 2000), a određena je i njena struktura kristalografskom analizom (Burmeister et al., 1997, 2000). To je β -tioglukozidaza sa primarnom strukturom (sekvenco aminokiselina) jako sličnom enzymima glukozil-hidrolazama (EC 3.2.1 – 3.2.3). Izgleda da je neophodno prisustvo hidroksilne grupe na C-2 položaju glukoze da bi se enzim vezao za supstrat. U aktivnom centru enzima nalazi se jedan nukleofilni glutamat (Glu426), neophodan za katalitičku aktivnost, za razliku od dva glutamata u aktivnim centrima grupe enzima 1 *O*-glikozidaza (Cottaz et al., 1996). Nakon hidrolitičkog raskidanja β -glukozil-ostatka, sulfatni ostatak se neenzimski oslobađa u obliku tiohidroksamat-*O*-sulfonata i kod alifatičnih i kod aromatičnih glukozinolata. Premeštanjem nastalog nestabilnog intermedijera nastaju izotiocianati ili drugi proizvodi degradacije (npr. tiocijanati, nitrili, epitionitrili, oksazolidin-2-tioni) na način koji zavisi od supstrata-glukozinolata, kao i od uslova odigravanja enzimske reakcije (npr. pH, prisutnost Fe^{2+} ili epitiospecifičnog proteina) (Šema 3.4).



Šema 3.4. Enzimska hidroliza glukozinolata. Uglastim zagradama su označeni nestabilni intermedijeri.

Kinetika enzimske reakcije mirozinaze veoma se razlikuje od vrste do vrste, a u istoj biljci se može naći i više forma ovog enzima (James & Rossiter, 1991). Osim biljnih, postoje gljivične (Reese et al., 1958; Ohtsuru & Hata, 1972) i bakterijske mirozinaze (npr. kod *Enterobacter cloacae*; Tani et al., 1974). Mirozinaze su, takođe, prisutne u mnogim bakterijama koje se obično povezuju sa ljudskom i životinjskom crevnom mikroflorom (Campbell et al., 1987; Diedrich & Kujawa, 1987; Nugon-Baudon et al., 1988, 1990; Rabot et al., 1993) i u krucivornim vašima (koje se hrane samo Krstašicama) *Brevicoryne brassicae* i *Lipaphis erisimi* (MacGibbon & Beuzenberg, 1978). Raniji podaci o postojanju aktivnosti sličnoj mirozinazama kod sisara (Goodman et al., 1959) najverovatnije predstavlja aktivnost crevne mikroflore (Oginsky et al., 1962; Rabot et al., 1993; Shapiro et al., 1998; Getahun & Chung, 1999). Mirozinaze se mogu aktivirati dejstvom askorbinske kiseline, a u nekim slučajevima enzim je skoro neaktiviran u odsustvu ovog jedinjenja (Shikita et al., 1999). Aktivacija mirozinaza nije posledica redoks reaktivnosti askorbinske kiseline, već se prepostavlja da ovaj molekul predstavlja nukleofilnu katalitičku grupu (Ettlinger et al., 1961;

Burmeister et al., 2000). Aktivacija enzima askorbinskom kiselinom je „nekompetitivna“, tj. askorbat povećava i maksimalnu brzinu (V_{max}) i Michaelis-Menten-ovu konstantu (K_m) glukozinolatnog supstrata (Shikita et al., 1999).

Mirozinaze su izolovane, prečišćene i okarakterisane iz bele slačice (*Sinapis alba*; Björkman & Janson, 1972; Palmieri et al., 1986), vrtne salate (*Lepidium sativum*, Durham & Poulton, 1989), slačice (*Brassica juncea*; Ohtsuru & Hata, 1972), uljane repice (*Brassica napus*; Lönnerdal & Janson, 1973), zatim iz vrste *Wasabia japonica* (Ohtsuru & Kawatani, 1979) i još nekoliko biljnih vrsta. Takođe je publikovano da se enzim nalazi i u vegetativnim organima (Iversen & Baggerud, 1980; El-Sayed et al., 1995) i klicama (Shikita et al., 1999) vrste *Raphanus sativus*. Poznato je da postoje velike varijacije u specifičnoj aktivnosti mirozinaze kod različitih krucifera; Wilkerson i saradnici (1984) su ispitali dvanaest vrsta povrća iz porodice Cruciferae (kineski, crveni, beli i Savoy kelj, rotkvica, salata-potočnica, prokelj, karfiol, brokoli, rotkva i bela rotkva) i utvrdili da se specifična aktivnost delimično prečišćene mirozinaze kreće od 0,3 mmol/min/mg proteina kod salate-potočnice do 10,5 mmol/min/mg proteina kod rotkve (Wilkinson et al., 1984). Specifična aktivnost čiste mirozinaze iz klica rotkve je 280 mmol/min/mg proteina sa sinigrinom kao supstratom (Shikita et al., 1999). Björkman i Lönnerdal (1973) su odredili diferencijalnu aktivnost mirozinaze na šest različitih glukozinolatnih supstrata. Nakon konzumiranja glukozinolata od strane čoveka, aktivnost β -tioglukozidaza crevne mikroflore je u velikoj meri odgovorna za degradaciju glukozinolata u izotiocijanate (Shapiro et al., 1998; Getahun & Chung, 1999). Slični rezultati su, takođe, dobijeni u brojnim studijama na životinjama, npr. kod kokošaka (Campbell et al., 1987), pacova (Diedrich & Kujawa, 1987; Nugon-Baudon et al., 1990) i kod gnotobiotičkih životinja koje opstaju kao mešane populacije ili samostalni bakterijski sojevi u ljudskim fekalijama (Nugon-Baudon et al., 1990; Rabot et al., 1993). Gotovo celokupna hemoprotektivna aktivnost krucifera (Odeljak 3.3.7) potiče od ovih izotiocijanata. Značajni napori su uloženi u ispitivanje katabolizma glukozinolata od strane mikroba (Brabban & Edwards, 1994).

3.3.4. SADRŽAJ GLUKOZINOLATA U BILJKAMA

Sadržaj glukozinolata u nekim tkivima kod *Brassica* iznosi oko 1% od suve mase (Rosa et al., 1997), mada sadržaj može biti veoma promenljiv (Kushad et al., 1999; Farnham et al., 2000) i dostići čak 10% u semenu nekih biljaka (Josefsson, 1970).^{*} Većina vrsta sadrži ograničen broj glukozinolata (izvestan broj vrsta sadrži samo jednu, dok većina sadrži 2–5 različitih struktura), a može ih biti i znatno više (u semenu i listu više eko-tipova vrste *Arabidopsis thaliana* identifikovana su čak 34 različita glukozinolata; Hogge et al., 1988; Haughn et al., 1991; Clarke, 2010; Kliebenstein et al., 2001). Raspodela glukozinolata po biljnim organima je različita, sa kvantitativnim i kvalitativnim razlikama u korenju, listu, stabljici i semenu, npr. seme ili

* Sadržaj glukozinolata u semenu *Moringa oleifera* iznosi čak 26% u odnosu na suvu masu (Bennett et al., 2003).

mladi izdanci brokolija (*Brassica oleracea* var. *italica*) mogu sadržati 70 – 100 µmol glukozinolata po gramu sveže mase koji se sastoje gotovo isključivo od alifatičnih glukozinolata glukorafanina, glukoerucina i glukoiberina sa < 1% udela indolskih glukozinolata (Fahey et al., 1997). Od kasne vegetativne do reproduktivne faze razvoja, isti kultivar može sadržati ukupno samo oko 1 – 4 µmol glukozinolata po gramu sveže mase, sa alifatičnim i indolskim glukozinolatima u otprilike jednakim količinama (Fahey et al., 1997; Fahey & Stephenson, 1999). Glukozinolati čine oko 0,05 – 0,1% od sveže mase brokolija ili oko 50 – 100 mg glukozinolata na 100 g mase (Kushad et al., 1999; Farnham et al., 2000). Iz ovoga se može zaključiti da je starost, odnosno faza razvoja najbitniji faktor koji utiče na kvalitativni i kvantitativni glukozinolatni profil kod biljaka. Ekološki faktori, kao što su plodnost tla (Booth & Walker, 1992; Fahey & Stephenson, 1999), uticaj patogena (Butcher et al., 1974), povređivanje (Bodnaryk, 1992) ili regulatori biljnog rasta (Bodnaryk, 1994; Bodnaryk & Yoshihara, 1995), takođe, imaju značajan uticaj na sadržaj određenih glukozinolata kod biljaka i mogu uticati na raspodelu istih po biljnim organima.

3.3.4.1. Posebne odlike indolskih glukozinolata

Izotiocijanati koji nastaju degradacijom indolskih glukozinolata su nestabilni i spontano se razgrađuju dajući indol-3-karbinol, indol-acetonitril, tiocijanatne jone i 3,3'-diindolilmetan. Indol-3-karbinol se zatim u stomaku, nakon konzumiranja, može spontano kondenzovati, pri kiselim uslovima u želucu, formirajući jedinjenja koja su veoma slična 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-*p*-dioksinu (TCDD, ili dioksin) po strukturi, toksičnosti i kancerogenosti (Bjeldanes et al., 1991). Uprkos toksičnosti metabolita indolskih glukozinolata, a naročito indol-3-karbinola, ispitano je njihovo protektivno dejstvo na pojavu raka (npr. Bradlow et al., 1991; Coll et al., 1997; Kim et al., 1997; Broadbent & Broadbent, 1998a,b; Fenwick et al., 1983; McDanell et al., 1988; Rosa et al., 1997; Stoewsand, 1995).

3.3.4.2. Anti-nutricionistički* i goitrogeni efekti glukozinolata

Hidrolizom β -hidroksialkenil-glukozinolata (npr. progoitrin i *epi*-progoitrin), nastaju β -hidroksialkenil-izotiocijanati. Ova jedinjenja spontano ciklizuju i daju oksazolidin-2-tione koji mogu imati goitrogeni uticaj na sisare, što je po prvi put uočeno kod zečeva i opisano kao „gušavost izazvana kupusom“ od strane Vebstera i Česnija (Webster & Chesney, 1930). „Antinutricionistička“ priroda β -hidroksialkenil-glukozinolata obrađivana je u radovima Bille-a i sar. (1983), Vermorel-a i sar. (1988), Mawson-a i sar. (1993a,b; 1994a,b; 1995a,b) Yong-Gang-a i sar. (1993), kao i u nešto opšenijim preglednim radovima Fenwick-a i sar. (1983), Rosa-e i sar. (1997) i Griffiths-a i sar. (1998). Hibridna sorta *Kanola* jedne od najvažnijih uljarica u svetu, uljane repice (*Brassica napus*) nastala je kao rezultat napora kojim je goitrogenost ove vrste svedena

* Anti-nutrijenti su supstance koje umanjuju apsorpciju, tj. ometaju varenje konzumirane hrane.

na minimum. *Kanola* (termin nastao od engleskih reči „Canadian“ i „oil“) je razvijena 1970-tih godina u programu oplemenjivanja bilja u svrhu razvoja novih sorti uljane repice sa niskim sadržajem glukozinolata i eručke kiseline. Seme kanole sadrži oko 40% ulja i prema pozitivnim zakonskim propisima ne sme sadržati više od 2% eručke kiseline; ostatak nakon ekstrakcije ulja se koristi kao stočna hrana pri čemu sadržaj glukozinolata ne sme biti veći od 30 mmol/g.

3.3.4.3. Prirodni izotiocijanati van biljnog carstva

Iako je poznato da su izotiocijanati prisutni van biljnog carstva (npr. α, ω -bisisotiocijanati dugih lanaca iz morskih sunđera; Karuso & Scheuer, 1987), pretpostavlja se da biosintetski put, u ovom slučaju, ne ide preko glukozinolata (Hagadone et al., 1984). Dugo je poznato da izotiocijanati iz gljiva imaju antibiotsko dejstvo (npr. paulomicin); njihova biosinteza, takođe, ne ide preko glukozinolata (Wiley et al., 1986).

3.3.5. BIOTIČKA INTERAKCIJA GLUKOZINOLATA I IZOTIOCIJANATA

Decenijama je poznata antibakterijska (Kjær & Conti, 1954; Procházka & Komersová, 1959; Virtanen, 1962; Wagner et al., 1965; Dornberger et al., 1975; Johns et al., 1982; Uda et al., 1993; Brabban & Edwards, 1995; Delaquis & Mazza, 1995; Hashem & Saleh, 1999; Lin et al., 2000) i antifungalna (Drobinca et al., 1967; Kojima & Ogawa, 1971; Mari et al., 1993; Delaquis & Mazza, 1995; Mayton et al., 1996; Manici et al., 1997; Hashem & Saleh, 1999) aktivnost glukozinolata/izotiocijanata. Izotiocijanati su našli primenu u poljoprivredi, gde se koriste za dobijanje brojnih agrohemikalija za antifungalnu i antihelmintsку primenu (Posner et al., 1994; Arnold et al., 1995; Lieber & Slutkin, 1962). Aktivnost izotiocijanata, npr. sulforafana, prema brojnim patogenim mikroorganizmima (npr. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida* sp.) u najmanju ruku doprinosi lekovitim svojstvima koja se pripisuju povrću iz porodice Krstašica, kao što su kupus i slačica, koje se vekovima koriste zbog antikancerogenih svojstava i kao sredstva za zaceljivanje rana (Hartwell, 1982). Aktivnost protiv širokog spektra gljivičnih i bakterijskih biljnih patogena je utvrđena i veoma opširno proučavana (Brown & Morra, 1997; Rosa & Rodrigues, 1999).

Antagonističke interakcije između biljaka koje sadrže glukozinolate i drugih organizama nisu ograničene na mikrobe, jer je utvrđena nematocidalna aktivnost glukozinolata (Lazzeri et al., 1993; Mayton et al., 1996) i da odvraća insekte iz reda Trichoptera, puževe i rakove iz reda Amphipoda od hranjenja biljkom (Newman et al., 1992). Jedna od složenijih interakcija glukozinolata, odnosno izotiocijanata i okoline je njihovo alelopatsko dejstvo na biljne zajednice koje rastu u neposrednoj blizini (npr. Brown & Morra, 1995; Charron & Sams, 1999, Smith, 2000). Rezultati dugogodišnjeg naučnog istraživanja iz ove oblasti sumirane su u publikovanom preglednom članku Brown-a i Morra (1997). Opšte je poznato dejstvo glukozinolata u odbrani od biljojeda, a vrlo je verovatno da imaju ulogu u prepoznavanju biljke domaćina od strane

specijalizovanih predatora, tj. ujedno se ponašaju kao insekticidi i atraktanti (Rodman & Chew, 1980; Louda & Rodman, 1983; Mithen et al., 1986, 1987b; Hammond & Lewis, 1987; Louda et al., 1987; Tsao et al., 1996; Rask et al., 2000). Na primer, glukozinolati predstavljaju atraktante koji privlače insekte, uključujući *Pieris* sp. gusenice i ostale specijalizovane insekte koji se hrane biljkama (npr. *Plutella* sp., insekti familija Curculionoidea i Chrysomelidae), koji su diferencijalno stimulisani da se hrane pojedinim glukozinolatima (Renwick et al., 1992). Specijalni tarzalni hemoreceptori larva različito reaguju na glukozinolate i odgovarajuće aglikone (npr. izotiocijanat), pa ženke koriste tragove glukozinolata u izboru odgovarajućih biljaka (Rodman & Chew, 1980). Određeni glukozinolati predstavljaju snažne stimulanse za hranjenje, što je utvrđeno kod biljke domaćina *Hesperis matronalis* i monofagih vrsta rilaša (*Ceutorhynchus inaeffectatus*) (Larsen et al., 1992). Mac-Gibbon i Beuzenberg (1978) su uočili intenzivnu mirozinazama sličnu aktivnost u pojedinim zonama u crevima vaši *Brevicoryne brassicae*, što je, verovatno, posledica bakterijske aktivnosti. Kod *Spodoptera frugiperda* i *Trichoplusia ni* indukovana je aktivnost zaštitnih enzima, kao što je glutation-transferaza, hranjenjem alil- i benzil-izotiocijanatom (Chew, 1988). Ispitivanje Mithen-a i saradnika (1995a) pruža uvid o uticaju genetskih modifikacija biljne hemije (npr. sadržaj glukozinolata) na interakcije biljka-biljojed. Više podataka o interakciji biljaka koje sadrže glukozinolate i herbivora može se naći u radovima Chew-a (1988), Rask-a i saradnika (2000), kao i u revijalnom članku Brown-a i Morra-e (1997).

3.3.6. IZOLOVANJE I ANALIZA GLUKOZINOLATA

3.3.6.1. Raniji radovi na izolovanju i kristalizaciji

Prvi radovi na izolovanju glukozinolata izvršeni su 60- i 70-tih godina XX veka korišćenjem isključivo metode tankoslojne hromatografije (TLC) (Greer, 1962; Bjorkman & Janson, 1972). Takođe je korišćena elektroforeza u kombinaciji sa hromatografijom na papiru, ali uz izvesne komplikacije i niske prinose (Elliott & Stowe, 1970; Wetter & Dyke, 1973; Olsen & Sørensen, 1980a). Ovi radovi su sumirani u revijalnom članku Olsen-a i Sørensen-a (1981). Za izolovanje indolskih i aril-glukozinolata korišćen je kiseli aluminijum-oksid u kombinaciji sa jonoizmenjivačkom hromatografijom na DEAE-Sephadex-25 smoli (Hanley et al., 1983) ili hromatografskim razdvajanjem na osnovu veličine čestica na G10 Sephadex-u (Hanley et al., 1984). Odlični rezultati u preparativnom izolovanju različitih glukozinolata iz ekstrakata korišćenjem ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) reversne polarnosti (C-18) ili flash-hromatografske reversno-fazne tehnike opisani su od strane Bjerg-a i Sørensen-a (1987) i Peterka-e i Fenwick-a (1988). Međutim, nedostatak ovih radova je u tome što se u većini slučajeva ne dobijaju čisti i kristalni proizvodi. Thies (1988) je opisao metodu po kojoj se mogu brzo dobiti gramske količine glukozinolata – u ovoj publikaciji se nalaze eksplicitni i lako razumljivi propisi za izolovanje dva glukozinolata

(sinigrin i glukotropeolin), međutim, kristalizacija drugih glukozinolata je problematična i daje slabe rezultate. Prema tome, vrlo je malo glukozinolata koji su izolovani u kristalnom stanju (Thies, 1988). Najraniji pokušaji u izolovanju glukozinolata zasnovani su na kristalizaciji Na-soli 2-hidroksi-2-metilpropil-glukozinolata i Na-soli tetraacetata i pentaacetata (derivatizacija tioglukozidnog ostatka) (Kjær et al., 1956; Schultz i Wagner, 1956). Kjær je do 1959. godine uspeo da izoluje devet glukozinolata kristalizacijom kalijumovih, natrijumovih ili rubidijumovih soli i još sedam koji su okarakterisani kao kristalni acetati (Kjær, 1961).

Od rada Ettlinger-a i Lundeen-a (1956a, b, 1957) do danas, puno je truda uloženo u razvoj metoda za efikasno izolovanje i identifikaciju glukozinolata (Betz & Fox, 1994). Većina prvih radova sa ovim ciljem oslanja se na hromatografiju na papiru ili TLC hromatografiju glukozinolata ili njihovih degradacionih proizvoda (npr. ispitivanje glukozinolata semena 151 vrste Krstašica (Danielak & Borkowski, 1969). Primenjivane su brojne tehnike za kvantifikaciju ukupnih glukozinolata. Npr. McGregor (1980) je ispitao primenljivost šest različitih analitičkih metoda za određivanje glukozinolata (npr. destilacija vodenom parom i titracija isparljivih izotiocianata, UV spektroskopija oksazolidin-2-tiona, gasna hromatografija (GC) isparljivih izotiocianata, GC/UV spektroskopija, UV spektroskopija izotiocianatnih derivata tiouree i GC trimetilsilikil-derivata glukozinolata). Sprovedeno je i razdvajanje glukozinolata GLC metodom trimetilsililovanih derivata glukozinolata kod kojih je uklonjena sulfatna grupa (Underhill & Kirkland, 1972a), a ova tehnika je kasnije kombinovana sa masenom spektrometrijom (Christensen et al., 1982). Enzimsko uklanjanje sulfatne grupe pre derivatizacije dovodi do nastajanja više proizvoda (Heaney & Fenwick, 1987; Theis, 1988). Ova metoda je korištena od strane Daxenbichler-a i saradnika (1991), koji je izvršio opsežno ispitivanje glukozinolata u semenima oko 300 biljnih vrsta (korišćenjem GC detekcije proizvoda hidrolize desulfoglukozinolata).

Fenwick i saradnici (Norwich, UK) su 1984. godine razvili reversno-faznu HPLC metodu za kvantitativnu analizu desulfoglukozinolata, koja se i danas veoma često koristi (Spinks et al., 1984). Ova metoda se zasniva na kolonskoj enzimskoj desulfataciji biljnih ekstrakata, a zatim HPLC detekciji dobijenih proizvoda. Iako je često korišćena, primena i interpretacija metode enzimske desulfacije enzimom sulfohidrolaza je još uvek otežana zbog izvesnih poteškoća, kao što je uticaj pH, vremena i enzimske aktivnosti (Minchinton et al., 1982; Spinks et al., 1984; Sang & Truscott, 1984). Ova metoda koristi pročišćeni desulfosinigrin i desulfobenzil glukozinolat kao interne standarde, a za identifikaciju komponenata koriste se poznate vrednosti retencionih vremena glukozinolata i upoređivanje sa standardizovanim ekstraktima. Nažalost, biološka aktivnost ovih molekula je kompromitovana uklanjanjem sulfatne grupe. Enzim mirozinaza ne prepoznaće desulfo-glukozinolate kao svoj supstrat, čijom bi se razgradnjom dobili izotiocianati neophodni za bio-testove ili za direktno određivanje metodom ciklokondenzacije sa benzenditiolom – ključnom

metodom kod ispitivanja farmakokinetike, farmakodinamike i bioaktivnosti ovih jedinjenja (Šema 3.5).

Mnogi biljni glukozinolati nisu okarakterisani modernim analitičkim i spektroskopskim tehnikama kao što su HPLC, NMR i MS (Fenwick et al., 1980; Eagles et al., 1981; Fenwick et al., 1982; Bjerg & Sørensen, 1987; Bradfield & Bjeldanes, 1987; Lafosse et al., 1990; Prestera et al., 1996). Uprkos višedecenijskom radu na izolovanju i kristalizaciji, dostupan je veoma mali broj glukozinolata visoke čistoće koji se mogu koristiti kao standardna jedinjenja kod hromatografskih metoda analize.

3.3.6.2. Stabilnost glukozinolata

Postoji veoma malo podataka o stabilnosti glukozinolata u toku prerade i ekstrakcije. U opštem slučaju, ekstrakcija se izvodi na temperaturama od 65–100 °C, blizu tačke ključanja rastvarača, pod prepostavkom da se pri ovim uslovima istovremeno vrši i inaktivacija mirozinaze (Oerlemans et al., 2006; Oerlemans et al., 2006; AOCS^{*}, 1998; Chuanphongpanich et al., 2006; ISO, 1992; Schreiner et al., 2007). Obradom u prisustvu denaturacionog reagensa kao što je metanol, glukozinolati se uspešno mogu izolovati u nativnom obliku (Kiddle et al., 2001). Ova prepostavka je dovedena u pitanje saznanjem da se 80% glukobrasicina (3-indolilmetil-glukozinolat) razgradi u toku 5 minuta na 100 °C i 120 bara pritiska kada se ekstrakcija vrši u 70%-tnom metanolu. Degradacija se dalje može minimizirati utapanjem biljnog materijala u tečni azot, deaktivacijom mirozinaze mikro-talasima i liofilizacijom neposredno pre homogenizacije (Brown et al., 2003; Verkerk & Dekker, 2004). Utvrđeno je da i stajanjem može opasti sadržaj glukozinolata (Force et al., 2007). Takođe je utvrđeno da se ova jedinjenja mogu razlagati i ne-enzimskim procesom na povišenoj temperaturi, pri čemu nastaju odgovarajući nitrili (Williams et al., 2009).

3.3.6.3. Ekstrakcija glukozinolata

Ekstrakcija glukozinolata iz biljnog materijala daje najbolje rezultate ako se koriste protični rastvarači. Veoma je raširena upotreba smeše metanol-voda u ove svrhe (ISO, 1992; AOCS, 1998). Osim smeša etanola i vode (1:1) i metanola i vode (7:3), koje se preporučuju za ekstrakciju glukozinolata iz liofiliziranog zelenog biljnog tkiva (Wathelet et al., 2004), koristi se i sama voda, zatim fosfatni pufer (Stoin & Dogaru, 2007), 2%-tna fosforna kiselina (Van Doorn et al., 1998), smeša metanol-vodeni rastvor amonijaka i 10%-tni metanolni rastvor amonijaka sa 5% vode (Rubin et al., 1986; Liu et al., 1995).

3.3.6.4. Izolovanje glukozinolata

Danas je dostupan izvestan broj standarda čistih glukozinolata izolovanih iz biljnih vrsta koje sadrže velike koncentracije ili manje kompleksne smeše ovih

* eng. American Oil Chemists' Society

jedinjenja (Bennett et al., 2004; Watherine et al., 2004; Brown et al., 2003). Prilikom ekstrakcije pomoću vode može se koristiti olovo(II)-acetat ili barijum(II)-acetat za taloženje proteina i slobodnih sulfata (Brown et al., 2003). Nakon centrifugiranja, prečišćavanje glukozinolata u opštem slučaju uključuje anjonsku jonoizmenjivačku hromatografiju, uglavnom na DEAE-Sephadex A-25, koja se koristi za enzimsku desulfataciju i analizu opisanu standardizovanom metodom ISO 9167-1 (Barillari et al., 2005). Tipična procedura za ekstrakciju nativnih, intaktnih molekula glukozinolata je eluiranje na smoli 0,5 M rastvorom kalijum-sulfata, zatim uparavanje rastvarača, ponovno rastvaranje u vrućem metanolu radi uklanjanja soli, prekristalizacija iz hladnog etanola i sušenje sa P_2O_5 (Watherine et al., 2004). Za razdvajanje se koristi i anjonska stiren-divinil-benzen kopolimerska jonoizmenjivačka smola (Elfakir et al., 1994). Brza protiv-strujna hromatografija, metoda koja se isključivo oslanja na princip raspodele supstance između faza, može se koristiti za razdvajanje gramskih količina struktorno i hromatografski sličnih glukozinolata (Fahey et al., 2003).

3.3.6.5. Metode detekcije/određivanja

Metode za detekciju/određivanje glukozinolata se mogu podeliti u tri grupe: (i) destruktivne, kolorimetrijske tehnike određivanja ukupnih glukozinolata, (ii) nedestruktivne metode određivanja ukupnih glukozinolata i (iii) metode analize individualnih komponenata hromatografskim razdvajanjem i detekcijom. Većina kolorimetrijskih metoda (građenje tiourea (Wetter & Youngs, 1976), reakcija sa timolom (DeClercq & Daun, 1989), ciklokondenzacija sa benzen-ditiolom* (Zhang et al., 1992, 1996), reakcija sa paladijum(II)-hloridom (Thies, 1988), ferocijanidni test (Jezek et al., 1999; Makkar et al., 2007) i oslobođanje sulfatnog jona (Goyal, 2002); Slika 3.11) i dalje se koriste bez značajnijih modifikacija. Brojne metode za detekciju glukoze poreklom iz glukozinolata (Tholen et al., 1993) su sada dostupne, od kojih se prvenstveno koristi metoda sa heksokinazom kuplovanom sa NADH i metoda sa glukoza-oksidazom i heksokinazom kuplovane sa različitim bojama kao što su hinonimin i dianizidin. Standardizovana metoda za određivanje sadržaja glukozinolata nedavno je opisana od strane Internacionalne organizacije za standardizaciju (ISO, 2007). Sve ove metode imaju prednosti i mane, pa se preporučuje da se ispitivanja ne zasnivaju na rezultatima samo jedne, već više metoda.

Near infrared reflectance spektroskopija predstavlja nedestruktivnu tehniku analize, gde se signal O–H, C–H i N–H grupa dovode u vezu sa ukupnim sadržajem glukozinolata u ispitivanom uzorku (Font et al., 2005). Ova metoda se i dalje koristi, s obzirom da je prosta i da se njome uporedo može vršiti određivanje sadržaja proteina i ulja (Ul-Hassan et al., 2007). Standardizovana, rentgenska fluorescentna metoda se koristi za određivanje sadržaja sumpora (ISO 9167-2 1994) (ISO, 1994).

* Osetljivost ove metode je 10 pmol izotiocianata u složenim biološkim smešama kao što su biljni ekstrakti.

U prošlosti, analiza intaktnih glukozinolata nije bila moguća, već je vršena hidroliza, čime su dobijana jedinjenja koja su pogodnija za hromatografska razdvajanja. Saopštenje publikovano 1982. godine (Michinton et al., 1982) po prvi put opisuje enzimsku razgradnju glukozinolata u desulfo-glukozinolate (sulfatazu). Ova metoda je nekoliko godina kasnije standardizovana od strane Međunarodne organizacije za standardizaciju (metoda ISO 9167-1 1992; ISO, 1992) i udruženja "American Oil Chemists' Society" (metoda Ak 1-92; AOCS, 1998) i predstavlja metodu određivanja sadržaja glukozinolata (kvalitativno i kvantitativno) u semenu repe sorte *Kolza*^{*} (*Brassica campestris* var. *oleifera*) i *Kanola*[†] (*Brassica napus*). Metoda je zasnovana na ekstrakciji glukozinolata metanolom, zatim enzimskoj desulfataciji na jonoizmenjivačkoj smoli i njihovom razdvajaju i identifikaciji reversno-faznom HPLC metodom (ISO 9167-1:1992). Osim HPLC tehnike, propisana je i metoda koja koristi rentgensku fluorescentnu spektrometriju (ISO 9167-2:1995). Iako se i dalje ova metoda često koristi (Kusznierewicz et al., 2008; Cartea et al., 2008) i predložena su izvesna poboljšanja (Wathelet et al., 1999, 2004; Fiebig, 2006), do sada nije prihvaćena kao standardna metoda za opštu primenu. Paralelno, enzimska hidroliza glukozinolata katalitičkim dejstvom mirozinaze i analiza isparljivih izotiocianata (nitrila, tiocijanata itd.) ili derivatizacija desulfo-glukozinolata i analiza dobijenih trimetilsilil-etara primenom GC-MS metode u poslednje vreme se manje koristi, međutim, GC-MS je veoma pogodna metoda kada su izotiocijanati (a ne glukozinolati) predmet istraživanja.

Metodologija utvrđivanja (ili prepostavka) prisustva glukozinolata detekcijom njegovih degradacionih proizvoda u analiziranom uzorku i dalje je veoma raširena (Radwan et al., 2007), ali su očigledna ograničenja, odnosno nedovoljna specifičnost i tačnost ovog pristupa. Razdvajanje i identifikacija izotiocijanata iz biljnih ekstrakata, takođe, se može vršiti korišćenjem HPLC tehnike (Zhang et al., 1992; Kore et al., 1993; Bertelli et al., 1998). Nedavno je unapređena metoda za razdvajanje i identifikaciju glukozinolata, prvobitno razvijena od strane Helboe-a i ostalih istraživača (Helboe et al., 1980; Betz & Fox, 1994; Prestera et al., 1996). Unapređenje metode su: (i) paired ion hromatografija alkilamonijum-soli (npr. tetraoktil- ili tetradecilamonijum-bromid) koje se koriste u kombinaciji sa hidrolitičkom aktivnošću mirozinaza i izotiocijanatnim testom (ciklokondenzacija sa vicinalnim ditiolima) (Zhang et al., 1992, 1996), (ii) nova metoda za zamenu kontra jona NH₄⁺-jom, što je presudno za bio-testove i masenu spektroskopiju, (iii) poboljšanja MS analize kombinovane sa bombardovanjem atomima velike kinetičke energije i hemijskom tehnikom ionizacije, i (iv) nuklearna magnetno-rezonantna (NMR) spektroskopija visoke rezolucije, kojom se dobija konačna potvrda identiteta (Prestera et al., 1996).

^{*} Uljana repica sorte *Kolza* se intenzivno gaji u Francuskoj, Belgiji, SAD-u, Holandiji i Nemačkoj. Ulje *Kolza* repe je korišćeno širom Evrope za osvetljenje do početka eksploracije prirodnog gasa. I danas je upotreba ovog ulja veoma raširena – koristi se kao mazivo (lubrikant) u industriji i kao sirovina u proizvodnji biodizela.

[†] Uljana repica sorte *Kanola* (sadrži 40-48% ulja i 18-25% belančevina) je industrijska biljka koja se koristi za proizvodnju prehrabnenog ulja i u proizvodnji biodizela (po hektaru površine zasejanim ovom kulturom može se dobiti 400 litara biodizela). Najveći proizvodači su u zemljama Evropske Unije, Kanadi, SAD-u, Australiji, Kini i Indiji.

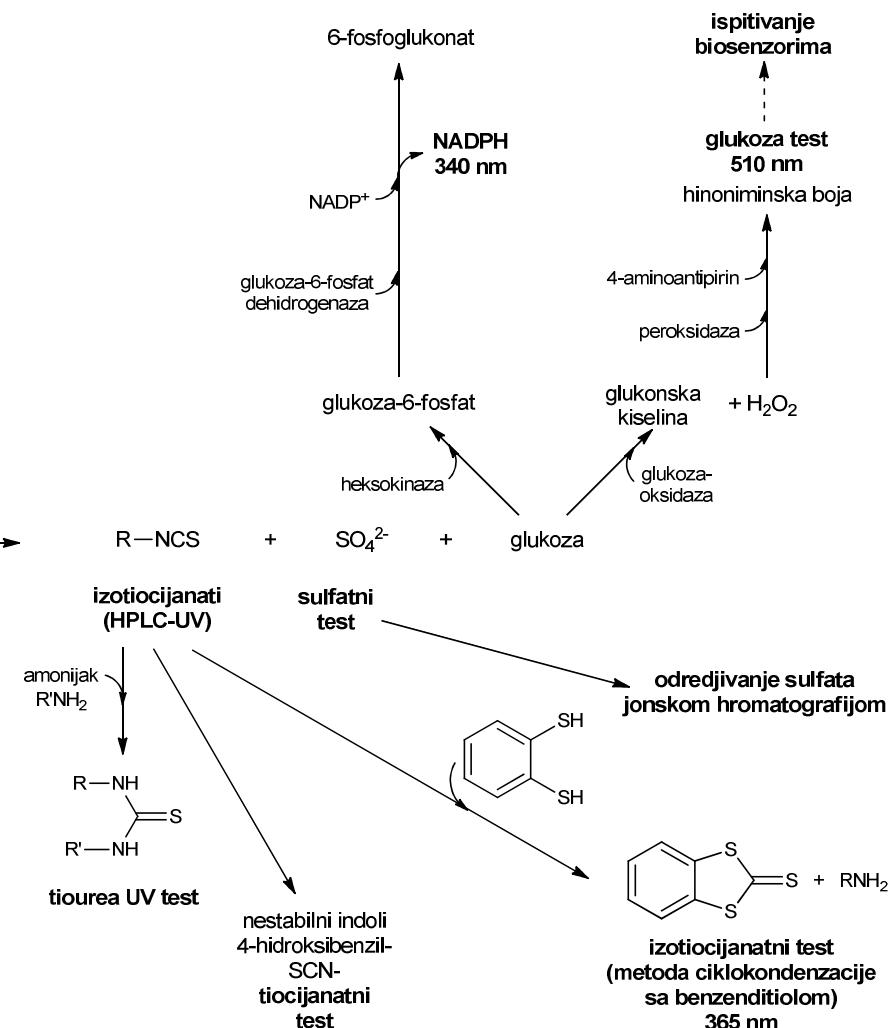
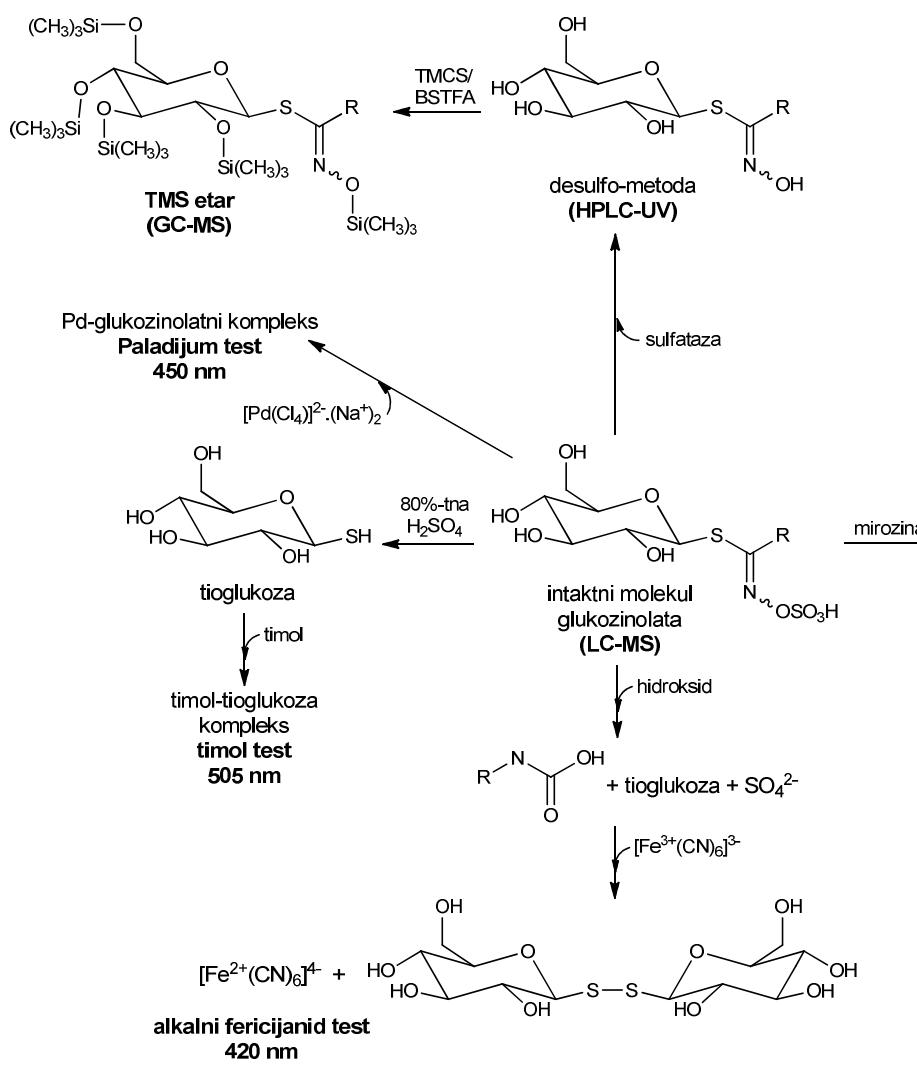
3.3.7. GLUKOZINOLATI/IZOTIOCIJANATI – ŠTITE OD KANCERA

Mnoštvo je uverljivih dokaza koji dovode u vezu smanjenu učestalost pojave mnogih vrsta raka sa povećanom konzumacijom voća i povrća, a naročito povrća iz porodice Brassicaceae (Steinmetz & Potter, 1991, 1996; Block et al., 1992; Doll, 1992; Verhoeven et al., 1996; Michaud et al., 1999; Talalay, 1999). Unošenje ovog povrća okovdu puta dnevno može umanjiti rizik od pojave raka na određenim mestima za čak 50% (Graham et al., 1978; Kune et al., 1987; Kohlmeier & Su, 1997). Veruje se da, makar delimično, protektivno dejstvo povrća iz porodice Brassicaceae potiče od glukozinolata. Utvrđeno je da određeni glukozinolati (npr. benzil-, *p*-hidroksibenzil- i 2-hidroksibut-3-enil-glukozinolati) indukuju enzime faze 2 detoksifikacije kod sisara (Wattenberg et al., 1986; Tawfiq et al., 1995; Fahey et al., 1997). Enzim mirozinaza, koja se aktivira u oštećenom bilnjnom tkivu, takođe je prisutna u mikroflori digestivnog trakta čoveka, gde katalizuje razgradnju glukozinolata u, između ostalog, izotiocianate, tiocijanate i nitrile. Najviše pažnje je usmereno na potencijalnu protektivnu aktivnost ovih jedinjenja u smislu pojave raka, a prvenstveno na indukciju enzima faze 2, ali i na moguću antiproliferativnu ulogu, indukciju apoptoze, i inhibitornog dejstva na redoks regulatorne enzime i enzime faze 1 (Zhang & Talalay, 1994, 1998; Barcelo et al., 1996; Nastruzzi et al., 1996; Institut International Life Sciences, 1999; Gamet-Payrastre et al., 2000; Nakamura et al., 2000). Nekoliko istraživanja na temu preventivnog dejstva glukozinolata data su u nastavku: (1) Utvrđeno je da sulforafan povećava nivo enzima faze 2 kod sisara ARE (*Antioxidant Response Element*) transkripcionom aktivacijom (Zhang et al., 1992, 1994; Prestera et al., 1993; Talalay et al., 1995; Talalay & Zhang, 1996; Fahey et al., 1997). Sulforafan smanjuje učestalost, odlaže pojavu i smanjuje veličinu tumora, što je utvrđeno na modelu tumora kod pacova (Zhang et al., 1994; Fahey et al., 1997), zatim deluje kao indirektni antioksidans (Fahey & Talalay, 1999), ispoljava *in vitro* selektivno citostatičko i citotoksično dejstvo na humane ćelije karcinoma debelog creva (Gamet-Payrastre et al., 1998), inhibira citochrom P450 (Mahéo et al., 1997; Morel et al., 1997), a naročito CYP2E1 (Barcelo et al., 1996) i indukuje usporavanje ćelijskog ciklusa i apoptizu kod humanih ćelija karcinoma debelog creva *in vitro* (Gamet-Payrastre et al., 2000); (2) Ispitivanja na modelima tumora pluća i jednjaka su pokazala da fenetil-izotiocijanat inhibira indukciju istih kod miševa i pacova (Morse et al., 1993; Stoner & Morse, 1996, 1997; Hecht, 1996; Stoner et al., 1999). Ovi rezultati dobro korelišu sa smanjenjem broja građenja adukata na DNA i snažno sugerisu na inhibiciju citochroma P450 kao mehanizam delovanja. Analogno dejstvo fenetil-izotiocijanat na NNK metabolizam, uočeno kod pušača koji su konzumirali salatu-potočnicu (vrsta *Nasturtium officinale* kao izvor fenetil-glukozinolata; Hecht, 1999), kao i značajno povećanje glukuronidacije nikotinskih metabolita ukazuju na indukciju aktivnosti enzima faze 2 detoksifikacije UDP-glukuronoziltransferaze kod ljudi (Hecht et al., 1999). Adesida i saradnici (1996) su pokazali da metaboliti fenetil-izotiocijanata ispoljavaju izraženo antiproliferativno dejstvo na ljudske ćelije leukemije *in vitro*; (3) Kramben (cijanohidroksibutan),

glukoiberin i indol-3-karbinol povećavaju nivo hinon-reduktaze i glutation transferaze (enzimi faze 2 detoksifikacije), CYP1A (enzim faze 1) i, u nekim slučajevima, deluju sinergistički; kramben je identifikovan kao jedinjenje sa najjačim dejstvom u ovom sistemu (Staack et al., 1998; Wallig et al., 1998); (4) U ispitivanju sprovedenom na ljudima, koji su unosili biljke koje sadrže sulforafan (Shapiro et al., 1998) i fenetilizotiocijanat (Getahun & Chung, 1999), ispitivan je metabolizam izotiocijanata, pri čemu je u oba ispitivanja potvrđena uloga mikroflore probavnog trakta u hidrolizi glukozinolata do izotiocijanata. Seow i sar. (1998) i Fowke i sar. (2001a,b) su sproveli testove ciklokondenzacije razvijene od strane Zhang-a i sar. (1992, 1996) kako bi pratili metabolizam izotiocijanata iz hrane i utvrdili korelaciju nivoa urinarnih izotiocijanata sa poznatim podacima o unosu povrća iz porodice Brassicaceae prilikom ishrane kod stanovnika u Singapuru i SAD-u.

3.3.8. EVOLUTIVNA VEZA GLUKOZINOLATA I CIJANOGENIH GLUKOZIDA

Cijanogeni glukozidi su široko rasprostranjeni u biljnem carstvu; nalaze se kod papratnjača, golosemenica i skrivenosemenica. Glukozinolati su evolutivno mlađi i prisutni su samo unutar reda Capparales i vrstama roda *Drypetes* (Euphorbiaceae). Iz razloga što obe grupe prirodnih proizvoda nastaju biosintezaom iz aminokiselina i imaju aldoksime kao intermedijere, pretpostavlja se da su biljke evolucijom razvile mogućnost za biosintezu glukozinolata na osnovu genetske mogućnosti biosinteze cijanogenih glukozida. Ova teorija je podržana činjenicom da CYP79 homolozi katalizuju transformaciju aminokiselina u aldoksime u oba slučaja. Mogući scenario evolucije glukozinolata je mutacija aldoksimetaboličkog enzima u biosintezi cijanogenih glukozida. Kao posledica navedene mutacije ne nastaje očekivani hidroksinitril, već toksično jedinjenje kojeg se biljka, nakon toga, oslobođa (Hansen et al., 2001). Iz ove perspektive, postaldoksim-enzimi biosinteze glukozinolata se mogu promatrati kao enzimi koji učestvuju u procesu detoksifikacije *aci*-nitro-jedinjenja ili nitril-oksida. U skladu sa tom hipotezom, glukoziltransferaze i sulfotransferaze predstavljaju mehanizme detoksifikacije koji se često koristi u prirodi (Halkier & Gershenson, 2006).



Šema 3.5. Degradacione metode za analizu glukozinolata

Tabela 3.5. Distribucija glukozinolata kod vrsta rodova *Erysimum* i *Hornungia*

Takson	Glukozinolati sa sumporom	Alifatični glukozinolati				Aromatični glukozinolati			Literatura	
		Normalnog niza	Račvasti	Nezasićeni	Alkoholi	Ketoni	Aril-	Benzoat	Indolski	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Erysimum</i>										
<i>allionii</i>	64, 76, 82, 84									Daxenbichler et al., 1991
<i>asperum</i>	33, 35, 37, 67, 72, 73, 76, 82, 88, 91, 94		61	107			23	8		Daxenbichler et al., 1991 Rodmann & Chew, 1980
<i>aureum</i>	95		61							Cole, 1976
<i>capitatum</i>	73, 82			107						Daxenbichler et al., 1991
<i>cheranthoides</i>	84, 95									Cole, 1976
<i>cuspidatum</i>	73, 82									Daxenbichler et al., 1991
<i>diffusum</i>	73, 82									Daxenbichler et al., 1991
<i>hieracifolium</i>	33, 35, 37, 72, 73, 82, 84, 94, 95			107	42					Cole, 1976, Daxenbichler et al., 1980 Daxenbichler et al., 1991 Kjær & Schuster, 1970
<i>linifolium</i>	73, 82									Daxenbichler et al., 1991
<i>ochroleucum</i>	82					1				Danielak & Borkowski, 1969
<i>odoratum</i>	73			107		1*				Blua et al., 1988 Chisholm, 1973 Daxenbichler et al., 1991 Kjær & Gmelin, 1957

Tabela 3.5. (*Nastavak*)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>perofskianum</i>	64, 76, 82, 84, 95									Cole, 1976
<i>repandum</i>	73, 84, 95									Danielak & Borkowski, 1969
<i>rhaeticum</i>	32, 34, 36, 37, 67, 72, 78, 81, 88, 94									Daxenbichler et al., 1991
<i>rupestre</i>	82				1					Cole, 1976, Daxenbichler, 1991
<i>sysimbrioides</i>	73, 82					23				Kjær & Schuster, 1973
<i>silvestre</i>	73, 95									Chisholm, 1973,
<i>Hornungia</i>										Daxenbichler et al., 1991
<i>alpina</i>						11,22,23,44 45,105,?**				Daxenbichler et al., 1991
										Bennett et al., 2004
										Kjær, 1953

*4-Acetilbutil-glukozinolat (glukoeripestrin ili 3-metoksikarbonilpropil-glukozinolat, **1**) je izolovan iz *E. odoratum* ili *E. rupestre* – postoji konfuzija oko identiteta biljke iz koje je ovo jedinjenje izolovano (Chisholm, 1973); **Detektovan izotiocijanat čija struktura nije odredena.

3.4. SINTEZA IZOTIOCIJANATA

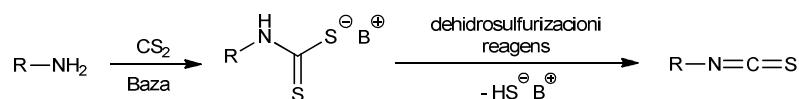
Izotiocijanati predstavljaju važnu grupu prirodnih proizvoda i farmaceutski aktivnih jedinjenja. Do sada je poznato oko 200 izotiocijanata koji se javljaju u prirodi*, dok je, sa druge strane, zbog njihovog značaja sintetisan veliki broj „sintetičkih“ izotiocijanata. Hemija ovih heteroalena temeljno je opisana u tri revijalna rada (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983; Mukerjee & Ashare, 1991). Izotiocijanati imaju široku primenu kao hemoselektivni elektrofilni u biohemiji (Fernandez et al., 1995) i predstavljaju ključne intermedijere u sintetičkoj organskoj hemiji, naročito u sintezi heterocikličnih jedinjenja sa sumporom, npr. tiohidantoina, tiopirimidona, tiochinazolona, merkaptoimidazola, tioamidazolona i benzotiazina (Mukerjee & Ashare, 1991 i reference citirane u tom radu; Stephensen & Zaragosa, 1997). Pogodnost upotrebe izotiocijanata kao sintona leži u njihovoј reaktivnosti i lakoci dobijanja. Hemija izotiocijanata se iz tih razloga intenzivno razvijala proteklih decenija.

Prvi radovi na sintezi izotiocijanata izvršeni su još u drugoj polovini XIX veka. Sima Lozanić je još 1872. godine sintetisao *p*-hlorfenil-izotiocijanat u reakciji tiouree sa jodom. Hofmann (1880) je dobio metil-izotiocijanat termalnom izomerizacijom metil-tiocijanata, dok je Werner (1891) dobio aril-izotiocijanate iz *sym*-diariltiourea korišćenjem kiselih reagenasa. Nekoliko godina kasnije, isto jedinjenje je sintetisano iz *N,N'*-dimetiltiuramdisulfida u reakciji sa jodom (Braun, 1902) i zagrevanjem u vodi ili metanolu (Freund & Asbrand, 1895).

Razvijene su brojne metode za sintezu izotiocijanata, od kojih se većina zasniva na (i) nukleofilnoj supstituciji organskih halogenida tiocijanatnom kiselinom ili njenim solima i (ii) korišćenju primarnih amina za tzv. „tiokarbonilni transfer“ pomoću ugljen-disulfida i tiofrozgена:

– Dehidrosulfurizacija ditiokarbaminske kiseline i njenih soli ili estara (Šema 3.6).

Primarni amini (dovoljno nukleofilni) reaguju sa ugljen-disulfidom u prisustvu alkalija, amina ili amonijaka, pri čemu nastaju soli ditiokarbaminske kiseline, koje zatim daju izotiocijanat upotrebo sledećih dehidrosulfurizacionih reagenasa:

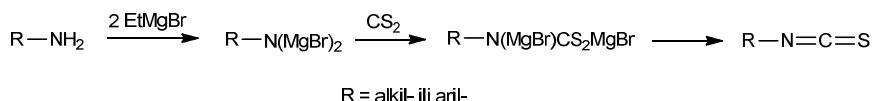


Šema 3.6. Sinteza izotiocijanata dehidrosulfurizacijom ditiokarbamata, dobijenih reakcijom amina sa ugljen-disulfidom u baznoj sredini.

- (i) *metalne soli* (npr. olovo(II)-nitrat), koje se koriste za sintezu uobičajenih alkil- i aril-izotiocijanata (Delépine, 1907, 1908; Dains et al., 1922, 1941; Worrall, 1928; Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)

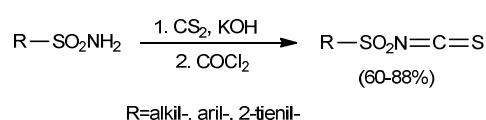
*Neki su prisutni u tkivima, a neki nastaju samo u stresnim stanjima.

- (ii) *fozgen* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (iii) *fosfor-oksihlorid* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (iv) *trihlor(o-fenilendioksi)fosforan* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (v) *organo-silicijumova jedinjenja* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (vi) *karbodiimidi* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (vii) *N,N'-disupstituisani propiol-amidini* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (viii) *soli α-halo masnih kiselina* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (ix) *natrijum-hipohlorit* (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (x) *metil- ili etil-hlorformijat* (Andreash, 1906; Kaluza, 1909, 1912; Stieger, 1916; Slotta & Dressler, 1930; Hodgkins & Ettlinger, 1956; Hodgkins & Reeves, 1964; Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983)
- (xi) *natrijum-hloracetat i cink(II)-hlorid* (van der Kerk et al., 1973)
- (xii) *vodonik-peroksid* (Johar et al., 1970; Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983; Li et al., 1997)
- (xiii) *bakar(II)-nitrat nanešen na glinu (Claycop)* (Laszlo & Pennetreau, 1987; Mesheram et al., 1997)
- (xiv) *2-hlor-1-metilpiridinijum soli* (Shibamura et al., 1977)
- (xv) *butil-litijum i ugljen-disulfid ili sumpor(II)-oksid* (Fujinami et al., 1978)
- (xvi) *cijanogen-hlorid* (Giesselmann et al., 1976)
- (xvii) *cijanamid* (Nippon Carbide Industries Co., 1981)
- (xviii) *di-2-piridil-karbonat* (Kim & Ko, 1987)
- (xix) *Grignard-ov reagens* (Šema 3.7; Sakai et al., 1975). Raspadanjem magnezijum-N-aryl- ili N-alkil-N-ditiokarbamata bromida dobijenih *in situ* iz amina, ugljen-disulfida i Grignard-ovog reagensa nastaju izotiocijanati.



Šema 3.7. Sinteza izotiocijanata upotreboom Grignard-ovog reagensa

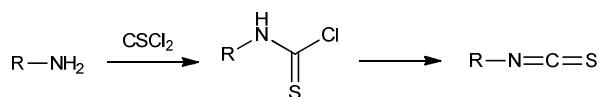
Reakcioni uslovi koje treba primeniti zavise od prirode supstrata i reagensa, npr. za dehidrosulfurizaciju ditiokarbamata heterocikličnih amina treba upotrebiti blaže reagense. Prinosi ove metode su generalno vrlo dobri i kreću se u intervalu 60–90%. Osim primarnih amina, *N*-nesupstituisani sulfonamidi, takođe, mogu reagovati, pri čemu nastaju odgovarajući sulfonil-izotiocijanati (Šema 3.8; Dickore & Kuhle, 1965).



Šema 3.8. Sinteza sulfonil-izotiocijanata iz odgovarajućih sulfonamida.

Sulfonil-izotiocijanati se takođe mogu dobiti modifikovanom metodom – zagrevanjem odgovarajućih metil-ditiokarbamata, u dobrom prinosu (Gompper & Haegle, 1966). Sličan pristup je primjenjen i za sintezu aril-izotiocijanata – zagrevanje odgovarajućih metil-ditiokarbamata u toluenu u prisustvu natrijum-hidroksida (Pak et al., 1982). Ova procedura je veoma jednostavna i može imati širu primenu. Nedavno je sintetisano nekoliko aromatičnih diizotiocijanata sa dobrim prinosom (72–83%), dehidrosulfurizacijom metil-ditiokarbamata živa(II)-oksidom u DMF-u u prisustvu amonijaka (Garin et al., 1989).

- **Konverzija primarnih amina u izotiocijanate u reakciji sa reagensima sa sumporom.** Primarni amini reaguju sa tiofogenom (Sharma, 1989; Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983; Dyson & George, 1924; Dyson, 1941; Nowick et al., 1996) pri čemu nastaju nestabilni tiokarbamoil-hloridi, koji zatim, dekompozicijom, daju izotiocijanate (Šema 3.9). Prinosi ove reakcije su srednji ili dobri. Reakcija se mora vršiti u aprotičnim rastavaračima kao što je hloroform, tolen itd. Tiofogen ne treba koristiti za reakciju sa aminima koji imaju reaktivnu grupu u vicinalnom položaju zbog mogućnosti ciklokondenzacione reakcije.



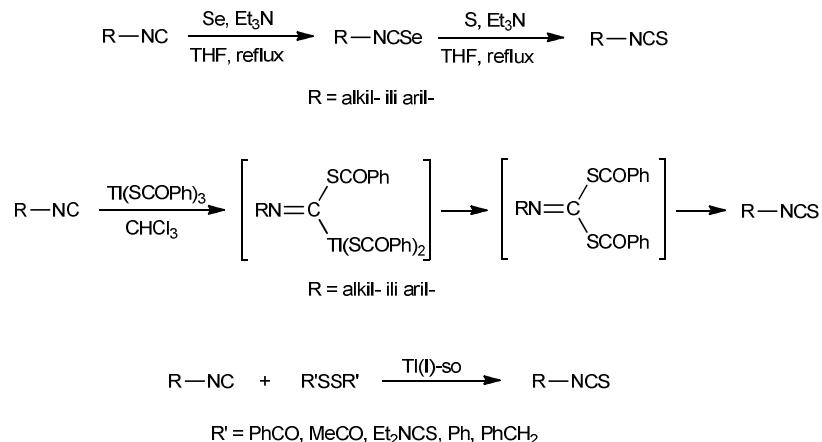
Šema 3.9. Sinteza izotiocijanata u reakciji primarnih amina sa tiofogenom

Ova metoda je više puta modifikovana, pa su umesto toksičnog tiofogena korišćeni dietil-tiokarbamoilhlorid (Sayigh et al., 1965), bis(dietiltio-karbamoil)sulfid ili disulfid (Marquardt, 1966), tiokarbonilditriazol (Larsen et al., 1978), tiokarbonildiimidazol (Larsen et al., 1981; Zehl & Cech, 1997), di-2-piridiltiokarbonat (Kim & Yi, 1985, 1987), 1,1’-(tiokarbonildioksi)dibenzotriazol (Chang & Kim, 1986), 1,1’-tiokarbonil-2,2’-dipiridon (Kim & Yi, 1964, 1986), trifozgen (bis(trihlormetil)-karbonat ($\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$); Nowick et al., 1996) i tiokarbonil-tetrahlorid (perhlormetilmerkaptan) u prisustvu kalaj(II)-hlorida (Connolly & Dyson, 1935).

- **Sinteza izotiocijanata iz izocijanida (Šema 3.10):**

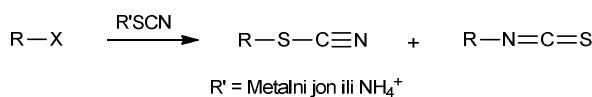
- (i) Niz alkil- i aril-izotiocijanata je sintetisan iz odgovarajućih izocijanida i elementarnog sumpora u prisustvu katalitičkih količina elementarnog selena sa dobrim ili odličnim prinosima (Fujiwara et al., 1991)
- (ii) Reakcijom izocijanida sa metalnim tiokarboksilatima: talijum(I)-tiobenzoat u hloroformu daje dobre prinose izotiocijanata (Tanaka et al., 1977)
- (iii) Reakcijom izocijanida sa disulfidima u prisustvu katalitičkih količina talijum(I)-soli. Dibenzoil-, diacetil- i tetraetiltiauramdisulfid u kombinaciji sa talijum(I)-acetatom daju dobre prinose alifatičnih i aromatičnih izotiocijanata, dok rastvarač nema značajniji uticaj na tok reakcije. Reakcija

se odvija jonskim mehanizmom, što je dokazano na taj način što hvatači slobodnih radikala nemaju uticaja na reakciju (Tanaka et al., 1977).



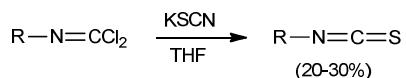
Šema 3.10. Sinteza izotiocijanata reakcijom izocijanida i elementarnog sumpora (gore), metalnih tiokarboksilata (u sredini) ili disulfida (dole).

– **Supstitucija halogenida tiocijanatnom (rodanidnom) kiselinom ili njenim solima (Šema 3.11).** Nukleofilna supstitucija reaktivnih organskih halogenida tiocijanatnim solima, npr. živa(II)- ili kalijum-rodanidom, daje tiocijanate i/ili izotiocijanate, u zavisnosti od prirode reaktanata i reakcionih uslova (Watanabe et al., 1974; Kitamura et al., 1990; Mukerjee & Ashare, 1991). Heteroaril-halogenidi ovom reakcijom daju tiocijanate. Međutim, 9-hlorakridini reaguju sa srebro- i olovo-tiocijanatom u polarnim rastvaračima i sa kalijum-tiocijanatom u DMF-u, pri čemu se dobijaju izotiocijanati sa dobrim prinosom (Kristian, 1961, 1970). Alkil- i aralkil-halogenidi generalno daju tiocijanate, koji spontano izomerizuju, u manjoj ili većoj meri, dajući odgovarajuće izotiocijanate. Izomerizacija je uslovljena prirodom supstituenta. Reakcioni uslovi, takođe, imaju značajnu ulogu. Tako, supstituisani benzil-izotiocijanati su dobijeni iz odgovarajućih halogenida sa prinosom od 50 – 66% refluktovanjem kalijum-tiocijanata u 1,2-dihlorbenzenu u prisustvu krunskih etara (Muthusamy & Ramakrishnan, 1989). Acil- i aroil-halogenidi daju odgovarajuće izotiocijanate direktno zagrevanjem sa metalnim tiocijanatima. 3-Tiofenil- (Smith & Kan, 1964), 2-furanoil- (Lipp et al., 1958) i nikotinil-izotiocijanati (Lipp et al., 1958) se dobijaju sa srednjim i dobrim prinosom u reakciji olovo-tiocijanata i odgovarajućih heteroaroil-hlorida.



Šema 3.11. Sinteza izotiocijanata nukleofilnom supstitucijom organskih halogenida rodanidnim jonom

Kondenzacija karboimidoil-dihlorida sa kalijum-tiocijanatom ili kalijum-tioacetatom u THF-u, takođe, daje odgovarajuće izotiocijanate (Šema 3.12). Nedostatak ove reakcije je mali prinos.



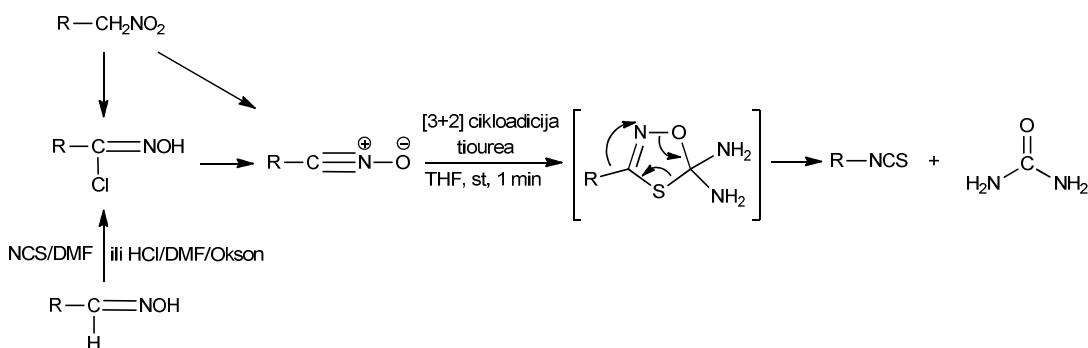
Šema 3.12. Sinteza izotiocijanata iz karboimidoil-dihlorida

– **Adicija HSCN na alkene (Šema 3.13; Cho & Posner, 1992).** Sekundarni alkil-izotiocijanati se mogu sintetisati adicijom tiocijanatne kiseline na polarizovanu dvogubu vezu (npr. 1*H*-inden sa prinosom od 70%) ili dvogubu C=C vezu pod torzionim naponom kod cikloalkena (npr. biciklo[2.2.1]hept-2-en, 92% i biciklo[2.2.1]hept-2,5-dien, 88%). Neaktivirani alkeni (npr. cikloheksen) nisu pogodan supstrat za adiciju cijanatne kiseline (Galat & Elion, 1939; Mukaiyama & Taguchi, 1970; Mukaiyama et al., 1971).



Šema 3.13. Sinteza izotiocijanata adicijom tiocijanatne kiseline na alilnu (slabu) dvogubu vezu alkena

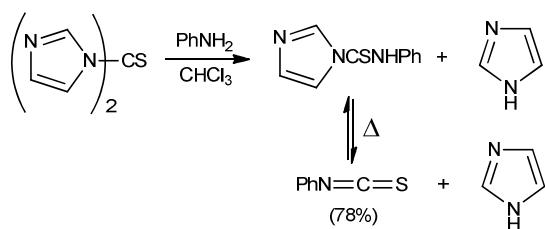
– **Reakcija nitril-oksida sa tiokarbonilnim jedinjenjima.** Reakcijom nitril-oksida sa jedinjenjima koja sadrže C=S vezu (tioaldehidi, tioketoni, tioamidi, tioneoestri, tionokarbonati, tioketeni, sulfonil-izotiocijanati, ugljen-disulfid i tiourea), takođe, nastaju izotiocijanati (Huisgen & Mack, 1972; Dondoni et al., 1972; Battaglia et al., 1971; Friedrich & Zamkanei, 1979; Borsus et al., 1975; Foye & Kauffman, 1966; Huisgen et al., 1961; Dickore & Wegler, 1966; Raasch, 1970; Schaumann & Ruhter, 1985). U poređenju sa ostalim tiokarbonilnim reagensima kod kojih je neophodno zagrevanje u toku dužeg vremena, tiourea reaguje sa nitril-oksidom pod blagim reakcionim uslovima, na sobnoj temperaturi i za veoma kratko vreme od svega jednog minuta je reakcija kvantitativna. Reakcija nitril-oksida sa tioureom, odnosno hidroksimoil-hlorida (Kim & Ryu, 1993), primarnih nitroalkana (Kim et al., 1994) i aldoksima (Kim et al., 1997) kao prekursora nitril-oksida, predstavljena je na Šemi 3.14.



Šema 3.14. Sinteza izotiocijanata reakcijom nitril-oksida i tiouree, odnosno hidroksimoil-hlorida, primarnih nitroalkana i aldoksima kao prekursora nitril-oksida

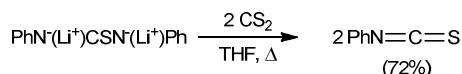
Razlaganje tiourea. Zagrevanjem u prisustvu nekih kiselina, *N,N'*-disupstituisane tiouree se razlažu dajući amine i izotiocijanate (Drobnica et al., 1977; Hartmann, 1983). Pirolizom acil-tiourea u *o*-dihlorbenzenu dobija se izotiocijanat kao glavni proizvod (Ljippa et al., 1979).

Pogodna metoda za sintezu izotiocijanata iz 1,1'-diimidazolil-tiouree data je na Šemi 3.15 (Staab & Walther, 1962). Ova metoda je primenljiva i za sintezu dialkilamino-izotiocijanata (Anthoni et al., 1966).



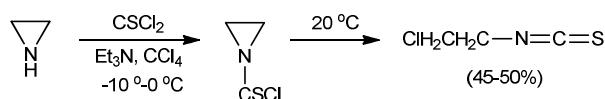
Šema 3.15. Sinteza izotiocijanata pirolizom 1,1'-diimidazoliltiouree

Sterozi zaklonjeni arilamini daju izotiocijanate sa visokim prinosom u reakciji njihovih tiourea sa fenil-izotiocijanatom (Habib & Rieker, 1984). U ovoj reakciji se fenil-izotiocijanat dodaje u višku da bi se oslobođeni anilin vezao u *N,N'*-difeniltioureu. Takođe je publikovana metoda za sintezu izotiocijanata iz tiourea korišćenjem 2,4-dihlor-5-nitropirimidina (Kondo et al., 1985). Tretiranjem metalovanih urea i tiourea ugljen-disulfidom ili 1,3-ditiolan-2-tionom dobijaju se izotiocijanati sa dobrim prinosima (Šema 3.16; Sakai et al., 1977).



Šema 3.16. Sinteza fenil-izotiocijanata reakcijom metalovane tiouree sa ugljen-disulfidom

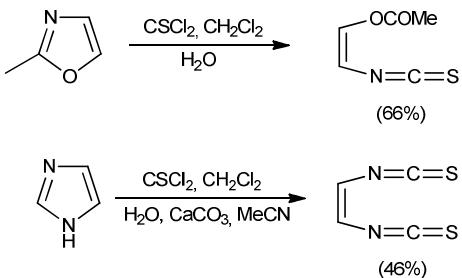
- **Otvaranje heterocikličnog prstena.** Reakcijom heterocikličnih jedinjenja i pojedinih reagenasa dolazi do otvaranja prstena i nastajanja izotiocijanata.
 - (i) *Reakcija heterocikličnih jedinjenja sa tiofogenom* (Šema 3.17). U reakciji tiofogena sa aziridinom dobija se 2-hloroetil-izotiocijanat sa prinosom od 45–50% (Tomalia, 1966).



Šema 3.17. Sinteza izotiocijanata u reakciji aziridina i tiofogena

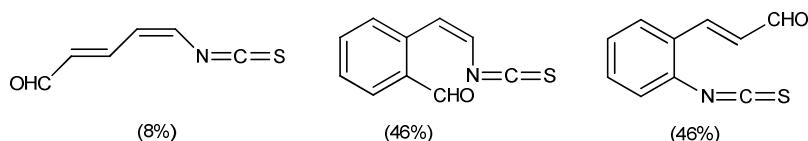
Adukti 2-metilosazola i imidazola sa tiofogenom podložni su hidrolitičkom raskidanju veze prstena pri čemu nastaju odgovarajući izotiocijanati (Šema 3.18; Faull & Hull, 1979; Gonda et al., 1987; Hull &

Seden, 1980). Benzoksazol i benzimidazol daju slične proizvode (Faull & Hull, 1979).



Šema 3.18. Sinteza izotiocijanata hidrolizom adukata 2-metiloksazola (gore) i imidazola (dole) sa tiofogenom

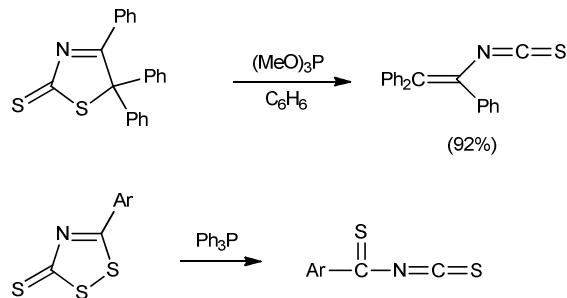
Reakcija piridina, hinolina i izohinolina sa tiofogenom, takođe, daje izotiocijanate (Šema 3.19; Boyle & Hull, 1974; Hull, 1968).



Šema 3.19. Izotiocijanati dobijeni reakcijom piridina, hinolina i izohinolina sa tiofogenom (s leva na desno)

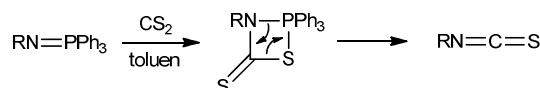
- (ii) *Reakcija sumpornih jedinjenja sa fosfornim reagensima.* Neka fosforna jedinjenja se mogu koristiti kao dehidrosulfurizacioni reagensi u sintezi izotiocijanata iz acikličnih i heterocikličnih sumpornih jedinjenja. Nedavno je upotrebljena kombinacija trifenilfosfina (Ph₃P) i ugljen-tetrahlorida u acetonitrilu za dehidrosulfurizaciju trietilamonijumskih soli strukturno različitih ditiokarbaminskih kiselina (Furukawa et al., 1988). Ova metoda je primenljiva na alkil- i aril-aminima kao i na estrima nekih amino kiselina, dok se ne može koristiti u sintezi izotiocijanata iz heterocikličnih amina.

Fotoliza ili tretiranje 3-tiazolin-2-tiona trimetoksifosfinom ((MeO)₃P) daje kao proizvod izotiocijanat sa odličnim prinosom (Šema 3.20 (gore); Hussein et al., 1978). Slična je reakcija ditiazolintiona sa PPh₃ pri čemu nastaju tioaroil-izotiocijanati (Šema 3.20 (dole); Goerdeler & Teller, 1972).



Šema 3.20. Sinteza izotiocijanata upotrebatim jedinjenja: reakcija 3-tiazolin-2-tiona sa trimetil-fosfinom (gore) i ditiazolintiona sa trifenil-fosfinom (dole)

Dok je prethodna reakcija primenljiva samo u nekoliko slučajeva, sinteza izotiocijanata cikloverzijom četvorčlanog prstena dobijenog u reakciji (*N*-alkil- i *N*-arilamino)fosforana sa ugljen-disulfidom ima opštiju primenu (Šema 3.21; Molina et al., 1982; Vegh & Kovac, 1981) i daje visoke prinose (75–96%).



Šema 3.21. Sinteza izotiocijanata reakcijom (*N*-alkil- i *N*-arilamino)fosforana sa ugljen-disulfidom

Ova reakcija je uspešno primenjena za sintezu 5-nitro-2-furilvinilen-izotiocijanata, potencijalnog antimikrobnog agensa (Vegh & Kovac, 1981).

Iako je utvrđeno da su svi pomenuti tiokarbonilni reagensi efikasni u formiranju izotiocijanata, upotrebatim većine pomenutih metoda dolazi do formiranja tiourea kao sporednih proizvoda u slučajevima manje reaktivnih amina. Neretko se dobijaju mali prinosi, koriste toksični reagensi (npr. tiofogen) i ili dobijaju nečisti proizvodi (teško izolovanje iz reakcione smeše). Da bi to izbeglo, razvijene su nove metode za sintezu kod kojih se koriste reagensi za desulfurilaciju ditiokarbamata čijom upotrebatim ne dolazi do nastajanja nepoželjnih tiourea, npr. uronijum- i fosfonijum-peptidni reagensi za kuplovanje (Boas & Jakobsen, 1995; Boas et al., 2004), trifenilfosfin-dibromid (Molina et al., 1982), tozil-hlorid (Jochims et al., 1967; Wong & Dolman, 2007), di-*terc*-butil-dikarbonat (Boc_2O) u prisustvu katalitičkih količina DMAP-a ili DABCO-a (Munch et al., 2008) itd.

Tabela 3.6. Neki sintetisani izotiocijanati i posebno dati prinosi tih reakcija

Izotiocijanat	Prinos		Literatura
	A	B	
Fenil-		Andreasch, 1906	
		Kaluza, 1912	
	65%	van der Kerk et al., 1973	
	81%	Hodgkins & Reeves, 1964	
	95%	Shibamura et al., 1977	
	82%	Sakai et al., 1975	
	100%	Tanaka et al., 1977	
Oktil-	99%	Kim & Ryu, 1993	
	72%	Wong & Dolman, 2007	
Heksil-	94%	Shibamura et al., 1977	
Cikloheksil-		Kaluza, 1909	
	96%	Tanaka et al., 1977	
	91%	Shibamura et al., 1977	
	90%	Sakai et al., 1975	
Metil-	95%	Fujiwara et al., 1991	
	77%	Wong & Dolman, 2007	
		Hofmann, 1880	
Etil-		Freund & Asbrand, 1895	
		Braun, 1902	
		Delépine, 1907, 1908	
		Kaluza, 1912	
		Worrall, 1928	
	95%	Fujiwara et al., 1991	
	68%	Kaluza, 1912	
<i>o</i> -Metilfenil-		Sakai et al., 1975	
	80%	Kaluza, 1912	
	77%	Hodgkins & Reeves, 1964	
	83%	Mesheram et al., 1997	
	91%	Sakai et al., 1975	
<i>m</i> -Metilfenil-	91%	Fujiwara et al., 1991	
	80%	Wong & Dolman, 2007	
	78%	Hodgkins & Reeves, 1964	
		Kaluza, 1912	
<i>p</i> -Metilfenil-	81%	Hodgkins & Reeves, 1964	
	87%	Sakai et al., 1975	
	91%	Fujiwara et al., 1991	
		Kaluza, 1912	
<i>o</i> -Metoksifenil-	72%	Hodgkins & Reeves, 1964	
	98%	Kim & Ryu, 1993	
	95%	Wong & Dolman, 2007	
<i>p</i> -Metoksifenil-	92%	Hodgkins & Reeves, 1964	
	94%	Fujiwara et al., 1991	
	99%	Kim & Ryu, 1993	
	97%	Wong & Dolman, 2007	
<i>p</i> -Cijanofenil-	0%	Hodgkins & Reeves, 1964	
<i>p</i> -Nitrofenil-	0%	Hodgkins & Reeves, 1964	
<i>p</i> -Hidroksifenil-	54%	Wong & Dolman, 2007	
<i>p</i> -Etoksifenil-	88%	Hodgkins & Reeves, 1964	
α -Naftil-		Kaluza, 1912	
	30%	Sakai et al., 1975	

Tabela 3.6. (Nastavak)

A	B	C
β -Naftil-	73% 40%	Kaluza, 1912 Hodgkins & Reeves, 1964 Sakai et al., 1975
Izoamil-	99%	Stieger, 1916
<i>o</i> -Hlorfenil-	99%	Kim & Ryu, 1993
<i>m</i> -Hlorfenil-	100%	Kim & Ryu, 1993
<i>p</i> -Hlorfenil-	65–68% 72–81% 34% 70% 100% 85%	van der Kerk et al., 1973 Dains et al., 1922 Dyson, 1941 Losanitsch, 1872 Connolly & Dyson, 1935 Wong & Dolman, 2007 Hodgkins & Reeves, 1964 Shibanuma et al., 1977 Fujiwara et al., 1991
<i>p</i> -fenilendiizotiocijanat	71%	van der Kerk et al., 1973
<i>p</i> -acetilaminofenil-	73%	van der Kerk et al., 1973
<i>p</i> -Etoksifenil-	64%	van der Kerk et al., 1973
<i>m</i> -Bromfenil-	65%	Wong & Dolman, 2007
<i>p</i> -Bromfenil-	55% 73% 77%	van der Kerk et al., 1973 Hodgkins & Reeves, 1964 Wong & Dolman, 2007
Fenil-	74–78% 85% 93%	Dains et al., 1941 Mesheram et al., 1997 Fujiwara et al., 1991
Izopropil-	80%	Hodgkins & Ettlinger, 1956 Sakai et al., 1975
Propil-	93%	Sakai et al., 1975
Izobutil-		Hodgkins & Ettlinger, 1956
Butil-	65–75% 85% 93% 93% 100%	Hodgkins & Ettlinger, 1956 Sakai et al., 1975 Fujiwara et al., 1991 Li et al., 1997 Tanaka et al., 1977
<i>sec</i> -Butil-	24% 83%	Sakai et al., 1975 Fujiwara et al., 1991
<i>terc</i> -Butil-	24% 81% 100% 98%	Sakai et al., 1975 Fujiwara et al., 1991 Tanaka et al., 1977 Kim & Ryu, 1993
<i>p</i> -(<i>N,N</i> -dimetilamino)fenil-	60%	Hodgkins & Reeves, 1964
1,6-Heksametilendiizotiocijanat	92%	Li et al., 1997
5-Izotiocijanato-1-pentanol	95%	Li et al., 1997
<i>p</i> -Hidroksifenil-	84%	Li et al., 1997
<i>p</i> -Hlorbenzil-	75%	Mesheram et al., 1997
<i>p</i> -Brombenzil-	97%	Wong & Dolman, 2007
α -Metilbenzil-	72%	Mesheram et al., 1997
Fenilen-1,2-diizotiocijanat	45%	Mesheram et al., 1997
Dodecil-	52%	Mesheram et al., 1997
Etil-2-izotiocijanato-3-fenilacetat	62%	Mesheram et al., 1997

Tabela 3.6. (*Nastavak*)

A	B	C
Etil-2-izotiocijanato-3-fenilpropanoat	65% 91%	Mesheram et al., 1997 Shibamura et al., 1977
Benzil-	98% 78%	Fujiwara et al., 1991 Wong & Dolman, 2007
Alil-	62%	Fujiwara et al., 1991
Metoksikarbonilmetyl-	71%	Fujiwara et al., 1991
2,6-Dimetilfenil-	81%	Fujiwara et al., 1991
4-Etoksibutil-	100%	Tanaka et al., 1977
2,6-Dihlorfenil-	100%	Kim & Ryu, 1993
2,4,6-Trimetilfenil-	100%	Kim & Ryu, 1993
p-Metoksibenzil-	96%	Wong & Dolman, 2007
Fenilpropil-	75%	Wong & Dolman, 2007

EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA

4.1.1. BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal korišćen za analizu sakupljen je u periodu maj 2006 – maj 2010. godine na teritoriji Srbije i Makedonije sa prirodnih staništa. Botanička identifikacija je izvršena prema dihotomnim ključevima “Flore SR Srbije”. Herbarski primerci deponovani su u herbariju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, Laboratorija za organsku analizu i sintezu i herbariju Odseka za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu pod rednim brojevima navedenim u Tabeli 4.1. Detaljne informacije o uzorcima (lokaliteti, staništa, vremena uzorkovanja i oznake vaučera) date su u Tabeli 4.2.

4.1.2. OBRADA BILJNOG MATERIJALA

Uzorci za izolovanje autolizata (ispitivane Brassicaceae vrste) obrađeni su u najkraćem mogućem vremenu, a najviše 6 h od uzorkovanja. Svi ostali uzorci su, nakon razdvajanja po organima, sušeni na vazduhu do konstantne mase, zatim usitnjeni i uskladišteni u papirnim vrećama do analize.

4.1.3. IZOLOVANJE ETARSKIH ULJA

Egarska ulja su izolovana hidrodestilacijom odmerene mase biljnog materijala u originalnom aparatu po Clevenger-u u toku 2,5 h. Dobijena etarska ulja su ekstrahovana dietil-etrom, a zatim su dobijeni ekstrakti sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata (Tabela 4.1). Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtriranjem i rastvarača destilacijom na rotacionom uparivaču na sobnoj temperaturi, etarska ulja su čuvana na 4 °C do analize.

4.1.4. AUTOLIZA GLUKOZINOLATA

4.1.4.1. Izolovanje proizvoda hidrolize (Radulović et al., 2008)

Autoliza glukozinolata prisutnih u tkivu vrsta porodice Brassicaceae je vršena na homogenizovanim uzorcima svežeg biljnog materijala (100 g uzorka), koji su pomešani s dovoljnom količinom destilovane vode kako bi se dobila polutečna konzistencija smeše (oko 250 ml). Prema modifikovanoj proceduri opisane od strane Vaughn-a i Berhow-a (2005), dietil-atar (100 ml) je dodat svakom uzorku, zatim je, nakon zatvaranja staklenih posuda, njihov sadržaj mešan na 200 obrtaja/min u toku 8 h na 25 °C. Nakon izvršene hidrolize je dodat natrijum-hlorid (60 g) i sadržaj je ponovo mešan. Etarski sloj je zatim odvojen od isoljenog vodenog sloja i biljnih ostataka i filtriran kroz Whatman No. 1 filter papir. Ostatak biljne mase je još tri puta ekstrahovan dietil-etrom.

Spojeni etarski ekstrakti su sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtracijom i rastvarača destilacijom na rotacionom uparivaču na 30 °C, ekstrakt je rastvoren u dietil-etu (10 ml) (Tabela 4.1).

4.1.4.2. Modifikovani postupak autolize glukozinolata

Modifikacija prethodnog postupka autolize glukozinolata izvršena je sa ciljem utvrđivanja mogućeg nastajanja artefakta (metil estar 4-izotiocijanatobutanske kiseline) u autolizatu *E. diffusum* u toku postupka izolovanja izotiocijanata/glukozinolata uz upotrebu vrućeg/ključalog metanola.

Modifikacija se sastoji u sledećem: sveži uzorak biljnog materijala (100 g) podeljen je na dva dela; jedan deo (50 g) biljnog materijala je, nakon homogenizacije, refluktovan u metanolu u toku 10 minuta; ekstrakt dobijen nakon uparavanja metanola na rotacionom vakuum uparivaču spojen je sa drugim, netretiranim delom biljnog materijala (50 g) koji služi kao izvor mirozinaze, pa je zatim izvršena autoliza prema prethodno opisanoj proceduri.

Tabela 4.1. Pripremljena etarska ulja i autolizati

Vaučer br.	Takson	Biljni delovi	Odvaga (g)	Prinos (mg)	Prinos (%, w/w)	Oznaka uzorka
VN100042	<i>Geranium macrorrhizum</i>	nad. delovi	1000	262	0,026	germ-n
		rizom	1500	180	0,018	germ-r
VN100037	<i>Geranium sanguineum</i>	cela biljka	508	50	0,010	gers-c
VN100041	<i>Geranium robertianum</i>	nad. delovi	1450	876	0,006	gerr-n
		koren	125	52	0,042	gerr-k
MD0206	<i>Geranium columbinum</i>	nad.delovi	680	72	0,011	gerc-n
		koren	402	357	0,089	gerc-k
MD0306	<i>Geranium lucidum</i>	cela biljka	464	134	0,029	gerl-c
MD0406	<i>Geranium purpureum</i>	cela biljka	153	36	0,024	gerp-c
MD0506	<i>Geranium phaeum</i>	nad.delovi	240	22	0,010	gerph-n1
MD0407	<i>Geranium phaeum</i>	nad.delovi	212	30	0,014	gerph-n2
		rizom	494	30	0,006	gerph-r2
3410	<i>Erodium cicutarium</i>	cela biljka	500	70	0,014	eroct-c1
3411	<i>Erodium ciconium</i>	cela biljka	300	182	0,061	erocn-c
3412	<i>Erodium absinthioides</i>	cela biljka	600	122	0,020	eroab-c
MD0106	<i>Erodium cicutarium</i>	cela biljka	250	25	0,010	eroct-c2
MD0108	<i>Erodium cicutarium</i>	nad. delovi bez cveta	250	27	0,011	eroct-n3
		koren	300	-	-	eroct-k3
MD0107	<i>Hornungia petraea</i>	cela biljka	80	65	0,081	horp-c1
MD0207	<i>Hornungia petraea</i>	cela biljka	125	70	0,056	horp-c2
MD0307	<i>Erysimum diffusum</i>	cela biljka	50	30	0,060	eryd-c1
MD0110	<i>Erysimum diffusum</i>	nad.delovi	67,50	54	0,080	eryd-n2
		koren	100	50	0,050	eryd-k2

Tabela 4.2. Podaci o uzorcima ispitivanih vrsta

Familija	Takson	Lokalitet	Stanište	Datum	Vaučer br.
Geraniaceae	<i>Geranium macrorrhizum</i>	planina Vlasina	senovita, kamenita mesta pored puta	20.09.2007.	VN100042
Geraniaceae	<i>Geranium sanguineum</i>	Suva Planina	planinska livada, na obodu šume	01.07.2006.	VN100037
Geraniaceae	<i>Geranium robertianum</i>	Suva Planina	šuma	24.05.2006.	VN100041
Geraniaceae	<i>Geranium columbinum</i>	Ploče, obronci Suve planine	sunčana, kamenita mesta pored puta	05.06.2006.	MD0206
Geraniaceae	<i>Geranium lucidum</i>	Dolac, Bela Palanka	kamenjar pored pruge	05.06.2006.	MD0306
Geraniaceae	<i>Geranium purpureum</i>	Dolac, Bela Palanka	kamenjar pored pruge	05.06.2006.	MD0406
Geraniaceae	<i>Geranium phaeum</i>	Ploče, obronci Suve planine	šuma	12.06.2006.	MD0506
Geraniaceae	<i>Geranium phaeum</i>	Ploče, obronci Suve planine	šuma	09.06.2007.	MD0407
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	Ploče, obronci Suve planine	kamenita mesta pored puta	18.05.2008.	3410
Geraniaceae	<i>Erodium ciconium</i>	Malošiće, Niš	ruderálna staništa, pored puta	20.05.2008.	3411
Geraniaceae	<i>Erodium absinthoides</i>	Planina Krstač, Makedonija	kamenita mesta pored puta	15.05.2008.	3412
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	Ploče, obronci Suve planine	sunčana, kamenita mesta pored puta	05.06.2006.	MD0106
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	Mramorsko Brdo, Niš	sunčana, kamenita mesta pored puta	10.06.2008.	MD0108
Brassicaceae	<i>Hornungia petraea</i>	klisura Prizrenске Bistrice, Prizren	kamenjari, krečnjak	23.03.2007.	MD0107
Brassicaceae	<i>Hornungia petraea</i>	Stara Planina	stenovita, kamenita mesta	12.04.2007.	MD0207
Brassicaceae	<i>Erysimum diffusum</i>	Dolac, Bela Palanka	ruderálna staništa, pored puta	05.05.2007.	MD0307
Brassicaceae	<i>Erysimum diffusum</i>	Mramorsko Brdo, Niš	pored puta	05.05.2010.	MD0110

4.2. METODE RAZDVAJANJA I ANALIZE

4.2.1. NUKLEARNO-MAGNETNA REZONANTNA (NMR) SPEKTROSKOPIJA

NMR spektri sintetisanih jedinjenja snimani su na Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu, na Varian Gemini 200 spektrometru (^1H na 200 MHz i ^{13}C na 50,3 MHz), koristeći TMS kao interni standard za ^1H NMR i deuterohloroform (CDCl_3) za ^{13}C NMR. Dobijeni podaci su obrađeni u programu MestreNova (ver. 6.0.2-5475, Mestrelab Research, Španija).

4.2.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)

FTIR spektri (ATR-attenuated total reflectance) sintetisanih jedinjenja snimani su na instrumentu Thermo Nicolet, model 6700 (Waltham, SAD).

4.2.3. HROMATOGRAFIJA NA TANKOM SLOJU (TLC)

TLC je vršena na aluminijumskim pločama sa prethodno nanešenim slojem silika-gela 60 UV₂₅₄ (Merck, Nemačka). Kao eluent korišćena je smeša heksana i dietil-etra. Vizualizacija mrlja vršena je pomoću UV svetlosti (254 nm), odnosno 30%-tним rastvorom sumporne kiseline, a zatim zagrevanjem.

4.2.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA PRI SREDNJIM PRITISCIMA (MPLC)

Preparativna MPLC razdvajanja komponenata smeša vršena su na Büchi instrumentu (tip C 610, Büchi Labortechnik, Švajcarska), na silika-gelu 60 (>230 mesh-a) pri protoku mobilne faze od 2,5 ml/min (smeša heksan/dietil-etar) pod gradijentnim uslovima.

4.2.5. GASNA HROMATOGRAFIJA – MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS) I GASNA HROMATOGRAFIJA (GC)

4.2.5.1. Gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)

Gasno-hromatografska analiza etarskih ulja, autolizata i sintetisanih jedinjenja izvršena je na aparatu HP 6890N, na HP-5MS ili DB5 kapilarnoj koloni (5% fenilmethylsiloxan, 30m × 0,25 mm, debiljina filma 0,25 μm, Agilent Technologies, SAD), opremljenim FID detektorom. Kao noseći gas, korišćen je helijum, sa konstantnim protokom od 1 ml/min. Temperaturni uslovi: radna temperatura injektora i detektora 250 °C, odnosno 320 °C; linearni temperaturni program kolone u opsegu od 70 °C – 315 °C, sa temperaturnim povećanjem od 5 °C/min, a zatim izotermalno u trajanju od 10 minuta. Injektirano je 1 μl rastvora uzorka u etru (1 mg u 1 ml dietil-etra)

(1:100), u pulsnom “split” modu (40:1), pri protoku od 1,5 ml/min u prvih 30 sekundi, a zatim 1,0 ml/min do kraja analize. GC-FID analiza je rađena pod istim eksperimentalnim uslovima. Procentualni sastav pojedinih komponenata određen je na osnovu površina pikova, bez korišćenja korekcionih faktora. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV, sa akvizicijom u m/z opsegu 35–650 i skeniranjem na 0,32 s.

4.2.5.2. Identifikacija komponenata

Podaci su obrađeni pomoću MSD ChemStation softvera (ver. D.03.00.611, Agilent Technologies, SAD) u kombinaciji sa AMDIS (ver. 2.68) i NIST MS Search programskim paketom (ver. 2.0d, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST), SAD). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara, tj. ekstrakciju čistih masenih spektara iz prekloppljenih pikova, dok je NIST MS Search obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka određen je upoređivanjem linearnih retencionih indeksa pojedinih komponenata (Adams, 2007), izračunatih u odnosu na C₇ – C₃₅ alkane (van den Dool et al., 1963), sa literaturnim vrednostima, poređenjem masenih spektara sa spektrima poznatih jedinjenja iz biblioteka *Wiley Registry of Mass Spectral Data 6th Edition, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05, Mass Finder 2.3, Adams* (Adams, 2007) i lične MS biblioteke, kao i koinjektiranjem standardnih supstanci (alkani, nekoliko terpenoida i aromatičnih jedinjenja, sintetisana jedinjenja).

4.3. HEMIKALIJE I RASTVARAČI

Sve hemikalije koje su korišćene u radu (p.a. čistoće), 2-metoksibenzaldehid, 3-metoksibenzaldehid, benzil-amin, 4-metoksibenzil-amin, benzil-hlorid, anizol, 4-aminobutanska kiselina, metil-jodid, paraformaldehid, trifenilfosfin, *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid, hidroksilamin-hidrohlorid, trietyl-amin, ugljen-disulfid, olovo(II)-nitrat, kalijum-karbonat, natrijum-hidroksid, magnezijum-sulfat, cink (prah), natrijum-borhidrid, natrijum-hydrogenkarbonat, natrijum-cijanid, kalijum-rodanid i hlorovodonična kiselina, kao i rastvarači dietil-etar, *N,N*-dimetilmelanamid, dihlormetan, heksan, ugljen-tetrahlorid, etanol i benzen, nabavljeni su od kompanija Sigma Chemical Co. (St. Luis, SAD), Acros Organics (New Jersey, SAD), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Nemačka), Merck (Darmstadt, Nemačka), J. T. Baker (Deventer, Holandija), Supelco (Bellefonte, SAD), Centrohem (Stara Pazova, Srbija), Zorka (Šabac, Srbija) i Zdravljje (Leskovac, Srbija). Rastvarači su neposredno pre korišćenja predestilovani, dok su ostale hemikalije upotrebljene bez prethodnog prečišćavanja.

4.3. IZOLOVANJE I SINTEZA ODABRANIH JEDINJENJA

4.3.1. IZOLOVANJE GERMAKRONA

Germakron (**194**) je izolovan frakcionom kristalizacijom (na 4 °C) iz etarskog ulja (1,3 g) izolovanog iz nadzemnog dela *G. macrorrhizum*. Nakon filtriranja, dobijeni kristali su isprani apsolutnim etanolom i sušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi u toku 24 h, pri čemu je dobijeno 0,55 g germakrona u obliku belih kristala, T_f 54–56 °C, EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 175 (21), 136 (55), 135 (73), 121 (28), 107 (100), 91 (33), 79 (21), 67 (57), 53 (21), 41 (23); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2983, 2915 (aliciklične C–H vibracije), 2850, 1670 (C=O), 1658, 1437, 1368, 1269, 1253, 1176, 1130, 1067, 1001, 891, 856, 757, 681, 629. GC analizom je ustanovljeno da je izolovano jedinjenje dovoljno čisto za testiranje antimikrobne aktivnosti.

4.3.2. SINTEZA 4-IZOTIOCIJANATOBUTANSKE KISELINE

Suspendovano je 0,45 g 4-aminobutanske kiseline (**195**, 4,40 mmol) u 5 ml etanola i dodato je, uz mešanje, 3,34 g ugljen-disulfida (CS_2 ; 44 mmol) i 888 mg trietilamina (Et_3N ; 8,80 mmol). Neophodna količina destilovane vode (nekoliko kapi) je zatim dodata u reakcionu smešu do izbistirivanja rastvora (do potpunog rastvaranja jedinjenja **195**). Nakon mešanja, u toku 1 h, na sobnoj temperaturi, reakcionalna smeša je presipana u čašu sa 100 ml destilovane vode. Dobijenom rastvoru je, uz konstantno mešanje, dodat rastvor 1,5 g olovo(II)-nitrata u 10 ml destilovane vode. Nakon zagrevanja na 40 °C, dolazi do taloženja olovo-sulfida braon boje koja brzo prelazi u crnu. Reakcionalna smeša je zatim ohlađena na ledenom kupatilu, filtrirana kroz Büchner-ov levak i filtrat ekstrahovan 3 puta etrom. Nakon uparavanja etra na rotacionom uparivaču dobijeno je 90 mg žutog ulja 4-izotiocijanatobutanske kiseline (**196**, 14,3%). GC analizom je ustanovljeno da je uzorak dovoljno čist za potpunu spektralnu karakterizaciju. R_f (DB-5) 15,07 min, RI 1401 (maksimum pika); EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 145 [$\text{M}]^+$ (86,8), 128 (7,9), 127 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (82,5), 100 [$(\text{CH}_2)_3\text{NCS}]^+$ (5,4), 99 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^+$ (10,2), 98 (5,7), 88 (5,8), 87 [$\text{M} - \text{NCS}]^+$ (39,5), 86 [$(\text{CH}_2)_2\text{NCS}]^+$ (93,1), 85 [$\text{CH}_2=\text{CHNCS}]^+$ (38,2), 73 [$\text{M} - \text{CH}_2\text{NCS}]^+$ (7,1), 72 [$\text{CH}_2\text{NCS}]^+$ (100,0), 71 (6,6), 70 (5,9), 69 (7,2), 61 (2,6), 60 [$\text{M} - \text{CH}_2=\text{CHNCS}]^+$ (65,1), 59 [$\text{M} - (\text{CH}_2)_2\text{NCS}]^+$ [$\text{HNCS}]^+$ (23,9), 58 [$\text{NCS}]^+$ (10,4), 57 (3,3), 55 (4,4), 46 [$\text{NS}]^+$ (3,4), 45 [$\text{HCS}]^+$ [$\text{M} - (\text{CH}_2)_3\text{NCS}]^+$ (77,1), 44 [$\text{CS}]^+$ (8,0), 43 (24,8), 42 (16,2), 41 (53,6), 40 (7,9), 39 (30,8), 38 (4,2); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2936 (C–H), 2181–2098 (NCS), 1703 (C=O), 1412, 1346, 1252, 1210, 1171, 1068, 917 (NCS), 787, 634; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 1,85 (qui, 2H, 3-H), 2,35 (t, 2H, 2-H), 3,66 (t, 2H, 4-H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 25,0 (C-3), 30,7 (C-2), 44,4 (C-4), 128,5 ($\underline{\text{NCS}}$), 173,6 ($\underline{\text{COOH}}$).

4.3.3. SINTEZA BENZIL-IZOTIOCIJANATA, TIOCIJANATA I NITRILA

Opšta procedura za sintezu metoksibenzaldehida 159a–b (Leardini et al., 2001)

Odgovarajući hidroksibenzaldehid (7,52 g; 59,7 mmol) je dodat suspenziji kalijum-karbonata (16,52 g; 120 mmol) u DMF-u (100 ml). Zatim je dodat metil-jodid (3,8 ml; 8,65 g; 61 mmol) i rastvor je mešan u toku 21 sata na sobnoj temperaturi. U reakcionu smešu je zatim sipana voda (100 ml) i ekstrahovana dietil-etrom (3×100 ml). Kombinovani organski ekstrakti su sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za dalje reakcije.

2-Metoksibenzaldehid (159a): bezbojna tečnost, 7,67 g (90%), R_t (DB5) 10,89 min, RI 1249; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 136 (100), 135 (55), 119 (32), 118 (33), 104 (24), 92 (28), 78 (27), 77 (66), 76 (35), 65 (26); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2939 (C–H), 2842 (C–H aldehida), 2020, 1985, 1685 (C=O vibracije arom. aldehida), 1598 (arom. C=C), 1513, 1466, 1394, 1285, 1242 (ar. C–O–al. C), 1160, 1103, 1021 (ar. C–O–al. C), 833, 756, 647.

3-Metoksibenzaldehid (159b): bledo-žuta tečnost, 6,27 g (75%), R_t (DB5) 9,46 min, RI 1190; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 136 (100), 135 (96), 107 (35), 92 (19), 77 (40), 65 (22), 64 (14), 63 (19), 51 (12), 39 (15); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2836 (C–H aldehida), 2731, 2036, 1698 (C=O vibracije arom. aldehida), 1585 (ar. C=C), 1484, 1458, 1384, 1259 (ar. C–O–al. C), 1146, 1036 (ar. C–O–al. C), 928, 866, 771, 681, 646.

Opšta procedura za sintezu oksima benzaldehida 160a–b (Vukićević et al., 2006)

U tarioniku je usitnjeno 0,84 g (12,1 mmol) hidroksilamin-hidrohlorida, a zatim je u porcijama dodavan natrijum-hidroksid (0,49 g; 12,1 mmol) i aldehid (1,5 g, 11 mmol). Reakciona smeša je ostavljena da odstoji 12 h, a zatim je više puta ekstrahovana etrom. Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom, sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za dalje reakcije.

Smeša (*Z*- i (*E*)- izomera oksima 2-metoksibenzaldehida (160a): beli kristali, 1,5 g (90%), R_t (DB5) 13,11 i 14,93 min, RI 1339 i 1413; EIMS*, 70 eV, m/z (rel. int.): 133 (100), 132 (32), 105 (87), 104 (75), 103 (99), 90 (45), 78 (18), 75 (21), 63 (20), 39 (23); FTIR (ATR) cm^{-1} : 3400–2500 (široka traka, O–H), 1628 (C=N), 1599, 1495, 1463, 1437, 1303, 1252 (ar. C–O–al. C), 1021 (ar. C–O–al. C), 968, 744.

Smeša (*Z*- i (*E*)-oksima 3-metoksibenzaldehida (160b): bezbojna tečnost, 1,63 g (98%), R_t (DB5) 12,09 i 14,78 min, RI 1298 i 1407; EIMS*, 70 eV, m/z (rel. int.): 133 (100), 104 (9), 103 (72), 102 (12), 90 (46), 76 (12), 64 (13), 63 (19), 50 (9), 39 (11); FTIR

* EIMS spektri (*Z*- i (*E*)-izomera su identični.

(ATR) cm^{-1} : 3600–2700 (široka traka, O–H), 1628 (C=N), 1599, 1578, 1491, 1455, 1431, 1259 (ar. C–O–al. C), 1039 (ar. C–O–al. C), 861, 781, 686.

Opšta procedura za redukciju aldoksima do amina **161a–b** (Tsukinoki et al., 1998)

U smešu aldoksima (1,5 g; 9,9 mmol) i 5%-tnog rastvora natrijum-hidroksida (40 ml) na sobnoj temperaturi, u toku 10 minuta, dodat je cink u prahu (10 g). Nakon mešanja, u toku 22 sata, na sobnoj temperaturi, reakciona smeša je filtrirana i filtrat je ekstrahovan etrom (3×100 ml). Kombinovani organski ekstrakti su ekstrahovani 5%-tnim rastvorom hlorovodončne kiseline (3×50 ml). Spojenim kiselim vodenim ekstraktima je zatim dodat 5%-tni rastvor natrijum-hidroksida tako da pH vrednost bude oko 12. Zatim je dobijeni alkalni rastvor ekstrahovan etrom (3×100 ml). Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom (100 ml), sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za dalje reakcije.

2-Metoksibenzil-amin (161a): svetlo-žuta tečnost, 0,96 g (71%), R_t (DB5) 12,23 min, RI 1303; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 137 (63), 136 (100), 121 (61), 120 (50), 119 (24), 108 (25), 106 (32), 104 (38), 91 (28), 66 (28); FTIR (ATR) cm^{-1} : 3378 (NH₂), 3280 (NH₂), 2934 (C–H), 2836 (C–H), 1599 (NH₂), 1490, 1461, 1236 (ar. C–O–al. C), 1026 (ar. C–O–al. C), 887, 750.

3-Metoksibenzil-amin (161b): svetlo-žuta tečnost, 0,87 g (64%), R_t (DB5) 11,86 min, RI 1288; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 137 (58), 136 (100), 121 (17), 109 (24), 108 (16), 106 (42), 94 (25), 79 (19), 78 (17), 77 (30); FTIR (ATR) cm^{-1} : 3380 (NH₂), 3280 (NH₂), 2946 (C–H), 2836 (C–H), 1594 (NH₂), 1487, 1454, 1257 (ar. C–O–al. C), 1149 (C–N), 1038 (ar. C–O–al. C), 851, 777, 692.

Opšta procedura za sintezu izotiocijanata **162a–d** iz amina (Tsogoeva et al., 2005)

Benzil-amin (**161d**, 3,59 g; 33 mmol) ili odgovarajući metoksibenzil-amin je rastvoren u 40 ml suvog dihlormetana. Nakon hlađenja na -10 °C, u rastvor je dodato 12,5 ml ugljen-disulfida i 6,3 g DCC-a (30,6 mmol). Uz mešanje, reakciona smeša je ostavljena da u toku od 3 sata dostigne sobnu temperaturu, zatim je mešana narednih 5 sati, takođe, na sobnoj temperaturi. Nakon odvajanja nastale tiouree filtriranjem, rastvarač je uparen na rotacionom uparivaču. Ostatak je rastvoren u etru i rastvor ponovo filtriran, pri čemu je odvojena nova količina tiouree. Nakon koncentrovanja rastvora, prethodni postupak je ponavljan do dobijanja sirovog proizvoda. Čisti **162a–d** je dobijen nakon MPLC hromatografije. GC analizom je ustanovljeno da su prečišćena jedinjenja dovoljno čista za koinjektiranje i testiranje antimikrobne aktivnosti.

2-Metoksibenzil-izotiocijanat (162a): tamno-žuta tečnost, 0,81 g (69%), R_t (DB5) 18,44 min, RI 1563; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 179 (13), 122 (9), 121 (100), 93 (8), 92 (8), 91 (97), 78 (13), 77 (12), 65 (16), 51 (12); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2927, 2853, 2170

(N=C=S), 2071 (N=C=S), 1693, 1602 (ar. C=C), 1492, 1462, 1342, 1246 (ar. C–O–al. C), 1287, 1118, 1026 (ar. C–O–al. C), 750 (C–S), 671 (N=C=S). Ukupan prinos: 39,7%.

3-Metoksibenzil-izotiocijanat (162b): žuta tečnost, 0,76 g (67%), R_t (DB5) 19,18 min, RI 1595; EIMS, 70 eV, *m/z* (rel. int.): 179 (32), 122 (9), 121 (100), 91 (28), 78 (15), 77 (14), 65 (8), 63 (6), 51 (8), 39 (6); FTIR (ATR) cm⁻¹: 2929, 2852, 2202 (N=C=S), 2089 (N=C=S), 1692, 1601 (ar. C=C), 1490, 1452, 1336, 1261 (ar. C–O–al. C), 1150, 1039 (ar. C–O–al. C), 773 (C–S), 700 (N=C=S), 544. Ukupan prinos: 31,5%.

4-Metoksibenzil-izotiocijanat (162c): svetlo-žuta tečnost, 2,76 g (77%), R_t (DB5) 19,82 min, RI 1623; EIMS, 70 eV, *m/z* (rel. int.): 179 (9), 122 (8), 121 (100), 91 (6), 89 (3), 78 (11), 77 (11), 63 (3), 52 (3), 51 (5); FTIR (ATR) cm⁻¹: 3291, 2928, 2835, 2183 (N=C=S), 2075 (N=C=S), 1685, 1610 (ar. C=C), 1510, 1438, 1341, 1246 (ar. C–O–al. C), 1174, 1029 (ar. C–O–al. C), 815, 751, 668, 545. Ukupan prinos: 77% (polazno jedinjenje **161c**).

Benzil-izotiocijanat (162d): svetlo-žuta tečnost, 3,73 g (75%), R_t (DB5) 13,45 min, RI 1353; EIMS, 70 eV, *m/z* (rel. int.): 149 (23), 92 (7), 91 (100), 90 (2), 89 (6), 65 (15), 63 (6), 51 (5), 50 (3), 39 (5); FTIR (ATR) cm⁻¹: 3063 (ar. C–H), 3031 (ar. C–H), 2166 (N=C=S), 2067 (N=C=S), 1495, 1454, 1346, 1301, 1200, 1072 (C–N), 813, 696 (N=C=S), 573. Ukupan prinos: 75% (polazno jedinjenje **161d**).

Opšta procedura za sintezu benzilalkohola **163a–b** redukcijom odgovarajućih aldehida

U 30 ml apsolutnog etanola ohlađenog u ledenom kupatilu na 0 °C suspendovano je 5 g natrijum-borhidrida, a zatim je dodato 5 g (36,7 mmol) jedinjenja **159a–b**. Reakciona smeša je mešana u toku 90 minuta na 0 °C, a zatim prelivena u čašu sa 100 ml destilovane vode. Uz mešanje, u više porcija, dodato je pažljivo nekoliko mililitara 2 M rastvora hlorovodonične kiseline radi uklanjanja neizreagovanog hidrida. Reakciona smeša je zatim ekstrahovana etrom (3×100 ml). Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom, sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za dalje reakcije.

2-Metoksibenzil-alkohol (163a): bezbojna tečnost, 4,27 g (84%), R_t (DB5) 11,36 min, RI 1249; EIMS, 70 eV, *m/z* (rel. int.): 138 (100), 137 (30), 121 (28), 109 (42), 107 (48), 105 (70), 91 (45), 79 (25), 77 (79), 51 (29); FTIR (ATR) cm⁻¹: 3600–3100 (široka traka, O–H), 2937, 2836, 1602 (ar. C–C), 1491, 1460, 1337, 1287, 1237 (ar. C–O–al. C), 1115, 1027 (CH₂–OH), 750.

3-Metoksibenzil-alkohol (163b): bezbojna tečnost, 4,15 g (82%).

Opšta procedura za sintezu benzil-hlorida **165a–b** iz odgovarajućih benzil-alkohola Appel-ovom reakcijom (Calzada & Hooz, 1974)

Rastvoren je 2 g (14,5 mmol) jedinjenja **163a–b** u 13 ml ugljen-tetrahlorida. Ovom rastvoru je dodato 4,94 g (18,8 mmol) trifenilfosfina. Reakciona smeša je refluktovana u toku 1 časa, a zatim ohlađena na sobnu temperaturu. Nakon dodavanja 20 ml suvog pentana i mešanja još 5 minuta na sobnoj temperaturi, reakciona smeša je filtrirana. Filtrat (od istaloženog trifenilfosfin-oksida) je koncentrovan uparavanjem na rotacionom uparivaču. Dobijeni sirovi proizvod je prečišćen „dry-flesh“ hromatografijom, pri čemu je kao eluent korišćen heksan. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za dalje reakcije.

2-Metoksibenzil-hlorid (165a): bezbojna tečnost, 0,68 g (30%), R_t (DB5) 10,32 min, RI 1225; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 158 (11), 156 (33), 122 (9), 121 (100), 91 (92), 89 (8), 78 (15), 77 (18), 65 (11), 51 (14); FTIR (ATR) cm^{-1} : 1652, 1494, 1386, 1254 (ar. C–O–al. C), 1093, 1062, 865, 659.

3-Metoksibenzil-hlorid (165b): bezbojna tečnost, 0,96 g (36%), R_t (DB5) 10,77 min, RI 1244; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 158 (11), 156 (33), 122 (9), 121 (100), 91 (27), 89 (6), 78 (15), 77 (21), 63 (7), 51 (11); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2960, 2834, 1601 (ar. C=C), 1490, 1255 (ar. C–O–al. C), 1154, 1038 (ar. C–O–al. C), 966, 840, 708, 596.

Sinteza 4-metoksibenzil-hlorida (165c) iz anizola (Müller et al., 1951)

U 120 ml benzena rastvoren je 21,63 g (0,2 mol) anizola. Uz mešanje, rastvor je ohlađen u ledenom kupatilu na 10 °C, pa je zatim zasićen suvim hlorovodonikom. Posle toga, u smešu koja se i dalje meša i u koju se i dalje uvodi suvi hlorovodonik, dodato je 7,81 g (0,26 mol) paraformaldehida tako da se temperatura ne povisi preko 30 °C. Oko sat vremena nakon dodavanja paraformaldehida i uvođenja hlorovodonika, rastvor je dekantovan od nastale male količine taloga, a benzenski sloj je ispran ledenom vodom, ohlađenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata, sušen preko magnezijum-sulfata, ponovo filtriran i koncentrovan na rotacionom uparivaču. Prečišćavanjem 17,34 g sirovog proizvoda „dry-flesh“ hromatografijom dobijeno je 7,04 g jedinjenja **165c** (23%), bezbojna tečnost, R_t (DB5) 11,22 min, RI 1262; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 158 (5), 156 (16), 122 (9), 121 (100), 91 (7), 89 (4), 78 (11), 77 (14), 52 (4), 51 (7); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2958, 2836, 2160, 1610 (ar. C=C), 1512, 1463, 1303, 1243 (ar. C–O–al. C), 1174, 1109, 1030 (ar. C–O–al. C), 829, 730, 661. GC analizom je ustanovljeno da je sintetisano jedinjenje dovoljno čisto za dalje reakcije.

Opšta procedura za sintezu tiocijanata **166a–d** (Suzuki et al., 1979)

Rastvoren je 2 g (15,8 mmol) benzil-hlorida (**165d**) ili odgovarajućeg hlorida **165a–c** i 31,5 g kalijum-rodanida (0,32 mol) u 150 ml DMF. Nakon mešanja u toku 4 časa na sobnoj temperaturi, reakciona smeša je pomešana sa 300 ml vode i ekstrahovana etrom (3×50 ml). Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom, sušeni preko

anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za koinjektiranje i testiranje antimikrobne aktivnosti.

2-Metoksibenzil-tiocijanat (166a): žuta tečnost, 0,24 g (84%), R_t (DB5) 17,82 min, RI 1536; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 179 (9), 122 (9), 121 (100), 93 (10), 92 (8), 91 (98), 78 (14), 77 (9), 65 (14), 51 (9); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2941, 2637, 2366, 2149 ($\text{SC}\equiv\text{N}$), 1600 (ar. C=C), 1492, 1462, 1438, 1291, 1247 (ar. C–O–al. C), 1180, 1107, 1025 (ar. C–O–al. C), 883, 853, 751, 641. Ukupan prinos: 19,1%.

3-Metoksibenzil-tiocijanat (166b): žuta tečnost, 0,22 g (98%), R_t (DB5) 18,81 min, RI 1579; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 179 (33), 121 (100), 91 (30), 89 (6), 78 (16), 77 (13), 65 (7), 63 (7), 51 (8), 39 (6); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2936, 2836, 2356, 2153 ($\text{SC}\equiv\text{N}$), 1600 (ar. C=C), 1489, 1453, 1435, 1265 (ar. C–O–al. C), 1153, 1037 (ar. C–O–al. C), 875, 782, 735, 700, 595, 568. Ukupan prinos: 21,7%.

4-Metoksibenzil-tiocijanat (166c): žuta tečnost, 2,02 g (82%), R_t (DB5) 19,41 min, RI 1605; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 135 (1), 121 (100), 107 (21), 94 (1), 79 (3), 77 (7), 69 (1), 64 (1), 51 (5), 41 (1); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2936, 2836, 2356, 2153 ($\text{SC}\equiv\text{N}$), 1600 (ar. C=C), 1489, 1453, 1435, 1265 (ar. C–O–al. C), 1153, 1037 (ar. C–O–al. C), 875, 782, 735, 700, 595, 568. Ukupan prinos: 18,9% (polazno jedinjenje **164**).

Benzil-tiocijanat (166d): beli kristali, 2,04 g (89%), R_t (DB5) 13,02 min, RI 1335; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 149 (3), 92 (8), 91 (100), 89 (4), 65 (15), 63 (6), 51 (4), 50 (2), 45 (2), 39 (7); FTIR (ATR) cm^{-1} : 3030 (ar. C–H), 2992, 2181 ($\text{SC}\equiv\text{N}$), 2050, 1598 (ar. C=C), 1492, 1454, 1426, 1243, 1203, 1159, 1074, 1027, 918, 804, 767–565 (ar. C–H i ar. C–C monosupstituisanog ar. jezgra). Ukupan prinos: 89% (polazno jedinjenje **165d**).

Opšta procedura za sintezu nitrila **167a–d** iz odgovarajućih benzil-hlorida (Adams & Thal, 1922)

Zagrevanjem na vodenom kupatilu, natrijum-cijanid (2,6 g; 53 mmol) je rastvoren u 3 ml vode. Nakon rastvaranja, dodavan je rastvor 4,4 g (34,8 mmol) benzil-hlorida (**165d**) u 4 ml etanola u toku 30 minuta uz refluks. Reakciona smeša je refluktovana još 3,5 sata, zatim je ohlađena na sobnu temperaturu i filtrirana, a talog ispran sa malo etanola. Etanol je uparen na rotacionom uparivaču, a ostatak je ekstrahovan etrom (3×50 ml). Kombinovani organski ekstrakti su sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani na rotacionom uparivaču. Nakon prečišćavanja jedinjenja „dry-flesh“ hromatografijom, GC analizom je ustanovljeno da su sintetisana jedinjenja dovoljno čista za koinjektiranje i testiranje antimikrobne aktivnosti.

2-Metoksifenilacetonitril (167a): žuta tečnost, 310 mg (67%), R_t (DB5) 13,26 min, RI 1345; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 147 (100), 132 (60), 116 (19), 107 (56), 104 (27), 91 (23), 89 (14), 78 (14), 77 (47), 51 (19); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2939, 2837, 2249 ($\text{C}\equiv\text{N}$),

1600 (ar. C=C), 1591, 1495, 1463, 1412, 1291, 1247 (ar. C–O–al. C), 1163, 1108, 1026 (ar. C–O–al. C), 751, 567. Ukupan prinos: 15,2%.

3-Metoksifenil-acetonitril (**167b**): žuta tečnost, 277,5 mg (69%), R_t (DB5) 14,02 min, RI 1376; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 147 (100), 146 (19), 132 (27), 117 (22), 116 (24), 104 (20), 90 (17), 77 (66), 63 (17), 51 (17); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2940, 2837, 2354, 2251(C≡N), 1683, 1601 (ar. C=C), 1489, 1455, 1414, 1284, 1259 (ar. C–O–al. C), 1148, 1108, 1039 (ar. C–O–al. C), 879, 778, 742, 690, 544. Ukupan prinos: 15,3%.

4-Metoksifenil-acetonitril (**167c**): žuta tečnost, 450 mg (58%), R_t (DB5) 14,45 min, RI 1393; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 147 (100), 146 (44), 132 (36), 116 (21), 107 (21), 104 (16), 91 (11), 78 (10), 77 (38), 51 (12); FTIR (ATR) cm^{-1} : 3002, 2936, 2837, 2250 (C≡N), 1612 (ar. C=C), 1510, 1463, 1416, 1303, 1245 (ar. C–O–al. C), 1178, 1109, 1029 (ar. C–O–al. C), 906, 810, 755, 705, 580. Ukupan prinos: 19,5% (polazno jedinjenje **164**).

Fenil-acetonitril (**167d**): žuta tečnost, 3,45 g (85%), R_t (DB5) 7,89 min, RI 1126; EIMS, 70 eV, m/z (rel. int.): 117 (100), 118 (9), 116 (42), 91 (9), 90 (47), 89 (29), 63 (12), 51 (13), 50 (9), 39 (9); FTIR (ATR) cm^{-1} : 2940, 2837, 2354, 2250 (C≡N), 1600 (ar. C=C), 1493, 1463, 1416, 1292, 1249, 1180, 1108, 1026, 832, 752, 696, 642, 593. Ukupan prinos: 85% (polazno jedinjenje **165d**).

4.4. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

4.4.1. KORIŠĆENI MIKROORGANIZMI

Za određivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, izolovanih i sintetisanih jedinjenja korišćeno je jedanaest Gram-pozitivnih, takođe, jedanaest Gram-negativnih sojeva bakterija i 6 fudgalnih mikroorganizama (Tabela 4.3.). Plesni *Aspergillus restrictus*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* i *Penicillium chrysogenum* izolovani su iz prašine dušeka, identifikovane od strane dr B. Rankovića, sa Odseka za biologiju, Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu, i gajene na podlozi krompir-dekstrozni agar (PDA). Klinički izolati bakterija su nabavljeni iz Instituta za javno zdravlje u Kragujevcu i Instituta za javno zdravlje u Nišu. Gram-negativna bakterija *E. coli* 95 nabavljena je iz Instituta za imunologiju i virologiju "Torlak" iz Beograda.

Tabela 4.3. Mikroorganizmi korišćeni za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Gram-pozitivne bakterije	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923, ATCC 6538, ATCC 27853, klinički izolat i izolat iz hrane
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus cereus</i>	izolat iz hrane
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341 i izolat iz hrane
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10240
Gram-negativne bakterije	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, ATCC 8739, Torlak 95, klinički izolat i izolat iz hrane
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031 i klinički izolat
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13076
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 i ATCC 25923
Gljivice	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
Plesni	
<i>Aspergillus restrictus</i>	izolat iz prašine dušeka
<i>Acremonium chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka
<i>Aspergillus fumigatus</i>	izolat iz prašine dušeka
<i>Penicillium chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka

4.4.2. TESTIRANJE IN VITRO ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Disk difuziona metoda. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja iz nadzemnih delova i rizoma vrste *G. macrorrhizum* i komponente izolovane iz ulja

nadzemnog dela ove vrste, germakrona, vršeno je disk difuzionom metodom na osnovu preporuka američkog Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2007). Postupak se sastoji u sledećem: suspenzija kultura ispitivanih mikroorganizama (100 ml; 10^8 ćelija/ml) je razlivena u Petrijeve šolje. Testirana je aktivnost čistih etarskih ulja i rastvora etarskih ulja u etanolu koncentracija 50, 25, 12,5 i 6,25% (v/v). Takođe je testirana aktivnost 33,3%-tnog i 20%-tnog (w/w) rastvora germakrona u etanolu. U Petrijeve šolje su stavljeni po četiri sterilna diska od sterilnog filter papira prečnika 6 mm, prethodno impregnirana sa 15 µl etarskog ulja, rastvora ispitivanog ulja ili rastvora germakrona. Kao pozitivna kontrola korišćeni su standardni antibiotski diskovi Amoksicilina za bakterije i Nistatina za gljivice, dok je rastvarač (etanol) korišćen kao negativna kontrola. Ovako pripremljene Petrijeve šolje termostatirane su u vremenu od 24 časa na 37 °C za bakterije i 48 časova na temperaturi od 28 °C za plesni i 30 °C za gljivice. Dobijeni rezultati predstavljaju zone inhibicije u mm uključujući prečnik (6 mm) papirnog diska. Testovi su ponavljeni pet puta.

Mikrodilucionna metoda. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vršeno je i mikrodilucionom metodom u bujonu (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) vršeno je metodom serije razblaženja u mikrotitarskim pločama sa 96 čašica. Bakterije su kultivisane na Mueller Hinton agaru (MHA) (37 °C), a gljivice na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA) (30 °C). Posle 18 časova kultivisanja, napravljena je bakterijska suspenzija u Mueller Hinton bujonu, pri čemu je turbidimetrijskom metodom broj mikroorganizama standardizovan na 0,5 jedinica na McFarland-ovoj skali. Konačna koncentracija bakterijskog i gljivičnog inokuluma je iznosila 5×10^5 CFU/ml. Apsorbancija svake od suspenzija je utvrđena spektrofotometrijski (UV/VIS 1610, Shimadzu, Japan). Suspenzije plesni su napravljene u Sabouraud dekstroznom agaru. Broj živih mikroorganizama je utvrđen korišćenjem hemocitometra (za bakterije) i "Thoma chamber" (za plesni). Fungalni inokulum je iznosio 1×10^4 CFU/ml.

Uzorci za testiranje (etarska ulja, izolovana i sintetisana jedinjenja) su pripremljeni rastvaranjem u 10%-tnom vodenom rastvoru dimetil-sulfoksida (DMSO) ili 70%-tnom etanolu (v/v; 4-izotiocianatobutanska kiselina, **196**). Početna koncentracija uzorka za testiranje iznosila je 20,0 mg/ml (etarska ulja *Erodium* vrsta, etarska ulja vrsta *G. macrorrhizum*, *G. sanguineum* i *G. robertianum*), 14,0 mg/ml (ulje iz nadzemnog dela *G. columbinum*), 12,0 mg/ml (ulje iz podzemnih delova *G. columbinum*), 13,4 mg/ml (etarsko ulje vrste *G. lucidum*), 10,0 mg/ml (4-izotiocianatobutanska kiselina, **196**). Napravljena je serija razblaženja osnovnih rastvora, razblaživanjem u odnosu 1:1 (za svaki uzorak ukupno 10 razblaženja; u slučaju etarskog ulja *G. macrorrhizum* i Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis* pripremljena je dodatna serija razblaženja). Mikrotitarske ploče su, nakon dodavanja inokuluma u čašice ploče, inkubirane na 37 °C u toku 24 časa (bakterije), 30 °C (gljivice) ili 28 °C (plesni) u toku 48 časa. Bakterijski rast je vizualizovan dodavanjem

20 ml 0,5%-tnog vodenog rastvora 2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorida (TTC). Amoksicilin, Hloramfenikol, Tetraciklin i Nistatin su korišćeni kao pozitivna, a odgovarajući rastvarači kao negativna kontrola (rezultati kontrola su uključeni u Tabele 5.3–5.7). MIC je definisan kao najniža koncentracija ispitivanog uzorka koja sprečava vidljiv rast mikroorganizma (crveno obojenje na dnu čašica nakon dodavanja TTC), dok minimalna baktericidalna/ fungicidalna koncentracija (MBC) označava najnižu koncentraciju koja ubija 99,9% ćelija. Prilikom određivanja MBC/MFC, bujon je uzet iz svih čašica bez vidljivog rasta i inokuliran na MHA u toku 24 časa na 37 °C za bakterije ili na SDA u toku 48 časa na 30 °C (gljivice) ili 28 °C (plesni). Testovi su ponavljani četiri puta.

4.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Jednostrana analiza varijance (ANOVA) korišćena je za statističku obradu dobijenih podataka i utvrđivanja značajnosti razlike između srednjih vrednosti. U svim statističkim analizama, interval poverenja bio je 95%.

REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. FITOHEMIJSKO ISPITIVANJE I MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH VRSTA IZ FAMILIJE GERANIACEAE

5.1.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA I HEMOTAKSONOMIJA

Ispitivanje hemijskog sastava isparljivih sekundarnih metabolita izolovanih iz *Geranium* i *Erodium* vrsta vršeno je metodom kapilarne gasne hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom.

Identifikacija je vršena poređenjem masenih spektara GC razdvojenih sastojaka smeše sa spektrima poznatih jedinjenja iz biblioteka masenih spektara. Međutim, vrlo često na ovaj način nije bilo moguće jednoznačno izvršiti identifikaciju jedinjenja,^{*} pa je iz tog razloga identitet jedinjenja potvrđen korišćenjem ortogonalne tehnike – poređenjem linearnih retencionih indeksa (RI)[†] sa literaturnim podacima (Adams, 2007) i u pojedinim slučajevima, GC koinjektiranjem čistih, standardnih supstanci.

Kompleksnost etarskih ulja često onemogućava potpuno razdvajanje komponenata smeše, tj. dolazi do preklapanja pikova u hromatogramu. U tim slučajevima je za uspešnu identifikaciju komponenata korišćena dekonvolucija masenih spektara, tj. “ekstrakcija” čistih masenih spektara iz prekloprenih pikova korišćenjem programskog paketa AMDIS.

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava etarskih ulja *Geranium* i *Erodium* vrsta dati su u Tabelama 5.1. i 5.2. U drugom delu tabela, ispod prikaza identifikovanih komponenti, iste su objedinjene u okviru grupa (i) terpenoidi (TER), (ii) masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (FAD), (iii) jedinjenja nastala razgradnjom karotenoida (CDC) i (iv) grupe neklasifikovanih konstituenata uključujući komponente mogućeg antropogenog porekla (OTH). Ukupni jonski hromatogrami ispitivanih etarskih ulja dati su u Prilogu (9.1, 9.2, 9.6–9.19).

^{*} Ovo je naročito slučaj kod mono- i seskviterpena – molekulska premeštanja (često analogna reakcijama koje se javljaju pri biosintezi) i gubitak čitavih fragmenata dovodi do interkonverzije različitih terpenoida, što rezultuje vrlo sličnim ili identičnim spektrima. Takođe, često se dešava da maseni spektri ne pružaju dovoljno informacija za razlikovanje položajnih izomera.

[†] Retencioni indeksi omogućavaju poređenje retencije jedinjenja analiziranih pri različitim uslovima (različite dimenzije kolone, protoci, temperaturni programi), pod uslovom da je stacionarna faza ista (Van den Dool & Kratz, 1963)

Tabela 5.1. Hemijski sastav etarskih ulja ispitivanih *Geranium* vrsta

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
889	2,5-Dietilfuran	FAD	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
900	Nonan	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
901	(Z)-4-Heptenal	FAD	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	RI,MS
901	Pentanska kiselina	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
902	Heptanal	FAD	t	t	t	t	t	0,2	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
908	Metional (=3-Metiltiopropanal)	OTH	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
911	(E,E)-2,4-Heksadienal	FAD	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
912	Tiglična kiselina	TER	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
914	2-Acetilfuran	FAD	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
920	(Z)-3-Heksenil-formijat	FAD	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
926	Triciklen	TER	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
929	α -Tujen	TER	0,1	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
931	2,5-Dimetilpiridin	OTH	-	-	-	-	-	t	-	-	t	-	-	-	RI,MS
936	4-Metilpentanska kiselina	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
937	α -Pinen	TER	0,2	t	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
946	2,3-Dimetilpiridin	OTH	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
952	5,5-Dimetil-2(5H)-furanon	OTH	-	-	-	0,1	-	-	-	-	t	-	-	-	RI,MS
952	6-Metil-2-heptanon	FAD	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI,MS
953	Kamfen	TER	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
954	(E)-2-Heptenal	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
963	5-Metilfurfural	OTH	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
964	Benzaldehid	OTH	t	t	0,2	0,4	-	t	-	t	-	t	1,2	0,9	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1012	(E,E)-2,4-Heptadienal	FAD	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	RI,MS
1014	(E)-2-Heksenska kiselina	FAD	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1014	Δ^3 -Karen	TER	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1019	α -Terpinen	TER	0,3	t	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1020	3-Etil-4-metil-1-pentanol	OTH	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,5	RI,MS
1023	p-Metilanizol	OTH	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1027	p-Cimen	TER	0,4	t	t	0,1	-	t	-	0,2	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1031	Limonen	TER	0,4	t	t	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1033	β -Felandren	TER	t	t	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1034	1,8-Cineol	TER	t	-	t	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1035	Benzil-alkohol	OTH	t	t	0,1	0,4	-	0,3	t	-	-	t	0,3	3,6	RI,MS,Co-GC
1036	(Z)- β -Ocimen	TER	0,2	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1038	(E)-3-Okten-2-on	FAD	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1043	Lavender lakton	TER/CDC	-	-	-	0,2	-	t	-	0,3	-	-	-	-	RI,MS
1044	3-Metilbutil-butanoat	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1046	Fenilacetaldehid	OTH	-	t	7,1	1,7	-	0,4	-	t	-	t	2,2	4,8	RI,MS,Co-GC
1047	(E)- β -Ocimen	TER	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1050	4-Oksopentanska kiselna	FAD	-	-	-	-	-	t	-	0,5	-	-	-	-	RI,MS
1058	(E)-2-Oktenal	FAD	-	-	0,2	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1060	γ -Terpinen	TER	1,4	t	t	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1066	(E)-2-Okten-1-ol	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1068	Heptanska kiselina	FAD	-	t	0,2	t	t	-	-	t	t	t	-	-	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1069	1-Oktanol	FAD	t	-	0,1	0,8	-	0,4	-	t	-	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1069	Acetofenon	OTH	-	-	-	-	-	t	-	0,3	-	t	0,4	0,3	RI,MS
1070	(E,Z)-3,5-Oktadien-2-on	FAD	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1072	2-Metilbenzaldehid	OTH	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1075	cis-Linalool-oksid (furanoidni obl.)	TER	0,1	0,3	1,7	0,6	-	-	-	-	0,3	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1078	Neidentifikovana komponenta ***	UIC	t	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1086	p-Tolualdehid	OTH	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1090	1-Undecen	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1092	trans-Linalool-oksid (furanoidni oblik)	TER	t	0,2	1,0	0,6	-	t	-	0,3	-	-	-	3,2	RI,MS,Co-GC
1092	2-Nonanon	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1093	Terpinolen	TER	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1093	p-Cimenen	TER	t	t	t	t	-	-	-	t	t	-	-	-	RI,MS
1095	Gvajakol	OTH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	RI,MS
1095	(E,E)-3,5-Oktadien-2-on	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1099	Rouz-furan	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1100	Undekan	FAD	t	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1100	α -Pinen epoksid (Izomer 1)	TER	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1100	Isopentil-2-metilbutanoat	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1101	Linalool	TER/CDC	0,9	0,1	2,7	1,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,2	RI,MS,Co-GC
1103	trans-Sabinen-hidrat	TER	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1104	5-Hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon	TER/CDC	-	-	-	-	t	-	-	-	t	t	-	-	RI,MS

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1228	Citronelol	TER/CDC	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1230	Benzotiazol	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1231	Nerol	TER	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1232	Timol-metil-etal	TER	t	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1233	Bornil-formijat	TER	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1234	<i>cis</i> -Karveol	TER	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1236	Karvakrol-metil-etal	TER	t	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1241	<i>cis</i> -p-Ment-2-en-7-ol	TER	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1241	Heksil-3-metilbutanoat	FAD	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1243	Neral	TER/CDC	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1245	Pulegon	TER	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1245	Kuminal	TER	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1247	<i>trans</i> -p-Ment-2-en-7-ol	TER	t	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1249	3-Metilbutil-heksanoat	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1249	Karvon	TER	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1250	Fenilsirćetna kiselina	OTH	-	-	-	0,9	-	0,3	-	t	t	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1253	<i>cis</i> -Mirtanol	TER	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1255	(E)-Geraniol	TER/CDC	0,1	-	1,6	t	-	-	-	-	-	-	-	1,3	RI,MS,Co-GC
1259	Piperiton	TER	-	-	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1263	(E)-2-Decenal	FAD	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1268	5-Pentil-2(3H)-furanon	FAD	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1270	Nonanska kiselina	FAD	-	-	0,3	0,8	t	0,6	t	0,3	0,3	t	-	-	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1374	1-Undekanol	FAD	-	-	-	t	-	t	-	-	t	-	-	-	RI,MS
1376	Farnezan**	TER	t	-	0,1	0,2	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1376	Butil-benzoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1377	α -Ilangen	TER	t	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1378	4-Metil-2-fenil-2-pentenal**	OTH	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1378	Metil-4-metoksibenzoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1381	α -Kopaen	TER	-	t	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1384	<i>tans</i> - <i>p</i> -Ment-6-en-2,8-diol	TER	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1386	(Z)-3-Heksenil-(Z)-3-heksenoat	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1388	Modhefen	TER	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1388	<i>trans</i> - β -Damaskenon	CDC	t	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1389	Benzil-2-metilbutanoat	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1391	β -Burbanen	TER	0,1	t	1,0	0,3	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1392	1-Tetradecen	FAD	-	-	-	-	-	t	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1393	1,5-di- <i>epi</i> - α -Burbanen	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1395	α -Izokomen	TER	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1395	2-Dodekanon	FAD	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1396	Benzil-3-metilbutanoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1396	β -Elemen	TER	0,6	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1400	Tetradekan	FAD	-	-	0,1	0,4	-	0,5	-	t	0,1	t	-	-	RI,MS,Co-GC
	1-(3,6,6-Trimetil-1,6,7,7 α -tetrahidrociklopenta[<i>c</i>]piran-1-il)etanon	OTH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	MS

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1487	α -Kurkumen	TER	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1487	Germakren D	TER	0,6	0,3	0,8	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	RI,MS,Co-GC
1490	2-Feniletil-2-metilbutanoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1491	cis-Eudesma-6,11-dien	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1491	Izoamil-fenilacetat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1491	(E)- β -Jonon	CDC	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	RI,MS,Co-GC
1491	(E)- β -Jonon-5,6-epoksid	CDC	-	-	-	t	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1492	1-Pentadecen	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1493	β -Selinien	TER	0,4	0,7	-	0,4	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1495	2-Feniletil-3-metilbutanoat	OTH	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1494	(2E)-5-Metil-2-fenil-2-heksenal	OTH	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1495	2-Tridekanon	FAD	t	-	0,1	0,1	t	t	-	-	t	t	0,2	-	RI,MS
1495	(3Z,6E)- α -Farnezen	TER/CDC	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1497	10,11-Epoksikalamenen	TER	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1497	δ -Selinien	TER	0,2	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1500	Pentadekan	FAD	t	-	t	0,7	t	0,6	-	t	0,3	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1498	α -Zingiberen	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1502	α -Selinien	TER	0,3	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1505	α -Muurolen	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1506	Acifilen	TER	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1510	(E,E)- α -Farnezen	TER/CDC	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1510	Tridekanal	FAD	t	-	t	t	t	0,4	-	t	-	t	t	-	RI,MS

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1547	Benzil-heksanoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1548	Selina-3,7(11)-dien	TER	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1549	α -Kalakoren	TER	t	0,6	0,1	t	-	t	-	-	-	t	-	-	RI,MS
1553	β -Vetivenen	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1556	5,5-Dimetil-4-(3-oksobutil)dihidro-2(3H)-furanon	OTH	-	-	-	0,2	-	-	-	t	t	-	-	-	MS
1556	Eremofila-1(10),11-dien-9 β -ol	TER	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1558	Kadina-1(10),6,8-trien	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
1559	Elemicin	OTH	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1563	Dodekanska kiselina	FAD	-	-	1,1	1,0	0,5	t	t	1,8	1,4	1,7	-	-	RI,MS,Co-GC
1564	Germakren B**	TER	11,3	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1565	(E)-Nerolidol	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1567	4 β H,5 α H-cis-Eudesm-6-en-11-ol	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1570	1-nor-Burbonan-1-on	FAD	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	t	-	-	RI,MS
1570	β -Kalakoren	TER	-	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1570	β -Bulnezen	TER	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1571	Tetrahidrofarnezol**	TER	-	-	0,2	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1574	(Z)-3-Heksenil-benzoat	OTH	t	-	t	t	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1576	1-Tridekanol	FAD	t	-	-	0,3	t	0,5	t	0,5	-	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1580	Heksil-benzoat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1580	6-Metil-5-(3-metilfenil)-2-heptanon	TER	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	MS

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1726	Metil-tetradekanoat	FAD	-	-	-	-	0,4	-	-	-	t	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1735	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	1,2	t	-	-	-	-	-	-	-	-
1742	Neidentifikovana komponenta***		2,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1746	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1747	(2E,6E)-Farnezal	TER	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1748	Oplopanon	TER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	RI,MS
1750	Eudesma-3,7(11)-dien-8-on	TER	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1766	Tetradeksanska kiselina	FAD	-	-	0,9	3,4	2,4	1,0	3,2	5,4	3,8	1,9	-	2,6	RI,MS,Co-GC
1769	Neidentifikovana komponenta***		1,7	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	Benzil-benzoat	OTH	t	-	0,3	0,4	-	0,3	t	0,8	0,6	0,2	-	-	RI,MS,Co-GC
1772	3-Metilheptadekan	FAD	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	RI,MS
1774	β -Bisabolenal	TER	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1776	14-Hidroksi- α -muurolen	TER	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1780	1-Pentadekanol	FAD	-	t	-	0,8	t	0,4	t	-	-	0,8	-	0,3	RI,MS
1782	Fenantren	OTH	t	-	0,1	t	t	-	-	0,7	0,7	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1785	(E)-3-Oktadecen	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1788	γ -Tridekalakton	FAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	RI,MS
1800	Oktadekan	FAD	t	-	t	0,4	t	t	t	-	1,1	0,1	0,2	-	RI,MS,Co-GC
1802	2-Heksadekanon	FAD	-	-	-	-	-	t	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1809	1-Tetradecil-acetat	FAD	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1810	Fitan**	TER	-	-	t	-	-	-	-	-	1,0	tr	-	-	RI,MS
1811	<i>trans</i> -6-Hidroksiizokalamenen	TER	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1817	Heksadekanal	FAD	t	t	0,1	-	t	1,0	-	t	-	0,5	tr	-	RI,MS,Co-GC
1819	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	Metil-pentadekanoat	FAD	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	RI,MS
1828	Izopropil-tetradekanoat	FAD	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1834	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	0,5	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1841	Neofitadien (izomer 1)	CDC/TER	-	-	t	0,3	-	t	-	-	-	t	0,2	-	RI,MS
1846	Heksahidrofarnezil-aceton	CDC	t	t	9,4	6,5	1,9	11,6	10,4	5,3	2,9	10,4	3,7	-	RI,MS
1860	2-Feniletil-benzoat	OTH	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1865	Pentadekanska kiselina	FAD	-	-	0,3	1,8	2,3	2,3	2,5	3,3	1,7	1,1	-	1,1	RI,MS,Co-GC
1866	Neofitadien (izomer 2)	CDC/TER	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1875	Benzil-salicilat	OTH	t	-	t	t	-	t	t	0,8	0,3	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1883	1-Heksadekanol	FAD	-	-	0,5	t	t	0,6	t	-	-	0,6	1,7	-	RI,MS,Co-GC
1884	Klovan-2,9-diol**	TER	-	-	-	1,2	-	-	-	0,2	-	-	-	-	MS
1895	γ -Tetradekalakton	FAD	-	-	t	-	t	t	t	t	0,5	-	-	-	RI,MS
1900	Nonadekan	FAD	t	-	t	0,7	t	3,2	t	t	1,8	0,3	-	-	RI,MS,Co-GC
1905	2-Heptadekanon	FAD	-	-	t	-	-	tr	-	-	-	t	-	-	RI,MS
1907	5-(4,8-Dimetilnonil)-5-metildihidro-2(3H)-furanon**	TER/CDC	-	-	t	0,4	-	t	-	t	-	-	-	-	MS
1913	2-Feniltridekan	OTH	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1920	2-Feniletil-fenilacetat	OTH	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1921	(E,E)-Farnezil-aceton	CDC/TER	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	RI,MS
1928	Metil-heksadekanoat	FAD	-	-	0,1	0,4	0,6	-	-	-	-	1,0	-	-	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
1929	2-Metilantracen	OTH	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	RI,MS
1941	Cikloheksadekanolid	FAD	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1951	Izofitol	CDC/TER/ HID	-	-	1,2	0,9	-	1,2	t	0,5	-	1,6	0,7	-	RI,MS
1956	8(14),15-Pimaradien	TER	t	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1961	Heksadekanska kiselina	FAD	t	t	9,6	16,6	45,3	17,6	60,8	32,3	33,5	36,1	3,2	55,2	RI,MS,Co-GC
1971	3-(4,8,12-Trimetiltridecil)furan (=Fitofuran) ^b	CDC	-	-	-	-	-	t	-	-	-	t	-	-	RI,MS
1995	1-Eikozen	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
1996	Etil-heksadekanoat	FAD	-	-	t	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
2000	Eikozan	FAD	t	t	0,4	0,7	t	1,1	t	t	2,2	0,4	0,1	-	RI,MS,Co-GC
2005	(E)-2-Eikozen	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2023	13- <i>epi</i> -Manoil-oksid	TER	t	-	-	1,1	1,5	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2023	Oktadekanal	FAD	-	-	0,1	t	-	t	-	-	-	-	t	-	RI,MS
2034	(E,E)-Geranillinalool	TER	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	RI,MS
2036	Metil-2-oksoheksadekanoat	FAD	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2063	Heptadekanska kiselina	FAD	-	-	t	0,3	0,6	t	t	0,5	1,9	-	-	-	RI,MS
2073	3-Metileikozan	FAD	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	RI,MS
2076	1-Oktadekanol	FAD	-	t	0,3	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
2080	1-Heneikozan	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2086	1-Oktadekanol	FAD	-	-	-	-	-	0,5	t	1,4	-	0,7	1,3	-	RI,MS,Co-GC
2100	Heneikozan	FAD	t	0,1	0,2	3,9	0,5	4,4	t	0,4	4,8	1,3	0,1	-	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.1. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	K	M	N	O	P
2104	Izooktil-dodekanoat	FAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	MS
2109	γ -Heksadekalakton	FAD	-	t	0,2	3,9	0,5	0,3	t	0,2	1,3	t	-	-	RI,MS
2118	(E)-Fitol	TER/CDC/ HID	t	-	2,6	1,9	-	t	-	-	-	-	25,9	-	RI,MS,Co-GC
2125	Nonadekanal	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2138	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienska kiselina (=Linolna kiselina)	FAD	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
2140	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	
2140	(Z)-9-Oktadecenska kiselina (=Oleinska kiselina)	FAD	-	-	-	0,6	0,6	0,6	t	0,9	-	-	-	8,6	RI,MS,Co-GC
2145	(Z,Z,Z)-9,12,15-Oktadekatrienska kiselina (=Linolenska kiselina)	FAD	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
2145	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	
2164	Oktadekanska kiselina	FAD	-	-	0,1	0,9	0,8	1,2	t	1,4	1,7	0,7	-	-	RI,MS,Co-GC
2183	1-Nonadekanol	FAD	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
2195	1-Dokozen	FAD	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2200	Dokozan	FAD	t	t	0,1	0,3	t	0,5	t	0,3	2,6	0,8	0,8	-	RI,MS,Co-GC
2224	Eikozanal	FAD	-	-	t	0,1	-	t	-	0,9	-	-	-	-	RI,MS
2261	4-Metildokozan	FAD	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2287	1-Eikozanol	FAD	-	-	-	t	t	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2294	1-Trikozen	FAD	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI,MS
2300	Trikozan	FAD	t	t	0,6	4,8	0,7	5,8	tr	2,1	3,8	3,4	1,4	-	RI,MS,Co-GC
2309	2-Heneikozanon	FAD	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	RI,MS

Tabela 5.1. (*nastavak*)

Tabela 5.1. (nastavak)

	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Grupisani sastoјci:												
Terpenoidi (TER)	88,2	90,7	25,0	26,7	1,5	6,6	t	12,5	0,3	2,6	31,8	8,7
Hemiterpenoidi	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpenoidi	9,9	5,0	14,2	10,5	t	0,8	t	8,4	0,2	0,4	0,8	8,7
Monoterpenski ugljovodonici	6,8	0,1	t	0,1	-	tr	-	2,2	t	t	-	-
Oksigenovani monoterpeni	3,1	4,9	14,2	10,4	t	0,8	t	6,2	0,2	0,4	0,8	8,7
Seskviterpenoidi	78,3	85,7	7,7	12,6	-	4,6	-	3,6	0,1	0,6	4,4	-
Seskviterpenski ugljovodonici	23,9	68,8	3,8	2,1	-	1,3	-	0,7	0,1	t	1,9	-
Oksigenovani seskviterpeni	54,4	16,9	3,9	10,5	-	3,3	-	2,9	-	0,6	2,5	-
Diterpenoidi	t	-	2,9	3,5	1,5	1,2	t	0,5	-	1,6	26,6	-
Diterpenski ugljovodonici	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksigenovani diterpeni	t	-	2,9	3,0	1,5	1,2	t	0,5	-	1,6	26,6	-
Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (FAD)	1,2	0,4	36,3	49,2	93,4	65,0	86,3	69,7	81,3	80,1	45,4	71,7
Jedinjenja nastala razgradnjom karotenoida (CDC)	t	t	19,8	8,3	1,9	12,1	10,4	5,5	4,9	11,4	6,9	-
Ostala jedinjenja (OTH)***	0,1	0,1	10,7	4,5	t	4,5	t	3,7	2,5	1,7	9,2	14,2
Identifikovano	89,5	91,2	91,8	88,6	96,8	88,2	96,7	91,4	89,0	95,8	93,3	94,6
Neidentifikovano (>0.1%)	8,2	6,3	2,5	7,2	1,2	-	-	-	3,2	0,4	-	-
Ukupno	97,7	97,5	94,3	95,8	98,0	88,2	96,7	91,4	92,2	96,2	93,3	94,6

*Srednja vrednost tri analize **Tačan izomer nije utvrđen. ***MS, 70eV, 230 °C, RI 1078, m/z (rel. int.): 93 (7), 92 (80), 91 (100), 77 (4), 65 (9), 59 (6), 51 (4), 43 (13), 41 (4), 39 (7); RI 1134, m/z (rel. int.): 93 (8), 92 (81), 91 (100), 79 (10), 77 (9), 65 (9), 59 (11), 51 (6), 43 (18), 39 (8); RI 1173, m/z (rel. int.): 109 (100), 108 (45), 93 (16), 83 (13), 81 (35), 79 (18), 67 (40), 55 (16), 41 (29), 39 (18); RI 1182, m/z (rel. int.): 109 (73), 108 (51), 93 (27), 85 (100), 81 (33), 79 (31), 67 (47), 55 (21), 41 (40), 39 (25); RI

Tabela 5.1. (nastavak)

1531, m/z (rel. int.): 180(27), 137(84), 125(28), 124(100), 81(23), 69(22), 55(76), 54(22), 41(25), 39(19); RI 1605, m/z (rel. int.): 220 (50), 187 (48), 161 (72), 121 (51), 119 (100), 107 (92), 105 (87), 93 (50), 91 (86), 43 (59); RI 1663, m/z (rel. int.): 121 (32), 107 (20), 95 (22), 93 (23), 79 (22), 70 (100), 68 (20), 67 (29), 42 (29), 41 (34); RI 1676, m/z (rel. int.): 136 (70), 135 (78), 121 (25), 108 (20), 107 (100), 105 (22), 91 (33), 79 (20), 67 (49), 41 (27); RI 1677, m/z (rel. int.): 85(40), 81(38), 71(59), 70(39), 69(53), 57(100), 56(49), 55(54), 43(72), 41(57); RI 1692, m/z (rel. int.): 109(31), 107(39), 96(100), 95(35), 81(58), 79(28), 67(44), 55(49), 43(66), 41(47); RI 1735, m/z (rel. int.): 111(46), 107(14), 93(18), 83(18), 82(15), 69(15), 67(21), 55(25), 49(100), 41(26); RI 1742, m/z (rel. int.): 218 (42), 121 (36), 109 (49), 96 (43), 93 (42), 91 (47), 79 (39), 68 (100), 67 (58), 41 (45); RI 1746, m/z (rel. int.): 109(46), 107(50), 95(67), 93(72), 91(48), 81(50), 79(54), 55(63), 43(100), 41(68); RI 1769, m/z (rel. int.): 138 (72), 137 (67), 123 (70), 119 (58), 109 (86), 105 (64), 91 (72), 81 (72), 67 (64), 41 (100); RI 1819, m/z (rel. int.): 127(80), 123(90), 109(95), 95(57), 93(44), 83(45), 81(86), 69(72), 55(100), 41(76); RI 1834, m/z (rel. int.): 185(53), 97(47), 83(40), 73(65), 69(50), 60(56), 57(100), 55(76), 43(75), 41(79); RI 2140, m/z (rel. int.): 99(13), 75(53), 71(74), 70(11), 69(13), 57(100), 56(13), 55(22), 43(62), 41(26); RI 2145, m/z (rel. int.): 111(18), 84(100), 97(28), 83(22), 71(21), 69(23), 57(28), 55(27), 43(34), 41(26).

**** Neklasifikovani konstituenti i konstituenti mogućeg antropogenog porekla. RI–Eksperimentalno određeni retencioni indeksi na HP-5MS koloni u odnosu na homologu seriju C₇–C₃₅ *n*-alkana. t– u tragovima (<0.05%). RI– upoređivanje eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima (Adams, 2007). MS– upoređivanje masenih spektara sa spektrima iz biblioteka. Co-GC– GC koinjektiranje standardnih supstanci. NMR– izolovanje i karakterizacija ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. HID– fitoli i izomeri fitola koji su najverovatnije nastali razgradnjom hlorofila u toku hidrodestilacije. - / nije detektovano.

Tabela 5.2. Hemski sastav etarskih ulja ispitivanih *Erodium* vrsta

RI _i	Jedinjenje	Klasa	<i>E. cicutarium</i> (cela biljka)	<i>E. ciconium</i> (cela biljka)	<i>E. absinthoides</i> (cela biljka)	<i>E. cicutarium</i> (cela biljka)	<i>E. cicutarium</i> (nad. delovi bez cveta)	Metoda identifikacije
			<i>erokt-c1</i>	<i>erocn-c</i>	<i>eroab-c</i>	<i>erokt-c2</i>	<i>erokt-n3</i>	
			%*					
A	B	C	D	E	F	G	H	I
752	Piridin	OTH	-	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
783	1-Heksen-3-on	FAD	-	-	0,1	-	-	RI,MS
800	Oktan	FAD	t	-	t	-	-	RI,MS,Co-GC
802	Heksanal	FAD	0,2	-	-	0,1	-	RI,MS,Co-GC
964	Benzaldehid	OTH	0,1	0,1	-	t	t	RI,MS,Co-GC
969	Heksanska kiselina	FAD	0,1	-	-	0,1	0,1	RI,MS,Co-GC
976	Fenol	OTH	-	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
976	1-Okten-3-on	FAD	-	-	0,7	-	-	RI,MS
993	2-Pentilfuran	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS
996	2,4,6-Trimetilpiridin	OTH	t	t	-	t	-	RI,MS
1000	Dekan	FAD	t	-	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1001	Oktanal	FAD	0,1	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1026	2-Etilheksanol	FAD	-	-	-	-	t	RI,MS
1028	p-Cimen	TER	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1033	β-Felandren	TER	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1035	Benzil-alkohol	OTH	t	t	-	t	t	RI,MS,Co-GC
1043	Lavender lakton	TER/CDC	t	-	-	t	-	RI,MS
1046	Fenilacetaldehid	OTH	0,1	0,3	0,7	t	0,1	RI,MS,Co-GC
1065	(E)-2-Okten-1-ol	FAD	-	t	-	-	-	RI,MS
1068	Heptanska kiselina	FAD	t	-	-	-	t	RI,MS,Co-GC
1068	1-Oktanol	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1075	<i>cis</i> -Linalool-oksid (furanoidni oblik)	TER	0,1	-	-	t	0,1	RI,MS,Co-GC
1092	<i>trans</i> -Linalool-oksid (furanoidni oblik)	TER	0,1	-	-	t	0,1	RI,MS,Co-GC
1092	2-Nonanon	FAD	t	-	-	-	-	RI,MS
1093	<i>p</i> -Cimenen	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1100	Undekan	FAD	-	-	t	-	-	RI,MS,Co-GC
1100	Linalool	TER/CDC	0,3	t	0,2	-	0,2	RI,MS,Co-GC
1105	Nonanal	FAD	0,2	0,1	t	0,1	-	RI,MS
1106	Hotrienol	TER	-	-	-	t	-	RI,MS
1107	(E)-6-Metil-3,5-heptadien-2-on	CDC	-	t	-	-	-	RI,MS
1112	2,6-Dimetilcikloheksanol	CDC	-	0,1	-	-	-	RI,MS
1117	β -Feniletanol	OTH	-	t	-	t	t	RI,MS,Co-GC
1125	Izoforon	CDC	-	t	-	-	-	RI,MS
1145	<i>trans</i> -Pinokarveol	TER	0,1	0,1	-	t	0,2	RI,MS
1147	<i>cis</i> -Verbenol	TER	-	0,2	-	-	t	RI,MS
1150	Kamfor	TER	0,1	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1163	<i>p</i> -Ment-1,5-dien-8-ol	TER	-	-	-	-	t	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1167	Benzoeva kiselina	OTH	0,5	0,3	t	0,9	1.0	RI,MS,Co-GC
1167	Oktanska kiselina	FAD	0,1	-	-	-	0,2	RI,MS,Co-GC
1170	Nonanol	FAD	0,1	0,1	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1171	Borneol	TER	-	-	-	0,5	-	RI,MS,Co-GC
1173	<i>cis</i> -Linalool-oksid (piranoidni oblik)	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1177	<i>trans</i> -Linalool-oksid (piranoidni oblik)	TER	t	-	-	-	-	RI,MS
1182	Terpinen-4-ol	TER	0,2	0,1	0,1	-	0,1	RI,MS,Co-GC
1185	<i>m</i> -Cimen-8-ol	TER	t	-	-	0,2	0,1	RI,MS
1189	<i>p</i> -Cimen-8-ol	TER	0,3	0,1	0,1	0,1	0,6	RI,MS
1191	2,6-Dimetil-3,7-oktadien-2,6-diol**	TER	t	-	-	0,2	-	RI,MS
1191	1-Dodecen	FAD	t	-	-	-	-	RI,MS
1192	Kripton	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1195	α -Terpineol	TER	t	0,1	0,3	t	0,2	RI,MS
1200	Dodekan	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1202	Mirtenol	TER	t	t	-	t	0,3	RI,MS
1204	Šafranal	TER	-	-	-	-	t	RI,MS
1207	Dekanal	FAD	0,1	0,2	0,1	t	t	RI,MS,Co-GC
1214	Verbenon	TER	t	0,1	-	-	-	RI,MS
1223	<i>trans</i> -Karveol	TER	-	0,1	-	t	0,1	RI,MS
1224	β -Ciklocitral	CDC	t	0,1	-	-	0,1	RI,MS
1227	<i>egzo</i> -2-Hidroksi-1,8-cineol	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1229	Nerol	TER	-	-	t	-	0,1	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1233	Bornil-formijat	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1249	Fenilsirćetna kiselina	OTH	0,1	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1255	Geraniol	TER	-	t	0,2	-	-	RI,MS,Co-GC
1261	(E)-2-Decenal	FAD	-	t	-	-	-	RI,MS
1263	cis-Hrizantenil-acetat	TER	-	-	0,1	-	-	RI,MS
1269	Nonanska kiselina	FAD	0,4	t	-	0,2	0,5	RI,MS,Co-GC
1271	1-Dekanol	FAD	-	0,1	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1273	2-Fenil-2-butenal**	OTH	-	0,1	-	-	0,1	RI,MS
1275	2,6-Dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol	TER	t	-	-	0,2	-	RI,MS
1278	3-Metildodekan	FAD	t	t	-	-	-	RI,MS
1288	cis-p-Ment-2-en-1,8-diol	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1290	Bornil-acetat	TER	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1293	2-Undekanon	FAD	-	t	-	-	-	RI,MS
1294	Kuminol (=p-Cimen-7-ol)	TER	-	-	-	t	t	RI,MS
1296	Timol	TER	0,1	-	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1300	Tridekan	FAD	t	-	-	t	t	RI,MS,Co-GC
1302	trans-Pinokarvil-acetat	TER	-	-	0,1	-	-	RI,MS
1304	Karvakrol	TER	t	t	-	-	-	RI,MS
1307	Undekanal	FAD	0,1	0,1	-	-	t	RI,MS
1316	Vinilvajakol	OTH	t	-	-	-	0,1	RI,MS
1317	(E,E)-2,4-Dekadienal	FAD	-	0,1	-	-	-	RI,MS
1326	(E,Z)-2,4-Dekadienal	FAD	t	-	-	-	0,1	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1340	δ-Elemen	TER	0,1	0,2	-	-	-	RI,MS
1353	1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftalen (=Dehidro- <i>ar-jonen</i>)	CDC	-	-	-	-	t	RI,MS
1360	Eugenol	OTH	t	-	-	-	0,3	RI,MS,Co-GC
1364	3-Dodecenal**	FAD	-	t	-	-	-	RI,MS
1366	Dekanska kiselina	FAD	0,1	-	-	-	0,3	RI,MS,Co-GC
1371	3-Metiltridekan	FAD	t	-	-	t	0,1	RI,MS
1377	Farnezan**	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1380	α-Kopaen	TER	-	-	1,5	-	-	RI,MS,Co-GC
1387	<i>trans</i> -β-Damaskenon	CDC	-	t	-	-	0,2	RI,MS
1392	β-Burbonen	TER	0,1	0,6	0,2	0,4	0,2	RI,MS
1394	2-Dodekanon	FAD	-	t	-	-	-	RI,MS
1397	β-Elemen	TER	t	-	0,2	t	-	RI,MS
1400	Tetradekan	FAD	0,2	-	-	0,2	0,1	RI,MS,Co-GC
1407	Tetrahidrogeranal-aceton	CDC	0,2	0,3	-	0,2	-	RI,MS
1411	Dodekanal	FAD	t	0,1	-	t	0,1	RI,MS
1424	β-Kariofilen	TER	-	1,8	7,5	-	0,4	RI,MS,Co-GC
1426	β-Ilangen	TER	-	-	-	t	-	RI,MS
1430	Karvon-hidrat	TER	-	-	-	t	-	RI,MS
1436	β-Kopaen	TER	-	t	-	t	-	RI,MS
1436	γ-Elemen	TER	0,3	-	0,9	-	-	RI,MS
1438	(E)-α-Bergamoten	TER	-	-	t	-	-	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1453	Geranil-aceton	CDC/TER	0,8	0,7	0,3	-	0,6	RI,MS
1457	5-Metiltetradekan	FAD	t	t	t	t	t	RI,MS
1457	(E)- β -Farnezen	CDC/TER	-	-	1,6	-	0,4	RI,MS
1458	α -Humulen	TER	t	0,7	2,9	-	t	RI,MS,Co-GC
1463	Homofarnezan**	FAD	0,5	0,5	-	1,1	2,0	RI,MS
1465	Undekansa kiselina	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1466	alo-Aromadendren	TER	-	0,3	0,2	-	-	RI,MS
1475	1-Dodekanol	FAD	0,1	0,1	-	0,2	0,2	RI,MS,Co-GC
1474	4,5-Di- <i>epi</i> -aristolohen	TER	-	-	0,5	-	-	RI,MS
1477	γ -Gurjunen	TER	t	-	-	-	0,2	RI,MS
1479	Selina-4,11-dien	TER	-	-	0,5	-	-	RI,MS
1481	γ -Kurkumen	TER	t	-	0,4	-	-	RI,MS
1483	γ -Muurolen	TER	0,1	0,1	-	0,4	-	RI,MS
1485	α -Kurkumen	TER	t	-	0,7	-	-	RI,MS
1486	Germakren D	TER	t	0,3	1,9	-	0,5	RI,MS,Co-GC
1488	(E)- β -Jonon	CDC	-	2,6	0,5	-	1,7	RI,MS,Co-GC
1491	β -Selinan	TER	-	-	0,4	-	-	RI,MS
1491	<i>trans</i> - β -Jonon-5,6-epoksid	CDC	0,1	-	-	0,1	-	RI,MS
1497	2-Tridekanon	FAD	t	0,1		t	-	RI,MS
1500	Pentadekan	FAD	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	RI,MS,Co-GC
1500	Biciklogermakren	TER	-	-	0,4	-	-	RI,MS
1506	α -Muurolen	TER	t	0,1	0,4	t	-	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1510	Germakren A	TER	-	-	0,4	-	-	RI,MS
1512	Tridekanal	FAD	0,3	0,1	-	0,1	0,2	RI,MS
1518	Dibenzofuran	OTH	t	t	-	-	-	RI,MS
1521	γ -Kadinen	TER	t	-	0,5	t	-	RI,MS
1524	3,4-Dimetil-5-pentil-2(5H)-furanon ($=$ dihidrobovolid) ^{**}	FAD	0,1	0,7	-	0,2	-	RI,MS
1526	δ -Kadinen	TER	-	0,9	2,6	-	-	RI,MS
1530	<i>trans</i> -Kalamenen	TER	0,1	-	-	0,1	-	RI,MS
1538	Dihidroaktinidiolid	CDC	0,1	0,3	-	0,2	-	RI,MS
1550	α -Kalakoren	TER	0,1	-	0,3	0,1	-	RI,MS
1558	Izokariofilen-oksid	TER	-	0,5	0,5	-	-	RI,MS
1561	Salviadienol ^{**}	TER	t	-	-	0,3	-	RI,MS
1563	Germakren B ^{**}	TER	-	-	8,9	-	-	RI,MS
1566	Dodekanska kiselina	FAD	0,3	-	-	1,4	1,1	RI,MS,Co-GC
1569	11- <i>nor</i> -Burbonan-1-on	TER	t	0,3	-	0,4	-	RI,MS
1571	γ -Kalakoren	TER	0,1	-	t	t	-	RI,MS
1575	(Z)-3-Heksenil-benzoat	OTH	t	0,2	0,1	0,3	-	RI,MS
1586	Spatulenol	TER	0,5	2,6	0,9	0,2	0,4	RI,MS,Co-GC
1586	(E,E)-3,5-Pseudojonon	CDC	-	-	-	-	t	RI,MS
1592	Kariofilen-oksid	TER	2,1	9,6	8,4	2,3	1,3	RI,MS,Co-GC
1597	Globulol	TER	-	0,5	-	-	-	RI,MS
1600	Heksadekan	FAD	0,2	-	1,0	t	0,5	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1600	Viridiflorol	TER	0,1	-	-	1,1	-	RI,MS
1613	5,7-Di- <i>epi</i> - α -eudezmol	TER	-	-	-	t	-	RI,MS
1614	Tetradekanal	FAD	0,4	0,1	-	0,2	0,3	RI,MS
1618	Humulenpoksid II	TER	0,1	1,4	2,2	0,3	0,6	RI,MS
1620	Torilenol	TER	-	-	-	0,3	-	RI,MS
1625	Junenol	TER	-	-	0,4	-	-	RI,MS
1632	<i>nor</i> -Kopaanon	TER	0,1	-	-	0,1	-	RI,MS
1633	Gvaja-6,10(14)-dien-4 β -ol	TER	-	5,2	0,9	-	0,5	RI,MS
1635	Muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol	TER	t	-	-	0,1	-	RI,MS
1639	Kubenol	TER	0,1	-	-	-	0,2	RI,MS
1642	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	TER	t	-	-	0,2	-	RI,MS
1645	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 β -ol	TER	t	-	-	0,3	-	RI,MS
1646	τ -Muurolol	TER	-	0,4	1,2	-	-	RI,MS
1647	<i>nor</i> -Pristan**	CDC/TER	t	-	-	-	0,2	RI,MS
1650	<i>epi</i> - α -Muurolol	TER	0,5	0,2	0,3	0,4	-	RI,MS
1653	α -Muurolol	TER	0,1	-	-	0,2	-	RI,MS
1659	α -Bisabolol-oksid B	TER	-	-	-	-	0,4	RI,MS
1663	α -Kadinol	TER	1,1	0,6	1,8	1,1	0,5	RI,MS
1663	Tridekanska kiselina	FAD	0,1	-	-	t	-	RI,MS
1664	2-Metilheksadekan	FAD	t	0,2	t	t	-	RI,MS
1667	<i>cis</i> -Kalamenen-10-ol	TER	-	-	-	t	-	RI,MS
1676	14-Hidroksi-(Z)-kariofilen	TER	-	0,3	-	-	-	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1676	1-Tetradekanol	FAD	t	0,5	-	-	0.8	RI,MS,Co-GC
1679	Heksil-salicilat	OTH	-	t	-	-	t	RI,MS,Co-GC
1683	Kadalen	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1695	Amorfa-4,9-dien-2-ol**	TER	0,3	-	-	0,3	-	RI,MS
1700	Germakron	TER	-	0,8	-	-	-	RI,MS,Co-GC
1700	Heptadekan	FAD	0,2	0,4	1,5	0,5	0.4	RI,MS,Co-GC
1703	Pristan**	CDC/TER	0,3	-	1,2	-	-	RI,MS
1711	10-nor-Kalamenen-10-on	TER	t	-	-	t	-	RI,MS
1716	Pentadekanal	FAD	0,3	0,2	0,7	0,5	0.7	RI,MS
1727	Metil-tetradekanoat	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1750	(E)-2-Heksil-cinamaldehid	OTH	-	-	-	-	0.3	RI,MS
1761	4-Metilheptadekan	FAD	t	-	0,6	-	-	RI,MS
1765	Tetradekanska kiselina	FAD	3,5	-	-	2,3	1.5	RI,MS,Co-GC
1771	Benzil-benzoat	OTH	0,5	0,1	0,5	0,1	-	RI,MS,Co-GC
1772	3-Metilheptadekan	FAD	t	-	-	0,2	-	RI,MS
1781	1-Pentadekanol	FAD	0,1	-	-	0,5	0.2	RI,MS
1784	Fenantren	OTH	0,4	0,5	0,6	0,4	0.5	RI,MS,Co-GC
1789	γ -Tridekalakton	FAD	t	-	-	t	-	RI,MS
1800	Oktadekan	FAD	0,1	0,4	1,7	t	0.2	RI,MS,Co-GC
1810	Fitan**	CDC/TER	0,1	0,3	1,6	t	-	RI,MS
1817	Heksadekanal	FAD	0,3	0,2	-	-	0.3	RI,MS
1841	Neofitadien (izomer 2)	CDC/TER	1,1	8,5	-	0,2	4.7	RI,MS

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1848	Heksahidrofarnesil-aceton	CDC/TER	15,5	9,9	8,3	11,6	10,8	RI,MS
1850	Neidentifikovana komponenta***	UIC	-	0,4	-	-	-	
1864	Pentadekanska kiselina	FAD	0,9	-	-	1,5	0,5	RI,MS
1876	Benzil-salicilat	OTH	t	-	-	t	-	RI,MS,Co-GC
1883	1-Heksadekanol	FAD	0,1	-	-	0,3	-	RI,MS,Co-GC
1900	2-Heptadekanon	FAD	-	-	0,6	-	-	RI,MS
1900	Nonadekan	FAD	0,1	0,3	0,9	0,2	0,3	RI,MS,Co-GC
1904	5-(4,8-Dimetilnonil)-5-metildihidro-2(3H)-furanon	OTH	t	0,4	-	-	-	MS
1918	(E,E)-5,9-Farnezil-aceton	CDC/TER	-	1,3	0,8	-	1,2	RI,MS
1928	Metil-heksadekanoat	FAD	0,1	0,3	-	0,2	0,4	RI,MS,Co-GC
1950	Izofitol	CDC/TER/HID	0,3	0,3	-	0,3	0,3	RI,MS
1965	Heksadekanska kiselina	FAD	38,8	8,7	5,4	35,9	22,8	RI,MS,Co-GC
1967	3-(4,8,12-Trimetiltridecil)furan (=Fitofuran)***	CDC	-	0,5	-	-	-	RI,MS
1996	Etil-heksadekanoat	FAD	t	-	-	0,6	-	RI,MS,Co-GC
2000	Eikozan	FAD	0,2	0,5	0,4	0,7	0,7	RI,MS,Co-GC
2023	Oktadekanal	FAD	0,3	0,3	-	0,1	0,4	RI,MS
2036	Metil-2-oksoheksadekanoat	FAD	-	-	-	t	-	RI,MS
2064	Heptadekanska kiselina	FAD	0,1	-	-	t	-	RI,MS
2066	Manool	TER	1,5	-	-	2,9	-	RI,MS
2086	1-Oktadekanol	FAD	0,2	-	-	0,2	-	RI,MS,Co-GC
2100	Heneikozan	FAD	1,6	1,4	0,6	3,4	1,8	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.2. (nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
2106	γ -Heksadekalakton	FAD	t	0,3	-	0,4	-	RI,MS
2116	(E)-Fitol	TER/HID	2,6	2,5	0,3	t	4,2	RI,MS
2135	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienska kiselina (=Linolna kiselina)	FAD	0,1	-	-	0,2	0,6	RI,MS,Co-GC
2140	(Z)-9-Oktadecenska kiselina (=Oleinska kiselina)	FAD	0,8	-	-	1,0	-	RI,MS,Co-GC
2164	Oktadekanska kiselina	FAD	2,3	-	-	0,9	-	RI,MS,Co-GC
2200	Dokozan	FAD	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	RI,MS,Co-GC
2220	(E)-Fitil-acetat	TER/HID	1,8	1,0	t	2,2	2,7	RI,MS
2226	Eikozanal	FAD	0,1	-	-	-	0,2	RI,MS
2267	Tributil-acetilcitrat	OTH	-	-	-	-	0,3	RI,MS
2300	Trikozan	FAD	0,6	0,9	0,6	3,1	1,6	RI,MS,Co-GC
2354	5-Metil-5-(4,8,12-trimetiltridecil)dihidro-2(3 <i>H</i>)-furanon	OTH	0,6	0,2	-	2,3	0,1	MS
2400	Tetrakozan	FAD	1,2	1,1	0,3	0,3	-	RI,MS,Co-GC
2496	1-Dokozanol	FAD	0,1	-	-	t	-	RI,MS
2500	Pentakozan	FAD	4,5	5,3	0,9	2,6	-	RI,MS,Co-GC
2600	Heksakozan	FAD	2,1	8,5	6,5	-	0,1	RI,MS,Co-GC
2700	Heptakozan	FAD	0,8	1,6	2,6	-	3,8	RI,MS,Co-GC
2800	Oktakozan	FAD	0,1	0,1	-	-	0,2	RI,MS,Co-GC
2900	Nonakozan	FAD	0,1	-	-	-	5,9	RI,MS,Co-GC
3000	Triakontan	FAD	t	-	-	-	0,1	RI,MS,Co-GC
3100	Hentriakontan	FAD	-	-	-	-	1,6	RI,MS,Co-GC

Tabela 5.2. (nastavak)

	D	E	F	G	H
Grupisani sastoјci:					
Terpenoidi (TER)	13,1	31,7	49,3	14,9	14,2
Monoterpenoidi	1,3	0,8	1,1	1,2	2,1
Monoterpenski ugljovodonici	t	-	-	t	-
Oksigenovani monoterpeni	1,3	0,8	1,1	1,2	2,1
Seskviterpenoidi	5,9	27,4	47,9	8,6	5,2
Seskviterpenski ugljovodonici	0,9	5,0	31,3	1,0	1,3
Oksigenovani seskviterpeni	5,0	22,4	16,6	7,6	3,9
Diterpenoidi	5,9	3,5	0,3	5,1	6,9
Diterpenski ugljovodonici	-	-	-	-	-
Oksigenovani diterpeni	5,9	3,5	0,3	5,1	6,9
Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (FAD)	63,8	34,0	25,5	60,1	51,3
Jedinjenja nastala razgradnjom karotenoida (CDC)	18,5	24,9	14,3	12,6	20,2
Ostala jedinjenja (OTH)****	2,3	2,2	1,9	4,0	2,8
Identifikovano	97,7	92,8	91,0	91,6	88,5
Neidentifikovano (>0,1%)	-	0,4	-	-	-
Ukupno	97,7	93,2	91,0	91,6	88,5

*Srednja vrednost tri analize **Tačan izomer nije utvrđen. ***MS, 70eV, 230 °C, RI 1850, m/z (rel. int.): 167 (45), 121 (45), 107 (40), 79 (30), 68 (100), 67 (84), 53 (29), 43 (38), 41 (48), 39 (31). ****Neklasifikovani konstituenti i konstituenti mogućeg antropogenog porekla. RI–Eksperimentalno određeni retencioni indeksi na HP-5MS koloni u odnosu na homologu seriju C₇–C₃₁ n-alkana. t– u tragovima (<0,05%). RI– upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima (Adams, 2007). MS– upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka. Co-GC– GC koinjektiranjem standardnih supstanci. HID– fitol, izomeri i derivati fitola koji su najverovatnije nastali razgradnjom hlorofila u toku hidrodestilacije. - / nije detektovano.

5.1.1.1. Sastav etarskog ulja biljne vrste *Geraniuim macrorrhizum*

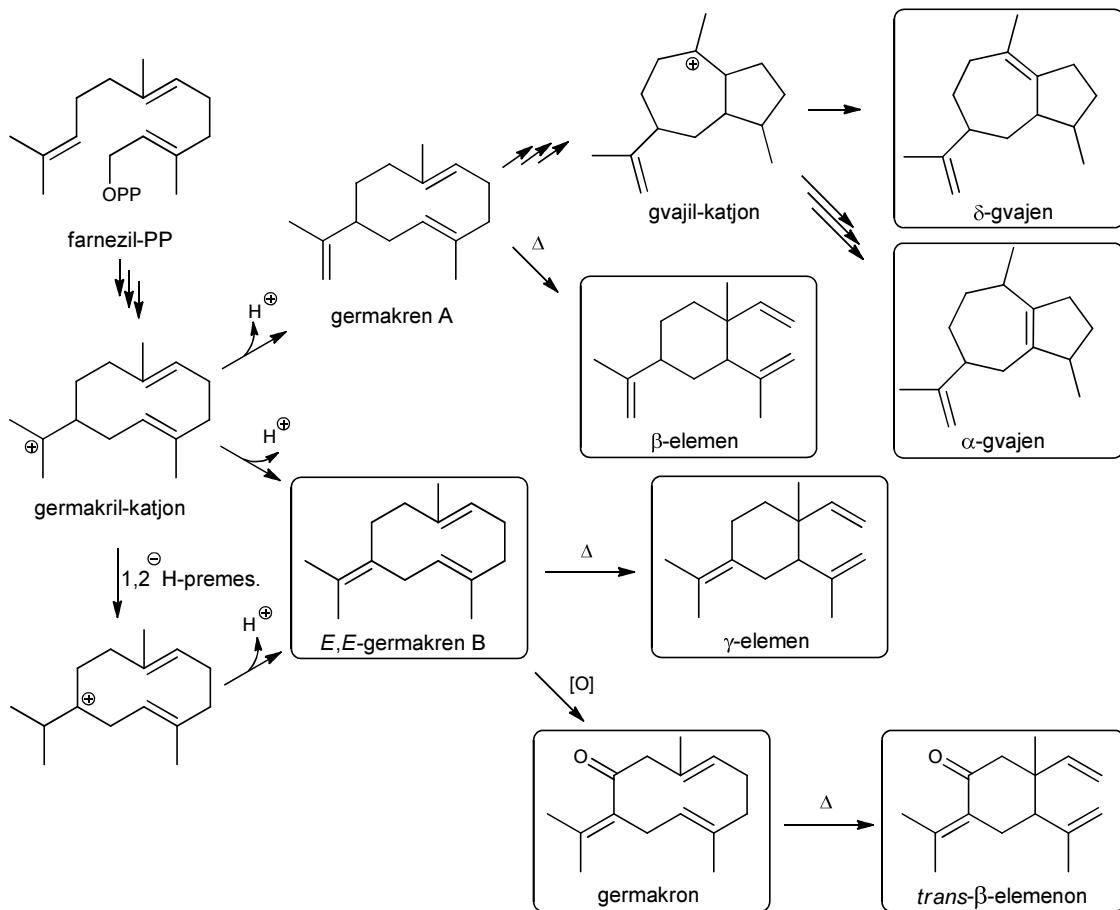
Detaljnog GC i GC/MS analizom etarskih ulja izolovanih iz nadzemnih delova i rizoma vrste *G. macrorrhizum* (uzorci sa oznakom *germ-n*, odnosno *germ-r*) identifikovano je 283 jedinjenja, što predstavlja oko 90% ukupne površine pikova u hromatogramima. Hemijskim sastavom oba ulja dominiraju seskviterpeni – *germ-n* je bogat oksigenovanim seskviterpenima (54,4%), dok seskviterpenski ugljovodonici čine veći deo ulja rizoma (68,8%).

Hidrodestilacijom nadzemnih delova dobijeno je žućkasto ulje polu-čvrste konzistencije sa jakim, ali priyatnim mirisom. Određeni hemijski sastav se slaže sa do sada publikovanim podacima o sastavu ulja za ovu biljnu vrstu (Tsankova & Ognyanov, 1972, 1977; Hodisan & Popescu, 1982; Chalchat et al., 2002). Glavni sastojak ulja je germakron (49,7%). Germakren B (11,3%), γ -kurkumen (4,1%), *trans*- β -elemenon (1,6%) and γ -elemen (1,3%) su, pored germakrona, najzastupljeniji sastojci ulja među identifikovanim seskviterpenoidima. Visok je sadržaj seskviterpenoida germakranskog tipa (61,6%) u ulju, uključujući ovde i seskviterpene elemanskog tipa (opšte je prihvaćena činjenica da strukture elemanskog tipa mogu nastati u toku gasne hromatografije kao posledica termalnog [3,3]-sigmatropnog premeštanja germakranskih prekursora (Baldovini et al., 2001), pa je moguće da ova jedinjenja (npr. *trans*- β -elemenon i γ -elemen) nisu nativni biljni metaboliti već da su nastala iz odgovarajućih germakranskih prekursora (Ognyanov, 1962). Etarsko ulje iz nadzemnih delova korišćeno je za izolovanje germakrona prema publikovanoj proceduri (Minnaard et al., 1999) radi ispitivanja mikrobiološke aktivnosti istog.

Hidrodestilacijom rizoma ove biljne vrste dobijeno je žuto-zeleno ulje, takođe, jako aromatičnog mirisa. Za razliku od ulja nadzemnog dela, podzemni delovi ove biljke proizvode ulje kojim dominiraju δ -gvajen (49,2%) i ostali seskviterpenoidi gvajanskog skeletnog tipa (61,1% ukupnog ulja). Ostali terpenoidi prisutni u značajnijem procentu su gemakron (11,5%), α -gvajen (8,7%), δ -selinen (1,7%), gvaja-6,10(14)-dien-4 β -ol (1,5%) i eudesm-11-en-4 α -ol (1,5%).

Sa ciljem sticanja boljeg uvida u razlike hemijskog sastava ulja iz rizoma i nadzemnih delova, pokušali smo da sumiramo prepostavljene biosintetske puteve glavnih komponenata oba ulja (Šema 5.1; Steele et al., 1998). Glavne komponente rizoma i nadzemnih delova biljke imaju zajednički biosintetski prekursor – germakril-katjon. Od germakril-katjona, biosinteza u pomenutim delovima biljke grana se u dva pravca, na način da je jedan biosintetski put aktivniji u nadzemnom delu (alilna oksidacija germakrena B u germakron), a drugi u rizomu (biosinteza seskviterpenoida gvajanskog skeletnog tipa detektovanih u etarskom ulju rizoma: α - i δ -gvajena koji nastaju iz germakrena A, β -elemena (proizvod Cope-ovog premeštanja), α - i β -selinena (kiselo-katalizovani ciklizacioni proizvodi; de Kraker et al., 1998), koji čine 59,4% ulja izolovanog iz rizoma). Ukratko, “germakren A” biosintetski put je aktivniji u rizomu,

dok "germakren B" biosintetski put, zajedno sa odgovarajućim seskviterpenoidima elemanskog tipa (63,9%) (Ognyanov, 1962; Reichardt *et al.*, 1989), preovladava u nadzemnom delu biljne vrste *G. macrorrhizum*.



Šema 5.1. Prepostavljeni biosintetski (i artefaktni) putevi najzastupljenijih terpenoida u vrsti *G. macrorrhizum* (identifikovane komponente u uljima su uokvirene)

Tsai i sar. (Hsu et al., 2006; Tsai et al., 2007) su sprovedli istraživanje sa ciljem pronalaženja prirodnog proizvoda sa anti-inflamatornom aktivnošću među sastojcima 110 etarskih ulja biljaka koje se koriste u Kineskoj tradicionalnoj medicini. U navedenom ispitivanju, etarsko ulje vrste *Pogostemon cablin* je pokazalo značajnu inhibitornu aktivnost prema (i) agregaciji trombocita indukovane trombocit-aktivirajućim faktorom (PAF), fosfolipidnim posrednikom inflamatornog procesa koji proizvode različite ćelije organizma koji ima ulogu kod alergijskih bolesti, upala, astme, rinitisa, šoka i kardiovaskularnih bolesti, i (ii) sekundarnoj agregaciji trombocita indukovane arahidonskom kiselinom. U daljem ispitivanju su iz pomenutog ulja izolovali α -bulnezen (sin. δ -gvajen) i zaključili da je to jedinjenje odgovorno za navedenu aktivnost ulja, odnosno da se potencijalno može koristiti kao anti-PAF agens. Na osnovu prethodno navedenog se može prepostaviti da etarsko ulje rizoma *G. macrorrhizum* može ispoljiti sličnu aktivnost, s obzirom da je anti-trimbocitni

seskviterpenoid δ -gvajen prisutan u značajnom procentu. Međutim, neophodna su dodatna istraživanja u ovom pravcu.

5.1.1.2. Sastav etarskog ulja biljne vrste *Geranium sanguineum*

GC i GC/MS analizom etarskog ulja biljne vrste *G. sanguineum* (uzorak *gers-c*) identifikovano je 248 sastojaka, odnosno 94,3% ukupnog ulja. Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (FAD) predstavljaju najzastupljeniju grupu jedinjenja sa udelom od 36,3%. Terpenska frakcija čini 25,0% ulja i uglavnom se sastoji od oksigenovanih jedinjenja. Glavne komponente etarskog ulja su heksadekanska kiselina (9,6%), heksahidrofarnezil-aceton (9,4%) i fenil-acetaldehid (7,1%).

Glikozidno vezan nezasićeni γ -lakton protoanemonin, koji je često prisutan kod biljaka familije *Ranunculaceae* (Seegal & Holden, 1945), veoma se lako oslobođa enzimskom reakcijom u toku prikupljanja i obrade biljnog materijala kao odgovor biljke na stres. Ovo jedinjenje može prouzrokovati iritaciju kože (Sun et al., 1999); unošenje/gutanje većih količina biljnog soka koji sadrži ovo jedinjenje može prouzrokovati iritaciju stomaka iz čega se može razviti stomačni kolitis, teški oblik gastroenteritisa i dijareje pomešane sa krvlju (Cornell University). S obzirom da je protoanemonin identifikovan u etarskom ulju *G. sanguineum* (0,1%), treba imati na umu posledice koje može izazvati ovo jedinjenje.

5.1.1.3. Sastav etarskog ulja biljne vrste *Geranium robertianum*

U etarskom ulju izolovanom iz nadzemnih delova ove biljne vrste (uzorak *gerr-n*) identifikovane su 152 sastojaka, koji čine 95,8% ulja. U ulju iz korena (uzorak *gerr-k*) uspešno su identifikovane 53 jedinjenja, odnosno 98% ukupnog ulja. Kao i u prethodnom slučaju, FAD predstavljaju najzastupljeniju grupu u oba ispitana uzorka – 49,2% u ulju nadzemnog dela, dok se ulje korena sastoje skoro isključivo komponente ove grupe (93,4%). Terpenoidi čine 26,7% ulja nadzemnog dela. Nizak sadržaj istih u ulju iz korena (1,5%) ukazuje na lokalizovanu biosintezu/akumulaciju terpenoida u nadzemnim delovima vrste *G. robertianum*. Najzastupljenije komponente su heksadekanska kiselina (16,6% u *gerr-n* i 45,3% u *gerr-k* ulju), pentakozan (28,5% u *gerr-k* ulju), heksahidrofarnezil-aceton (6,5% u uzorku *gerr-n*) i kariofilen-oksid (5,4% u *gerr-n* ulju).

Uočljive su značajne razlike u hemijskom sastavu ispitivanih etarskih ulja i prethodno publikovanog za istu biljnu vrstu. Naime, linalool (22,9%), γ -terpinen (13,9%), germakren D (7,8%), limonen (5,3%) i geraniol (4,4%), najzastupljenije komponente ulja iz Holandije (Pedro et al., 1992), nisu detektovane čak ni u tragovima, osim u slučaju linaloola i geraniola, koji su u uzorku *gerr-n* prisutni kao minorni sastojci (1,4%, odnosno u tragovima). Moguće objašnjenje navedenih razlika u

hemijskom sastavu može biti uticaj ekoloških faktora i/ili genetska varijabilnost ispitivanih populacija.

5.1.1.4. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta *Geranium columbinum* i *Geranium lucidum*

Hidrodestilacijom nadzemnih delova (uzorak *gerc-n*) i korena (uzorak *gerc-k*) biljne vrste *G. columbinum* i uzoraka celih biljaka vrste *G. lucidum* (uzorak *gerl-c*) dobijena su svetlo-žuta ulja polu-čvrste konzistencije, u sva tri slučaja, sa prinosima datim u Tabeli 4.1. Analizom etarskog ulja nadzemnog dela *G. columbinum* identifikovana su 142 sastojka (88,2% ukupnog ulja), 43 jedinjenja u ulju uzorka *gerc-k* (96,7% ulja) i 117 jedinjenja u ulju *gerl-c* (91,4%). FAD jedinjenja, takođe, predstavljaju glavne sastojke sva tri uzorka (65,0% u *gerc-n*, 86,3% u *gerc-k* i 69,7% u *gerl-c* ulju), sa heksadekanskom kiselinom, tetradekanskom kiselinom, heksahidrofarnezil-acetonom i tetrakozanom, kao najzastupljenijim jedinjenjima. Udeo terpenoida u ulju nadzemnog dela vrste *G. columbinum* iznosi 6,6% i ovu grupu čine uglavnom oksigenovani mono- i seskviterpenoidi. Najzastupljeniji terpenoidi u *gerc-n* ulju su borneol (0,8%), homofarnezan (1,1%) i kariofilen-oksid (1,1%). α -Pinen (0,9%), 1,8-cineol (1,4%) i heksahidrofarnezol (1,2%) su najzastupljeniji terpenoidi *gerl-c* ulja. Etarsko ulje izolovano iz korena *G. columbinum* skoro potpuno se sastoji od FAD i CDC jedinjenja, dok su terpenoidi detektovani samo u tragovima. Kao i u slučaju vrste *G. robertianum*, može se zaključiti da je biosinteza/akumulacija terpenoida lokalizovana u nadzemnim delovima vrste *G. columbinum*.

Dobijeni rezultati su u skadu sa hipotezom Radulovića i sar. (2009), koja se odnosi na vezu između prinosa ulja i hemijskog sastava. Naime, usled nedostatka značajnije proizvodnje isparljivih sekundarnih biljnih metabolita (npr. terpenoida, fenilpropanoida itd.), biljne vrste siromašne etarskim uljem (sa prinosom ulja manjim od 0,1%) sadrže ulje koje se pretežno sastoji od FAD i/ili CDC jedinjenja.

Interesantno je napomenuti da nekoliko identifikovanih jedinjenja može nastati autooksidacijom u toku sušenja biljnog materijala i/ili hidrodestilacije. Naime, Rontani i sar. (1996) su nedavno publikovali rezultat da heksahidrofarnezil-aceton (prisutan u *gerc-n* ulju sa udelom od 11,6%, *gerc-k* (10,4%) i *gerl-c* (5,3%)) može nastati fotodegradacijom fitil-bočnog lanca hlorofila. Isti autori su pokazali da 5-metil-5-(4,8,12-trimetiltridecil)dihidro-2(3H)-furanon može nastati autooksidacijom α -tokoferola (vitamin E), opšte prisutnog u biljnom carstvu (Rontani et al., 2007). Pored toga, α , β -nezasićeni- γ -lakton dihidrobovolid, takođe identifikovan u ispitanim uljima, može nastati u suvom lišću u procesu indukovanim svetlošću (Horita et al., 1985). Monoterpenski lakton 5,5-dimetil-4-(3-oksobutil)dihidro-2(3H)-furanon, trivijalno nazvan homoterpenilmetyl-keton, može nastati iz α -terpineola oksidativnim raskidanjem dvogube veze koja je praćena laktonizacijom dobijene γ -hidroksi-kiseline (oksidacija α -terpineola na vazduhu) (Tsai & Cheng, 1984). Ovaj niz oksigenovanih jedinjenja sugerije da autooksidacija ima važnu ulogu u formiranju isparljivih biljnih metabolita

izolovanih iz suvog biljnog materijala. Prema nedavnoj studiji, oksigenovani seskviterpen klovan-diol, takođe identifikovan u *gerl-c* ulju (0,2%), može nastati hidrolizom kariofilen-oksida u toku hidrodestilacije, pa prema tome može predstavljati artefakt procedure izolovanja (Yang & Deinzer, 1994).

Račvasti alkohol 3-etil-4-metil-1-pentanol identifikovan je kod *Harpegnathos saltator* i *Formica rufa* radnika, *Formica polyctena* kraljica i kod *Polyergus breviceps* kraljica (Nascimento et al., 1993; Francke et al., 1985; Greenberg et al., 2004). U poslednjem slučaju, (*R*)-enantiomer istog jedinjenja je identifikovan kao seksualni feromon sa funkcijom privlačenja mužjaka mrava (Greenberg et al., 2007). Ovo jedinjenje je identifikovano u *gerc-n* ulju sa udelom od 0,4%, kao i u nekoliko drugih vrsta (Barra et al., 2007; Ruberto et al., 2008). S obzirom na ulogu u privlačenju pojedinih vrsta mrava, 3-etil-4-metil-1-pentanol može imati ekološku ulogu u interakciji biljaka i mrava (npr. oprašivanje, zaštita od biljojeda itd.).

5.1.1.5. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta *Geranium purpureum* i *Geranium phaeum*

U etarskom ulju izolovanom iz uzoraka celih biljaka vrste *G. purpureum* (uzorak sa oznakom *gerp-c*) identifikovano je 68 jedinjenja sa udelom od 92,2%, dok je u etarskim uljima nadzemnih delova i rizoma *G. phaeum* (uzorci nadzemnih delova *gerph-n1*, *gerph-n2* i uzorak rizoma sa oznakom *gerph-r2*) identifikovano, redom, 94, 68 i 25 sastojaka, odnosno 96,2%, 93,5% i 94,6% ukupnog ulja. U svim uljima, takođe, dominiraju FAD jedinjenja sa udelom 45,4–81,3%. Etarsko ulje vrste *G. purpureum* veoma je siromašno terpenoidima (svega 0,3%). Ukupan sadržaj terpenoida u uzorcima vrste *G. phaeum* (*gerph-n1*, *gerph-n2* i *gerph-r2*) iznosi 2,6%, 31,8%, odnosno 8,7%. Relativno visok sadržaj ovih jedinjenja u *gerph-n2* ulju može se objasniti visokim udelom (*E*-fitola (25,9%), koji je najverovatnije nastao razgradnjom hlorofila u toku hidrodestilacije. Glavne komponente etarskog ulja vrste *G. purpureum* su heksadekanska kiselina (33,5%), pentakozan (8,5%) i heneikozan (4,8%). Heksadekanska kiselina (36,1%), pentakozan (11,5%) i heksahidrofarnezil-aceton (10,4%) najzastupljenije su komponente *gerph-n1* ulja. (*E*)-Fitol (25,9%), heksakozan (15,9%) i pentakozan (8,3%) su glavne komponente *gerph-n2* ulja, dok u rizomu iste biljke (uzorak *gerph-r2*) dominiraju heksadekanska kiselina sa 55,2%, oleinska kiselina sa 8,6%, fenilacetaldehid sa 4,8% i *trans*-linalool-oksid (furanoidni oblik) sa 3,2%.

U *gerph-r2* ulju identifikovan je račvasti alkohol 3-etil-4-metil-1-pentanol (0,5%), jedinjenje za koje se prepostavlja da ima ekološku ulogu u interakciji biljaka i mrava (Odeljak 5.1.1.4.).

5.1.1.6. Sastav etarskog ulja biljne vrste *Erodium cicutarium*

GC/MS analizom etarskih ulja izolovanih iz celih biljaka *E. cicutarium* (uzorci *eroct-c1* i *eroct-c2*) i nadzemnog dela bez cveta (uzorak *eroct-n3*) identifikovano je 162, 134, odnosno 99 sastojaka, sa udelom od 97,7%, 91,6% odnosno 88,5%. Sva tri uzorka

karakteriše visok sadržaj FAD jedinjenja (51,3%–63,8%) i nizak sadržaj terpenoidnih struktura (13,1%–14,9%) pri čemu dominiraju oksigenovani seskvi- i diterpenoidi.

Glavne komponente u *eroct-c1* ulju su heksadekanska kiselina (38,8%), heksahidrofarnezil-aceton (15,5%) i pentakozan (4,5%), dok u terpenskoj frakciji dominiraju (*E*)-fitol (2,6 %) i kariofilen-oksid (2,1 %). Najzastupljenije komponente u uljima uzoraka *eroct-c2* i *eroct-n3* su, takođe, heksadekanska kiselina, sa udelom od 35,9%, odnosno 22,8%, i heksahidrofarnezil-aceton (11,6%, odnosno 10,8%).

Isparljiva jedinjenja vrste *E. cicutarium* nalaze se u nadzemnom delu biljke. Ovaj zaključak je izведен na osnovu činjenice da je analizom ulja uzoraka *eroct-c2* koji čine cele biljke (koren, stablo, list i cvet) i *eroct-n3* (list i stabljika bez cveta) dobijeno ulje veoma sličnog hemijskog sastava i prinosa iako potiču sa različitih lokaliteta, dok hidrodestilacijom korena (uzorak *eroct-k3*) pod istim uslovima nije uopšte dobijeno etarsko ulje. S obzirom da koren ne doprinosi ukupnom sadržaju etarskog ulja, može se zaključiti da cvetovi sadrže isparljive metabolite u veoma maloj količini ili ih uopšte nemaju, naročito ako se zna da cvetovi čine veoma mali deo ukupne mase biljke.

Jedina publikacija koja se odnosi na ispitivanje isparljivih metabolita ove biljne vrste je analiza heksanskog ekstrakta izolovanog iz lista ove biljne vrste. Glavni sastojci ispitivanog ekstrakta bile su geraniol (16,7%), citronelol (15,4%), izomenton (11,2%) i metileugenol (10,6%). Ovi rezultati se veoma razlikuju od naših rezultata s obzirom da pomenute komponente nisu detektovane čak ni u tragovima u našim uzoricima ove biljne vrste. Veći deo identifikovanih supstinenta od strane Lis-Balchin-ove su bili monoterpenoidi, dok su terpenoidi činili manji deo, tačnije oko 10% ukupnog ulja. Naši rezultati se i u ovom pogledu drastično razlikuju, što je uočljivo na osnovu podataka u Tabeli 5.2. Iako nije moguće potpuno pouzdano donositi zaključke upoređivanjem hemijskog sastava ekstrakata dobijenih iz različitih biljnih organa, u ovom slučaju to nema bitnijeg uticaja na rezultate jer masa listova ove biljke čini najveći deo ukupne mase biljke. Prema tome, očigledna razlika u hemijskom sastavu može biti posledica hemotipifikacije, uticaj ekoloških faktora ili je možda razlog razlika u metodama izolovanja ekstrakata.

5.1.1.6. Sastav etarskih ulja biljnih vrsta *Erodium ciconium* i *Erodium absinthoides*

U etarskih uljima vrsta *Erodium ciconium* (uzorak *erocn-c*) i *E. absinthoides* (uzorak *eroab-c*) identifikovano je 107, odnosno 79 jedinjenja (92,8%, odnosno 91,0% ukupnog ulja). U *erocn-c* ulju, sadržaj FAD, CDC i TER jedinjenja je uporediv po vrednosti (34,0%, 24,9%, odnosno 31,7%). Terpenoidi, tačnije seskviterpenoidi predstavljaju dominantnu grupu jedinjenja u *eroab-c* ulju (49,3%, odnosno 47,9%). Glavne komponente *erocn-c* ulja su heksahidrofarnezil-aceton (9,9 %), kariofilen-oksid (9,6 %), heksadekanska kiselina (8,7 %) i neofitadien (izomer 2) (8,5%). Germakren B (8,9%), kariofilen-oksid (8,4%), heksahidrofarnezil-aceton (8,3%), i β -kariofilen (7,5%) predstavljaju glavne sastojke *eroab-c* ulja.

5.1.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *GERANIUM* I *ERODIUM*

Antimikrobna aktivnost izolovanih etarskih ulja ispitivana je disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom prema preporukama američkog Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2007). Korišćeni su kontrolni laboratorijski sojevi mikroorganizama, American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, SAD, Instituta za virusologiju i imunologiju "Torlak" iz Beograda, klinički izolati mikroorganizama i izolati iz hrane, kao i neki fungalni sojevi izolovani iz praštine dušeka, veoma česti u ljudskom okruženju i, veruje se, odgovorni za alergijske bolesti respiratornog trakta (Odeljak 4.4.1).

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja biljne vrste *Geranium macrorrhizum*. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja bilje vrste *G. macrorrhizum* (uzorci *germ-n* i *germ-r*) vršeno je disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom na sedam bakterijskih sojeva i četiri fungalna mikroorganizma. Ispitivani uzorci su aktivni prema svim testiranim sojevima, izuzev gljivice *Candida albicans*, koja nije osetljiva na ulje rizoma. Antifungalna aktivnost prema testiranim plesnim (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus restrictus* i *Penicillium chrysogenum*) je slaba, sa najvišim MIC vrednostima. Generalno, ulje rizoma je pokazalo značajno slabiju aktivnost u poređenju sa *germ-n* uljem, koje pri nižim koncentracijama (u poređenju sa *germ-r* uljem) ispoljava inhibitorno dejstvo na sve ispitivane mikroorganizme (Tabele 5.3 i 5.4).

Gram-pozitivne i -negativne bakterije su podjednako osetljive prema *germ-n* i *germ-r* ulju u oba testa. Rezultati testiranja čistog ulja iz rizoma disk-difuzionom metodom pokazuju najveću osetljivost bakterije *B. subtilis*. *Escherichia coli* i *Clostridium sporogenes* su najotporniji sojevi na *germ-r* ulje. Slaba antifungalna aktivnost *germ-r* ulja evidentna je na osnovu vrednosti inhibicionih zona i, skoro u svim slučajevima, na osnovu visokih MIC vrednosti. Kod testiranja antifungalne aktivnosti disk-difuzionom metodom, *germ-n* ulje je neaktivno samo u slučaju *A. restrictus*, dok je *C. albicans* osetljiva samo na ulje dobijeno iz nadzemnih delova biljke.

Uočene MIC vrednosti za bakterije uglavnom korelišu sa vrednostima veličine zone inhibicije dobijenim disk-difuzionom metodom i pokazuju da je *B. subtilis* najosetljiviji soj sa inhibitornom vrednošću (MIC) od 0,4 µg/ml za ulje rizoma, dok je *E. coli* najrezistentniji soj prema testiranim uljima. Ulje nadzemnih delova je pokazalo veću aktivnost od ulja rizoma prilikom testiranja aktivnosti prema bakterijskim i fungalnim sojevima. Međutim, rezultati ove dve metode (disk-difuziona i mikrodilucionu) se u izvesnoj meri razlikuju kada su u pitanju gljivice. Naime, testirane koncentracije ulja i germakrona, kod ispitivanja aktivnosti mikrodilucionom metodom, nisu dovoljno visoke za inhibiciju rasta *Candida albicans*, dok je ovaj soj pokazao osetljivost kod ispitivanja disk-difuzionom metodom.

Tabela 5.3. Antimikrobnna aktivnost etarskih ulja nadzemnih delova i rizoma vrste *Geranium macrorrhizum*, germakrona i njihovih razblaženih rastvora (zone inhibicije u mm, uključujući prečnik diskova^{*})

Bakterijski soj	Rizom					Nadzemni delovi					Germakron	
	Čisto ulje ^{**}	v/v ^{**}				Čisto ulje ^{**}	v/v ^{**}				EtOH ^{**}	A ^{***}
		50%	25%	12,5%	6,25%		50%	25%	12,5%	6,25%		
<i>E. coli</i> (klinički izolat)	13	10	8	7	7	12	11	11	10	8	34	20
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13	13	8	7	7	26	25	13	8	7	26	20
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	18	14	12	10	n.a.	25	22	14	12	10	n.a.	n.a.
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	17	8	8	7	n.a.	32	19	n.a.	n.a.	n.a.	25	18
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	24	17	10	n.a.	n.a.	25	12	13	9	8	20	16
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	14	10	8	7	n.a.	15	14	8	7	n.a.	29	19
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	38	23	15	9	7	33	21	20	17	9	34	22
Fungalni soj												N ^{***}
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	20	17	14	12	9	n.a.	n.a.
<i>A. restrictus</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12	9	n.a.
<i>P. chrysogenum</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8	8	n.a.	n.a.	n.a.	12	10
<i>A. fumigatus</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	22	20	12	10	8	10	n.a.

*Prečnik diskova 6,0 mm. **15 µl uzorka po disku. ***30 µg po disku. EtOH-Etanol. A-Amoksicilin. N-Nistatin. n.a.–nije aktivno

Tabela 5.4. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/ml) i minimalne baktericidne/ fungicidne koncentracije (MBC/MFC) etarskih ulja vrste *G. macrorrhizum* i germakrona

Bakterijski soj	Rizom		Nadzemni delovi		Germakron	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
mg/mL						
<i>E. coli</i> (klinički izolat)	5	10	2.5	>5	1.25	>5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	1.25	5	0.625	5	>5	>5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.5	2.5	0.312	0.312	1.25	5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.5	2.5	0.039	1.25	2.5	>5
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	0.625	1.25	0.312	1.25	5	>5
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	2.5	10	0.625	0.625	5	5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.0004	0.001	0.001	0.001	1.25	2.5
Fungalni soj	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>P. chrysogenum</i> (izolat iz prašine dušeka)	10	10	10	>10	>5	>5
<i>A. restrictus</i> (izolat iz prašine dušeka)	10	10	10	10	>5	>5
<i>A. fumigatus</i> (izolat iz prašine dušeka)	5	10	5	>10	2.5	>5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>10	>10	>10	>10	>5	>5

>5 – nije aktivno pri datoj koncentraciji

Slično rezultatima ispitivanja disk-difuzionom metodom, ulje rizoma ne pokazuje aktivnost prema fungalnim sojevima ni na osnovu MIC vrednosti, a koje ukazuju na izrazitu rezistentnost ovih mikroorganizama. MIC jednaka ili manja od 0,5 mg/ml je karakteristična za supstance sa izraženom antimikrobnom aktivnošću, a MIC vrednosti u rasponu 0,6–1,50 mg/ml se tretiraju kao aktivnost srednjeg intenziteta, dok supstance sa većim MIC vrednostima nemaju značaja kao antimikrobni agensi (Sartoratto *et al.* 2004). Prema ovome, testiranja su pokazala veoma izraženu aktivnost oba ulja prema bakteriji *B. subtilis*, dok je u slučaju mikroorganizama *E. coli*, *S. aureus* i kliničkog izolata *S. aureus* samo *germ-n* ulje pokazalo umerenu aktivnost.

Pored ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja dobijenih iz nadzemnih delova i rizoma, testirana je i aktivnost germakrona, glavnog sastojka *germ-n* ulja. Rezultati testiranja aktivnosti ovog jedinjenja se u izvesnoj meri razlikuju od rezultata dobijenih za ulja. Najuočljivija razlika je potpuno odsustvo aktivnosti prema bakteriji *K. pneumoniae*, koja je osetljiva na oba testirana ulja. Antifungalna aktivnost germakrona je veoma slaba i slična aktivnostima ulja. Najosetljiviji mikroorganizmi na dejstvo ovog jedinjenja su mikroorganizmi *B. subtilis* i *E. coli*.

Na osnovu ovih rezultata, a naročito MIC vrednosti, germakron nije glavni nosilac antimikrobne aktivnosti testiranih ulja. Rezultati aktivnosti ulja i ovog ketona

prema *B. subtilis*, *S. aureus* i *C. sporogenes* sugeriju da germakron doprinosi aktivnosti, ali se ne može u potpunosti iskoristiti za objašnjavanje dobijenih rezultata.

U poređenju sa rezultatima mikrodilucionog testiranja, ispitivanje antimikrobne aktivnosti disk-difuzionom metodom daje sasvim drugačiju sliku kada je u pitanju aktivnost germakrona. U nekim slučajevima, germakron pokazuje veću aktivnost od ulja nadzemnih delova biljke, što se može objasniti razlikama u rastvorljivosti, odnosno difuzionoj sposobnosti germakrona ili ostalih aktivnih principa, a ne treba isključiti ni mogućnost sinergističkog ili antagonističkog delovanja sastojaka ulja.

Kada je u pitanju antimikrobno dejstvo germakrona, dobijeni rezultati se značajno razlikuju od opšteprihvaćenog mišljenja da je to jedinjenje glavni biološki aktivni konstituent ove i nekih drugih biljnih vrsta (Barrero et al., 2008). Na primer, utvrđeno je da je germakron jedan od glavnih komponenata etarskog ulja *Asarum caulescens*, vrste koja se koristi u kineskoj tradicionalnoj medicini za lečenje prehlade, kašla i astme i koja, takođe, pokazuje antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim i -negativnim bakterijama i fungalnim sojevima (Shunying et al., 2006). Utvrđeno je da geometrijski izomer germakrona izolovan iz korala roda *Gorgonia* ispoljava aktivnost prema *E. cloaceae* i *K. pneumoniae* (Roussis et al., 2001). Međutim, većina ostalih radova navodi germakron kao biološki aktivnu komponentu samo na osnovu prepostavke da aktivnost potiče od glavnog sastojka (Deng et al., 2006; Yang et al., 2007; Raj et al., 2008).

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta *Geranium sanguineum* i *Geranium robertianum*. Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti *gers-c*, *gerr-n* i *gerr-k* etarskih ulja, kao i aktivnosti standardnih antibiotika korišćenih kao pozitivne kontrole, dati su u Tabeli 5.5. Testiranje aktivnosti vršeno je mikrodilucionom metodom na šest Gram-pozitivnih, osam Gram-negativnih bakterijskih sojeva i pet gljivica.

Prema dobijenim MIC vrednostima, uzorak *gerr-n* je potpuno neaktivan pri svim testiranim koncentracijama u slučaju tri bakterijska i tri fungalna soja. Isti uzorak je pokazao aktivnost u intervalu koncentracija 0,312–10,0 mg/ml – najaktivniji je prema *E. coli* i *A. fumigatus*, sa najnižim vrednostima mikrobicidalne koncentracije od 0,312 mg/ml, dok tri bakterijska soja (*E. coli*, *K. pneumoniae* i *S. enterica*) pokazuju potpunu otpornost pri testiranim koncentracijama. Antifungalna aktivnost je slaba prema tri fungalna mikroorganizma.

Etarsko ulje korena ove biljne vrste (uzorak *gerr-k*) ispoljava jaču aktivnost u poređenju sa uljem nadzemnog dela, sa samo jednim popuno rezistentnim sojem (*S. enterica*). MIC vrednosti ovog ulja kreću se od 0,156 do 10,0 mg/ml. Najbolji rezultat za ovo ulje je inhibicija rasta kliničkog izolata *E. coli* (0,625 mg/ml). Nasuprot aktivnosti ulja nadzemnog dela, svi testirani fungalni mikroorganizmi su osetljivi na ulju (MIC=0,312–10,0 mg/ml).

Prilikom ranijeg ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskog ulja *G. robertianum*, korišćenjem Kirby-Bauer agar difuzione metode (Hersch-Martínez et al.,

2005), nije uočena neka značajnija aktivnost istog. Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom od strane Schelz-a i sar. (2006), isto ulje je pokazalo umerenu antimikrobnu aktivnost prema *Staphylococcus epidermidis* i dva soja *Saccharomyces cerevisiae*. Bitno je napomenuti da nijedna od navedenih publikacija ne navodi podatak o tome koji je deo biljke (nadzemni delovi, koren ili cela biljka) korišćen prilikom izolovanja ulja.

MIC i MBC vrednosti etarskog ulja vrste *G. sanguineum* nalaze se u intervalu 0,312–5,00 mg/ml, odnosno 0,312–10,0 mg/ml. Najosetljiviji soj bio je *M. flavus* ($\text{MIC}=\text{MBC}=0,312 \text{ mg/ml}$), a najrezistentniji *E. coli* 95 ($\text{MIC}=5,00$, $\text{MBC}>10 \text{ mg/ml}$), dok je soj *K. pneumoniae* ATCC 10031 pokazao potpunu otpornost na ulje.

Aktivnost sva tri ispitana ulja (*gers-c*, *gerr-n* i *gerr-k*) je slična, sa uporedivim MIC vrednostima u intervalu 0,156–10,0 mg/ml, što je i očekivano na osnovu sličnosti hemijskog sastava tih ulja. Utvrđeno je da je heksadekanska kiselina (45,3% u *gerr-k* ulju i glavni sastojak *gers-c*, *gerr-n* ulja) jak antimikrobni agens (Kabara et al., 1972; Yff et al., 2002; Cakir et al., 2004; Lei et al., 2008). Takođe, predloženo je da je heksahidrofarnezil-aceton takođe antimikrobni agens zbog izrazitog dejstva (Radulović et al., 2006). Poznato je da je biljni antibiotik protoanemonin, aktivni sastojak prisutan u biljkama familije Ranunculaceae (Holden & Seegal, 1945), aktivan protiv širokog spektra mikroorganizama (Didry, 1991). S obzirom da je prisutan u *gers-c* ulju (0,1%), ovo jedinjenje doprinosi, makar u određenoj meri, antimikrobnim svojstvima ovog etarskog ulja.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta *Geranium columbinum* i *Geranium lucidum*. Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti *gerc-n*, *gerc-k* i *gerl-c* etarskih ulja, kao i aktivnosti standardnih antibiotika korišćenih kao pozitivne kontrole dati su u Tabeli 5.6. Testiranje aktivnosti vršeno je mikrodilucionom metodom na šest Gram-pozitivnih, devet Gram-negativnih bakterijskih sojeva i pet fungalnih mikroorganizama. MIC vrednosti pokazuju jaču aktivnost pomenutih uzoraka protiv Gram-pozitivnih sojeva, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima ranijih testiranja antimikrobne aktivnosti (Consentino et al., 1999; Karaman et al., 2003; Sahin et al., 2002; Matasyoh et al., 2009).

Etarsko ulje izolovano iz nadzemnih delova vrste *G. columbinum* aktivnije je od *gerc-k* i *gerl-c* etarskih ulja, osim u slučaju dva soja *E. coli* (ATCC 5922 i ATCC 8739), koja su u potpunosti rezistentna na sva tri ulja. Ovo ulje je najaktivnije prema *C. sporogenes* ($\text{MIC}=0,437 \text{ mg/ml}$). Etarsko ulje izolovano iz korena iste vrste je pokazalo slabiju antimikrobnu aktivnost. Najosetljiviji soj mikroorganizama na ovo ulje je *K. pneumoniae* ($\text{MIC}=0,750 \text{ mg/ml}$), međutim, aktivnost je samo inhibitorna ($\text{MBC}>12,0 \text{ mg/ml}$). Ostali sojevi nisu osetljivi na *gerc-k* ulje pri testiranim koncentracijama. Na osnovu prethodnog, može se zaključiti da ovo ulje pokazuje uglavnom bakteriostatsku aktivnost, sa baktericidnom aktivnošću prema samo dva soja.

Etarsko ulje vrste *G. lucidum* je najaktivnije protiv testiranog soja *P. aeruginosa* ($MIC=MBC=0,837$ mg/ml) i kliničkog izolata *K. pneumoniae* ($MIC=0,837$, $MBC=1,675$ mg/ml).

Prisustvo 1,8-cineola (1,4%) u *gerl-c* ulju može biti razlog umerene antimikrobne aktivnosti *gerl-c* ulja. Sa druge strane, visok procenat heksadekanske kiseline i heksahidrofarnezil-acetona, takođe, može biti razlog uočene aktivnosti sva tri ulja. Međutim, treba naglasiti da aktivnosti ulja se ne mogu pripisati prisustvu samo pojedinih sastojaka u uljima iz razloga što ideo istih ne koreliše sa uočenom aktivnošću ulja. Prema tome, može se pretpostaviti da je uočena aktivnost rezultat sinergističke aktivnosti sastojaka ulja. Hemijski sastav *gerl-c* ulja karakteriše i prisustvo jedinjenja sa izrazitom antifungalnom aktivnošću, kariofilen-oksida (Cakir et al., 2004), pa to može biti razlog nešto veće antifugalne aktivnosti ovog ulja u odnosu na *gerc-n* i *gerc-k* ulje.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta *Erodium cicutarium*, *Erodium ciconium* i *Erodium absinthoides*. Rezultati antimikrobnog testiranja etarskih ulja ispitanih *Erodium* vrsta (uzorci *eroct-c1*, *erocn-c* i *eroab-c*), kao i standardnih antibiotika korišćenih kao pozitivne kontrole dati su u Tabeli 5.7. Testiranje aktivnosti vršeno je mikrodilucionom metodom na četiri Gram-pozitivna, četiri Gram-negativna bakterijska soja i pet fudgalnih mikroorganizama.

Rezultati testiranja pokazuju antibakterijsku aktivnost srednjeg intenziteta i relativno jaku antifungalnu aktivnost testiranih ulja, mada dosta slabiju od vrednosti antibiotika Nistatina. Najveću otpornost je imao mikroorganizam *K. pneumoniae*, dok je *B. subtilis* najosetljivija bakterija na testirana ulja *Erodium* vrsta. Ovakva osetljivost *B. subtilis* je već ranije uočena (Sartoratto et al., 2004). Nema značajnih razlika u aktivnostima testiranih uzoraka prema Gram-pozitivnim, odnosno Gram-negativnim sojevima, što je, takođe, prethodno publikovano (Ouattara et al., 1997; Burt, 2007).

Uzorak *eroct-c1* pokazuje antimikrobnu aktivnost srednjeg intenziteta, sa MIC vrednostima u intervalu 0,312–2,50 mg/ml za bakterije i 0,078–0,325 mg/ml za fudgalne sojeve. Najizraženija je aktivnost protiv *S. aureus* (ATCC soj) i *C. sporogenes* ($MIC=0,312$ mg/ml; $MBC=2,5$ mg/ml), dok je klinički izolat *S. aureus* najrezistentniji soj prema *eroct-c1* ulju. Najosetljiviji testirani fudgalni soj je *A. restrictus* ($MIC=MBC=0,078$ mg/ml), a najrezistentniji *C. albicans* ($MIC=0,312$ mg/ml; $MBC=2,5$ mg/ml). S obzirom da je etarsko ulje *E. cicutarium* jedino ulje ovog roda čija je antimikrobnna aktivnost prethodno ispitana, poređenje rezultata je moguće samo u slučaju ove biljne vrste. Nikitina i sar. (2007) su ispitivali antimikrobnu aktivnost ekstrakta lista pri koncentracijama od 500 i 1000 mg/ml. Vodni ekstrakt je pokazao najjaču aktivnost, i to prema četiri od ukupno jedanaest testiranih sojeva *B. subtilis* i prema svih sedam testiranih *Pseudomonas* sp. sojeva. MIC vrednosti *eroct-c1* ulja prema *Pseudomonas* and *Bacillus* mikroorganizmima (312, odnosno 625 µg/ml) su niže u poređenju sa onim u navedenoj publikaciji.

MIC vrednosti etarskog ulja *E. ciconium* su u intervalu 0,156–5,00 mg/ml. Etarsko ulje je aktivno protiv svih testiranih bakterijskih i fungalnih sojeva. Najizraženiju aktivnost ima protiv *B. subtilis* (MIC=0,156 mg/ml), dok je *E. coli* (ATCC soj) najrezistentniji od testiranih sojeva (MIC=5 mg/ml; MBC>5 mg/ml). Antifungalna aktivnost *erocn-c* ulja je naročito izražena protiv *A. restrictus* (MIC=MBC=0,039 mg/ml), dok je *C. albicans* najrezistentniji fungalni soj (MIC=0,156 mg/ml; MFC=2,5 mg/ml).

Antibakterijska aktivnost etarskog ulja *E. absinthoides* je niža u poređenju sa aktivnostima *eroct-c1* i *erocn-c* ulja. Dva soja (*S. aureus* i *K. pneumoniae*) su rezistentna pri svim testiranim koncentracijama, a rast dva soja je inhibiran samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji (5 mg/ml), dok je, opet, najosetljiviji testirani soj *B. subtilis* (MIC=MBC=0,625 mg/ml). Antifungalna aktivnost *eroab-c* ulja je nešto izraženija od njegove antibakterijske aktivnosti, gde je *A. restrictus* (MIC=MBC=0,078 mg/ml) najosetljiviji i *C. albicans* (MIC=0,156 mg/ml; MBC=2,50 mg/ml) najrezistentniji fungalni soj.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz vrsta *G. purpureum* (uzorak *gerp-c*), *G. phaeum* (uzorci *gerph-n1*, *gerph-n2*, *gerph-r2*) i *E. cicutarium* (uzorci *eroct-c2*, *eroct-n3*) nije ispitana zbog malih prinosa ulja, odnosno nedovoljnih količina etarskih ulja za testiranje.

Iako su aktivnosti etarskih ulja značajno slabije u poređenju sa pozitivnom kontrolom, tj. antibioticima, ne treba zaboraviti da su u pitanju smeše sa moguće visokim sadržajem mikrobiološki inaktivnih supstanci. Primenom različitih tehnika razdvajanja mogu se potencijalno izolovati čiste aktivne komponente ili njihovi koncentrati sa znatno jačim dejstvom. Naravno, ne sme se zaboraviti ni činjenica da su ispitivanja vršena *in vitro*. Da bi se utvrdio pun potencijal navedenih ekstrakata i njihovih aktivnih komponenti, biće neophodno uzeti u obzir i procese apsorpcije i metabolizma pod dejstvom digestivnih enzima i crevne mikroflore, transport putem krvotoka, degradaciju u jetri, konjugaciju i izlučivanje.

Tabela 5.5. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/ml) i minimalne baktericidalne/ fungicidalne koncentracije (MBC/MFC) etarskih ulja vrsta *G. sanguineum* i *G. robertianum*

Bakterijski soj	<i>G. sanguineum</i> (cela biljka, mg/ml)		<i>G. robertianum</i> (nad. delovi, mg/ml)		<i>G. robertianum</i> (koren, mg/ml)		Hloramfenikol (µg/ml)
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>E. coli</i> (klinički izolat)	0,312	0,625	0,312	0,312	0,156	0,625	0,031
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5,00	5,00	10,0	10,0	5,00	5,00	0,062
<i>E. coli</i> ATCC 8379	1,25	>10,0	5,00	>10,0	2,50	>10,0	0,062
<i>E. coli</i> 95	5,00	>10,0	>10,0	>10,0	5,00	>10,0	0,062
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	0,156	2,50	0,062
<i>K. pneumoniae</i> (klinički izolat)	2,50	>10,0	5,00	>10,0	5,00	>10,0	0,062
<i>S. aureus</i> ATCC 27853	5,00	5,00	10,0	10,0	10,0	10,0	0,015
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	5,00	5,00	5,00	>10,0	5,00	>10,0	0,062
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404	0,625	5,00	2,50	10,0	2,50	5,00	0,250
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8247	2,50	10,0	2,50	10,0	10,0	10,0	0,125
<i>S. enterica</i> ATCC 13076	5,00	5,00	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	0,125
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	5,00	10,0	10,0	>10,0	10,0	>10,0	0,125
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	0,312	0,312	2,50	5,00	5,00	>10,0	0,031
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	2,50	5,00	5,00	>10,0	2,50	10,0	0,015
Fungalni soj	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	Nistatin (µg/ml)
<i>P. chrysogenum</i> (izolat z prašine dušeka)	10,0	10,0	>10,0	>10,0	10,0	10,0	0,039
<i>A. restrictus</i> (izolat z prašine dušeka)	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	0,078
<i>A. fumigatus</i> (izolat z prašine dušeka)	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312	0,039
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	5,00	10,0	10,0	>10,0	5,00	10,0	2,500
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	2,50	10,0	>10,0	>10,0	2,50	2,50	1,750

>10,0 – nije aktivno pri datoj koncentraciji

Tabela 5.6. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/ml) i minimalne baktericidalne/ fungicidalne koncentracije (MBC/MFC) etarskih ulja vrsta *G. columbinum* i *G. lucidum*

Bakterijski soj	<i>G. columbinum</i> (nadzemni delovi)		<i>G. columbinum</i> (koren)		<i>G. lucidum</i> (cela biljka)		Hloramfenikol
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
	mg/ml						µg/ml
A	B	C	D	E	F	G	H
<i>E. coli</i> (klinički izolat)	0,875	0,875	12,0	>12,0	>13,4	>13,4	0,031
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>14,0	>14,0	>12,0	>12,0	>13,4	>13,4	0,062
<i>E. coli</i> ATCC 8379	>14,0	>14,0	>12,0	>12,0	>13,4	>13,4	0,062
<i>E. coli</i> (Torlak 95)	14,0	14,0	>12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,062
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	14,0	>14,0	>12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,062
<i>K. pneumoniae</i> (klinički izolat)	1,750	1,75	0,750	>12,0	0,873	1,675	0,062
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25923	0,875	7,00	6,00	12,0	0,837	0,837	0,250
<i>S. aureus</i> ATCC 27853	1,750	1,75	12,0	>12,0	3,35	3,35	0,015
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	3,50	14,0	6,00	>12,0	1,675	13,4	0,062
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404	0,437	3,50	6,00	12,0	1,675	>13,4	0,062
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	7,00	>14,0	12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,125
<i>S. enterica</i> ATCC 13076	14,0	>14,0	>12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,125
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	7,00	>14,0	>12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,125
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	7,00	>14,0	6,00	>12,0	13,4	13,4	0,031
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	14,0	>14,0	12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,015

Tabela 5.6. (*Nastavak*)

A Fungalni soj	B MIC	C MFC	D MIC	E MFC	F MIC	G MFC	H Nistatin
<i>P. chrysogenum</i> (izolat z prašine dušeka)	7,00	14,0	12,0	>12,0	>13,4	>13,4	0,039
<i>A. restrictus</i> (izolat z prašine dušeka)	7,00	14,0	12,0	>12,0	13,4	>13,4	0,078
<i>A. fumigatus</i> (izolat z prašine dušeka)	0,109	7,00	0,375	>12,0	0,837	1,675	0,039
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,437	1,75	1,75	3,50	0,837	3,350	2,50
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	0,437	0,437	>12,0	>12,0	6,70	>13,4	1,75

>12,0, >13,4, >14,0 – nije aktivno pri datim koncentracijama

Tabela 5.7. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/ml) i minimalne baktericidalne/ fungicidalne koncentracije (MBC/MFC) etarskih ulja vrsta *E. ciconium*, *E. cicutarium* i *E. absinthoides*

Bakterijski soj	<i>E. ciconium</i> (cela biljka)		<i>E. cicutarium</i> (cela biljka)		<i>E. absinthoides</i> (cela biljka)		Hloramfenikol
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
	mg/ml						µg/ml
A	B	C	D	E	F	G	H
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25923	2,5	>5	0,312	>5	1,25	2,5	>5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	>5	0,625	2,5	5	5	5
<i>E. coli</i> (klinički izolat)	2,5	2,5	2,5	2,5	0,156	2,5	5
<i>K. pneumoniae</i> (klinički izolat)	2,5	>5	1,25	>5	>5	>5	5
<i>S. aureus</i> ATCC 27853	5	5	0,312	2,5	5	5	2,5
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	2,5	>5	2,5	>5	>5	>5	2,5
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404	0,312	5	0,312	2,5	0,312	2,5	5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,156	0,156	0,625	0,625	0,312	0,312	1,75
Fungalni soj	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	Nistatin
<i>P. chrysogenum</i> (izolat z prašine dušeka)	0,156	1,250	0,156	1,250	0,156	0,625	0,039
<i>A. restrictus</i> (izolat z prašine dušeka)	0,039	0,039	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078
<i>A. chrysogenum</i> (izolat z prašine dušeka)	0,078	0,078	0,156	0,156	0,078	0,078	0,039
<i>A. fumigatus</i> (izolat z prašine dušeka)	0,078	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,039
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,156	2,50	0,325	2,5	0,156	5	2,5

>5– nije aktivno pri datoj koncentraciji

5.2. FITOHEMIJSKO I MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE ODABRANIH VRSTA IZ PORODICE BRASSICACEAE

Najveći broj biljnih vrsta koji sadrže glukozinolate, sekundarne metabolite sa značajnom ulogom u zaštiti biljaka od patogenih mikroorganizama, nalazi se u okviru familije Brassicaceae, pa su iz tih razloga odabrani taksoni ove familije za fitohemijsko i mikrobiološko ispitivanje.

5.2.1. HEMIJSKI SASTAV AUTOLIZATA BILJNIH VRSTA *ERYSIMUM DIFFUSUM* I *HORNUNGIA PETRAEA*, HEMOTAKSONOMIJA I SINTEZA ODABRANIH METABOLITA

Iako se veliki broj članaka u naučnoj literaturi odnosi na identifikaciju glukozinolata primenom raznovrsnih metoda (Odeljak 3.3.6), često je bilo veoma teško dobiti usaglašene rezultate. Razlog za to leži u nedostatku pouzdane, standardizovane metode analize glukozinolata, njihovoj stabilnosti, tj. nestabilnosti pri uslovima analize i nedostatku analitičkih podataka neophodnih za pouzdanu identifikaciju. Analiza isparljivih degradacionih proizvoda, odnosno hidrolizata ovih biljnih metabolita, korišćenjem GC-MS tehnike, predstavlja prostu, brzu i, u većini slučajeva, pouzdanu metodu kvalitativne analize glukozinolata, odnosno njihovih degradacionih proizvoda. Kada je jedan od ciljeva ispitivanje biološke aktivnosti ovih jedinjenja, GC-MS analiza je veoma pogodna metoda za njihovu hemijsku analizu s obzirom da su lako isparljivi, degradacioni proizvodi glukozinolata biološki aktivne forme ovih jedinjenja.

Katalitičkim dejstvom enzima mirozinaza dolazi do hidrolize glukozinolata, pri čemu nastaju nestabilni tiohidroksimat-*O*-sulfati, koji otpuštanjem sulfatne grupe (Lössen-ovo premeštanje), u zavisnosti od pH i/ili ostalih faktora, mogu dati različite degradacione proizvode – izotiocijanate, tiocijanate, nitrile itd. Hidroliza glukozinolata u ovom radu katalizovana je endogenom mirozinazom u skladu sa prethodno publikovanom procedurom (Radulović et al., 2008).

Analiza autolizata je vršena na uzorcima biljne vrste *Erysimum diffusum*, prikupljenim sa dva lokaliteta (uzorci sa oznakama *eryd-c1*, *eryd-n2* i *eryd-k2*) i vrste *Hornungia petraea* (uzorci *horp-c1* i *horp-c2*, takođe prikupljenih sa dva lokaliteta, Odeljak 4.1.4.2.). GC i GC-MS analizom etarskih ekstrakata dobijenih nakon autolize identifikovana su 43 sastojka u uzorcima *E. diffusum*, odnosno 30 jedinjenja u uzorcima vrste *H. petraea* (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Hemijiški sastav autolizata (etarskih ekstrakata) ispitivanih vrsta porodice Brassicaceae

RI	Jedinjenje	Klasa	<i>E. diffusum</i> (cela biljka)		<i>E. diffusum</i> (nadzemni delovi)		<i>Ey. diffusum</i> (koren)		<i>H. petraea</i> (cela biljka)		<i>H. petraea</i> (cela biljka)		Metoda identifikacije
			<i>eryd-c1</i>	<i>eryd-n2</i>	<i>eryd-k2</i>	<i>horp-c1</i>	<i>horp-c2</i>	%*					
A	B	C	D	E	F	G	H	I					
765	(Z)-2-Penten-1-ol	FAD	1,3	-	-	-	-	-					RI, MS
801	(Z)-3-Heksenal	FAD	0,9	-	-	-	-	-					RI, MS
847	(E)-3-Heksen-1-ol	FAD	0,3	-	-	-	-	-					RI, MS
851	(Z)-3-Heksen-1-ol	FAD	21,9	-	-	-	-	-					RI, MS
860	(E)-2-Heksen-1-ol	FAD	3,7	-	-	-	-	-					RI, MS
911	(E,E)-2,4-Heksadienal	FAD	0,2	-	-	-	-	-					RI, MS
964	Benzaldehid	OTH	0,4	-	-	-	tr	-					RI, MS, Co-GC
968	Heksanska kiselina	FAD	0,3	-	-	-	-	-					RI, MS, Co-GC
978	Fenol	OTH	-	-	-	-	0,1	-					RI, MS, Co-GC
989	(E)-3-Heksenska kiselina	FAD	3,1	-	-	-	-	-					RI, MS
1008	(E)-2-Heksenska kiselina	FAD	1,1	-	-	-	-	-					RI, MS
1027	2-Etil-1-heksanol	OTH	-	-	-	-	0,1	-					RI, MS
1036	Benzil-alkohol	OTH	1,3	-	-	-	-	-					RI, MS, Co-GC
1046	Fenilacetraldehid	OTH	0,3	-	-	-	-	-					RI, MS, Co-GC

Tabela 5.8. (Nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1106	Nonanal	FAD	-	-	-	0,2	-	RI, MS, Co-GC
1117	2-Fenil-1-etanol	OTH	0,1	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1129	Fenilacetonitril	NIT	-	-	-	1,2	0,2	RI, MS
1356	Benzil-izotiocijanat	ITC	-	-	-	8,5	4,8	RI, MS, Co-GC
1379	3-Metoksifenilacetonitril	NIT	-	-	-	2,4	1,6	RI, MS, Co-GC
1401	4-Izotiocijanatobutanska kiselina	ITC	7,6	-	14,1	-	-	RI, MS, Co-GC, NMR
1404	Vanilin	OTH	0,4	-	-	0,1	-	RI, MS, Co-GC
1458	(E)-β-Farnezen	TER/OTH	-	0,2	-	-	-	RI, MS
1480	Hidroksifenil-acetonitril**	NIT	-	-	-	1,5	-	RI, MS
1599	3-Metoksibenzil-izotiocijanat	TIO	-	-	-	25,1	34,4	RI, MS, Co-GC
1629	4-Metoksibenzil-izotiocijanat	ITC	-	-	-	-	tr	RI, MS, Co-GC
1703	Hidroksibenzil-izotiocijanat**	ITC	-	-	-	15,9	22,1	RI, MS
1841	Neofitadien (izomer 2)	TER/OTH	0,6	0,1	0,1	0,9	-	RI, MS
1846	Heksahidrofarnezil-aceton	OTH	-	0,1	0,1	-	-	RI, MS
1900	Nonadekan	FAD	-	-	-	tr	-	RI, MS, Co-GC
1962	Heksadekanska kiselina	FAD	3,4	2,1	13,9	1,1	0,3	RI, MS, Co-GC
2000	Eikozan	FAD	-	-	-	0,2	-	RI, MS, Co-GC
2070	Neidentifikovana komponenta***	-	-	-	1,5	-	-	
2100	Heneikozan	FAD	-	-	-	0,3	0,1	RI, MS, Co-GC
2118	(E)-Fitol	TER/OTH	0,5	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
2138	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienska kiselina (=Linolna kiselina)	FAD	1,2	0,9	8,3	-	-	RI, MS, Co-GC

Tabela 5.8. (Nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
2141	(Z,Z,Z)-9,12,15-Oktadekatrienska kiselina (=Linolenska kiselina)	FAD	6,2	5,4	18,1	2,6	0,2	RI, MS, Co-GC
2144	(Z)-9-Oktadecenska kiselina (=Oleinska kiselina)	FAD	-	-	13,8	-	-	RI, MS, Co-GC
2164	Oktadekanska kiselina	FAD	-	0,9	0,8	-	-	RI, MS, Co-GC
2200	Dokozan	FAD	-	t	-	0,4	0,1	RI, MS, Co-GC
2300	Trikozan	FAD	0,1	0,8	t	0,5	0,1	RI, MS, Co-GC
2400	Tetrakozan	FAD	0,1	0,1	0,2	0,3	-	RI, MS, Co-GC
2500	Pentakozan	FAD	13,2	1,3	0,6	0,6	1,4	RI, MS, Co-GC
2600	Heksakozan	FAD	t	0,1	t	0,5	-	RI, MS, Co-GC
2632	Tetrakozanal	FAD	-	0,3	-	-	-	RI, MS
2700	Heptakozan	FAD	1,2	2,8	0,7	1,7	1,2	RI, MS, Co-GC
2733	Pentakozanal	FAD	-	6,1	-	-	-	RI, MS
2800	Oktakozan	FAD	-	0,6	-	0,9	-	RI, MS, Co-GC
2834	Skvalen (sve E)	TER	-	-	0,9	2,1	0,9	RI, MS
2837	Heksakozanal	FAD	-	0,9	-	-	-	RI, MS
2900	Nonakozan	FAD	7,4	16,7	-	12,2	10,8	RI, MS, Co-GC
3000	Triakontan	FAD	0,9	2,2	0,9	2,1	3,0	RI, MS, Co-GC
3043	Oktakozanal	FAD	-	1,2	-	-	-	RI, MS
3100	Hentriakontan	FAD	17,2	35,1	11,7	8,5	4,2	RI, MS, Co-GC
3103	α -Tokoferol	OTH	0,5	-	0,7	3,6	3,3	RI, MS, Co-GC
3200	Dotriakontan	FAD	-	2,3	0,8	-	-	RI, MS, Co-GC
3254	Triakontanal	FAD	-	0,9	-	-	-	RI, MS

Tabela 5.8. (Nastavak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
3300	Tritriakontan	FAD	-	10,9	2,8	-	-	MS, Co-GC
3487	Dotriakontanal	FAD	-	0,2	-	-	-	MS

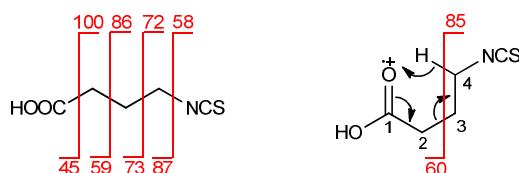
Grupisane komponente:

Izotiocjanati (ITC)	7,6	-	14,1	24,4	26,9
Tiocjanati (TIO)	-	-	-	25,1	34,4
Nitrili (NIT)	-	-	-	5,1	1,6
Terpenoidi (TER)	1,1	0,3	1,0	7,0	0,9
Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (FAD)	83,9	91,8	72,6	28,1	21,4
Ostala jedinjenja (OTH) ****	3,0	0,1	0,8	3,9	3,3
Identifikovano	95,6	92,2	88,5	93,6	87,5
Neidentifikovano (>0,1%)	-	-	1,5	-	-
Ukupno	95,6	92,2	90,0	93,6	88,5

*Srednja vrednost tri analize **Tačan izomer nije određen. ***MS, 70eV, 230 °C, RI 1850, m/z (rel. int.): 175 (100), 174 (18), 160 (28), 146 (26), 144 (31), 129 (56), 116 (21), 104 (42), 89 (20), 76 (18). ****Neklasifikovani konstituenti i konsistuenti mogućeg antropogenog porekla. RI_i.-Eksperimentalno određeni retencioni indeksi na HP-5MS koloni u odnosu na homologu seriju C₇-C₃₅ n-alkana. t- u tragovima (<0,05%). RI- uporedjivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima (Adams, 2007). MS- uporedjivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka. Co-GC- GC-koinjektiranjem standardnih supstanci. - / nije detektovano.

5.2.1.1. Analiza autolizata biljne vrste *Erysimum diffusum*, identifikacija novog izotiocijanata – 4-izotiocijanatobutanske kiselina

GC i GC-MS analizom etarskih ekstrakata autolizata utvrđeno je prisustvo 29 sastojaka u uzorku *eryd-c1*, 25 jedinjenja u uzorku *eryd-n2* i 20 jedinjenja u uzorku *eryd-k2*. Pored uobičajenih široko rasprostranjenih biljnih sekundarnih metabolita, FAD jedinjenja i terpenoida, u uzorcima *eryd-c1* (cela biljka) i *eryd-k2* (koren) detektovan je nepoznat, isparljivi izotiocijanat sa retencionim indeksom (RI) od 1401 jedinice (vrh širokog pika). Intenzivni molekulski jon mase *m/z* 145 i fragmentni joni karakteristični za izotiocijanatu grupu u masenom spektru ovog jedinjenja (Prilog 9.23) upućuju na to da bi taj molekul mogao biti degradacioni proizvod glukozinolata. Joni na *m/z* 59, 72 i 86 mogu se pripisati HNCS^+ , CH_2NCS^+ odnosno $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}^+$ katjonima. Fragmentni jon sa *m/z* vrednošću M^+-45 može da nastane gubitkom karboksilne grupe, što zajedno sa oblikom pika u hromatogramu (*tailing*) ukazuje na to da nepoznato jedinjenje može biti 4-izotiocijanatobutanska kiselina (**196**, Slika 5.2.). Signali u masenom spektru na *m/z* 85 i 60 odgovaraju jonima koji nastaju intramolekulskim premeštanjem C4 vodonika na karbonilni kiseonik i raskidanjem C2-C3 veze (McLafferty-evo premeštanje) (Slika 5.1).



Slika 5.1. Levo: 4-izotiocijanatobutanska kiselina (**156**), prepostavljena struktura neidentifikovane komponente, detektovane u autolizatu korena *E. diffusum*; desno: McLafferty-evo premeštanje, fragmentaciona reakcija kojom se mogu objasniti fragmentni joni na *m/z* 85 i 60 u masenom spektru detektovane komponente (Prilog 9.23)

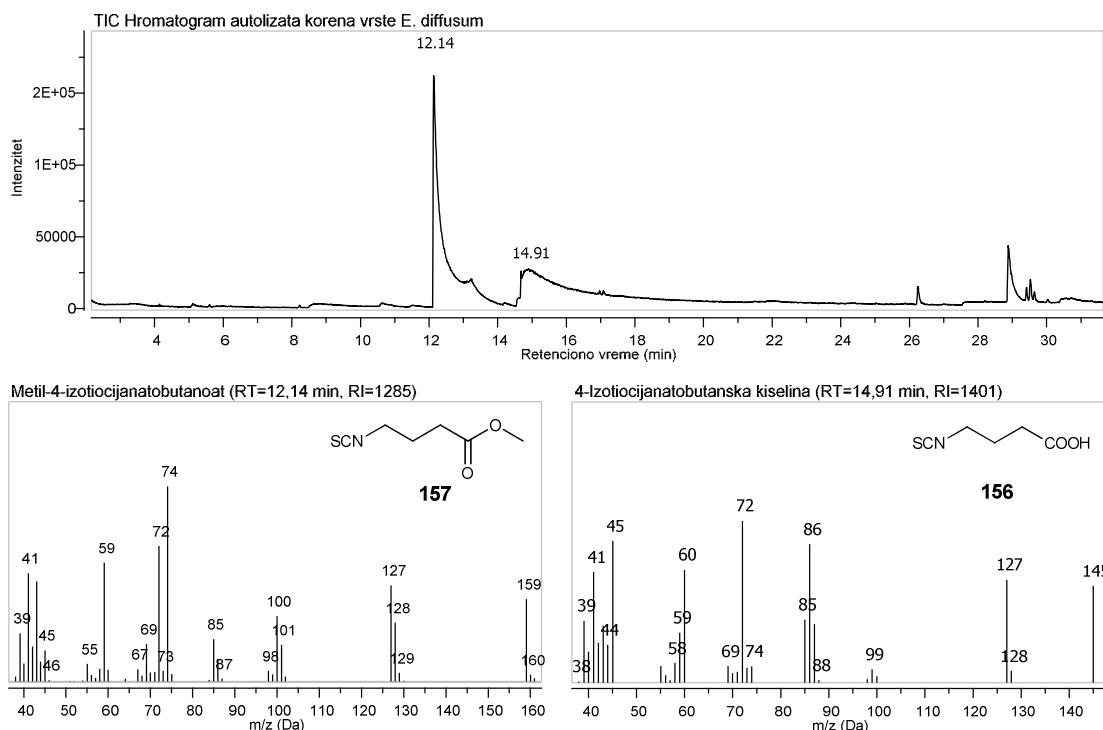
Inicijalna potvrda identiteta prepostavljene strukture izvršena je prevodenjem kiseline u odgovarajući metil-estar, reakcijom autolizata sa diazometanom. Ovom derivatizacionom reakcijom je jedinjenje **156** u potpunosti esterifikovano u poznato jedinjenje metil-4-izotiocijanatobutanoat (**157**), koje je identifikованo poređenjem masenog spektra dobijenog jedinjenja sa spektrom iz Wiley-NIST biblioteke masenih spektara. Sa ciljem dobijanja dodatne potvrde identiteta, kao i određene količine čistog jedinjenja, kiselina **156** je sintetisana polazeći od 4-aminobutanske kiseline (**155**) prema modifikovanoj proceduri Munch-a i sar. (2008) i okarakterisana IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru sintetisanog jedinjenja bila je prisutna traka na 1702 cm^{-1} , karakteristična za $\text{C}=\text{O}$ vibracije karboksilne grupe. Široka traka $2098\text{--}2181 \text{ cm}^{-1}$ (dublet) potvrđuje prisustvo $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ grupe, dok traka na 2936 cm^{-1} potiče od apsorpcije metilenskih C-H veza. U ^1H NMR spektru, kvintet na $\delta 1,85$, triplet na $\delta 2,35$ i triplet na $\delta 3,66$ potiču od CH_2 protona na položajima C-3, C-2, odnosno C-4. U ^{13}C NMR se javlja 5 signala: tri metilenska $\text{C}-sp^3$ signala sa hemijskim pomeranjima od 25,0, 30,7 i

44,4 ppm (C-3, C-2 odnosno C-4), slab i širok signal ugljenika izotiocijanatne grupe na δ 128,5 i pomeranje atoma ugljenika karboksilne grupe na 173,6 ppm. Konačno, autolizat korena vrste *E. diffusum* i sintetisano jedinjenje **156** su GC koinjektirani, pri čemu uvećanje pika o kome je diskutovano je nesumnjivo predstavljalo potvrdu identiteta jedinjenja nepoznatog metabolita. Važno pažnje je primetiti da ovo jedinjenje nije detektovano u autolizatu nadzemnog dela biljke.

Nakon detaljne pretrage naučne literature zaključeno je da jedinjenje **156** predstavlja novi proizvod hidrolize glukozinolata, koji do sada nije detektovan u prirodi, mada je već sintetisan (Kricheldorf, 1970). Identifikovana struktura upućuje na postojanje 3-karboksipropil-glukozinolata kao prekursora jedinjenja **156**. Nekoliko pionirske istraživača je izolovalo/identifikovalo strukturno veoma blizak glukozinolat iz određenog broja krucifera (od kojih većina pripada rodu *Erysimum*). Naime, Kjær i Gmelin (1957) su iz semena biljne vrste *Erysimum odoratum* izolovali glukozinolat koji su identifikovali kao 3-metoksikarbonilpropil-glukozinolat i nazvali glukoeripestrin (u navedenom radu je ispitivana vrsta *E. odoratum* zbog pogrešne botaničke determinacije, smatrana za *E. rupestre* (Chisholm, 1973)). U istom radu je navedeno da semena nekoliko vrsta roda *Erysimum* – *E. ochroleucum*, *E. pumilum* i *E. rupestre* f. *aurantiacum* sadrže isti glukozid. Nekoliko godina kasnije, Chisholm je ponovo izolovao glukoeripestrin po prvi put ovoga puta iz vrste *E. rupestre* i istraživao njegovu biosintezu (Chisholm, 1973). Metil-estar 4-izotiocijanatobutanske kiseline je takođe detektovan kod vrsta *Diplotaxis tenuifolia* i *Eruca sativa* od strane Schläter-a i Gmelina (1972) i vrste *D. harra* od strane Hashem-a i Saleh-a (1999). U ispitivanju distribucije glukozinolata kod 51 vrste krucifera, Al-Shehbaz i Al-Shammary (1987) su utvrdili prisustvo pomenutog metil-estra kod dve (*E. aucherianum* i *E. filifolium*) od četiri ispitivane vrste roda *Erysimum*. Autori, takođe, ističući prisustvo (u ispitanim *Erysimum* vrstama) nepoznatog jedinjenja sa karakteristikama izotiocijanata i znatno manjom R_f vrednošću (papirna hromatografija) njegove tiouree od bilo koje poznate, i da veruju da bi to mogao biti novi glukozinolat, odnosno derivat/hidrolizat novog glukozinolata.

Pažljivim razmatranjem primenjivane metodologije za izolovanje/identifikaciju glukozinolata ili njihovih degradacionih proizvoda od strane gore navedenih istraživača, može se videti da se u ovim postupcima koristi vruć/ključali metanol, u većini slučajeva, za inaktivaciju mirozinaze u koraku koji prethodi ekstrakciji intaktnih molekula glukozinolata (ISO 9167-1:1992; Elliott & Stowe, 1971; Kjær & Schuster, 1973; Daxenbichler et al., 1980; Al-Gendy & Lockwood, 2003). Mogućnost da može da dođe do esterifikacije (ili transesterifikacije) u ključalom metanolu u toku postupka ekstrakcije je već zabeležena (Elliott & Stowe, 1971). Na osnovu ovih zapažanja, sa ciljem ispitivanja mogućnosti artefaktskog nastajanja jedinjenja **157** (ili odgovarajućeg glukozinolata) iz jedinjenja **156** (ili odgovarajućeg glukozinolata), ponovljena je analiza korena vrste *E. diffusum* prema modifikovanoj proceduri (pogledati odeljak 4.1.4.). Modifikacija se sastojala u prethodnoj inaktivaciji endogene mirozinaze pomoću ključalog metanola u toku 10 minuta u jednom delu biljnog materijala. Nakon

uparavanja metanola, biljni materijal je pomešan sa istom količinom svežeg biljnog materijala koji nije tretiran metanolom (izvor mirozinaze) i podvrgnut autolizi prema standardnoj proceduri (Radulović et al., 2008). Pri ovim uslovima, koji su u početnom delu prate metodologiju publikacija iz literature za ekstrakciju intaktnih glukozinolata, u hromatogramu je uočen (detektovan) pik odgovarajućeg metil-estra (procena je da su površine ispod pikova jedinjenja **156** i **157** (metil-estar jedinjenja **156**) približno iste u dobijenom TIC hromatogramu, Slika 5.2).



Slika 5.2. TIC Hromatogram autolizata korena *E. diffusum* dobijen po modifikovanoj proceduri (modifikacija se sastoji u prethodnoj delimičnoj inaktivaciji endogene mirozinaze u jednom delu biljnog materijala pomoću ključalog metanola) (gore) i maseni spektri i strukture pravog proizvoda autolize 4-izotiocianatobutanske kiseline (**156**, dole desno) i artefakta metil-estra pomenutog jedinjenja formiranog u toku izolovanja (**157**, dole levo).

Uzimajući u obzir i činjenicu da metil-4-izotiocianatobutanoat nije detektovan u autolizatu dobijenom po standardnoj proceduri (bez korišćenja ključalog metanola radi inaktivacije mirozinaze), može se zaključiti da su pomenuti metil-estar i odgovarajući glukozinolat verovatno artefakti izolovanja, a nastali esterifikacijom u toku operacija koje uključuju upotrebu ključalog metanola. Prisustvo jedinjenja **156** u nekim *Erysimum* vrstama je možda nagovešteno od strane Al-Shehbaz-a i Al-Shammary-ja (1987) – nepoznati izotiocianat sa malom R_f vrednošću na papirnom hromatogramu autolizata vrsta *E. aucherianum* i *E. filifolium*, koji se javlja zajedno sa metil-estrom ove kiseline. Jedine argumente u korist jedinjenja **157** i njegovog glukozinolata pruža biosintetska studija sprovedena od strane Chisholm-a (1973). Između ostalog, u ovoj studiji se navodi da metil-grupa ovih estara potiče od metionina (7,9% ukupne inkorporacije ^{14}C koji potiče iz metionina), t.j. da se metil-grupa ne inkorporira u molekule u toku

ekstrakcije (treba naglasiti da iako su za ispitivanje biosinteze korišćena izotopski markirana ^{14}C jedinjenja, izolovanje glukozinolata je vršeno procedurom koja uključuje ekstrakciju ključalim metanolom). Ove biosintetski važne eksperimente treba ponoviti pri čemu u koraku izolovanja izotiocijanata treba izbeći upotrebu metanola.

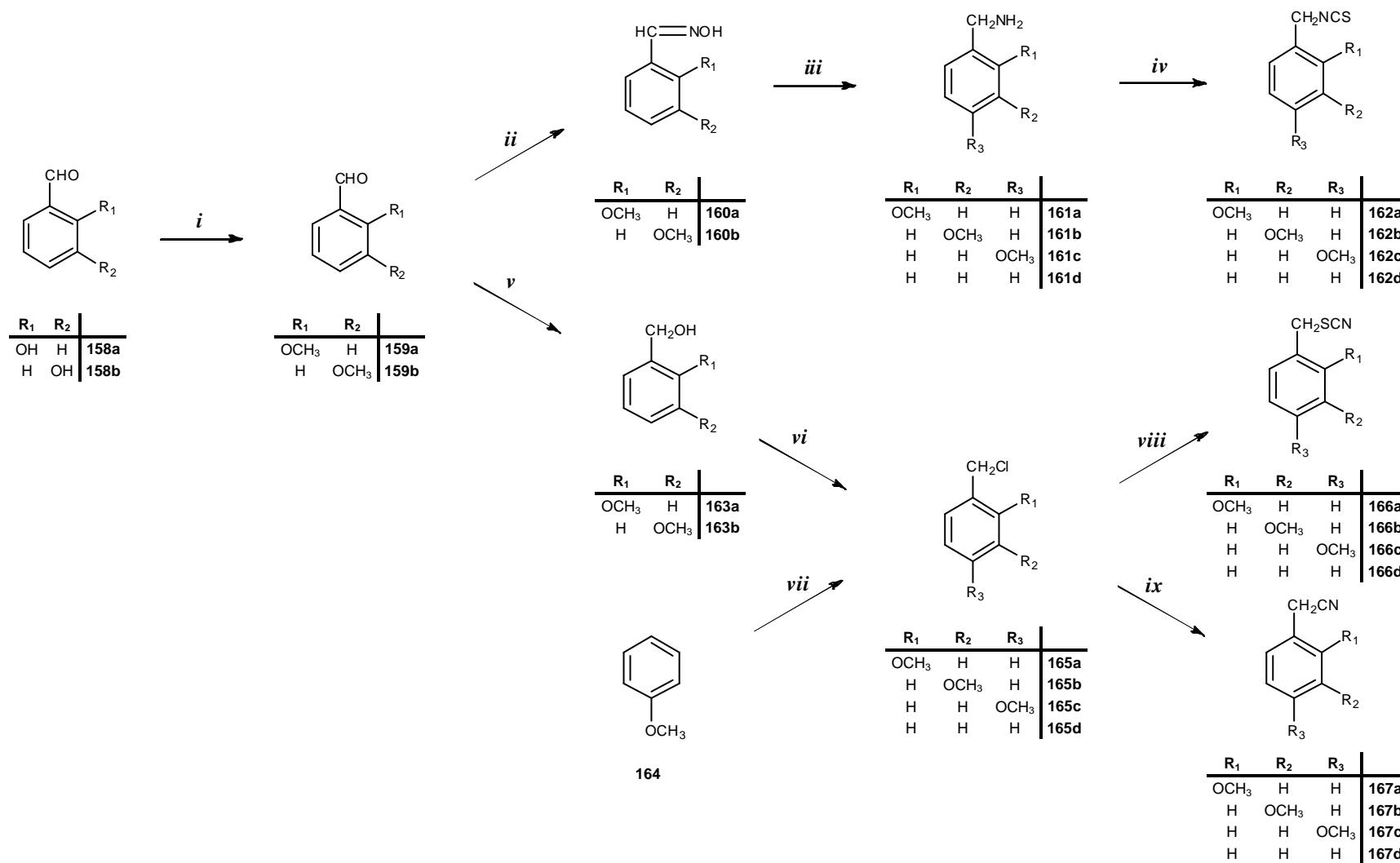
Metil-estar jedinjenja **156** zajedno sa etil-estrom, pominje se u radovima Pivnick-a i sar. (1991, 1992). Istraživanje se odnosi na atraktantno dejstvo ovih jedinjenja, pojedinačno ili u smeši, na insekte *Phyllotreta* vrste i *Nysius niger* (Pivnick et al., 1991; Pivnick et al., 1992). Etil-estar korišćen u ovom istraživanju sintetisan je u prvom navratu slučajno, pa zatim sa namerno, jer je utvrđeno da deluje privlačno za *N. niger*, dok metil-estar nije aktivан u tom smislu. Još jednom treba napomenuti da su u pitanju sintetisana, a ne prirodna jedinjenja.

5.2.1.2. Analiza autolizata biljne vrste *Hornungia petraea* i sinteza izomernih metoksibenzil-izotiocijanata, tiocijanata i cijanida

GC i GC-MS analizom etarskih ekstrakata autolizata uzoraka vrste *H. petraea* (*horp-c1* i *horp-c2*), prikupljenih sa dva lokaliteta, identifikovano je prisustvo 29, odnosno 18 sastojaka autolizata. Pored sveprisutnih biljnih sekundarnih metabolita (FAD jedinjenja i terpenoidi) u oba uzorka je detektovano više degradacionih proizvoda glukozinolata (aromični izotiocijanati i nitrili).

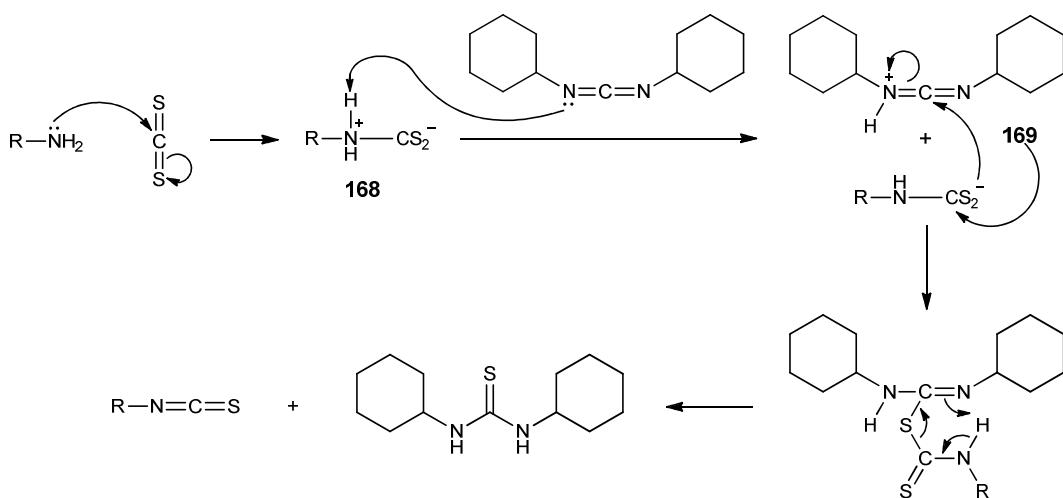
Već je napisano (Odeljak 5.1.1) da izomerna jedinjenja često poseduju veoma slične masene spektre (u ovom slučaju položajni (*o*-, *m*- i *p*-) i funkcionalni (-NCS i -SCN) izomeri (monometoksi)benzil-(izo)tiocijanata i položajni izomeri monometoksifenilacetonitrila). Drugim rečima, maseni spektri pružaju nedovoljno informacija za pouzdano razlikovanje izomera i uspešnu identifikaciju, pa je iz tog razloga neophodno utvrditi, tj. potvrditi identitet jedinjenja korišćenjem nekog ortogonalnog seta podataka – npr. poređenjem linearnih retencionih indeksa sa literaturnim podacima. Međutim, u literaturi, retencionih indeksa za konkretnе degradacione proizvode glukoznolata iz *H. petraea* nije bilo, tako da je, u ovom slučaju, bilo neophodno izvršiti sintezu nesupstituisanih, zatim *o*-, *m*- i *p*-metoksi-benzil-tiocijanata, izotiocijanata i cijanida (Šema 5.2), GC ko-injektirati sintetisana jedinjenja sa ispitivanim autolizatima i na osnovu povećanja površine pikova utvrditi sa sigurnošću identitet jedinjenja.

Kao polazna jedinjenja za sintezu (Šema 5.2) izotiocijanata **162a–b** korišćeni su 2-, odnosno 3-hidroksibenzaldehid (**158a–b**), koji su u prvom koraku sinteze metilovani korišćenjem metil-jodida po metodi Leardini-ja i sar. (2001), dajući odgovarajuće metiletre. Dobijeni metoksi-benzaldehydi (**159a–b**) prevedeni su u odgovarajuće aldoksime primenom „solvent free“ reakcije (Vukićević et al., 2006). Zatim je izvršena redukcija oksima **160a–b** pomoću cinka u 5%-tnom vodenom rastvoru natrijum-hidroksida, pri čemu su dobijeni amini **161a–b** (Tsukinoki et al., 1998). Sledeći i poslednji korak u sintezi izotiocijanata je reakcija amina **161a–d** (jedinjenja **161c–d** nisu sintetisana jer su



Šema 5.2. Sinteza nesupstituisanih i monometoksibenzil-izotiocijanata (162a–d) tiocijanata (166a–d) i cijanida (167a–c). (i) *O*-Metilovanje fenola: CH_3I , K_2CO_3 , DMF, st, 24 h; (ii) “Solvent free” sinteza aldoksima: $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOH , st, 1 h; (iii) Redukcija aldoksima: Zn , 5%-tni rastvor NaOH , st, 22 h; (iv) Sinteza izotiocijanata: CS_2 , DCC, CH_2Cl_2 , st, 6 h; (v) Redukcija aldehida: NaBH_4 , anh. EtOH , 0 °C, 100 min; (vi) Dobijanje benzil-hlorida (Appel-ova reakcija): Ph_3P , CCl_4 , refluks, 1 h; (vii) Hlormetilovanje anizola: HCl , paraformaldehid, C_6H_6 , 30 °C, 1 h; (viii) Sinteza tiocijanata: KSCN , DMF, st, 4 h; (ix) Sinteza nitrila: NaCN , EtOH , refluks, 4 h.

bila na raspolaganju) i ugljen-disulfida sa *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimidom kao dehidrosulfurizacionim sredstvom, prema modifikovanoj metodi Tsogoeva-e i sar. (2005), pri čemu se dobijaju ciljni izotiocijanati **162a-d**. Naime, deprotonovanjem adukta **168** formiranog u reakciji amina i ugljen-disulfida pomoću DCC-a dobija se karbamoditioat **169**. Nukleofilnim napadom jedinjenja **169** na *sp*-hibridizovani ugljenik protonovanog molekula DCC-a nastaje intermedijer, koji zatim daje izotiocijanat i dicikloheksiltioureu (Šema 5.3).

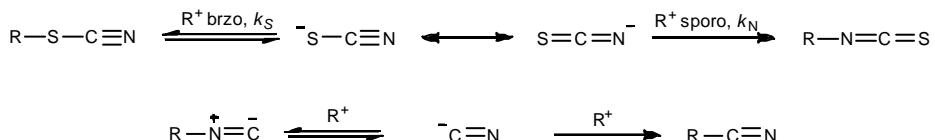


Šema 5.3. Pretpostavljeni mehanizam sinteze izotiocijanata reakcijom amina sa DCC-om i ugljen-disulfidom.

Tok svih reakcija je praćen hromatografijom na tankom sloju, dok je čistoća i identitet svih sintetisanih međuproizvoda i konačnih proizvoda potvrđen na osnovu IR spektara i GC-MS analizom (Prilozi 9.46–9.51).

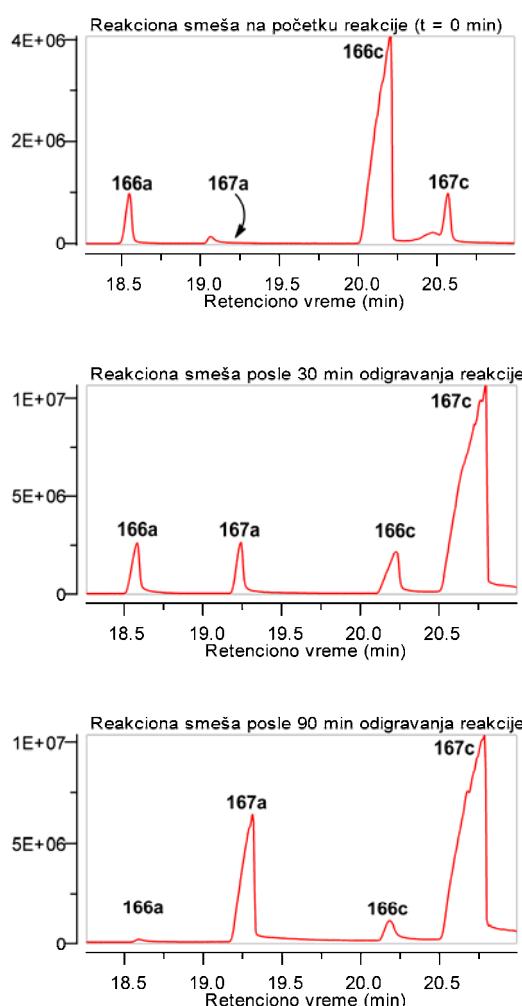
Aril-tiocijanati **166a-d** i -cijanidi **167a-d** su sintetisani iz odgovarajućih benzil-halogenida, s obzirom da su isti vrlo reaktivni i lako stupaju u reakciju sa nukleofilima (tiocijanatni i cijanidni-jon). U reakciji benzil-hlorida i kalijum-rodanida na sobnoj temperaturi u DMF u toku 4 sata dobijeni su tiocijanati **166a-d** kao proizvodi kinetički kontrolisane reakcije, dok su benzil-cijanidi **167a-d** dobijeni u reakciji aril-hlorida sa natrijum-cijanidom u smeši voda/etanol refluktovanjem u toku 4 sata.

Benzil-hloridi **165a-b** su dobijeni redukcijom aldehida **159a-b** prema poznatoj proceduri (reakcija sa natrijum-borhidridom u apsolutnom etanolu), a zatim nukleofilnom supstitucijom dobijenih benzil-alkohola **163a-b** u reakciji sa trifenilfosfinom i ugljendisulfidom (Appel-ova reakcija). *p*-Metoksibenzil-hlorid (**165c**) je sintetisan hlormetilovanjem anizola (**164**) (Müller et al., 1951; jedinjenje **165d**, benzil-hlorid, je komercijalno dostupno). Tok svih reakcija je praćen hromatografijom na tankom sloju, dok je čistoća i identitet svih sintetisanih međuproizvoda i konačnih proizvoda, takođe, potvrđen na osnovu tumačenja IR spektara i GC-MS analizom. Jedinjenje **166b** se može smatrati potpuno novom strukturom, s obzirom da detaljnou pretragom naučne literature nisu pronađeni nikakvi podaci o ovom jedinjenju.



Šema 5.4. Nukleofilna supstitucija tiocijanatnim, odnosno cijanidnim jonom. Moguća su dva proizvoda: tiocijanati i izotiocijanati, odnosno izonitrili i nitrili.

Aril-halogenidi veoma lako stupaju u reakcije nukleofilne supstitucije, u našem slučaju sa tiocijanatnim-jonima iz kalijum-rodanida i cijanidnim-jonima iz natrijum-cijanida. Tiocijanatni i cijanidni joni reaguju sa elektrofilom R^+ ili $\text{R}-\text{L}$ (gde je L odlazeća grupa), i u zavisnosti od prirode elektrofila i reakcionih uslova, u opštem slučaju, po dva moguća mehanizma ($\text{S}_{\text{N}}1$ i $\text{S}_{\text{N}}2$) pri čemu se mogu dobiti dva proizvoda: tiocijanati i izotiocijanati, odnosno izonitrili i nitrili (Šema 5.4).

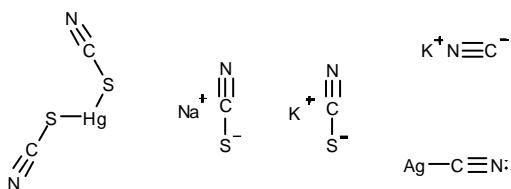


Slika 5.3. Termalna izomerizacija smeše tiocijanata **166a,c** u izotiocijanate **167a,c** refliktovanjem u DMF; $t=0$ min, **166a:167a**=96:4, **166c:167c**=90:10; $t=30$ min, **166a:167a**=52:48, **166c:167c**=12:88; $t=90$ min, **166a:167a**=2:98, **166c:167c**=4:96.

U reakciji benzil-hlorida i kalijum-rodanida dobijeni su tiocijanati kao proizvodi brže, kinetički kontrolisane reakcije.* Izotiocijanati su proizvodi termodinamički kontrolisane reakcije (jača C–N u odnosu na C–S vezu) i nastaju izomerizacijom tiocijanata brzinom koja zavisi od prirode elektrofila i reakcionih uslova. Izomerizacija tiocijanata može biti inicirana prisustvom tiocijanatnog jona (Fava et al., 1965), zagrevanjem (Smith & Emerson, 1960), fotolitički (Parks & Spurlock, 1973; Lex et al., 2006), katalitički (metalne soli, kao što su kadmijum-jodid, cink-hlorid, zatim jake kiseline; Gillis, 1920; Schmidt et al., 1930) itd. Za ovu reakciju je predložen niz mehanizama (Smith & Emerson, 1960).

Radi dodatne potvrde strukture dobijenih tiocijanata i izotiocijanata, izvršena je transformacija, tj. termalna izomerizacija smeše tiocijanata **166a,c** u izotiocijanate **167a,c**. Reakcija je vršena zagrevanjem tiocijanata u DMF-u na

* Eksperimentalno je utvrđeno da se k_S/k_N odnos (Slika 5.6) kreće u opsegu od 10^2 do 10^3 kod reakcija $\text{S}_{\text{N}}2$ tipa (Tonellato & Levorato, 1969; Fava et al., 1965) i od 2 do 10 kod $\text{S}_{\text{N}}1$ reakcija (Iliceto et al., 1961; Fava et al., 1965; Ceccon et al., 1969; Cannell & Taft, 1956; White & Li, 1992; Lewis & Cooper, 1962; Tonellato, 1969), što je i moguće objasniti na osnovu HSAB principa (Pearson, 1997).



Slika 5.4. Nukleofilni reagensi u sintezi (izo)tiocijanata i nitrila, živa(II)-tiocijanat, natrijum-rodanid, kalijum-rodanid, kalijum-cijanid i srebro(I)-cijanid

objasniti Pearson-ovim principom tvrdih/mekih kiselina i baza (*eng. hard soft acid base* (HSAB); Pearson, 1997). Naime, prema HSAB principu, sumpor, kao meki nukleofil ambidentnog tiocijanatnog jona, trebalo bi da bude reaktivniji prema mekim elektrofilima benzil-halogenidima od azota (tvrdi nukleofil) (Buckley et al., 1994), tj. po ovom principu tiocijanati su glavni proizvod kinetički kontrolisane reakcije što i jeste slučaj. Intermedijerni karb-katjon nastao iz benzil-hlorida, kao meki elektrofil (rezonantna delokalizacija negativne šarže)[†] ili sam halogenid u S_N2 reakciji gradi vezu sa sumporom tiocijanatnog jona.[‡] Nastajanje tiocijanata kao glavnog proizvoda kinetički kontrolisane reakcije delimično se može objasniti i malim promenama u dužini veza i reorganizaciji tiocijanatnog-jona prilikom građenja C-S veze kod formiranja tiocijanata u poređenju sa izotiocijanatima (Fleming, 2009). Više informacija se može naći u publikaciji Loos-a i sar. (2003).

I pored činjenice da je sumpor veoma dobar nukleofil, supstitucija tiocijanatom alkil-halogenida se može usmeriti u pravcu građenja C–N veze (izotiocijanati) izborom pogodnog nukleofilnog reagensa kojim je favorizovan nukleofilni napad azota tiocijanatnog jona. Korišćenjem natrijum- ili kalijum-rodanida dobijaju se isključivo tiocijanati kao proizvod kinetički kontrolisane reakcije,[§] međutim, upotrebo reagenasa kod kojih je veza anjona i katjona, makar delimično, kovalentnog tipa (npr. živa(II)-tiocijanat, živa(I)-tiocijanat, bakat(II)-tiocijanat itd.), proizvod reakcije je najčešće smeša oba izomera, npr. u reakciji benzil-hlorida sa živa(II)-tiocijanatom na 30–34 °C u toku 2,5 časa dobija se isključivo izotiocijanat, dok se u reakciji istog supstrata sa kalijum-rodanidom na 30–32 °C u toku 0,66 časova dobija isključivo tiocijanat (Watanabe et al., 1974).

Cijanidni joni reaguju sa mekim alkil-halogenidima po S_N2 mehanizmu i karb-katjonima (tvrdi elektrofili) po S_N1 mehanizmu dajući, skoro uvek, nitrile, koji su termodinamički favorizovani. U pojedinim slučajevima, kao što je reakcija halogenida sa srebro-cijanidom dobijaju se izonitrili (Slika 5.4). Ovo se može objasniti postojanjem

[†] Osim što rezonantni efekat favorizuje odvijanje reakcije po S_N1 mehanizmu, ovaj efekat čini S_N2 reakciju brzom, pa se može reći da se ova reakcija odigrava mešanim mehanizmom.

[‡] Sumpor ambidentnog tiocijanatnog jona je 1000 puta nukleofilniji, tj. reaktivniji prema benzil-halogenidima od azota (Schiavon, 1962; Buckley & Oppenheimer, 1994)

[§] Veza između natrijuma, odnosno kalijuma i tiocijanatnog jona je jonskog tipa. Natrijum- i kalijum-rodanid grade ortorombičnu kristalnu rešetku, gde je Na^+ -jon oktaedralno okružen sa po tri atoma azota i sumpora, a tiocijanatni-jon skoro linearan (178,3°) (van Rooyen & Boeyens, 1975; Blaschko et al., 1991).

koordinativne veze između atoma srebra i ugljenika čineći azot nukleofilnijim (ugljenik maskiranim), dok u slučaju kalijum-cijanida, atom kalijuma nije kovalentno vezan za CN⁻ omogućavajući nukleofilni napad ugljenika cijanidnog-jona (Šema 5.4).

Sintetisani izotiocijanati, tiocijanati i cijanidi su GC koinjektirani sa autolizatom vrste *H. petraea*, pri čemu je uvećanje nekih pikova degradacionih proizvoda glukozinolata nesumnjivo predstavljalo potvrdu identiteta posmatranih jedinjenja. U autolizatu vrste *H. petraea* su, dakle, prisutni fenilacetonitril (**167d**), benzil-izotiocijanat (**162d**), 3-metoksifenilacetonitril (**167b**), 3-metoksibenzil-izotiocijanat (**162b**) i 4-metoksibenzil-izotiocijanat (**162c**). Pored ovih detektovani su izomerni hidroksibenzil-izotiocijanat i cijanid sa neodređenim položajem na benzenovom jezgru. Identifikovani degradacioni proizvodi glukozinolata upućuju na glukotropaeolin (**11**, benzil-glukozinolat), glukolimnantin (**45**, 3-metoksibenzil-glukozinolat) i glukoaubrietin (**46**, 4-metoksibenzil-glukozinolat) kao prekursore identifikovanih jedinjenja **162b-d** i **167b,d**.

Ispitivanjem vrste *Hutchinsia alpina* (Tabela 3.4), taksonu srodnom ispitivanoj vrsti *H. petraea*, utvrđeno je prisustvo benzil- (glukotropaeolin, **11**), 3-hidroksibenzil- (glukolepigramin, **22**), 4-hidroksibenzil- ((gluko)sinalbin, **23**), 2-metoksibenzil- i 3-metoksibenzil-glukozinolata (glukolimnantin, **45**) (Bennett et al., 2004). Isti autori su odredili glukozinolatni profil većeg broja biljnih vrsta, pri čemu su uočili grupisanje ispitanih biljaka prema sadržaju glukozinolata na grupe koje sadrže (i) alifatične glukozinolate kraćih ugljovodoničnih lanaca i lance srednje dužine, (ii) alifatične glukozinolate sa dugim lancima, (iii) proste aromatične i (iv) višestruko supsuvisane aromatične glukozinolate. Prema ovoj podeli *H. alpina* i *H. petraea* se mogu svrstati u grupu sa prostim aromatičnim glukozinolatima, s obzirom da obe vrste sadrže glukozinolate slične strukture. Sličnost glukozinolatnog profila ova dva taksona podržava predlog Appel-a i Al-Shehbaz-a (1997) da se rod *Hutchinsia* (=Pritzelago) redukuje na sinonim *Hornungia*, tj. da se vrsta *Hutchinsia alpina* tretira kao vrsta roda *Hornungia*.

5.2.2. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST SINTETISANOG JEDINJENJA, POTENCIJALNOG PROIZVODA HIDROLIZE GLUKOZINOLATA VRSTE *E. DIFFUSUM*

Od ranije je poznato da izotiocijanati ispoljavaju antimikrobno dejstvo (Odeljak 3.3.5; (Drobnica et al., 1967; Iwu et al., 1991; Delaquis & Sholberg, 1997). Imajući ovo u vidu, u cilju utvrđivanja moguće biološke uloge identifikovanog jedinjenja, testirana je *in vitro* antimikrobna aktivnost novog izotiocijanata (4-izotiocijanatobutanska kiselina) mikrodilucionom metodom protiv 13 patogenih bakterijskih sojeva i jednog fungalnog mikroorganizma. Rezultati testiranja su dati u Tabeli 5.9. Testirano jedinjenje je pokazalo izrazitu antimikrobnu aktivnost u intervalu vrednosti 10–220 µg/ml za inhibitorno i 10–1175 µg/ml za mikrobicidalno dejstvo. Najosetljiviji bakterijski soj je bio veoma važan ljudski patogen *S. aureus* ATCC 6538

(MIC=MBC=10 µg/ml). *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativna bakterija) je pokazala znatnu otpornost na jedinjenje **156** (MIC=430 µg/ml i MBC=1175 µg/ml). Dejstvo testiranog jedinjenja na gljivicu *C. albicans* je naročito jako, sa vrednošću od 20 µg/ml za inhibitorno i fungicidno dejstvo (MFC nistatina iznosi 6,25 µg/ml). Prema rezultatima nekih istraživanja koja se bave mehanizmom dejstva alilnih izotiocijanata, vrlo je verovatno da ova jedinjenja imaju višestruko antimikrobnو dejstvo, s obzirom da uzrokuju enzimsku inhibiciju i oštećenja ćelijskih membrana (Lin et al., 2000; Luciano et al., 2008). Tačan *modus operandi* i dodatno biološko testiranje ovog izotiocijanata tek treba ispitati/izvršiti. U ekološkom smislu, na osnovu neselektivne i izražene antimikrobne aktivnosti i lokalizacije u biljci (koren koji je najizloženiji dejstvu mikroba) može se reći da ovo jedinjenje predstavlja prvu liniju odbrane biljke od napada patogenih mikroorganizama.

Tabela 5.9. Antimikrobnа aktivnost izotiocijanatobutanske kiseline – minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MFC)

Bakterijski soj	MIC	MBC/MFC	Tetraciklin
	mg/ml	µg/ml	
Gram-negativni			
<i>E.coli</i> (klinički izolat)	0,110	0,430	0,195
<i>E.coli</i> (izolat iz hrane)	0,220	0,430	1,562
<i>E.coli</i> ATCC 8739	0,220	0,220	1,562
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0,050	0,110	0,390
<i>K. pneumoniae</i> (klinički izolat)	0,220	0,220	0,390
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,430	1,175	1,562
<i>S. enterica</i> ATCC 13076	0,220	0,220	0,195
Gram-pozitivni			
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	0,110	0,220	0,195
<i>B. cereus</i> (izolat iz hrane)	0,050	0,050	0,195
<i>S. aureus</i> (klinički izolat)	0,050	0,110	0,098
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,010	0,010	0,098
<i>S. aureus</i> (izolat iz hrane)	0,050	0,220	0,098
<i>S. lutea</i> (izolat iz hrane)	0,010	0,010	0,390
Fungalni soj		Nistatin	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,020	0,020	6,250

I Z V O D

Fitohemijskim i mikrobiološkim ispitivanjem odabranih vrsta familije Geraniaceae – *Geranium macrorrhizum*, *Geranium sanguineum*, *Geranium robertianum*, *Geranium columbinum*, *Geranium lucidum*, *Geranium purpureum*, *Geranium phaeum*, *Erodium absinthoides*, *Erodium ciconium* i *Erodium cicutarium* i familije Brassicaceae – *Erysimum diffusum* i *Hornungia petraea*, dobijeni su sledeći rezultati:

- Izolovanjem i detaljnom analizom hemijskog sastava etarskih ulja rizoma i nadzemnih delova vrste *G. macrorrhizum* identifikovano je ukupno 283 sastojka. Glavne komponente ispitivanih ulja su germakron (nadzemni deo, 49,7%) i δ-gvajen (rizom, 49,2%). Uočene su značajne razlike u hemijskom sastavu ulja izolovanih iz pomenutih delova biljke. Ispitana je antimikrobna aktivnost, pri čemu je uočeno da testirana ulja ispoljavaju veoma izraženo i selektivno antibakterijsko dejstvo prema *Bacillus subtilis*, sa MIC vrednošću reda veličine 1 µg/ml. Daljim testiranjem je utvrđeno da germakron nije jedini nosilac antibakterijskog dejstva testiranih ulja. Takođe, predložena je biosintetska šema seskviterpenoida prisutnih u ovoj biljnoj vrsti, kojom su dovedene u vezu seskviterpenske strukture gvajanskog tipa čija je biosinteza dominantna u rizomu i seskviterpenske strukture germakranskog tipa čija je biosinteza aktivnija u nadzemnom delu ove biljne vrste.
- Izolovanjem i detaljnom analizom hemijskog sastava etarskih ulja vrsta *G. sanguineum* i *G. robertianum* identifikovano je 304 sastojka. Glavne komponente ulja vrste *G. sanguineum* su heksadekanska kiselina (9,6%), heksahidrofarnezil-aceton (9,4%) i fenilacetaldehid (7,1%). Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju izolovanom iz vrste *G. robertianum* su heksadekanska kiselina (16,6% u ulju nadzemnom dela i 45,3% u ulju iz korena), pentakozan (28,5% u ulju iz korena), heksahidrofarnezil-aceton (6,5% u ulju nadzemnog dela) i kariofilen-oksid (5,4% u ulju nadzemnog dela). Testiranje antimikrobne aktivnosti je pokazalo da je etarsko ulje vrste *G. robertianum* jako aktivno prema *Escherichia coli* i *Aspergillus fumigatus*, dok su *Micrococcus flavus* i, takođe, *Aspergillus fumigatus* najosetljiviji mikroorganizmi na etarsko ulje vrste *G. sanguineum*. Isparljivi sekundarni metaboliti biljne vrste *G. sanguineum* nisu ispitani, dok je za vrstu *G. robertianum* publikovan samo jednom rad koji se odnosi na ispitivanje etarskog ulja izolovanog iz nadzemnih delova ove vrste.
- GC i GC-MS analizom etarskih ulja izolovanih iz vrsta *G. columbinum* (nadzemni delovi i koren) i *G. lucidum* identifikovano je ukupno 184 jedinjenja, odnosno 88,2–96,7% ukupnog ulja. Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina dominiraju u ta tri ispitana ulja (65,0–86,3%), za kojima slede derivati karotenoida (5,5–12,1%) i terpenoidi (6,6–12,5%). Najzastupljeniji sastojci su

heksadekanska i tetradekanska kiselina, heksahidrofarnezil-aceton i tetrakozan. Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti su pokazali jaku aktivnost etarskog ulja iz nadzemnih delova vrste *G. columbinum* prema gljivici *C. albicans* ($MIC=0,437$, $MBC=1,75$ mg/ml). U naučnoj literaturi nema podataka o ispitivanju etarskih ulja vrsta *G. columbinum* i *G. lucidum*.

- Detaljnom analizom etarskog ulja vrste *G. purpureum* identifikovano je 68 jedinjenja sa udelom od 92,2%, dok je u etarskim uljima nadzemnih delova i rizoma *G. phaeum* identifikovano, redom, 94, 68 i 25 sastojaka, odnosno 96,2%, 93,5% i 94,6% ukupnog ulja. Ulja se pretežno sastoje od FAD jedinjenja sa udelom 45,4–81,3%. Etarsko ulje vrste *G. purpureum* veoma je siromašno terpenoidima sa svega 0,3%. Ukupan sadržaj terpenoida u uzorcima vrste *G. phaeum* iznosio 2,6–31,8%. Etarsko ulje vrste *G. purpureum* nije ispitano, dok je za vrstu *G. phaeum* publikovan samo jednom rad koji se odnosi na ispitivanje etarskog ulja izolovanog iz nadzemnih delova ove vrste.
- GC-MS analizom etarskih ulja izolovanih iz tri uzorka vrste *E. cicutarium* identifikovano je 162, 134, odnosno 99 sastojaka, sa udelom od 97,7%, 91,6% odnosno 88,5% od ukupno detektovanih jedinjenja. Sva tri uzorka karakteriše visok sadržaj FAD jedinjenja (51,3–63,8%) i nizak sadržaj terpenoidnih struktura (13,1–14,9%) sa dominantnim oksigenovanim seskvi- i diterpenoidima. Glavni sastojci etarskih ulja sva tri uzorka su heksadekanska kiselina, heksahidrofarnezil-aceton i pentakozan.
- U etarskih uljima vrsta *Ero. ciconium* i *Ero. absinthoides* identifikovano je 107, odnosno 79 jedinjenja (92,8%, odnosno 91,0% ukupnog ulja). U etarskom ulju vrste *E. ciconium* sadržaj FAD, CDC i TER jedinjenja je međusobno uporediv (34,0%, 24,9%, odnosno 31,7%). Glavni sastojci su heksahidrofarnezil-aceton (9,9 %), kariofilen-oksid (9,6 %), heksadekanska kiselina (8,7 %) i neofitadien (izomer 2) (8,5%). Terpenoidi, tačnije seskviterpenoidi predstavljaju dominantnu grupu jedinjenja u etarskom ulju vrste *E. absinthoides* (49,3%, odnosno 47,9%). Germakren B (8,9%), kariofilen-oksid (8,4%), heksahidrofarnezil-aceton (8,3%), i β -kariofilen (7,5%) su glavna jedinjenja etarskog ulja vrste *E. absinthoides*. Isparljivi sekundarni metaboliti taksona roda *Erodium* ispitani su samo u slučaju vrste *E. moschatum*.
- Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja ispitivanih *Erodium* vrsta pokazuju antibakterijsku aktivnost srednjeg intenziteta i relativno jaku antifungalnu aktivnost. Otpornost *Klebsiella pneumoniae* je najizraženija, dok je *Bacillus subtilis* najosetljiviji mikroorganizam prema testiranim uljima *Erodium* vrsta.
- GC-MS analizom autolizata vrste *Erysimum diffusum* detektovan je, a daljim radom identifikovan i spektralno okarakterisan novi degradacioni proizvod glukozinolata – 4-izotiocijanatobutanska kiselina. Dugo se verovalo da je metil-estar ove kiseline degradacioni proizvod glukozinolata, međutim, pokazano je da je to jedinjenje najverovatnije artefakt koji nastaje u postupku obrade biljnog materijala i izolovanja. Testirana je antimikrobna aktivnost novog izotiocijanata, 4-izotiocijanatobutanske

kiseline, pri čemu je testirano jedinjenje pokazalo izrazitu antimikrobnu aktivnost u intervalu vrednosti 10–220 µg/ml za inhibitorno i 10–1175 µg/ml za mikrobicidalno dejstvo. Najosetljiviji bakterijski soj je bio veoma važan ljudski patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (MIC=MBC=10 µg/ml).

- GC-MS analizom etarskih ekstrakata autolizata vrste *Hornungia petraea*, uzoraka prikupljenih sa dva lokaliteta, utvrđeno je prisustvo 29, odnosno 18 sastojaka. Pored sveprisutnih biljnih sekundarnih metabolita (FAD jedinjenja i terpenoidi) u oba uzorka je detektovano nekoliko jedinjenja (aromatični izotiocijanati i nitrili) kao mogućih proizvoda dejstva endogene mirozinaze na glukozinolate u tkivu ove vrste. Izvršena je sinteza niza jedinjenja (12 izotiocijanata, tiocijanata i nitrila, ukupno) za koje se pretpostavilo da bi mogli da budu gore pomenuti metaboliti. Struktura sintetisanih jedinjenja je potvrđena GC-MS analizom i IR spektroskopijom. Sintetisana jedinjenja su GC koinjektirana sa autolizatima radi nedvosmislene identifikacije komponenata detektovanih u autolizatu. Identifikacija fenilacetonitrila, benzil-izotiocijanata, 3-metoksifenilacetonitrila, 3-metoksibenzil-izotiocijanata i 4-metoksibenzil-izotiocijanata upućuje na glukotropaeolin (benzil-glukozinolat), glukolimnantin (3-metoksibenzil-glukozinolat) i glukoaubrietin (4-metoksibenzil-glukozinolat) kao prekursore identifikovanih jedinjenja.

S U M M A R Y

Presented below are the results of the phytochemical investigation and antimicrobial assays, carried out on selected plant species belonging to Geraniaceae family – *Geranium macrorrhizum*, *Geranium sanguineum*, *Geranium robertianum*, *Geranium columbinum*, *Geranium lucidum*, *Geranium purpureum*, *Geranium phaeum*, *Erodium absinthoides*, *Erodium ciconium* and *Erodium cicutarium*, and Brassicaceae family – *Erysimum diffusum* and *Hornungia petraea*:

- A detailed chemical analysis of the aerial parts and rhizome essential oils of *Geranium macrorrhizum* resulted in the identification of 283 constituents. The oils consisted mainly of sesquiterpenoids, the main ones being germacrone (49.7% in the oil from aerial parts) and δ-guaiene (49.2% in the rhizome oil). Significant qualitative and quantitative compositional differences in the oils from the two plant parts were observed. The essential oils were screened for their antimicrobial activity in disc diffusion and microdilution assays. The assays pointed out to the very high and selective activity of the oils against *Bacillus subtilis* having a minimum inhibitory concentration with the order of value of 1 µg/ml. Further antimicrobial testing made possible to determine that germacrone, the major constituent of the oil from aerial parts, was not the sole agent responsible for the observed activity. Also, putative biosynthetic pathways mutually connecting the main essential oil constituents (sesquiterpenoids) were summarized in order to obtain a more general picture encompassing the differences noted in the rhizome and aerial parts oils – prevailed formation of the guaiane-type sesquiterpenoids found in rhizome oil, and germacrane-type sesquiterpenoids found in aerial parts oil of *G. macrorrhizum*.
- A detailed chemical analysis of the essential oils of *Geranium sanguineum* and *Geranium robertianum* (aerial and underground parts) made possible the identification of 304 components, in total. The main compounds of *G. sanguineum* oil were hexadecanoic acid (9.6%), hexahydrofarnesyl acetone (9.4%) and phenylacetaldehyde (7.1%). The most dominant constituents of the oil of *G. robertianum* were hexadecanoic acid (16.6% and 45.3% for the oils from the aerial and underground parts, respectively), pentacosane (28.5% in the underground parts), hexahydrofarnesyl acetone and caryophyllene oxide (6.5% and 5.4% in the aerial parts of the plant, respectively). The antimicrobial assay showed a strong activity of the *G. robertianum* oil against *E. coli* and *A. fumigatus*. *Micrococcus flavus* and *A. fumigatus* were the most susceptible strains to *G. sanguineum* oil. To date, there is only one report regarding *G. robertianum* essential oil with respect to its compositional analysis (and the oil obtained only from the aerial parts of the plant), while in the case of *G. sanguineum*, no previous reports dealing with the chemistry of its volatiles can be found in the literature.

- GC and GC-MS analyses of the essential oils of *G. columbinum* (aerial and underground parts) and *G. lucidum* allowed the identification of 184 components, accounting for 88.2–96.7% of the detected GC peak areas. The essential oils consisted mainly of fatty acids and fatty acid derived compounds (65.0–86.3%), followed by carotenoid derived compounds (5.5–12.1%) and terpenoids (6.6–12.5%). The major compounds of the essential oils were hexadecanoic acid, hexahydrofarnesyl acetone and tetracosane. The antimicrobial assay showed a strong activity of the oil from aerial parts of *G. columbinum* against the pathogenic yeast *C. albicans* (MIC=0.437, MBC=1.75 mg/ml). To date, no previous reports dealing with any investigation of the volatiles of these two species can be found in the literature.
- GC and GC-MS analyses of the essential oil of *Geranium purpureum* resulted in the identification of 68 constituents (92.2% of total oil), while the analyses of the oils of *G. phaeum* (two samples of the aerial parts and one sample of the rhizomes) resulted in the identification of 94, 68 and 25 components, respectively. All oils consisted mainly of fatty acids and fatty acid derived compounds (45.4–81.3%). The essential oils consisted mainly of fatty acids and fatty acid derived compounds (45.4–81.3%), with hexadecanoic acid (33.5% and 36.1% in the oil of *G. purpureum* and *G. phaeum*, respectively) and (E)-phytol (25.9% in the second oil of *G. phaeum*) as the major constituents. The oil of *G. purpureum* was poor in terpenoids with only 0.3% total percentage of this compounds. The content of terpenoids in the oils of *G. phaeum* was 2.6%, 31.8% and 8.7%, respectively. To date, there is only one report regarding *G. phaeum* essential oil with respect to its compositional analysis (and the oil obtained only from the aerial parts of the plant). In the case of *G. purpureum*, no previous reports dealing with the chemistry of its volatiles can be found in the literature.
- GC and GC-MS analyses of the *Erodium cicutarium* essential oils (three samples) allowed the identification of 162, 134 and 99 components, accounting for 97.7%, 91.6% and 88.5%, respectively. All three samples were characterized by a high content of FAD (51.3–63.8%) while terpenoids accounted for 13.1–14.9%, with a predominance of oxygenated sesqui- and diterpenes. The main constituents of all three oils were hexadecanoic acid and hexahydrofarnesyl acetone. The analyses of the essential oils of *E. ciconium* and *E. absinthoides* allowed the identification of 107 and 79 components (92.8% and 91.0% of the total oil), respectively. The content of FAD, CDC and TER classes, in the oil of *E. ciconium* were mutually very similar (34.0%, 24.9% and 31.7%, respectively). The main constituents of *E. ciconium* oil were, hexahydrofarnesyl acetone (9.9 %), caryophyllene oxide (9.6 %), hexadecanoic acid (8.7 %), and neophytadiene (isomer II) (8.5 %). Germacrene B (8.9 %), caryophyllene oxide (8.4 %), hexahydrofarnesyl acetone (8.3 %), and β -caryophyllene (7.5 %) were the main compounds of *E. absinthoides* oil. The essential oils of the three *Erodium* species were evaluated for their antimicrobial properties. The antibacterial activity of the tested oils was a moderate one, while the antifungal activity of all three oils was relatively high although still much lower than that of the reference antibiotic. The

most susceptible organism was *B. subtilis*, while the most resistant bacterial strain to the tested *Erodium* essential oils was *K. pneumoniae*. The composition of *E. ciconium* and *E. absinthoides* essential oils have not been studied on any previous occasion. In the case of *E. cicutarium*, there is only one report regarding the investigation of leaf hexane extract.

- A GC-MS analysis of *Erysimum diffusum* Ehrh. (Brassicaceae) glucosinolate autolysis products led to the identification of a new mustard oil constituent—4-isothiocyanatobutanoic acid. The identity of the new glucosinolate breakdown product was confirmed by means of co-injection of the synthetic compound in the GC with the root autolysate and derivatization reaction to the well known methyl ester. Methyl ester of this acid was long believed to be a genuine glucosinolate hydrolysis product but we now provide evidence that it could be an artifact of the isolation procedure. 4-Isothiocyanatobutanoic acid was assayed for antimicrobial activity and demonstrated significant inhibitory (10-220 µg/ml) and microbicidal (10-1175 µg/ml) activity against important human pathogens. The most sensitive bacterial strain was the important human pathogen, *S. aureus* (ATCC 6538), with both MIC and MBC values of 10 µg/ml.
- GC and GC-MS analyses of the volatile products of *Hornungia petraea* autolysis (two samples from different locations) made possible the detection/identification of 29 and 18 components. Along with ubiquitous components of extracts (fatty acids, fatty acid-derived compounds and terpenoids), several compounds were also detected as the possible direct products of endogenous myrosinase activity. The synthesis of a collection of compounds (12 isothiocyanates, thiocyanates and nitriles, in total) that were believed to possibly be the glucosinolate autolysis products in this case, was carried out, and the structures of the synthesized compounds were confirmed by GC-MS analyses and IR spectroscopy. The synthetic compounds were co-injected in the GC with the *H. petraea* autolysates, with the aim of an unambiguous identification of the autolysate components. The identification of phenyl acetonitrile, benzyl isothiocyanate, 3-methoxyphenyl acetonitrile, 3-methoxybenzyl isothiocyanate and 4-methoxybenzyl isothiocyanate implies on benzyl- (glucotropaeolin), 3-methoxybenzyl- (glucolimnatin) and 4-methoxyoxybenzyl- (glucoaubriettin) as the “mustard oil” precursors.

LITERATURA

- Abramski, W.; Chmielewski, M. *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 109.
- Abubakirov, N. K. *Izuch. I Ispol'z Lekarstv. Rastit. Resursov SSSR (Leningrad: Med.) Sb.* **1964**, 200.
- Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, **2007**.
- Adams, R.; Thal, A. F. *Org. Synth.* **1922**, 2, 9.
- Adesida, A.; Edwards, L.G.; Thornalley, P.J. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 385.
- Ahmed, Z. F.; Rizk, A. M.; Hammouda, F. M.; Seif El-Nasr, M. M. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 251.
- Ahmed, Z. F.; Rizk, A. M.; Hammouda, F. M.; Seif El-Nasr, M. M. *Planta Med.* **1972**, *21*, 35.
- Aires, A.; Mota, V. R.; Saavedra, M. J.; Monteiro, A. A.; Simoes, M.; Rosa, E. A. S.; Bennett, R. N. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 2096.
- Al-Gendy, A. A.; Lockwood, G. B. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 148.
- Al-Shehbaz, I. A. *Contr. Gray Herb.* **1973**, *204*, 3.
- Al-Shehbaz, I. A. *J. Arnold Arboretum* **1988**, *69*, 193.
- Al-Shehbaz, I. A.; Al-Shammary, K. I. *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 559.
- Al-Shehbaz, I. A.; Al-Shammary, K. I.. *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 559.
- Amaral, S.; Mira, L.; Nogueira, J. M. F.; Pereira da Silva, A.; Florencio, M. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1876.
- Andreasch, R. *Monatsh. Chem.* **1906**, *27*, 1211.
- Anilakumar, K. R.; Khanum, F.; Bawa, A. S. *J. Food Sci. Technol.* **2006**, *43*, 8.
- Anthoni, U.; Larsen, C.; Nielsen, P. H. *Acta Chem. Scand.* **1966**, *20*, 1714.
- AOCS. *Method American Oil Chemists Society. AK1-92 Determination of glucosinolate content in rapeseed and canola by HPLC*. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 5th ed. AOCS, Champaign, IL, **1998**.
- Appel., O.; Al-Shehbaz, A. *Novon* **1997**, *7*, 338.
- Arnold, J. T.; Wilkinson, B. P.; Sharma, S.; Steele V. E. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 537.
- Aucagne, V.; Gueyrard, D.; Tatibouet, A.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Lafosse, M.; Rollin, P. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7319.
- Baldovini, N.; Tomi, F.; Casanova, J. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 58.
- Ball, A. R.; Casadei, G.; Samosorn, S.; Bremner, J. B.; Ausubel, F. M.; Moy, T. I.; Lewis, K. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 594.
- Barcelo, S.; Gardiner, J.M.; Gescher, A.; Chipman, J.K. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 277.
- Barillari, J.; Cervellati, R.; Paolini, A. T.; Tatibouet, A.; Rollin, P.; Iori, R. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9890.
- Barra, A.; Baldovini, N.; Loiseau, A. -M.; Albino, L.; Lesecq, C.; Lizzani Cuvelier, L. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1279.

- Barra, A.; Norouzi-Arassi, H.; Sedaghat-Sharehjini, S.; Baldovini, N. *Nat. Prod. Comm.* **2006**, 5, 387.
- Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Catalán, J. V. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, 3, 567.
- Barrett, J. E.; Klopfenstein, C. F.; Leipold, H. W. *Cancer Lett.* **1998**, 127, 83.
- Bate-Smith, E. C. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1755.
- Battaglia, A.; Dondoni, A.; Maccagnani, G.; Mazzanti, G. *J. Chem. Soc. B: Phys. Org.* **1971**, 2096.
- Begum, J.; Bhuiyan, M. N. I.; Chowdhury, J. U. *Bangladesh J. Bot.* **2008**, 37, 217.
- Beilstein, M. A.; Al-Shehbaz, I. A.; Mathews, S.; Kellogg, E. A. *Am. J. Bot.* **2008**, 95, 1307.
- Bellostas, N.; Sorensen, A. D.; Sorensen, J. C.; Sorensen, H. *Adv. Bot. Res.* **2007**, 45, 369.
- Benn, M. H. *Can. J. Chem.* **1963**, 41, 2836.
- Benn, M. H. *Can. J. Chem.* **1964**, 42, 163.
- Benn, M. H. *Can. J. Chem.* **1964**, 42, 2393.
- Benn, M. H. *J. Chem. Soc.* **1964**, 4072.
- Benn, M. H.; Ettlinger, M.G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1965**, 19, 445.
- Benn, M. H.; Meakin, D. *Can. J. Chem.* **1965**, 43, 1874.
- Benn, M. H.; Yelland, L. J. *Can. J. Chem.* **1967**, 45, 1595.
- Bennett, R. N.; Hick, A. J.; Dawson, G. W.; Wallsgrave, R. M. *Plant Physiol.* **1995**, 109, 299.
- Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Foidl, N.; Pratt, J. H.; DuPont, M. S.; Perkins, L.; Kroon, P. A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3546.
- Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Kroon, P. A. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 428.
- Bennett, R.; Donald, A.; Dawson, G. W.; Hick, A.; Wallsgrave, R. *Plant Physiol.* **1993**, 102, 1307.
- Bertelli, D.; Plessi, M.; Braghierioli, D.; Monzani, A. *Food Chem.* **1998**, 63, 417.
- Betz, J. M.; Fox, W. D. In: Huang, M. -T.; Osawa, T.; Ho, C. -T.; Rosen, R. T. (Eds.), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I: Fruits and Vegetables*, American Chemical Society, Washington, DC, **1994**, p. 180.
- Bille, N.; Eggum, B. O.; Jacobsen, I.; Olsen, O.; Sorensen, H. *Tier-ernährung und Futtermittlkunde* **1983**, 49, 195.
- Bjeldanes, L. F.; Kim, J.-Y.; Grose, K. R.; Bartholomew, J. C.; Bradfield, C. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 9543.
- Bjerg, B.; Fenwick, G. R.; Spinks, A.; Sorensen, H. *Phytochemistry* **1987**, 26, 567.
- Bjerg, B.; Sorensen, H. In: Wathelet, J. -P. (Ed.), *Glucosinolates in Rapeseeds: Analytical Aspects*, Martinus Nijhoff, New York, **1987**, p. 59.
- Bjorkman, R.; Janson, J.-C. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 276, 508.
- Bjorkman, R.; Lonnerdal, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 327, 121.

- Bjorkqvist, B.; Hase, A. *J. Chromatogr.* **1988**, *435*, 501.
- Blanc-Muesser, M.; Driguez, H.; Joseph, B.; Viaud, M.C.; Rollin, P.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3867.
- Blaschko, O.; Schwarz, W.; Schranz, W.; Fruith, A. *Phys. Rev. B* **1991**, *44*, 9159.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. *Nutr. Cancer* **1992**, *18*, 1.
- Blua, M. J.; Hanscom, Z. Collier, B.D. *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14*, 623.
- Blua, M. J.; Hanscom, Z. *J. Chem. Ecol.* **1986**, *12*, 449.
- Bnouham, M.; Mekhfi, H.; Legssyer, A.; Ziyyat A. *Diabetes Metab.* **2002**, *10*, 33.
- Boas, U.; Jakobsen, M. H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1995.
- Boas, U.; Pedersen, H. G.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 269.
- Bodnaryk, R. P. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2671.
- Bodnaryk, R. P. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 301.
- Bodnaryk, R.; Yoshihara, T. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 1735.
- Bones, A. M. *J. Exp. Bot.* **1990**, *41*, 737.
- Bones, A.; Iversen, T. -H. *Israel J. Bot.* **1985**, *34*, 351.
- Bones, A.; Thangstad, O. P.; Haugen, O.A.; Espevik, T. *J. Exp. Bot.* **1991**, *42*, 1541.
- Bones, A.M.; Rossiter, J. T. *Physiol. Plant.* **1996**, *97*, 194.
- Booth, E. J.; Walker, K. C. *Phyton* **1992**, *32*, 9.
- Borsus, J. M.; L'abbe, G.; Smets, G. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 1537.
- Boufford, D. E.; Kjaer, A.; Madsen, J.O. *Biochem. Syst. Ecol.* **1989**, *17*, 375.
- Boutard, B.; Lebreton, P. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **1975**, *9*, 289.
- Boyle, F. T.; Hull, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1541.
- Bozhkova, N. V.; Stoev, G.; Orahovats, A. S.; Rizov, N. A. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 917.
- Brabban, A. D.; Edwards, C. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *119*, 83.
- Brabban, A. D.; Edwards, C. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, *79*, 171.
- Bradfield, C.A.; Bjeldanes, L. F. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 46.
- Bradlow, H. L.; Michnovicz, J.; Telang, N. T.; Osborne, M. P. *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 1571.
- Braun, J. v. *Ber. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 817.
- Broadbent, T. A.; Broadbent, H. S. *Curr. Med. Chem.* **1998a**, *5*, 469.
- Broadbent, T. A.; Broadbent, H. S. *Curr. Med. Chem.* **1998b**, *5*, 337.
- Brown, I. V.; Stuart, K. L. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 1409.
- Brown, P. D.; Morra, M. J. *Adv. Agron.* **1997**, *61*, 167.
- Brown, P. D.; Morra, M. J. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 3070.
- Brown, P. D.; Tokuhisa, J. G.; Reichelt, M.; Gershenson, J. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 471.
- Buchvarov, Y. *Farmatsiya (Sofia, Bulgaria)* **1979**, *29*, 25.
- Buchvarov, Y. *Farmatsiya (Sofia, Bulgaria)* **1979**, *29*, 25.

- Buckley, N.; Oppenheimer, N. *J. J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 247.
- Burmeister, W. P.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Iori, R.; Palmieri, S.; Henrissat, B. *Structure* **1997**, *5*, 663.
- Burmeister, W. P.; Cottaz, S.; Rollin, P.; Vasella, A.; Henrissat, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *10*, 1074.
- Burt, S. A. *Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food*. Ph. D. thesis. Utrecht University, Utrecht, Netherlands, **2007**.
- Butcher, D. N.; El-Tigani, S.; Ingram, D. S. *Physiol. Plant Path.* **1974**, *4*, 127.
- Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Izumi, S.; Hirata, T. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 62.
- Calzada, J. G.; Hooz, J. *Org. Synth.* **1974**, *54*, 63.
- Campbell, L. D.; Slominski, B.A.; Stanger, N.E. Proceedings of the 7th International Rapeseed Congress, Poznan, Poland, **1987**, 1704.
- Cannell, L. G.; Taft, R. W. Jr. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1956**, *129*, 46N.
- Carpino, S.; Mallia, S.; Licitra, G.; Van Soest, P. J.; Acree, T. E. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 293.
- Carson, C. F.; Riley, T. V. *J. Appl. Microbiol.* **1995**, *78*, 264.
- Cartea, M. E.; Rodri'guez, V. M.; de Haro, A; Velasco P.; Ordas, A. *Euphytica* **2008**, *159*, 111.
- Cartea, M. E.; Velasco, P. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 213.
- Cassel, S.; Casenave, B.; Deleris, G.; Latxague, L.; Rollin, P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8515.
- Ceccon, A.; Fava, A.; Papa, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5547.
- Chadwick, D. J.; Marsh, J. (Eds). *Bioactive compounds from plants (CIBA foundation symposium 154)*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1990**.
- Chalchat, J. -C.; Petrović, S. D.; Maksimović, Z. A.; Gorunović, M. S. *J. Essent. Oil Res.* **2002**, *14*, 333.
- Challenger, F. In: *Aspects of the Organic Chemistry of Sulphur*, Butterworths, London, **1959**, p. 115.
- Chan, H. T. Jr.; Heu, R. A.; Tang, C. -S.; Okazaki, E. N.; Ishizaki, S. M. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 255.
- Chang, H.; Kim, S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1986**, *7*, 407.
- Charron, C. G.; Sams, C. E. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1999**, *124*, 462.
- Chevolleau, S.; Joseph, B.; Rollin, P.; Tulliez, J. *J. Labelled Compd. Rad.* **1993**, *33*, 671.
- Chew, F. S. In: Cutler, H. G. (Ed.), *Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture*. American Chemical Society, Washington, DC, **1988**, p. 155.
- Chisholm, M. D. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 197.
- Chisholm, M. D. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 605.
- Chisholm, M. D.; Wetter, L. R. *Can. J. Biochem.* **1964**, *42*, 1033.

- Chistensen, B. W.; Kjaer, A.; Ogaard-Madsen, J.; Olsen, C. E.; Olsen, O.; Srensen, H. *Tetrahedron* **1982**, 38, 353.
- Cho, C.- G.; Posner, G. H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3599.
- Clair, G.; Delaveau, P.; Paris, R. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **1963**, 110, 1.
- Clarke, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food, *Anal. Methods* **2010**, 2, 310.
- Claude, M.; Françoise, P. *Compt. Rend.* **1964**, 258, 1036.
- Cole, R. A. *Phytochemistry* **1976**, 15, 759.
- Coll, D. A.; Rosen, C. A.; Auborn, K.; Potsic, W. P.; Bradlow, H. L. *Am. J. Otolaryngol.* **1997**, 18, 283.
- Connolly J. M.; Dyson, G. M. *J. Chem. Soc.* **1935**, 679.
- Consentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, 29, 130.
- Corina, P.; Dimitris, S.; Emanuil, T.; Nora, R. *Oftalmologia* **1999**, 46, 55.
- Cornell University, Department of Animal Science, Plants Poisonous to Livestock.
Available from:
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/ranunculoside.html> [accessed on: 14 november 2009].
- Cottaz, S.; Henrissat, B.; Driguez, H. *Biochemistry* **1996**, 35, 15256.
- Cottaz, S.; Rollin, P.; Driguez, H. *Carbohydr. Res.* **1997**, 298, 127.
- Dains, F. B.; Brewster, R. Q.; Olander, C. P. *Org. Synth. 1941, Coll. Vol. 1*, 447.
- Dains, F. B.; Brewster, R. Q.; Olander, C. P. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **1922**, 13, 1.
- Danielak, R.; Borkowski, B. *Dissertations in Pharmacy and Pharmacology* **1969**, 21, 563.
- Das, B. R.; Kurup, P. A.; Rao, P.; Narasimha, L. *Indian J. Med. Res.* **1957**, 45, 191.
- Daubos, P.; Grumel, V.; Iori, R.; Leoni, O.; Palmieri, S.; Rollin, P. *Ind. Crops Prod.* **1998**, 7, 187.
- Davies, G. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 7090.
- Dawson, G. W.; Hick, A. J.; Bennett, R. N.; Donald, A.; Pickett, J. A.; Wallsgrove, R. M. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27154.
- Daxenbichler, M. E.; Spencer, G. F.; Carlson, D. G.; Rose, G. B.; Brinker, A. M.; Powell, R. G. *Phytochemistry* **1991**, 30, 2623.
- Daxenbichler, M. E.; Spencer, G. F.; Schroeder, W. P. *Phytochemistry* **1980**, 19, 813.
- Daxenbichler, M. E.; Van Etten, C. H.; Wolf, I. A. *Biochemistry* **1965**, 4, 318.
- Daxenbichler, R.; Van Etten, C. H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, 51, 449.
- de Kraker, J. W.; Franssen, M. C. R.; de Groot, A.; König, W. A.; Bouwmeester, H. J. *Plant Physiol.* **1998**, 117, 1381.
- DeClercq, D. R.; Daun, J. K. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, 66, 788.
- Delaquis, P. J.; Mazza, G. *Food Technol.* **1995**, 49, 73.
- Delaquis, P. J.; Sholberg, P. L. *J. Food Prot.* **1997**, 60, 943.

- Delépine, M. *B. Soc. Chim. Fr.* **1908**, 4, 641.
- Delépine, M. *Compt. Rend. Chim.* **1907**, 144, 1125.
- Deng, C.; Ji, J.; Li, N.; Yu, Y.; Duan, G.; Zhang, X. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1117, 115.
- Dickore, K.; Kuhle, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1965**, 4, 430.
- Dickore, K.; Wegler, R. *Angew. Chem.* **1966**, 78, 1023.
- Didry, N.; Dubreuil, L.; Pinkas, M. *Pharmazie* **1991**, 46, 546.
- Diedrich, M.; Kujawa, M. *Proceedings of the 7th International Rapeseed Congress*, Krzymanski, J. (Ed.), Plant Breeding and Acclimatization Institute, Poznan, Poland, **1987**, 1710.
- Doll, R. *Cancer Res.* **1992**, 52, 2024s.
- Dolya, V. S. *Farm. Zhur.* **1973**, 28, 90.
- Donaldson, J. R.; Cates, R. G. *Pharm. Biol.* **2004**, 42, 478.
- Dondoni, A.; Barbaro, G.; Battaglia, A.; Giorgianni, P. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3196.
- Dornberger, K.; Bockel, V.; Heyer, J.; Schonfeld, C.; Tonew, M.; Tonew, E. *Pharmazie* **1975**, 30, 792.
- Drobinca, L.; Zemanova, M.; Nemec, P.; Antos, K.; Kristian, P.; Stullerova, A.; Knoppova, V.; Nemen, P. *Appl. Microbiol.* **1967**, 15, 701.
- Drobnica, L.; Kristian, P.; Augustin, J. In *The Chemistry of Cyanates and Their Thio Derivatives*, Patai, S., (Ed.), John Wiley and Sons, New York, **1977**, p. 1003.
- Drozdowska, L.; Thangstad, O. P.; Beisvaag, T.; Evjen, K.; Bones, A.; Iversen, T. -H. *Israel J. Bot.* **1992**, 41, 213.
- Du, L. C.; Halkier, B. A. *Phytochemistry* **1998**, 48, 1145.
- Duke, L. A. In *Advances in new crops*, Simon, J. E. (Ed.), Timber Press, Portland, OR, **1990**, p. 491.
- Duncan, A. J.; Milne, J. A. *Aspects Appl. Biol.* **1989**, 19, 75.
- Durham, P.; Poulton, J. E. *Plant Physiol.* **1989**, 90, 48.
- Dyson, G. M. *Org. Synth.* **1941**, Coll. Vol. 1, 165.
- Dyson, G. M.; George, H. J. *J. Chem. Soc.* **1924**, 125, 1702.
- Eagles, J.; Fenwick, G. R.; Gmelin, R.; Rakow, D. *Biomed. Mass Spectrom.* **1981**, 8, 265.
- Eisenberg, D. M.; Davis, R. B.; Ettner, S. L.; Appel, S.; Wilkey, S.; van Rompay, M.; Kessler, R. C. *JAMA* **1998**, 280, 1569.
- Eisenberg, D. M.; Davis, R. B.; Ettner, S. L.; Appel, S.; Wilkey, S.; van Rompay, M. V.; Kessler, R. C. *JAMA–J. Am. Med. Assoc.* **1998**, 280, 1569.
- El Migirab, S.; Berger, Y.; Jadot, J. *Phytochemistry* **1977**, 16, 1719.
- Elfakir, C.; Mercier, J. P.; Dreux, M. *Chromatographia* **1994**, 38, 585.
- Elliott, M. C.; Stowe, B. B. *Phytochemistry* **1970**, 9, 1629.
- Elliott, M. C.; Stowe, B. B. *Plant Physiol.* **1971**, 47, 366.
- Elliott, M. C.; Stowe, B. B. *Plant Physiol.* **1971**, 48, 498.

- El-Sayed, S. T.; Jwanny, E. W.; Rashad, M. M.; Mahmoud, A. E.; Abdallah, N. M. *Appl. Biochem.Biotechnol.* **1995**, 55, 219.
- Eskander, E. F.; Won Jun, H. *Egypt. J. Pharmaceut. Sci.* **1995**, 36, 331.
- Ettlinger, M. G.; Dateo, G.P.; Harrison, B. W.; Mabry, T. J.; Thompson, C. P. *Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A.* **1961**, 47, 1875.
- Ettlinger, M. G.; Lundeen, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956a**, 78, 4172.
- Ettlinger, M. G.; Lundeen, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956b**, 78, 1952.
- Ettlinger, M.G.; Kjaer, A. *Recent Adv. Phytochem.* **1968**, 1, 59.
- Ettlinger, M.G.; Lundeen, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 1764.
- Fahey, J. W.; Stephenson, K. K. *Hort. Science* **1999**, 34, 4.
- Fahey, J. W.; Talalay, P. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, 37, 973.
- Fahey, J. W.; Wade, K. L.; Stephenson, K. K.; Chou, F. E. *J. Chromatogr. A* **2003**, 996, 85.
- Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T.; Talalay, P. *Phytochemistry* **2001**, 56, 5.
- Fahey, J. W.; Zhang, Y.;Talalay, P. *Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A.* **1997**, 94, 10367.
- Farnham, M. W.; Stephenson, K. K.; Fahey, J. W. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, 125, 482.
- Faull, A. W.; Hull, R. *J. Chem. Res. (S)* **1979**, 148.
- Faull, A. W.; Hull, R. *J. Chem. Res. (S)* **1979**, 240.
- Fava, A.; Iliceto, A.; Bresadola, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 4791.
- Fava, A.; Iliceto, A.; Ceccon, A.; Koch, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 1045.
- Fecka, I.; Cisowski, W. *JPC J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* **2002**, 15, 429.
- Fecka, I.; Cisowski, W. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2005**, 60, 555.
- Fecka, I.; Kowalczyk, A.; Cisowski, W. *Z. Naturforsch., C* **2001**, 56, 943.
- Feijão, R. O. *Medicina Pelas Plantas*, Gráfica Sepol Ltd, Lisabon, **1954**, p. 94.
- Fenwick, G. R.; Eagles, J.; Gmelin, R.; Rakow, D. *Biomed. Mass Spectrom.* **1980**, 7, 410.
- Fenwick, G. R.; Eagles, J.; Self, R. *Org. Mass Spectrom.* **1982**, 17, 544.
- Fenwick, G. R.; Heaney, R.K.; Mullin, W.J. *CRC Cr. Food Sci. Nutr.* **1983**, 18, 123.
- Fernandez, J. M. G.; Mellet, C. O.; Blanco, J. L. J.; Mota, J. F.; Gadelle, A.; Coste Sarguet, A.; Defaye, J. *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 57.
- Fiebig, H. J.; *Lipid Fett.* **2006**, 93, 264.
- Fisher, P.; Ward, M. Complementary medicine in Europe. *Brit. Med. J.* **1994**, 309, 107.
- Flath, R. A.; Forrey, R. R. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 103.
- Fleming, I. *Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions*, John Wiley & Sons, Chichester, **2009**.
- Fodorea, C. S.; Vlase, L.; Leucuta, S. E.; Tamas, M. *Farmacia* **2004**, 52, 55.
- Font, R.; Del Rio-Celestino, M.; Rosa, E.; Aires, A.; De Haro-Bailon, A. *J. Agric. Sci.* **2005**, 143, 65.

- Font-Quer, P. *Plantas Medicinales, El Dioscórdies Renovado*, S. A. Labor, Barcelona, **1981**, p. 415.
- Force, L. E.; O'Hare, T. J.; Wong, L. S.; Irving, D. E. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *44*, 175.
- Foye W. O.; Kauffman, J. M. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2417.
- Francke, W.; Borchert, J.; Klimetzek, D. Z. *Naturforsch.* **1985**, *40c*, 661.
- Freund, v. M. Asbrand, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1895**, *285*, 166.
- Friedrich K.; Zamkanei, M. *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 1873.
- Fujinami, T.; Ashida, M.; Sakai, S. *Nippon Kagaku Kaishi* **1978**, *5*, 773.
- Fujiwara, S.; Shin-Ike, T.; Sonoda, N.; Aoki, M.; Okada, K.; Miyoshi, N.; Kambe, N. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3503.
- Fuke, Y.; Haga, Y.; Ono, H.; Nomura, T.; Ryoyama, K. *Cytotechnology* **1997**, *25*, 197.
- Fursa, N. S.; Dolya, V. S.; Litvinenko, V. I. *Rastit. Resur.* **1984**, *20*, 244.
- Furukawa, I.; Abe, N.; Hashimoto, S. A novel synthesis of isothiocyanates from amines using triphenylphosphine/carbon tetrachloride. *Chemistry Express* **1988**, *3*, 215
- Fu-Sheng, G.; Jian-Ou, Q.; Yi, Z.; Xian-Qiao, J. *Respirology* **2009**, *14*, 360.
- Gadamer, J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 2322.
- Gaind, K. N.; Gandhi, K. S.; Juneja, T. R.; Kjaer, A.; Nielsen, B. J. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1415.
- Galat, A.; Elion, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 3585.
- Gamet-Payrastre, L.; Li, P.; Lumeau, S.; Cassar, G.; Dupont, M. -A.; Chevolleau, S.; Gasc, N.; Tulliez, J.; Terce, F. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1426.
- Gamet-Payrastre, L.; Lumeau, S.; Gasc, N.; Cassar, G.; Rollin, P.; Tulliez, J. *Anticancer Drugs* **1998**, *9*, 141.
- Gardrat, C.; Quinsac, A.; Joseph, B.; Rollin, P. *Heterocycl.* **1993**, *35*, 1015.
- Garin, J.; Melendez, E.; Merchan, F.; Merino, P.; Tejero, T. A Facile New Method for the Preparation of Aromatic Diisothiocyanates. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1989**, *98*, 289.
- Gastaldo, P.; Barberis, G.; Fossati, F. *Atti Accad. Ligure Sci. Lett.* **1978**, *35*, 125.
- Gayoso-De-Lucio, J. A.; Torres-Valencia, J. M.; Camacho-Luis, L. A.; Alarcón-Hernández, E.; Muñoz-Sánchez, J. L.; López, R.; Barrón, B. L. *J Mex. Chem. Soc.* **2008**, *52*, 103.
- Getahun, S.M.; Chung, F.-L. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 447.
- Ghaout, S.; Louveaux, A.; Mainguet, A. M.; Deschamps, M.; Rahal, Y. *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 1499.
- Giamoustaris, A.; Mithen, R. *Theor. Appl. Gen.* **1996**, *93*, 1006.
- Giesselmann, G.; Schreyer, G.; Vanheertum, R. German Patent 2603508, **1976**.
- Gil, V.; MacLeod, A. J. *J. Sci. Food Agric.* **1980a**, *31*, 739.
- Gil, V.; MacLeod, A. J. *Phytochemistry* **1980b**, *19*, 227.
- Gil, V.; MacLeod, A. J. *Phytochemistry* **1980c**, *19*, 1365.

- Gil, V.; MacLeod, A. J. *Phytochemistry* **1980d**, *19*, 1369.
- Gil, V.; MacLeod, A. J. *Tetrahedron* **1980e**, *36*, 779.
- Gill, M. S.; MacLeod, A. J.; Moreau, M. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1937.
- Gillis, J. *Rec. Trav. Chim.* **1920**, *39*, 330.
- Glendening, T. M.; Poulton, J. E. *Plant Physiol.* **1988**, *86*, 319.
- Gmelin, R.; Kjaer, A. *Phytochemistry* **1970a**, *9*, 569.
- Gmelin, R.; Kjaer, A. *Phytochemistry* **1970b**, *9*, 591.
- Gmelin, R.; Kjaer, A. *Phytochemistry* **1970c**, *9*, 599.
- Gmelin, R.; Kjaer, A. *Phytochemistry* **1970d**, *9*, 601.
- Gmelin, R.; Kjaer, A.; Schuster, A. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3031.
- Gmelin, R.; Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **1959a**, *13*, 1474.
- Gmelin, R.; Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **1959b**, *13*, 1718.
- Goerdeler, J.; Teller, W. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 1513.
- Golbeck-Wood, S. *Brit. Med. J.* **1996**, *313*, 131.
- Gompper, R.; Haegele, W. *Chem. Berichte* **1966**, *99*, 2885.
- Gonda, J.; Kristian, P.; Sipos, J. Czechoslovakia Patent 239396, **1987**.
- Goodman, I.; Fouts, J. R.; Bresnick, E.; Menegas, R.; Hitchings, G. H. *Science* **1959**, *130*, 450.
- Goyal, S. S.; *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2002**, *33*, 15.
- Graham, S.; Dayal, H.; Swanson, M.; Mittelman, A., Wilkinson, G. *J. Nat. Cancer Inst.* **1978**, *61*, 709.
- Greenberg, L.; Aliabadi, A.; McElfresh, J. S.; Topoff, H.; Millar, J. G. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1297.
- Greenberg, L.; Troger, A. G.; Francke, W.; McElfresh, J. S.; Topoff, H.; Aliabadi, A.; Millar, J. G. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 935.
- Greer, M.A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *99*, 369.
- Griffiths, D. W.; Birch, A. N. E.; Hillman, J. R. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **1998**, *73*, 1.
- Grob, K.; Matile, P. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1789.
- GrootWassink, J. W. D.; Reed, D. W.; Kolenovsky, A.D. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 425.
- Guo, L.; Poulton, J. E. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1133.
- Habib, N. S.; Rieker, A. *Synthesis* **1984**, 825.
- Haddock, E. A.; Gupta, R. K.; Haslam, E. *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 2535.
- Hagadone, M.R.; Scheuer, P.J.; Holm, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2447.
- Halas, J; Krawiecki, C; Gora, J.; Kolemba, D.; Kurowska, *Przeglad Skorzany* **1991**, *46*, 63.
- Halkier, B. A.; Du, L. C. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 425.
- Halkier, B. A.; Gershenson, J. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303.
- Halkier, B.A. In: Ikan, R. (Ed.), *Naturally Occurring Glycosides*, Wiley, Chichester, UK, **1999**, p. 193.
- Hammond, K. E.; Lewis, B. G. *Plant Pathol.* **1987**, *36*, 135.

- Hanley, A. B.; Curl, C. L.; Fenwick, G. R.; Heaney, R. K. *Cruciferae Newsletter* **1984**, 9, 66.
- Hanley, A. B.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, 34, 869.
- Hansen, C. H.; Du, L. C.; Naur, P.; Olsen, C. E.; Axelsen, K. B. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 24790.
- Hartmann, A. In *Methoden der Organischen Chemie (Houben- Weyl)*, Hagemann, H. (Ed.), Thieme, Stuttgart, **1983**, E4, 834.
- Hartwell, J. L. *Plants Against Cancer: A Survey*. Quarterman Publications, Lawrence, MA, **1982**.
- Hasapis, X.; MacLeod, A. J.; Moreau, M. *Phytochemistry* **1981**; 20, 2355.
- Hashem, F. A.; Saleh, M. M. *Phytother. Res.* **1999**, 13, 329.
- Haughn, G. W.; Davin, L.; Giblin, M.; Underhill, E. W. *Plant Physiol.* **1991**, 97, 217.
- Heaney, R. K.; Fenwick G. R. In: Watson, D. H. (Ed.), *Natural Toxicants in Food: Progress and Prospects*, Watson, Ellis & Horwood, Chichester, UK, **1987**, p. 76.
- Hecht, S. S. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 401, 1.
- Hecht, S. S. *J. Nutr.* **1999**, 129, 768S.
- Hecht, S. S.; Carmella, S.G.; Murphy, S. E. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, 8, 907.
- Hegi, G. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, vol. IV, A. Pichler's Witwe & Sohn, Wien, **1906**.
- Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S.; Williamson, E. M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Elsevier Science Ltd., Spain, **2004**.
- Helboe, P.; Olsen, O.; Sorensen, H. *J. Chromatogr.* **1980**, 197, 199.
- Hersch-Martínez, P.; Leanos-Miranda, B. E.; Solórzano-Santos, F. *Fitoterapia* **2005**, 76, 453.
- Hodgkins, J. E.; Ettlinger, M. G. *J. Org. Chem.* **1956**, 21, 404.
- Hodgkins, J. E.; Reeves, W. P. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3098.
- Hodisan, V.; Popescu, H. *Clujul Med.* **1982**, 55, 316.
- Hodisan, V.; Suciu, G. *Medicine for treating dental disorders*, Institutul de Medicina si Farmacie, Romania, RO 83-110664 19830415, **1984**.
- Hofmann, A. W. *Ber. Chem. Ges.* **1880**, 13, 1349.
- Hogge, L. R.; Reed, D. W.; Underhill, E. W.; Haughn, G. W. *J. Chromatogr.* **1988**, 26, 551.
- Hoglund, A. -S.; Lenman, M.; Falk, A.; Rask, L. *Plant Physiol.* **1991**, 95, 213.
- Holland, H. L.; Brown, F. M.; Larsen, B. G.; Zabic, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1569.
- Holst, B.; Williamson, G. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 425.
- Horita, H.; Hara, T.; Sannai, A.; Fujimori, T. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 3601.
- Hsu, H. C.; Yang, W. C.; Tsai, W. J.; Chen, C. C.; Huang, H. Y.; Tsai, Y. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 345, 1033.

- Hu, Z.; Lewis, J. A.; Hanley, A. B.; Fenwick, G. R. *Phytochemistry* **1989**, 28, 1252.
- Huang, X. P.; Renwick, J. A. A.; Sachev-Gupta, K. *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20, 423.
- Huisgen R.; Mack, W. *Chem. Ber.* **1972**, 105, 2815.
- Huisgen, R.; Mack, W.; Anneser, E. *Angew. Chem.* **1961**, 73, 656.
- Hull, A. K.; Vij, R.; Celenza, J. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 2379.
- Hull, R. *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 1777.
- Hull, R.; Seden, T. P. *Synth. Commun.* **1980**, 10, 489.
- Hussein, A. Q.; Abu-Taha, A.; Jochims, J. C. *Chem. Ber.* **1978**, 111, 3750.
- Husson, G. P.; Vilagines, R.; Delaveau, P. *Ann. Pharm. Fr.* **1986**, 44, 41.
- Iliceto, A.; Fava, A.; Mazzucato, U.; Rossetto, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 2729.
- Inoue, Y.; Hada, T.; Shiraishi, A.; Hirose, K.; Hamashima, H.; Kobayashi, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 1770.
- International Code of Botanical Nomenclature, Regnum Vegetable 131, Koeltz Scientific Books, Konigstein, **1993**.
- International Life Sciences Institute, Isothiocyanates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1999**, 39, 245.
- Iori, R.; Bernardi, R.; Gueyrard, D.; Rollin, P.; Palmieri, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1047.
- ISO 9167-1:1992. *Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Method using high-performance liquid chromatography*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, **1992**.
- ISO 9167-2:1995. *Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Method using X-ray fluorescence spectrometry*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, **1995**.
- ISO 9167-3: 2007 (E). *Rapeseed - Determination of glucosinolates content – Part 3: Spectrometric method for total glucosinolates by glucose release*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, **2007**.
- Ivancheva, S.; Bourzeix, M. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1999**, 52, 51.
- Ivancheva, S.; Manolova, N.; Serkedjieva, J.; Dimov, V.; Ivanovska, N. *Basic Life Sci.* **1992**, 59, 717.
- Ivancheva, S.; Petrova, A. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28, 255.
- Ivancheva, S.; Stancheva, B.; Serkedjieva, J. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1996**, 49, 41.
- Ivancheva, S.; Wollenweber, E. *Indian Drugs* **1989**, 27, 167.
- Ivancheva, S.; Wollenweber, E. L. *Indian Drugs* **1989**, 27, 167.
- Ivancheva, S.; Zapesochnaya, G.; Ognyanov, I. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1976**, 29, 205.
- Iversen, T. -H.; Baggerud, C. Z. *Pflanzenphysiol.* **1980**, 97, 399.
- Iwu, M. W.; Unaeze, N. C.; Okunji, C. O.; Corley, D. G.; Sanson, D. R.; Tempesta, M. *S. Int. J. Pharmacogn.* **1991**, 29, 154.
- Jacanović, D.; Jacanović, M. *Timoč Med. Glas.* **2002**, 27, 71.

- Jain, J. C.; Groot Wassink, J. W. D.; Kolenovsky, A. D.; Underhill, E. W. *Phytochemistry* **1990a**, 29, 1425.
- Jain, J. C.; Groot Wassink, J. W. D.; Reed, D. W.; Underhill, E. W. *J. Plant Physiol.* **1990b**, 136, 356.
- James, D.C.; Rossiter, J.T. *Physiol. Plant.* **1991**, 82, 163.
- Janković, M. M. In *Flora of Serbia*, vol. 5, Josifović, M. (Ed.), Srpska akademija nauka i umetnosti, Belgrade, **1973**, p. 134.
- Janković, M. M. In: *Flora of Serbia*, Josifović, M. (Ed.), Tome V, Belgrade, Srpska akademija nauka i umetnosti, **1973**, p. 136.
- Jezek, J.; Haggett, B. G. D.; Atkinson, A; Rawson, D.M. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4669.
- Jochims, J. C.; Seeliger, A. *Angew. Chem.* **1967**, 79, 151.
- Johar, G. S.; Agarwala, U.; Rao, P. B. *Indian J. Chem.* **1970**, 8, 759
- Johns, T.; Kitts, W. D.; Newsome, F.; Towers, G. H. N. *J. Ethnopharmacol.* **1982**, 5, 149.
- Jordanov, D.; Nikolov, P.; Boichinov, A. In *Phytotherapy*, Medicina, Sofia, **1973**, p. 158.
- Josefsson, E. Pattern, *Swedish Seed Association (Svalof, Sweden)* **1970**.
- Joseph, B.; Rollin, P. *J. Carbohydr. Chem.* **1993a**, 12, 719.
- Joseph, B.; Rollin, P. *J. Carbohydr. Chem.* **1993b**, 12, 1127.
- Jovanović-Dunjić, R.; Diklić, N.; Nikolić, V. In *Flora of Serbia*, vol. 3, Josifović, M. (Ed.), Srpska akademija nauka i umetnosti, Belgrade, **1972**, p. 177.
- Jovanović-Dunjić, R.; In *Flora of Serbia*, vol. 3, Josifović, M. (Ed.), Srpska akademija nauka i umetnosti, Belgrade, **1972**, p. 339.
- Jurkstiene V.; Kondrotas, A. J.; Kevelaitis E. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **2007**, 43, 60.
- Kabara, J. J.; Swieczkowski, D. M.; Conley, A. J.; Truant, J. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, 2, 23.
- Kalemba, D.; Kurowska, A.; Gora, J.; Lis, A. *Farmacja Polska* **1992**, 48, 442.
- Kaluza, L. *Monatsh. Chem.* **1909**, 30, 701.
- Kaluza, L. *Monatsh. Chem.* **1912**, 33, 363.
- Karaman, I.; Sahin, F.; Gulluce, M.; Ogutcu, H.; Sengul, M.; Adiguzel, A. J. *Ethnopharmacol.* **2003**, 85, 231.
- Kartnig, T.; Bucar-Stachel, J. *Planta Med.* **1991**, 57, 292.
- Karuso, P.; Scheuer, P. *J. Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4633.
- Katalinić, V.; Miloš, M.; Kulišić, T.; Jukić, M. *Food Chem.* **2006**, 94, 550.
- Keller, T. H.; Yelland, L. J.; Benn, M. H. *Can. J. Chem.* **1984**, 62, 437.
- Khodzhaev, K. N.; Shamsutdinov, M. I.; Shakirov, T. T. *Khim. Prir. Soedin.* **1975**, 11, 245.

- Kiddle, G.; Bennett, R. N.; Botting, N. P.; Davidson, N. E.; Robertson, A. A. B.; Wallsgrove, R. M. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 226.
- Kim, D. J.; Han, B. S.; Ahn, B.; Hasegawa, R.; Shirai, T.; Ito, N.; Tsuda, H. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 377.
- Kim, J. N.; Jung, K. S.; Lee, H. J.; Son, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1597.
- Kim, J. N.; Ryu, E. K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8283.
- Kim, J. N.; Song, J. H.; Ryu, E. K. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 1101.
- Kim, J.; Marshall, M. R.; Wei, C. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2839.
- Kim, S.; Ko, Y. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1987**, *8*, 50.
- Kim, S.; Yi, K. Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1987**, *8*, 466.
- Kim, S.; Yi, K. Y. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2613.
- Kim, S.; Yi, K. Y. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1661.
- Kirkland, D. F.; Matsuo, M.; Underhill, R.W. *Lloydia* **1971**, *34*, 195.
- Kitamura, T.; Kobayashi, S.; Taniguchi, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1801.
- Kjaer, A. *Acta Chem. Scand.* **1959**, *13*, 851.
- Kjaer, A. *Glucosinolates in the Cruciferae*, In: Vaughan, J.G.; MacLeod, A. J.; Jones, B.M.G. (Eds.), *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*, Academic Press, London, **1976**, p. 207.
- Kjaer, A. In: Bendy, G.; Santesson, J. (Eds.), *Chemistry in Botanical Classification*, Academic Press, London, **1974**, p. 229.
- Kjaer, A. In: Kharasch, N. (Ed.), *Organic Sulfur Compounds*, Pergamon Press, New York, **1961**, p. 409.
- Kjaer, A.; Christensen, B.W. *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 83.
- Kjaer, A.; Conti, J. *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 295.
- Kjaer, A.; Conti, J.; Larsen, I. Isothiocyanates. IV. *Acta Chem. Scand.* **1953**, *7*, 1276.
- Kjær, A.; Gmelin, R. *Acta Chem. Scand.* **1957**, *11*, 577.
- Kjaer, A.; Gmelin, R. *Acta Chem. Scand.* **1958**, *12*, 1693.
- Kjaer, A.; Gmelin, R.; Jensen, R. B. *Acta Chem. Scand.* **1956**, *10*, 432.
- Kjaer, A.; Jensen, S. R. *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 3324.
- Kjaer, A.; Madsen, J. O.; Maeda, Y.; Ozawa, Y.; Uda, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1715.
- Kjaer, A.; Malver, O. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1565.
- Kjaer, A.; Malver, O.; El-Menshaw, B.; Reisch, J. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1485.
- Kjaer, A.; Ogaard-Madsen, J.; Maeda, Y. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1285.
- Kjaer, A.; Olesen Larsen, P. In: Geissman, T.A. (Ed.), *Specialist Periodical Reports*, The Chemical Society, London, **1973**, p. 71.
- Kjaer, A.; Olesen Larsen, P. In: Geissman, T.A. (Ed.), *Specialist Periodical Reports*, The Chemical Society, London, p. 179
- Kjaer, A.; Schuster, A. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 1631.
- Kjaer, A.; Schuster, A. *Acta Chem. Scand.* **1972a**, *26*, 8.

- Kjaer, A.; Schuster, A. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 3155.
- Kjaer, A.; Schuster, A. *Phytochemistry* **1972b**, *11*, 3045.
- Kjær, A.; Schuster, A. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 929.
- Kjaer, A.; Schuster, A.; Park, R. J. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 455.
- Kjaer, A.; Thomsen, H. *Acta Chem. Scand.* **1962a**, *16*, 591.
- Kjaer, A.; Thomsen, H. *Acta Chem. Scand.* **1962b**, *17*, 2065.
- Kjaer, A.; Thomsen, H. *Acta Chem. Scand.* **1963a**, *17*, 561.
- Kjaer, A.; Thomsen, H. *Phytochemistry* **1963b**, *2*, 29.
- Kjaer, A.; Wagnieres, M. *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 1989.
- Kjaer, A.; Wagnieres, M. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2195.
- Kliebenstein, D. J.; Kroymann, J.; Brown, P.; Figuth, A.; Pedersen, D.; Gershenson, J.; Mitchell-Olds, T. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 811.
- Kliebenstein, D. J.; Lambrix, V. M.; Reichelt, M.; Gershenson, J.; Mitchell-Olds, T. *Plant Cell* **2001**, *13*, 681.
- Kliebenstein, D. J.; Rowe, H. C.; Denby, K. J. *Plant J.* **2005**, *44*, 25-36.
- Kobakhidze, K. B.; Alaniya, M. D.; Kutateladze, I. G. *Chem. Nat. Comp.* **2004**, *40*, 89.
- Kohlmeier, L.; Su, L. *FASEB Journal* **1997**, *11*, A369.
- Kojima, M.; Ogawa, K. *J. Ferment. Technol.* **1971**, *49*, 740.
- Kondo, K.; Komamura, C.; Murakami, M.; Takemoto, K. I. *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 171.
- Kore, A. M.; Spencer, G. F.; Wallig, M. A. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 89.
- Kostecka-Madalska, O.; Dziurzycka, B.; Kudrewicz-Hubicka, Z. *Acta Soc. Bot. Pol.* **1965**, *34*, 621.
- Kricheldorf, H. R. *Angew. Chem. Intl. Ed.* **1970**, *9*, 526.
- Kristian, P. *Chem. Zvesti* **1961**, *15*, 333.
- Kristian, P. *Chem. Zvesti* **1969**, *23*, 371.
- Kune, S.; Kune, G. A.; Watson, L. F. *Nutr. Cancer* **1987**, *9*, 21.
- Kushad, M. M.; Brown, A. F.; Kurlich, A. C.; Juvik, J. A.; Klein, B.P.; Wallig, M. A.; Jefery, E. H. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *47*, 1548.
- Kusznierewicz, B.; Bartoszek, A.; Wolska, L.; Drzewiecki, J.; Gorinstein S.; Namiesnik, J. *LWT–Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1.
- Lafosse, M.; Rollin, P. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 7319.
- Lafosse, M.; Rollin, P.; Elfakir, C.; Morin-Allory, L.; Martens, M.; Dreux, M. J. *Chromatogr.* **1990**, *505*, 191.
- Lalli, J. Y. Y. *In vitro Pharmacological Properties and Composition of leaf Essential Oils and Extracts of Selected Indigenous Pelargonium (Geraniaceae) Species*, PhD Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg, **2005**.
- Larsen, C.; Harpp, D. N. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2465.
- Larsen, C.; Stelliou, K.; Harpp, D. N. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 337.
- Larsen, L.M.; Nielsen, J.K.; Sorensen, H. *Entomol. Exp. Appl.* **1992**, *64*, 49.

- Larsen, L.M.; Olsen, O.; Sorensen, H. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2314.
- Laszlo, P.; Pennetreau, P. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2407.
- Lazar, S.; Rollin, P. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2173.
- Lazzeri, L.; Tacconi, R.; Palmieri, S. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 825.
- Leardini, R.; McNab, H.; Minozzi, M.; Nanni, D.; Reed, D.; Wright, A.G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2704.
- Lei, J.; Yu, J.; Yu, H.; Liao, Z. *Food Chem.* **2008**, 107, 1205.
- Leifertova, I.; Buckova, A.; Mlady, F.; Lisa, M.; Eisenreichova, E. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* **1976**, 29, 145.
- Lenman, M.; Rodin, J.; Josefsson, L. G.; Rask, L. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 194, 747.
- Leucuta, S.; Vlase, L.; Gocan, S.; Radu, L.; Fodorea, C. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2005**, 28, 3109.
- Lewis, E. S.; Cooper, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 3847.
- Lex, A.; Trimmel, G.; Kern, W.; Stelzer, F. *J. Mol. Cat. A* **2006**, 254, 174.
- Li, G.; Tajima, H.; Ohtani, T. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4539.
- Li, Y.; Zhang, X.; Li, X. *Geranium extract, its preparation and anti-helicobacter pylori pharmaceutical composition containing the same*, Jiangsu Chia-Tai Tianqing Pharmaceutical Co. Ltd., China, CN 2006-10161639 20061229, **2008**.
- Lieber, E.; Slutkin, R. *Diisothiocyanates and Derivatives*. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 2214.
- Lin, C. -M.; Kim, J.; Du, W. -X.; Wei, C. -I. *J. Food Prot.* **2000**, 63, 25.
- Lin, C. M.; Preston, J. F.; Wei, C. I. *J. Food Prot.* **2000**, 63, 727.
- Linscheid, M.; Wendisch, D.; Strack, D. *Z Naturforsch* **1980**, 35C, 907.
- Lipp, M.; Dallacker, F.; Koenen, G. *Chem. Ber.* **1958**, 91, 1660.
- Lis-Balchin, M. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5, 317.
- Lis-Balchin, M. T., Hart, S. L. *J. Herbs Spices Med. Plants* **1994**, 2, 41.
- Lis-Balchin, M. *The genera Geranium and Pelargonium*, Taylor & Francis, London and New York, **2002**.
- Liu, J.; Shi, M.; Diosady, L. L.; Rubin, L. J. *J. Food Eng.* **1995**, 24, 35.
- Lockwood, G. B.; Belkhiri, A. *Plant Syst. Evol.* **1991**, 176, 11.
- Lonnerdal, B.; Janson, J.-C. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 315, 421.
- Loos, R.; Kobayashi, S.; Mayr, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14126.
- Losanitsch, S. *Ber. Chem. Ges.* **1872**, 5, 156.
- Louda, S.M.; Farris, M.A.; Blua, M.J. *J. Chem. Ecol.* **1987**, 13, 569.
- Louda, S.M.; Rodman, J.E. *Biochem. Syst. Ecol.* **1983**, 11, 199.
- Luciano, F. B.; Hosseinian, F. S.; Beta, T.; Holley, R. A. *J. Food Sci.* **2008**, 73, M214.
- Ludwig-Muller, J.; Pieper, K.; Ruppel, M.; Cohen, J. D.; Epstein, E.; Kiddle, G.; Bennett, R. *Planta* **1999**, 208, 409.
- Luning, B.; Kers, L. E.; Seffers, P. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, 20, 394.
- Luthy, B.; Matile, P. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **1984**, 179, 5.
- MacGibbon, D. B.; Beuzenberg, E. J. *New Zeal. J. Sci.* **1978**, 21, 389.

- MacLeod, A. J.; Panchasara, S. D. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 705.
- MacLeod, A. J.; Pieris, N. M. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1005.
- Magrath, R.; Bano, F.; Morgner, M.; Parkin, I.; Sharpe, A.; Lister, C.; Dean, C.; Turner, J.; Lydiate, D.; Mithen, R. *Heredity* **1994**, *72*, 290.
- Magrath, R.; Herron, C.; Giamoustaris, A.; Mithen, R. *Plant Breeding* **1993**, *111*, 55.
- Magrath, R.; Mithen, R. *Plant Breeding* **1993**, *111*, 249.
- Maheo, K.; Morel, F.; Langouet, S.; Kramer, H.; Le Ferrec, E.; Ketterer, B.; Guillouzo, A. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3649.
- Mainardi, T.; Kapoor, S.; Bielory, L. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *123*, 283.
- Makkar, H. P. S.; Siddhuraju, P.; Becker, K. *Plant secondary metabolites. Methods in Molecular Biology, (Chapter 11) Glucosinolates*, Humana Press Inc., Totowa, NJ., **2007**, p. 55.
- Manici, L. M.; Lazzeri, L.; Palmieri, S. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2768.
- Manolov, P.; Ivancheva, S.; Petkov, V.; Tsonev, I.; Isaev, I.; Iosifov, I.; Boyadzhiev, G.; Klouchek, E.; Kushev, V.; Totev, I. *Bulg. Problemi na Vutreshnata Meditsina* **1980**, *8*, 41.
- Manolov, P.; Petkov, V. D.; Ivancheva, S. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* **1977**, *30*, 1657.
- Mari, M.; Iori, R.; Leoni, O.; Marchi, A. *Ann. Appl. Biol.* **1993**, *123*, 155.
- Marquardt, F. M. *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 1716.
- Marsh, R. E.; Waser, J. *Acta Crystallogr. B* **1970**, *26*, 1030.
- Maslennikova, V. A.; Genkina, G. L.; Umarova, R. U.; Navruzova, A. M.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prirod. Soedin.* **1967**, *3*, 173.
- Maslennikova, V. A.; Khristulas, F. S.; Abubakirov, N. K. Glucosides of *Erysimum* species plants. I. Glucosides of *Erysimum diffusum*. *Zh. Obshch. Khim.* **1961**, *31*, 2069.
- Matasyoh, J. C.; Maiyo, Z. C.; Ngure, R. M.; Chepkorir, R. *Food Chem.* **2009**, *113*, 526.
- Matsuo, M. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *38*, 4101.
- Mavlyanov, S. M.; Islambekov, Sh. Yu.; Kamaev, F. G.; Abdullaev, U. A.; Karimdzhanov, A. K.; Ismailov, A. I. *Chem. Nat. Comp.* **1997**, *33*, 179.
- Mavlyanov, S. M.; Islambekov, Sh. Yu.; Kamaev, F. G.; Ismailov, A. I. Phenolic compounds of *Geranium sanguineum*. *Khim. Prirod. Soedin.* **1994**, *30*, 40.
- Mavratzotis, M.; Dourtoglou, V.; Lorin, C.; Rollin, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5699.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Piskula, M.; Kozlowska, H. *Nahrung* **1993a**, *37*, 131.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Zdunczyk, Z.; Kozlowska, H. *Nahrung* **1993b**, *37*, 336.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Zdunczyk, Z.; Kozlowska, H. *Nahrung* **1994b**, *38*, 178.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Zdunczyk, Z.; Kozlowska, H. *Nahrung* **1995a**, *39*, 21.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Zdunczyk, Z.; Kozlowska, H. *Nahrung* **1995b**, *39*, 32.
- Mawson, R.; Heaney, R. K.; Zdunczyk, Z.; Kozlowska, H.. *Nahrung* **1994a**, *38*, 167.
- Mayton, H. S.; Olivier, C.; Vaughn, S. F.; Loria, R. *Phytopathology* **1996**, *86*, 267.

- McDanell, R.; McLean, A. E. M.; Hanley, A. B.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R. *Food Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 59.
- McGregor, D. I. In: *Canola Council of Canada*, (Ed.) Analytical Chemistry of Rapeseed and its Products: A Symposium, **1980**, p. 59.
- Medrano, M. A.; Frontera, M. A.; Tomas, M. A. *An. Asoc. Quim. Argent.* **1978**, *66*, 107.
- Mesheram, H. M.; Dale, S.; Yadav, J. S., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8743.
- Michaud, D. S.; Spiegelman, D.; Clinton, S. K.; Rimm, E. B.; Willett, W. C.; Giovannucci, E. L. *J. Nat. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 605.
- Michinton, I.; Sang, J.; Burke, D.; Truscott, R. J. W. *J. Chromatogr.* **1982**, *247*, 141.
- Miliauskas, G. *Screening, isolation and evaluation of antioxidative compounds from Geranium macrorrhizum, Potentilla fruticosa and Rhaponticum carthamoides*, PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands, **2006**.
- Miliauskas, G.; Mulder, E.; Linssen, J. P. H.; Houben, J. H.; van Beek, T. A.; Venskutonis, P. R. *Meat Sci.* **2007**, *77*, 703.
- Miliauskas, G.; van Beek, T. A.; Venskutonis, P. R.; Linssen, J. P. H.; de Waard, P. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 253.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; van Beek, T. A. *Food Chem.* **2004**, *85*, 231.
- Minchinton, I.; Sang, J.; Burke, D.; Truscott, R. J. W. *J. Chromatogr.* **1982**, *247*, 141.
- Minnaard, A. J.; Wijnberg, J. B. P. A.; de Groot, A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2115.
- Miron, G.; Miron, G. S.; Miron, Z. *Hydroalcoholic extract for the treatment of sexual dysfunctions and infertility*, Elzin Plant S.r.l., Romania, RO 2006-200600725 20060920, **2009**.
- Mithen, R. F.; Dekker, M.; Verkerk, R.; Rabot, S.; Johnson, I. T. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 967.
- Mithen, R.; Campos, H. *Entomol. Exp. Appl.* **1996**, *80*, 202.
- Mithen, R.; Clarke, J.; Lister, C.; Dean, C. *Heredity* **1995b**, *74*, 210.
- Mithen, R.; Heaney, R. K.; Fenwick, G.R. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1986**, *87*, 433.
- Mithen, R.; Lewis, B. G.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R. *Phytochemistry* **1987a**, *26*, 1969.
- Mithen, R.; Lewis, B.G.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1987b**, *88*, 525.
- Mithen, R.; Raybould, A. F.; Giamoustaris, A. *Heredity* **1995a**, *75*, 472.
- Mlinaric, A.; Kreft, S.; Umek, A.; Strukelj, B. Screening of selected plant extracts for *in vitro* inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). *Die Pharmazie* **2000**, *55*, 75.
- Molina, P.; Alajarín, M.; Tamiaki, H. *Synthesis* **1982**, 596.
- Morel, F.; Langouet, S.; Maheo, K.; Guillouzo, A. *Cell. Biol. Toxicol.* **1997**, *13*, 323.
- Moreno, D. A.; Carvajal, M.; Lopez-Berenguer, C.; Garcia-Viguera, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1508.
- Morse, M. A.; Zu, H.; Galati, A. J.; Schmidt, C. J.; Stoner, G. D. *Cancer Lett.* **1993**, *72*, 103.

- Mukaiyama, T.; Taguchi, T. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3411.
- Mukaiyama, T.; Taguchl, T.; Nishi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1971**, *44*, 2797.
- Mukerjee, A. K.; Ashare, R. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1.
- Müller, A.; Meszaros, E.; Lempert-Sreter, M.; Szara, J. *J. J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 1003.
- Mulzer, J.; Bohlmann, R. (Eds). *The Role of Natural Products in Drug Discovery (Ernst Schering Research Foundation Workshop 32)*, Springer-Verlag, Berlin, **2000**.
- Munch, H.; Hansen, J. S.; Pittelkow, M.; Christensen, J. B.; Boas, U. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117.
- Murzakhmetova M.; Moldakarimov S.; Tancheva Lj.; Abarova S.; Serkedjieva J. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 746.
- Muthusamy, S.; Ramakrishnan, V. T. *Org. Prep. Proced. Int.* **1989**, *21*, 228.
- Nakamura, Y.; Ohigashi, H.; Masuda, S.; Murakami, A.; Morimitsu, Y.; Kawamoto, Y.; Osawa, T.; Imagawa, M.; Uchida, K. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 219.
- Nakashima, R.; Yoshikawa, M.; Matsuura, T. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1502.
- Nascimento, R. R.; Do Billen, J.; Andmorgan, E. D. *Comp. Biochem. Physiol.* **1993**, *104B*, 505.
- Nastruzzi, C.; Cortesi, R.; Esposito, E.; Menegatti, E.; Leoni, O.; Iori, R.; Palmieri, S. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1014.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, Tentative standard, M26-T, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, **2007**.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility test, 9th International Supplement. M100-S9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, **1999**.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. Document M 100-S11, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, **2003**.
- Navruzova, A. M.; Maslennikova, V. A.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prir. Soedin.* **1973**, *6*, 750.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.
- Newman, R. M.; Hanscom, A.; Kerfoot, W. C. *Oecologia* **1992**, *92*, 1.
- Nikitina, V. S. *Hydroxycinnamic acid and flavonoid content in extractive polyphenols of Southern Urals plants*. Novye Dostizheniya v Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii Rastitel'nogo Syr'ya, Materialy Vserossiiskoi Konferentsii, 3rd, Barnaul, Russian Federation **2007**, *2*, 155.
- Nikitina, V. S.; Kuzmina, L. Yu.; Melentev, A. I.; Shendel, G. V. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 629.
- Nikolić, V. In *Flora of Serbia*, vol. 3, Josifović, M. (Ed.), Srpska akademija nauka i umetnosti, Belgrade, **1972**, p. 202.
- Nippon Carbide Industries Co. Inc. Japan Patent 81158758, **1981**.

- Nowick, J. S.; Holmes, D. L.; Noronha, G.; Smith, E. M.; Nguyen, T. M.; Huang, S. L. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3929.
- Nugon-Baudon, L.; Rabot, S.; Szylit, O.; Raibaud, P. *Xenobiotica* **1990**, *20*, 223.
- Nugon-Baudon, L.; Szylit, O.; Raibaud, P. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *43*, 299.
- O.; Sorensen, H. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 353.
- Oerlemans, K.; Barrett, D. M.; Suades, C. B.; Verkerk, R.; Dekker, M. *Food Chem.* **2006**, *95*, 19.
- Oginsky, E. L.; Stein, A.E.; Greer, M.A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, *119*, 360.
- Ognyanov, I. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* **1962**, *15*, 393.
- Ognyanov, I. V.; Ivancheva, S. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1972**, *25*, 1057.
- Ognyanov, I.; Ivancheva, S.; Zapesochnaya, G. G. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1975**, *28*, 1621.
- Ognyanov, I.; Mkhailov, M.; Burogudzkiev, Z. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1963**, *16*, 517.
- Ohtsuru, M.; Hata, T. *Agricul. Biol. Chem.* **1972**, *36*, 2495.
- Ohtsuru, M.; Kawatani, H. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 2249.
- Olsen, O.; Rasmussen, K.W.; Sorensen, H. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1857.
- Olsen, O.; Sorensen, H. *J. Agric. Food Chem.* **1980a**, *28*, 43.
- Olsen, O.; Sorensen, H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *1981*, 857.
- Olsen, O.; Sorensen, H. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1547.
- Olsen, O.; Sorensen, H. *Phytochemistry* **1980b**, *19*, 1783.
- Orčić, D. *Gasnohromatografska analiza etarskih ulja*, Seminarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, **2007**.
- Ouattara, B.; Simard, R. E.; Holley, R. A.; Piette, G. J.-P.; Begin, A. *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, *37*, 155.
- Pak, C. S.; Youn, I. K.; Lee, Y. S. *Synthesis* **1982**, 969.
- Palada, M.C. *HortScience* **1996**, *31*, 794.
- Palmieri, S.; Iori, R.; Leoni, O. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 140.
- Pantev, A.; Ivancheva, S.; Staneva, L.; Serkedjieva, J. *Z. Naturforsch., C* **2006**, *61*, 508.
- Parkin, I.; Magrath, R.; Keith, A.; Sharpe, A.; Mithen, R.; Lydiate, D. *Heredity* **1994**, *72*, 594.
- Parks, T. E.; Spurlock, L. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3922.
- Pattnaik, S.; Subramanyam, V. R.; Bapaji, M.; Kole, C. R. *Microbios* **1997**, *89*, 39.
- Pearson, R. G. *Chemical Hardness*, Wiley, New York, **1997**.
- Pedro, L. G.; Pais, M. S. S.; Scheffer, J. J. C. *Flavour Fragr. J.* **1992**, *7*, 223.
- Peterka, S.; Fenwick, G. R. *Fat Sci. Technol.* **1988**, *90*, 61.
- Petrova, A.; Kozuharov, S. In *Flora na NR Bălgarija* (Vol. VII), Jordanov, D. (Ed.), Izdatelstvo na Bălgarskata Akademija na Naukite, Sofia, Bulgaria, 1979, p. 27.
- Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Salgueiro, L.; Goncalves, M. J.; Costa-de-Oliveira, S.; Cavaleiro, C.; Palmeira, A.; Rodrigues, A.; Martinez-de-Oliveira, J. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 1367.

- Pivnick, K. A.; Lamb, R. J.; Reed, D. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 863.
- Pivnick, K. A.; Reed, D. W.; Millar, J. G.; Underhill, E. W. *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 931.
- Ploetz, K.; Orr, B. *Econ. Bot.* **2004**, *58*, 231.
- Posner, G. H.; Cho, C. G.; Green, J. V.; Zhang, Y.; Talalay, P. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 170.
- Prakash, A. O. *Int. J. Crude Drugs Res.* **1986**, *24*, 19.
- Prestera, T.; Fahey, J. W.; Holtzclaw, W. D.; Abeygunawardana, C.; Kachinski, J. L.; Talalay, P. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 168.
- Prestera, T.; Zhang, Y.; Spencer, S. R.; Wilczak, C. A.; Talalay, P. *Adv. Enzyme Regul.* **1999**, *33*, 281.
- Prochazka, Z.; Komersova , I. *Cesk. Farm.* **1959**, *8*, 373.
- Proestos, C.; Boziaris, I. S.; Nychas, G. -J. E.; Komaitis, M. *Food Chem.* **2006**, *95*, 664.
- Quave, C. L.; Plano, L. R. W.; Pantuso, T.; Bennett, B. C. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *118*, 418.
- Quinsac, A.; Charrier, A.; Ribaille, D. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 201.
- Raasch, M. S. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3470.
- Rabot, S.; Nugon-Baudon, L.; Raibaud, P.; Szylit, O. *Br. J. Nutr.* **1993**, *70*, 323.
- Racz, G.; Fuzi, J. *Acta Pharm. Hung.* **1959**, *29*, 64.
- Radulović, N.; Blagojević, P.; Palić, R. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 405.
- Radulović, N.; Dekić, M.; Stojanović-Radić, Z.; Palić, R. *Cent. Eur. J. Biol.* **2009**, *4*, 404.
- Radulović, N.; Stojanović, G.; Palić, R. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 85.
- Radulović, N.; Zlatković, B.; Skropeta, D.; Palić, R. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 807.
- Radwan, H. M.; El-Missiry, M. M.; Al-Said, W. M.; Ismail, A. S.; Abdel Shafeek,K.A.; Seif-El-Nasr, M. M. *Res. J. Med. Med. Sci.* **2007**, *2*, 127.
- Rainova, L.; Tsonev, I.; Petkov, V.; Ivancheva, S.; Marinov, M. *Farmatsiya (Sofia, Bulgaria)* **1968**, *18*, 11.
- Raj, G.; Baby, S.; Dan, M.; Thaha, A. R. M.; Sethuraman, M. G.; George1, V. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 348.
- Rajab, M. S.; Cantrell, C. L.; Franzblau, S. G.; Fisher, N. H. *Planta Med.* **1998**, *64*, 2.
- Rajappa, S.; Rajagopalan, T. G.; Sreenivasan, R.; Kanal, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 2001.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B.; Meijer, J. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *42*, 93.
- Raskin, I.; Ribnicky, D. M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D. A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 522.
- Redžić, S. S. *Coll. Antropol.* **2007**, *31*, 869.

- Reed, D.W.; Davin, L.; Jain, J. C.; Deluca, V.; Nelson, L.; Underhill, E. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *305*, 526.
- Reese, E. T.; Clapp, R. C.; Mandels, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *75*, 228.
- Reichardt, P. B.; Anderson, B. J.; Clausen, T. P.; Hoskins, L. C. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 1174.
- Renwick, J. A. A.; Radke, C. D.; Sachev-Gupta, K.; Stadler, E. *Chemoecology* **1992**, *3*, 33.
- Rich, T. C. G. *Crucifers of Great Britain and Ireland*, Botanical Society of the British Isles, London, UK, **1991**, p. 336.
- Rodman, J. E. In: Young, D.A.; Seigler, D.S. (Eds.), *Phytochemistry and Angiosperm Phylogeny*, Praeger, New York, **1981**, p. 43.
- Rodman, J. E. *Syst. Bot.* **1991a**, *16*, 619.
- Rodman, J. E. *Syst. Bot.* **1991b**, *16*, 598.
- Rodman, J. E.; Chew, F.S. *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, *8*, 43.
- Rodman, J. E.; Price, R. A.; Karol, K.; Conti, E.; Sytsma, K.J.; Palmer, J. D. *Ann. MO Bot. Gard.* **1993**, *80*, 686.
- Rollins, R. C. *The Cruciferae of continental North America: systematics of the mustard family from the Arctic to Panama*, Stanford University Press, Stanford, CA, **1993**, p. 976.
- Rontani, J. -F.; Cuny, P.; Grossi, V. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 347.
- Rontani, J. -F.; Nassiry, M.; Mouzdzahir, A. *Org. Geochem.* **2007**, *38*, 37.
- Rosa, E. A. S.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R.; Portas, C. A. M. *Hort. Rev.* **1997**, *19*, 99.
- Rosa, E.A.S.; Rodrigues, P.M.F. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **1999**, *74*, 667.
- Roussis, V.; Chinou, I. B.; Tsitsimpikou, C.; Vagias, C.; Petrakis, P. V. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 364.
- Ruberto, G.; Renda, A.; Amico, V.; Tringali, C. *Bioresource Technol.* **2008**, *99*, 260.
- Rubin, L. J.; Diosady, L. L.; Naczk, M.; Halfani, M. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **1986**, *19*, 57.
- Rukmini, C.; Deosthale, Y. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 503.
- S. Chuanphongpanich, D. Buddhasukh, P. Pirakitkuir and S. Phanichphant, *Chiang Mai J. Sci.* **2006**, *33*, 223.
- Sahin, F.; Karaman, I.; Gulluce, M.; Ogutcu, H.; Sengul, M.; Adiguzel, A. J. *Ethnopharmacol.* **2002**, *87*, 61.
- Said, O.; Khalil, K.; Fulder, S.; Azaizeh, H. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *83*, 251.
- Sakai, S.; Fujinami, T.; Aijawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1977**, *50*, 425.
- Sakai, S.; Fujinami, T.; Aizawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1975**, *48*, 2981.
- Sakushima, A.; Coskun, M.; Maoka, T. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 483.
- Sang, J. P.; Truscott, R. J. W. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1993**, *67*, 829.
- Santos, P. O.; Costa, J. C. M.; Alves, J. A. B.; Nascimento, P. F. C.; de Melo, D. L. F. M.; Barbosa Jr, A. M.; Trindade, R. C.; Blank, A. F.; Arrigoni-Blank, M. F.; Alves,

- P. B.; Nascimento, M. P. F. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1648.
- Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G. *Braz. J. Microbiol.* **2004**, *35*, 275.
- Sayigh, A. A. R.; Ulrich, H.; Potts, J. S. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2465.
- Schaumann, E.; Ruhter, G. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5265.
- Schelz, Z.; Molnar, J.; Hohmann, J. *Fitoterapia* **2006**, *77*, 279.
- Schiavon, G. *Ric. Sci.* **1962**, *32*, 69.
- Schlüter, M.; Gmelin, R. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3427.
- Schmidt, E.; Striewsky, W.; Seefelder, M.; Hitzler, F. *Ann.* **1950**, *568*, 192.
- Schraudolf, H. *Experientia* **1965**, *29*, 520.
- Schraudolf, H. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 259.
- Schraudolf, H.; Bauerle, R. *Z. Naturforsch.* **1986**, *41c*, 526.
- Schraudolf, H.; Schmidt, B.; Weberling, F. *Experientia* **1971**, *27*, 1090.
- Schreiner, M.; Peters, P.; Krumbein, A. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S585.
- Schultz, O.E.; Wagner, W. *Arch. Pharm.* **1956**, *289*, 597.
- Schwab, C. J.; Cooley, J. D.; Brasel, T.; Jumper, C. A.; Graham, S. C.; Straus, D. C. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *130*, 200.
- Seck, D.; Lognay, G.; Haubrige, E.; Wathélet, J.P.; Marlier, M.; Gaspar, C.; Severin, M. *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 377.
- Seegal, B. C.; Holden, M. *Science* **1945**, *101*, 413.
- Seidemann, J. *World Spice Plants*, Springer-Verlag, Berlin, **2005**, p. 165.
- Seow, A.; Shi, C. Y.; Chung, F. L.; Jiao, D.; Hankin, J. H.; Lee, H. P.; Coetzee, G. A.; Yu, M. C. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* **1998**, *7*, 775.
- Serkedjieva, J.; Gegova, G.; Mladenov, K. *Pharmazie* **2008**, *63*, 160.
- Serkedjieva J; Ivancheva S. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 59.
- Serkedjieva, J. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* **2009**, *62*, 1527.
- Serkedjieva, J. *Pharmazie* **2003**, *58*, 53.
- Serkedjieva, J.; Gegova, G.; Mladenov, K. *Pharmazie* **2008**, *63*, 160.
- Serkedjieva, J.; Hay, A. *J. Antiviral Res.* **1998**, *37*, 121.
- Serkedjieva, J.; Ivantcheva, S.; Stantcheva, B.; Ivanova, I. *Farmatsiya (Sofia)* **1998**, *45*, 17.
- Serkedjieva, J.; Manolova, N. *Basic Life Sci.* **1992**, *59*, 705.
- Serkedjieva, J.; Nikolova, E.; Kirilov, N. *Acta Virol.* **2010a**, *54*, 137.
- Serkedjieva, J.; Roeva, I.; Ivanova, I. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **2005b**, *19*, 6.
- Serkedjieva, J.; Stefanova, T.; Krumova, E. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **2010b**, *65*, 419.
- Serkedjieva, J.; Toshkova, R.; Antonova-Nikolova, S.; Stefanova, T.; Teodosieva, A.; Ivanova, I. *Antiviral Chem. Chemother.* **2007**, *18*, 75.
- Shapiro, T. A.; Fahey, J. W.; Wade, K. L.; Stephenson, K.K.; Talalay, P. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* **1998**, *7*, 1091.
- Sharawy, S. M.; Badr, A. *Int. J. Bot.* **2008**, *4*, 225.

- Sharma, S. *J. Sulfur Chem.* **1989**, 8, 327.
- Shibanuma, T.; Shiono, M.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1977**, 537.
- Shikita, M.; Fahey, J. W.; Golden, T. R.; Holtzclaw, W. D.; Talalay, P. *Biochem. J.* **1999**, 341, 725.
- Shunying, Z.; Yang, Y.; Huaidong, Y.; Yue, Y.; Dong, L.; Guolin, Z. *J Wuhan. Univ. Natur. Sci. Ed.* **2006**, 11, 699.
- Slotta, K. H.; Dressler, H. *Ber. Chem. Ges.* **1930**, 63, 888.
- Smith, P. A. S.; Emerson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82, 3076.
- Smith, P. A. S.; Kan, R. O. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2261.
- Smith, V. L. *Phytochemistry* **2000**, 9, 865.
- Sokmen, M.; Angelova, M.; Krumova, E.; Pashova, S.; Ivancheva, S.; Sokmen, A.; Serkedjieva, J. *Life Sci.* **2005**, 76, 2981.
- Song, L.; Thornalley, P. J. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, 216.
- Spinks, E. A.; Sones, K.; Fenwick, G. R. *Fette Seifen Anstrichmittel* **1984**, 86, 228.
- Sroka, Z.; Rzadkowska-Bodalska, H.; Mazol, I. Z. *Naturforsch., C: Biosci.* **1994**, 49, 881.
- Staab, H. A.; Walther, G. Synthese von Isothiocyanaten. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1962**, 657, 104.
- Staack, R.; Kingston, S.; Wallig, M. A.; Jefery, E. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, 149, 17.
- Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2078.
- Steinmetz, K. A.; Potter, J. D. *Cancer Causes Control* **1991**, 2, 325.
- Steinmetz, K.A.; Potter, J. D. *J. Am. Diet. Assoc.* **1996**, 96, 1027.
- Stephensen, H.; Zaragosa, F. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6096.
- Stermitz, F. R.; Lorenz, P.; Tawara, J. N.; Zenewicz, L. A.; Lewis, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 1433.
- Stieger, K. H. *Monatsh. Chem.* **1916**, 37, 635.
- Stoewsand, G. S. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, 33, 537.
- Stoin, D. F.; Dogaru, R. D. *Bull. USAMV-CN* **2007**, 63, 77.
- Stoner, G. D.; Kresty, L. A.; Carlton, P. S.; Siglin, J. C.; Morse, M. A. *Toxicol. Sci.* **1999**, 52, 95.
- Stoner, G. D.; Morse, M. A. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 401, 13.
- Stoner, G. D.; Morse, M. A. *Cancer Lett.* **1997**, 114, 113.
- Su, D.; Song, Y.; Li, R. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* **1990**, 10, 144.
- Sun, J. W.; Kim, S. Y.; Kim, Y. C.; Choi, K. C.; Chung, B. S. *Korean J. Dermatol.* **1999**, 37, 1544.
- Swart, H.; Van Dyk, S.; Malan, S. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2435.
- Tadzhibaev, Y. A.; Mukhamedova, K. S.; Akramov, S. T. *Khim. Prir. Soedin.* **1977**, 5, 623.

- Takeshi, I.; Tomoo, H.; Norihiro, T.; Toshimischi, I.; Mitsuru, A.; Kenichi, K. *Jpn. J. Allergol.* **2007**, 56, 101.
- Talalay, P. *Proc. Am. Philos. Soc.* **1999**, 143, 52.
- Talalay, P.; Fahey, J. W.; Holtzclaw, W. D.; Prester, T.; Zhang, Y. *Toxicol. Lett.* **1995**, 82, 173.
- Talalay, P.; Zhang, Y. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, 24, 806.
- Tanaka, S.; Uemura, S.; Okano, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1977**, 50, 2785.
- Tang, C. -S. *J. Food Sci.* **1974**, 39, 94.
- Tang, C. S. *Phytochemistry* **1973**, 12, 769.
- Tang, C. -S.; Hamilton, R. A. *Phytochemistry* **1976**, 15, 1767.
- Tani, N.; Ohtsuru, M.; Hata, T. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38, 1623.
- Tao, X.; Cush, J. J.; Garret, M.; Lipsky, P. E. *J. Rheumatol.* **2001**, 28, 2160.
- Tao, X.; Younger, J.; Fan, F. Z.; Wang, B.; Lipsky, P. E. *Arthritis Rheum.* **2002**, 46, 1735.
- Tawfiq, N.; Heaney, R. K.; Plumb, J. A.; Fenwick, G. R.; Musk, S. R.; Williamson, G. *Carcinogenesis* **1995**, 16, 1191.
- Tellez, M. R.; Khan, I. A.; Kobaisy, M.; Schrader, K. K.; Dayan, F. E.; Osbrink, W. *Phytochemistry* **2002**, 61, 149.
- Thies, W. *Fat Sci. Technol.* **1988**, 90, 311.
- Tholen, J. T.; Buzzo, G.; McGregor, D. I.; Truscoir, R. J. W. *Plant Breed.* **1993**, 110, 137.
- Thomas, K. J.; Nicholl, J. P.; Coleman, P. *Complement. Ther. Med.* **2001**, 9, 2.
- Tisher, P.; Ward, M. *BMJ* **1994**, 309, 107.
- Tomalia, D. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1966**, 3, 384.
- Tonellato, U. *Boll. Sci. Fac. Chim. Ind. Bologna* **1969**, 27, 249.
- Tonellato, U.; Levorato, G. *Boll. Sci. Fac. Chim. Ind. Bologna* **1969**, 27, 261.
- Toroser, D.; Thormann, C. E.; Osborne, T. C.; Mithen, R. *Theor. Appl. Gen.* **1995**, 91, 802.
- Tortorano, A. M.; Viviani, M. A.; Biraghi, E.; Rigoni, A. L.; Prigitano, A.; Grillot, R. *J. Med. Microbiol.* **2005**, 54, 955.
- Toshkova, R.; Nikolova, N.; Ivanova, E.; Ivancheva, S.; Serkedjieva, J. *Pharmazie* **2004**, 59, 150.
- Traka, M.; Mithen, R. *Phytochem. Rev.* **2009**, 8, 269.
- Trevino, J.; Martinez, D. I.; Chaudhuri, A. R.; Gonzalez, E. E. *GC-MS analysis of volatile chemical constituents in arandano, matarique, hierba de san roberto, and tronadora used in mexican folk medicine for the treatment of type 2 diabetes.* Abstracts of Papers, 239th ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, **2010**.
- Tsai, M. D.; Cheng, Y. S. *J. Chin. Chem. Soc.* **1974**, 21, 149.

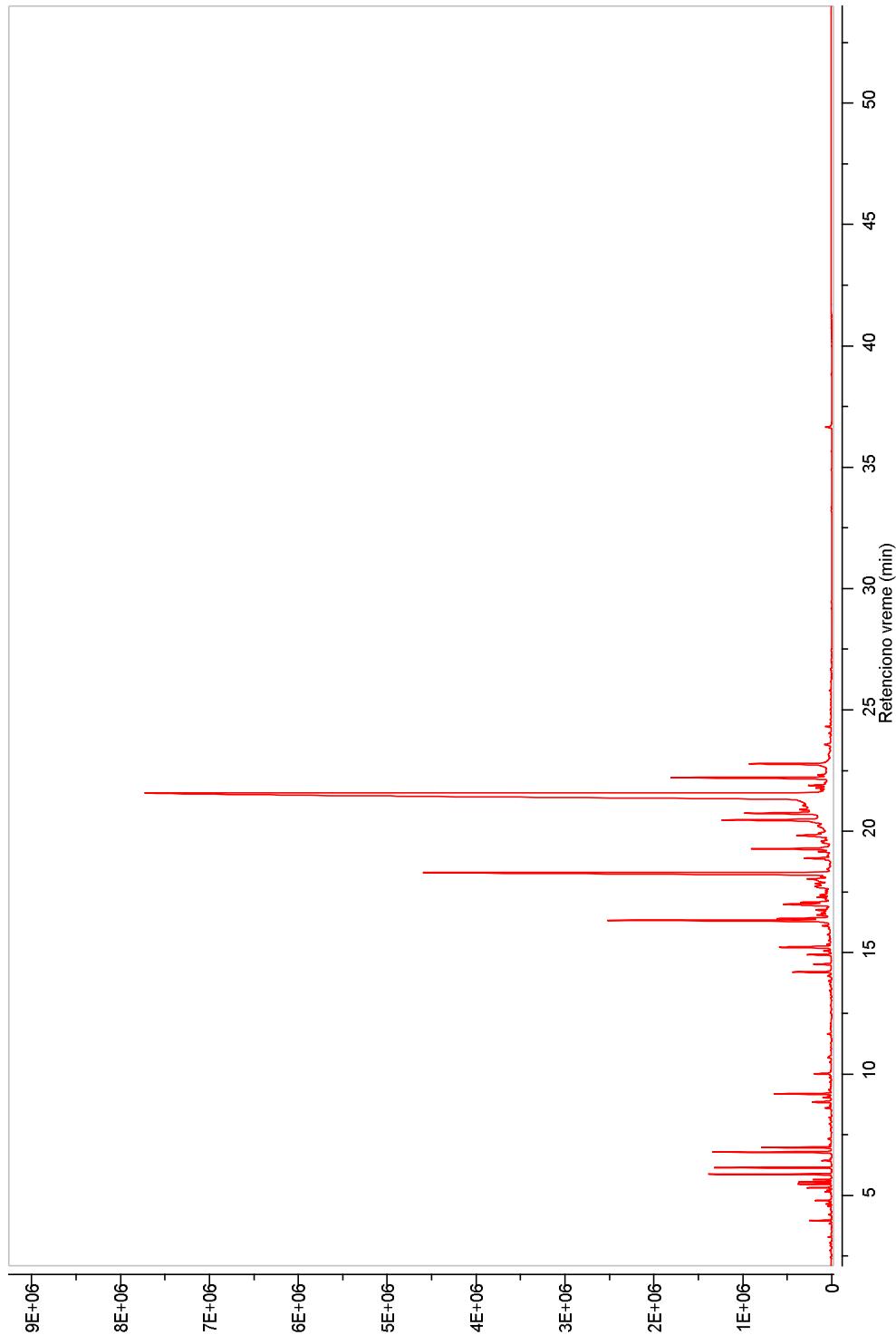
- Tsai, Y. C.; Hsu, H. C.; Yang, W. C.; Tsai, W. J.; Chen, C. C.; Watanabe, T. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 7.
- Tsankova, E.; Ognyanov, I. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk* **1972**, *25*, 1229.
- Tsankova, E.; Ognyanov, I. *Izvestiya po Khimiya* **1977**, *10*, 593.
- Tsankova, E.; Ognyanov, I. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *42*, 3833.
- Tsao, R.; Reuber, M.; Johnson, L.; Coats, J. R. *J. Agric. Entomol.* **1996**, *13*, 109.
- Tsevegsuren, N.; Aitzetmuller, K.; Vosmann, K. *Lipids* **2004**, *39*, 571.
- Tsogoeva, S. B.; Yalalov, D. A.; Hateley, M. J.; Weckbecker, C.; Huthmacher, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4995.
- Tsukinoki, T.; Mitoma, Y.; Nagashima, S.; Kawaji, T.; Hashimoto, I.; Tashiro, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 887.
- Tucakov, J. *Phytotherapy*, Rad, Belgrade, **1990**.
- Turova, A. D. *Farmakol. Toksikol. Moscow* **1964**, *27*, 561.
- Uda, Y.; Matsuoka, H.; Kumagami, H.; Shima, H.; Maeda, Y. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **1993**, *40*, 743.
- Ul-Hassan, F.; Manaf, A.; Qadir, G.; Basra, S. M. A. *Int. J. Agric. Bot.* **2007**, *9*, 504.
- Umarova, R. U.; Maslennikova, V. A.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prir. Soedin.* **1977**, *6*, 821.
- Underhill, E. W. In: Bell, E. A.; Charlwood, B. V. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer, Berlin, **1980**, p. 493.
- Underhill, E. W.; Chisholm, M. D.; Wetter, L. R. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1962**, *40*, 1505.
- Underhill, E. W.; Kirkland, D. F. *Phytochemistry* **1972b**, *11*, 2085.
- Underhill, E. W.; Wetter, L. R.; Chisholm, M. D. *Biochem. Soc. Symp.* **1973**, *38*, 303.
- Usher, G. *A dictionary of plants used by man*, Constable, London, **1974**.
- Van den Dool, H.; Kratz, P. D. *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463.
- van der Kerk, G. J. M.; Pluygers, C. W.; de Vries, G. *Org. Synth.* **1973**, Coll. Vol. 5, 223.
- Van Doorn, H. E.; van Holst, G.J.; van der Kruk, G. C.; Raaijmakers-Ruijs, N. C. M. E.; Postmae, E. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 793.
- van Rooyen, P. H.; Boeyens, J. C. A. *Acta Cryst.* **1975**, *B31*, 2933.
- Vaughn, S. F. In *Principles and Practices in Plant Allelochemical Interactions*, Cutler, H. G.; Cutler, S. J. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, **1999**, p. 81.
- Vaughn, S. F.; Berhow, M. A. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21*, 193.
- Vegh, D.; Kovac, J. Czechoslovakia Patent 203651, **1981**.
- Venskutonis, P. R.; Dedonyte, V.; Lazutka, J.; Slapsyte, G.; Maroziene, A.; Nemeikaite-Ceniene, A.; Cenas, N.; Miliauskas, G. *Acta Biochim. Pol.* **2010**, *57*, 157.
- Verhoeven, D. T.; Goldbohm, R. A.; van Poppel, G.; Verhagen, H.; van den Brandt, P.A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 733.
- Verkerk, R.; Dekker, M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7318.

- Verkerk, R.; Schreiner, M.; Krumbein, A.; Ciska, E.; Holst, B.; Rowland, I.; De Schrijver, R.; Hansen, M.; Gerhäuser, C.; Mithen, R.; Dekker, M. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S219.
- Vermorel, M.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *44*, 321.
- Viaud, M. C.; Rollin, P. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1417.
- Viaud, M. C.; Rollin, P.; Latxague, L.; Gardrat, C. *J. Chem. Res.* **1992**, 1669.
- Vig, A. P.; Rampal, G.; Thind, T. S; Arora, S. *LWT–Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1561.
- Vioque, J.; Pastor, J. E.; Alaiz, M.; Vioque, J. *Bot. J. Linn. Soc.* **1994**, *116*, 343.
- Virtanen, A.I. *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 374.
- Vukićević, R. D.; Damljanović, I.; Vukićević, M. *Monatsh. Chem.* **2006**, *137*, 301.
- Wagner, H.; Horhammer, L.; Nufer, H. *Arzneimittel-Forsch.* **1965**, *15*, 453.
- Wallig, M. A.; Kingston, S.; Staack, R.; Jeferey, E. H. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 365.
- Warwick, S. I.; Francis, A.; Al-Shehbaz, I. A. *Plant Syst. Evol.* **2006**, *259*, 249.
- Watanabe, N.; Okano, M.; Uemura, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1974**, *47*, 2745.
- Wathelet, J. P.; Iori, R.; Leoni, O.; Rollin, P.; Quinsac, A.; Palmieri, S. *Agroindustria* **2004**, *3*, 257.
- Wathelet, J. P.; Mabon N.; Marlier, M. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia **1999**, p 185.
- Wattenberg, L. W.; Hanley, A. B.; Garany, G.; Sparnins, V. L.; Lam, L. K. T.; Fenwick, G. R. In: Hayashi, Y., et al. (Eds.), *Diet, Nutrition & Cancer*, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, **1986**, p. 193.
- Webster, B.; Chesney, A. M. *Am. J. Pathol.* **1930**, *6*, 275.
- Werner, E. A. Action of acetic anhydride on substituted thiocarbamides, and on an improved method for preparing aromatic thiocarbimides. *J. Chem. Soc. Trans.* **1891**, *59*, 396.
- Wetter, L. R.; Youngs, C. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1976**, *53*, 162.
- Wetter, L.R.; Dyke, J. *Can. J. Anim. Sci.* **1973**, *53*, 625.
- White, E. H.; Li, M.; Lu, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1252.
- Wiley, P. F.; Mizošak, S. A.; Baczyński, L.; Argoudelis, A. D.; Duchamp, D. J.; Watt, W. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2493.
- Wilkinson, A. P.; Rhodes, M. J. C.; Fenwick, G. R. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 543.
- Williams, D. J.; Critchley, C.; Pun, S.; Chaliha M.; O'Hare, T. J. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1401.
- Witczak, Z. *J. Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 165.
- Wittstock, U.; Halkier, B. A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14 659.
- Wong, R.; Dolman S. *J. J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3969.
- Worrall, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, *50*, 1456.
- Xue, J. P.; Lenman, M.; Falk, A.; Rask, L. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 387.

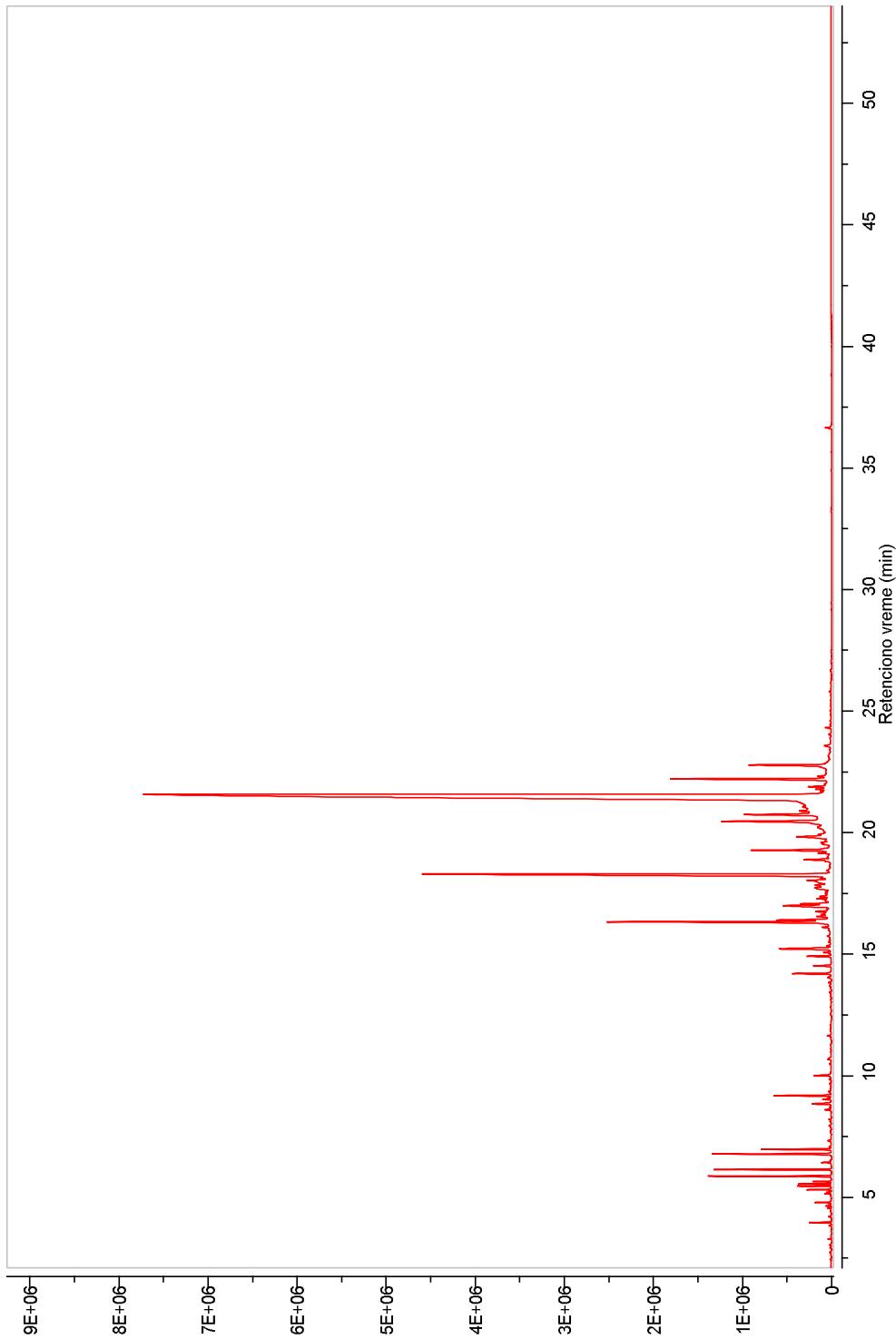
- Yan, J.; Chen, G.; Tong, S.; Feng, Y.; Sheng, L.; Lou, J. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1070*, 207.
- Yang, F. Q.; Li, S. P.; Zhao, J.; Lao, S. C.; Wang, Y. T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 73.
- Yang, X.; Deinzer, M. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 514.
- Yff, B. T. S.; Lindsey, K. L.; Taylor, M. B.; Erasmus, D. G.; Jager, A. K. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 101.
- Yong-Gang, L.; Steg, A.; Hindle, V. A. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1993**, *41*, 133.
- Yuenyongsawad, S.; Tewtrakul, S. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2005**, *27*, 497.
- Zehl, A.; Cech, D. *Liebigs Ann.* **1997**, *1997*, 595.
- Zhang, Y.; Cho, C.G.; Posner, G.H.; Talalay, P. *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 100.
- Zhang, Y.; Kensler, T. W.; Cho, C. G.; Posner, G. H.; Talalay, P. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3147.
- Zhang, Y.; Talalay, P. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1976s.
- Zhang, Y.; Talalay, P. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4632.
- Zhang, Y.; Wade, K. L.; Prestera, T.; Talalay, P. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 160.
- Zielinska-Jenczylik, J.; Sypula, A.; Budko, E.; Rzadkowska-Bodalska, H. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **1987**, *35*, 211.
- Živanović, P.; Pavlović, S. *Sistematika lekovitih biljaka*, Službeni list SRJ, Beograd, **1999**, p. 105.
- Zsolnai, T. *Arzneimittel-Forschung* **1966**, *16*, 870.
- Zukalova, H.; Vasak, J. *Rostlinna Vyrobay* **2002**, *48*, 175.
- <http://www.succulent-plant.com/families/geraniaceae.html>

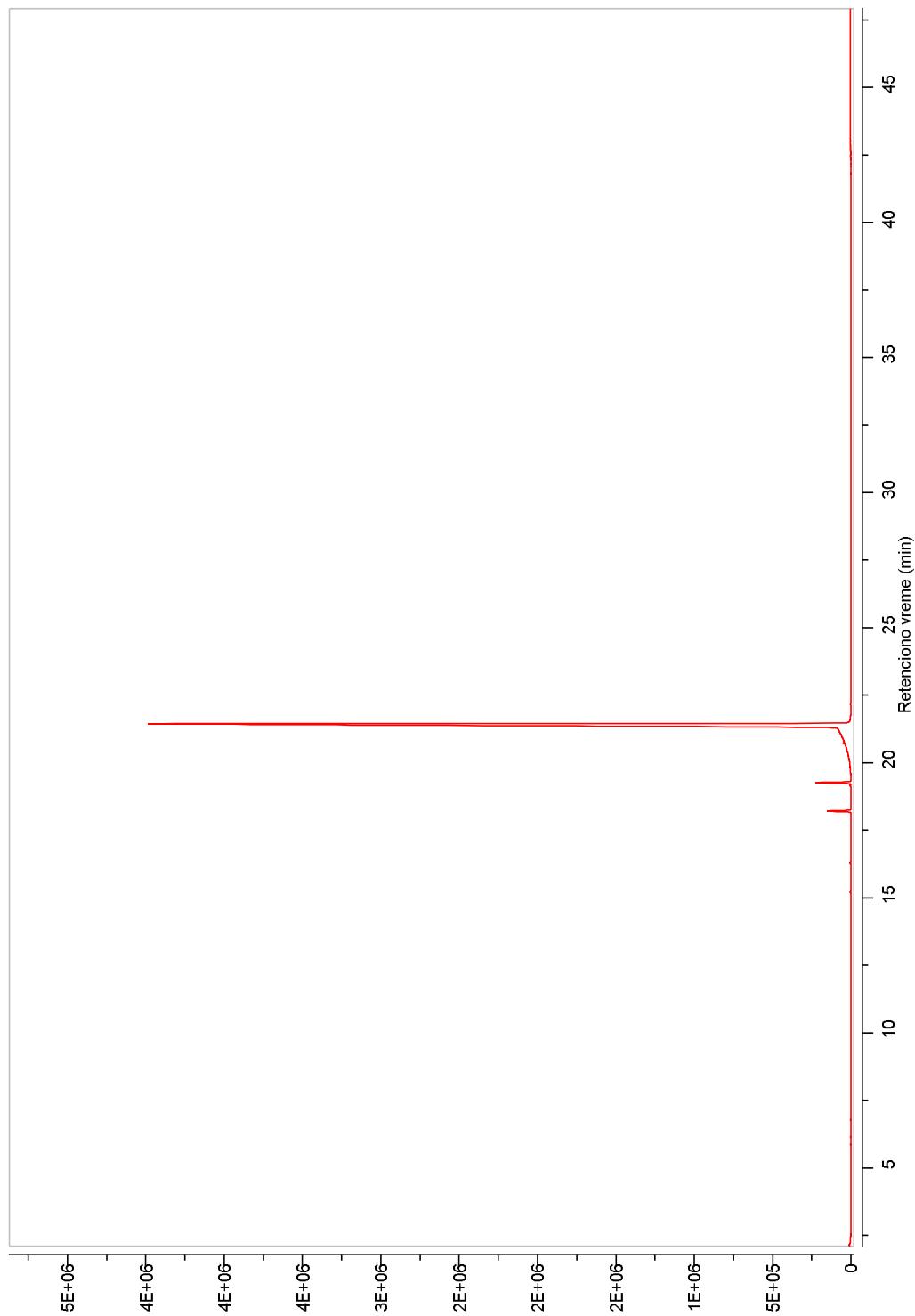
P R I L O G

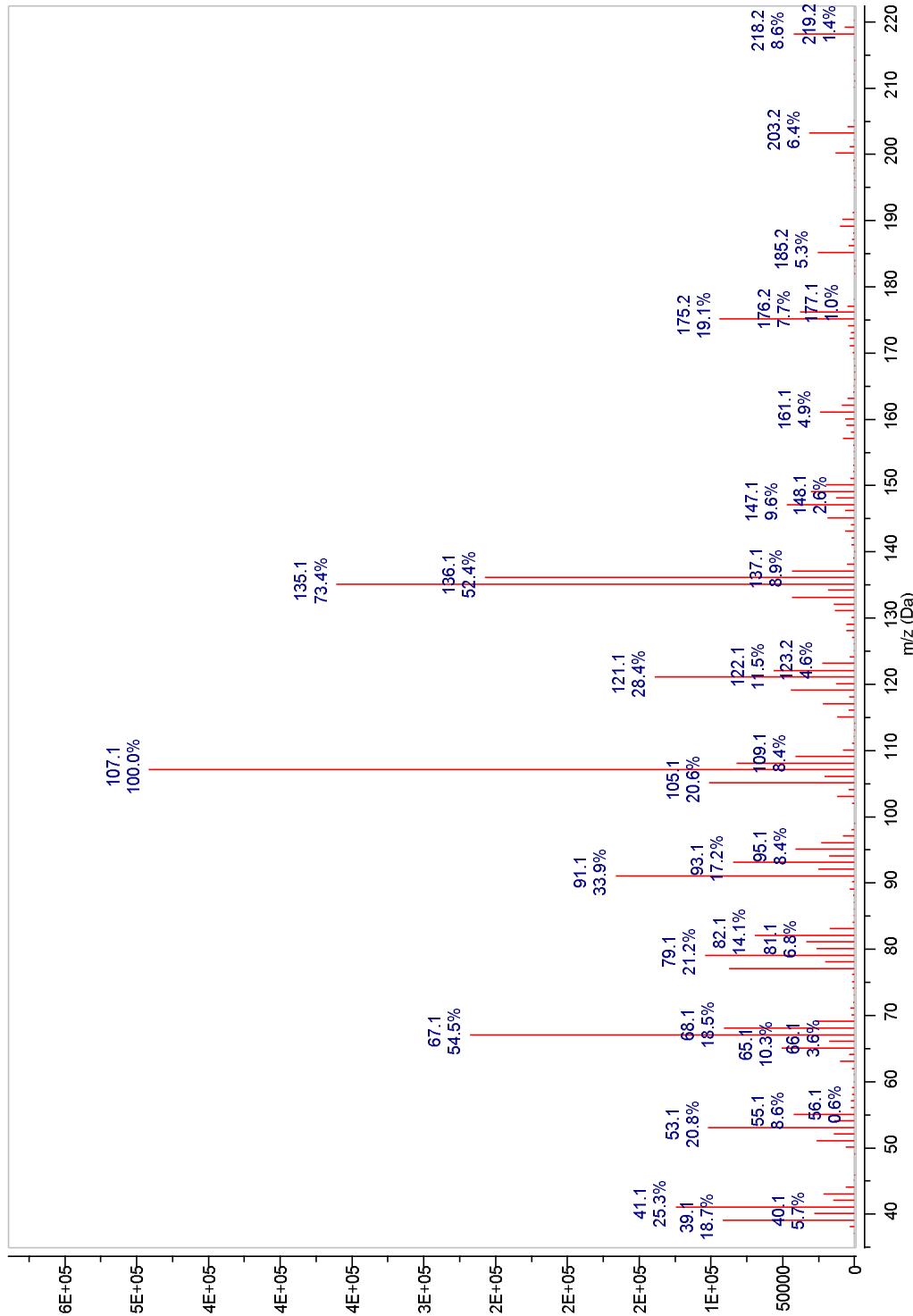
**9.1. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. macrorrhizum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom *germ-n*)**

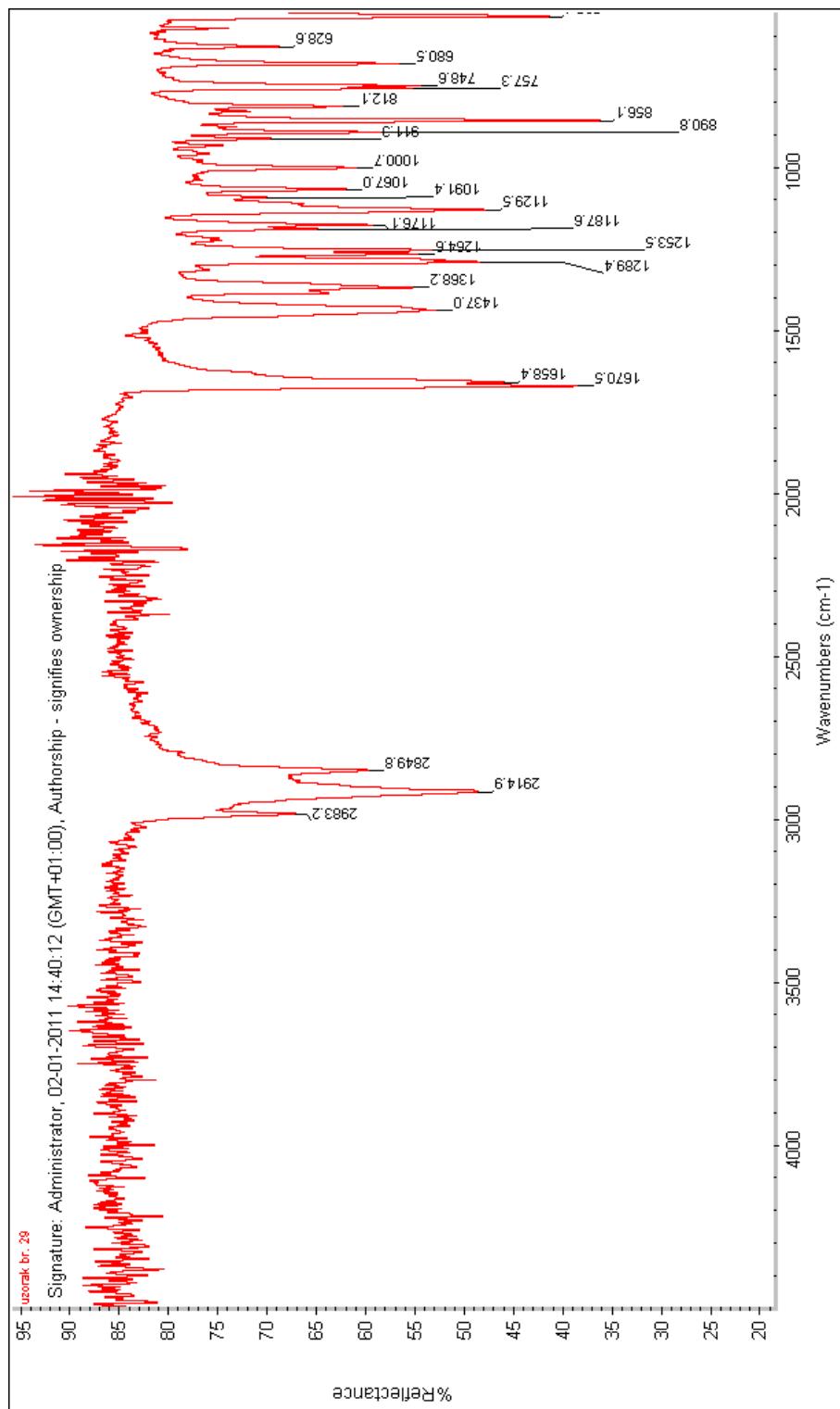


**9.2. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. macrorrhizum*
(uzorci rizoma sa oznakom *germ-r*)**

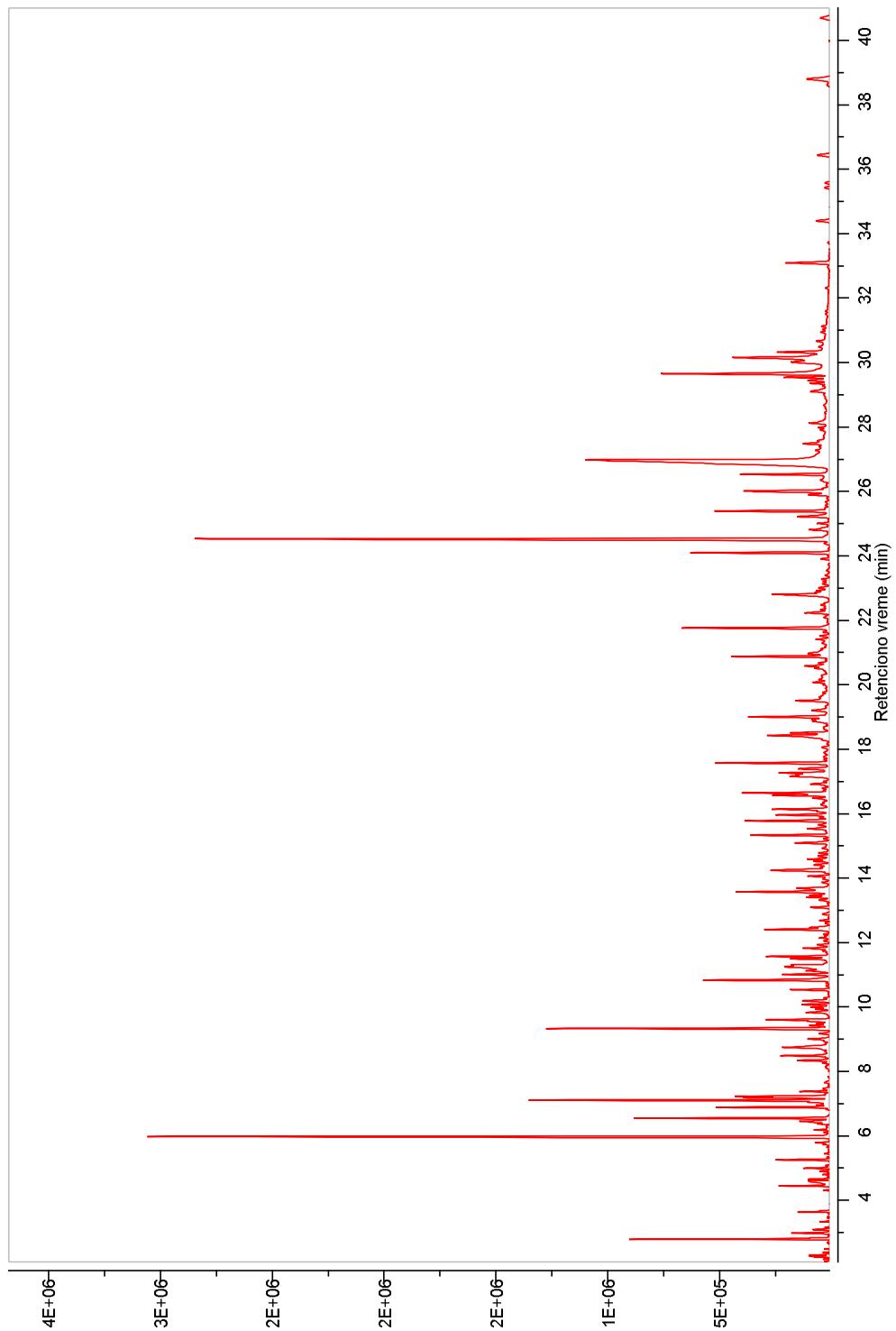


9.3. TIC Hromatogram izolovanog germakrona (194)

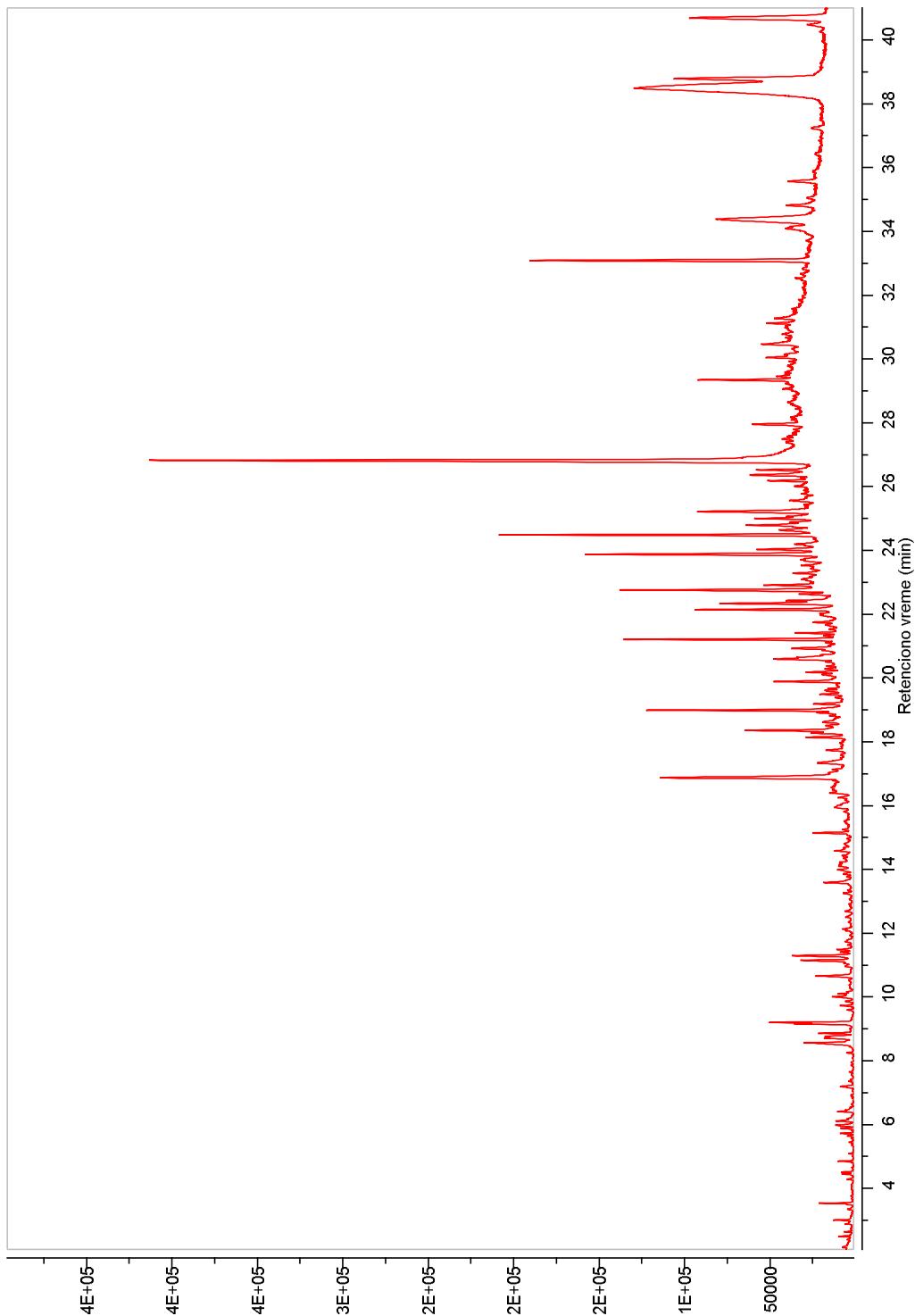
9.4. MS spektar germakrona (194)

9.5. IR spektar germakrona (194)

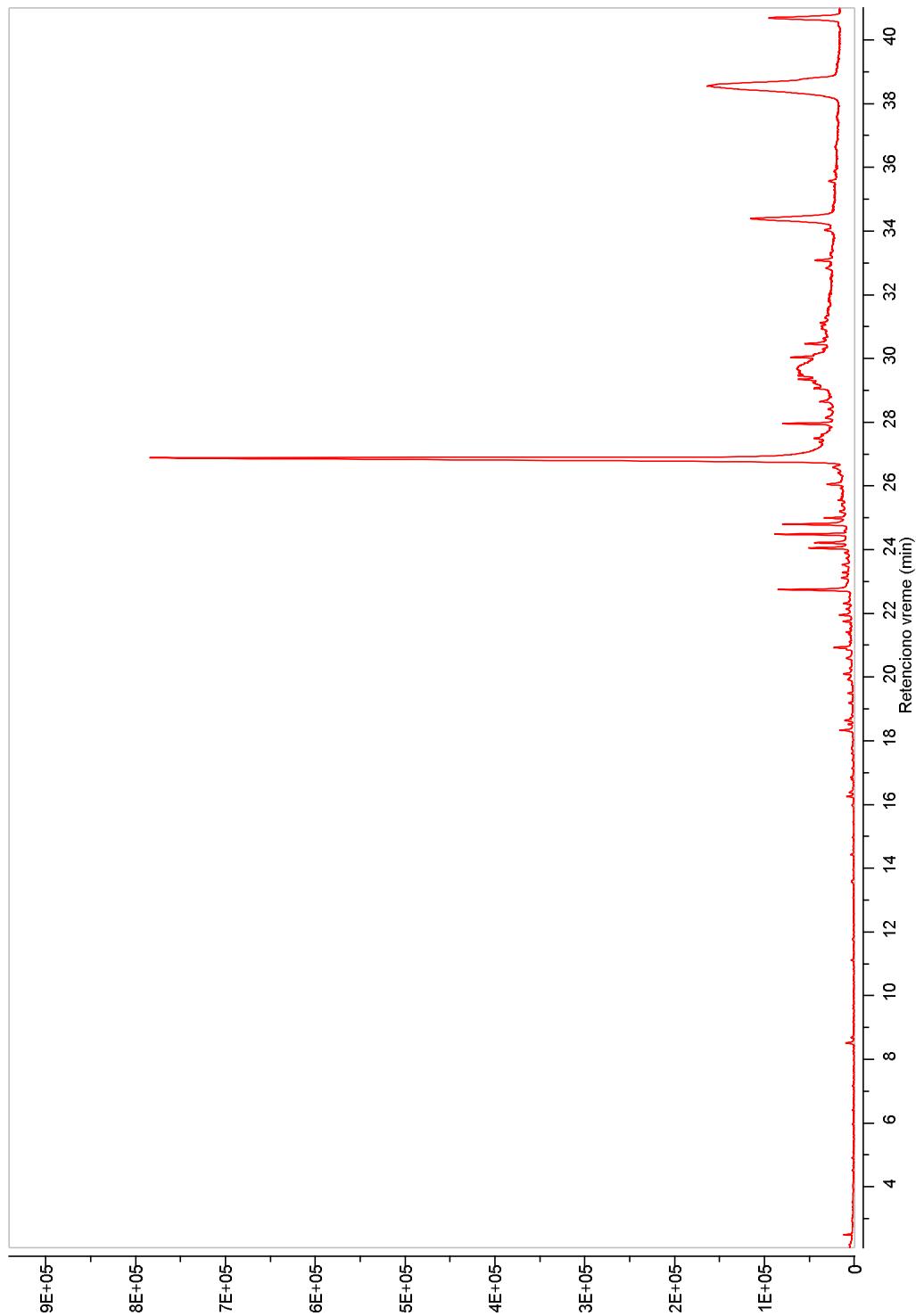
**9.6. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. sanguineum*
(uzorci cele biljke sa oznakom *gers-c*)**



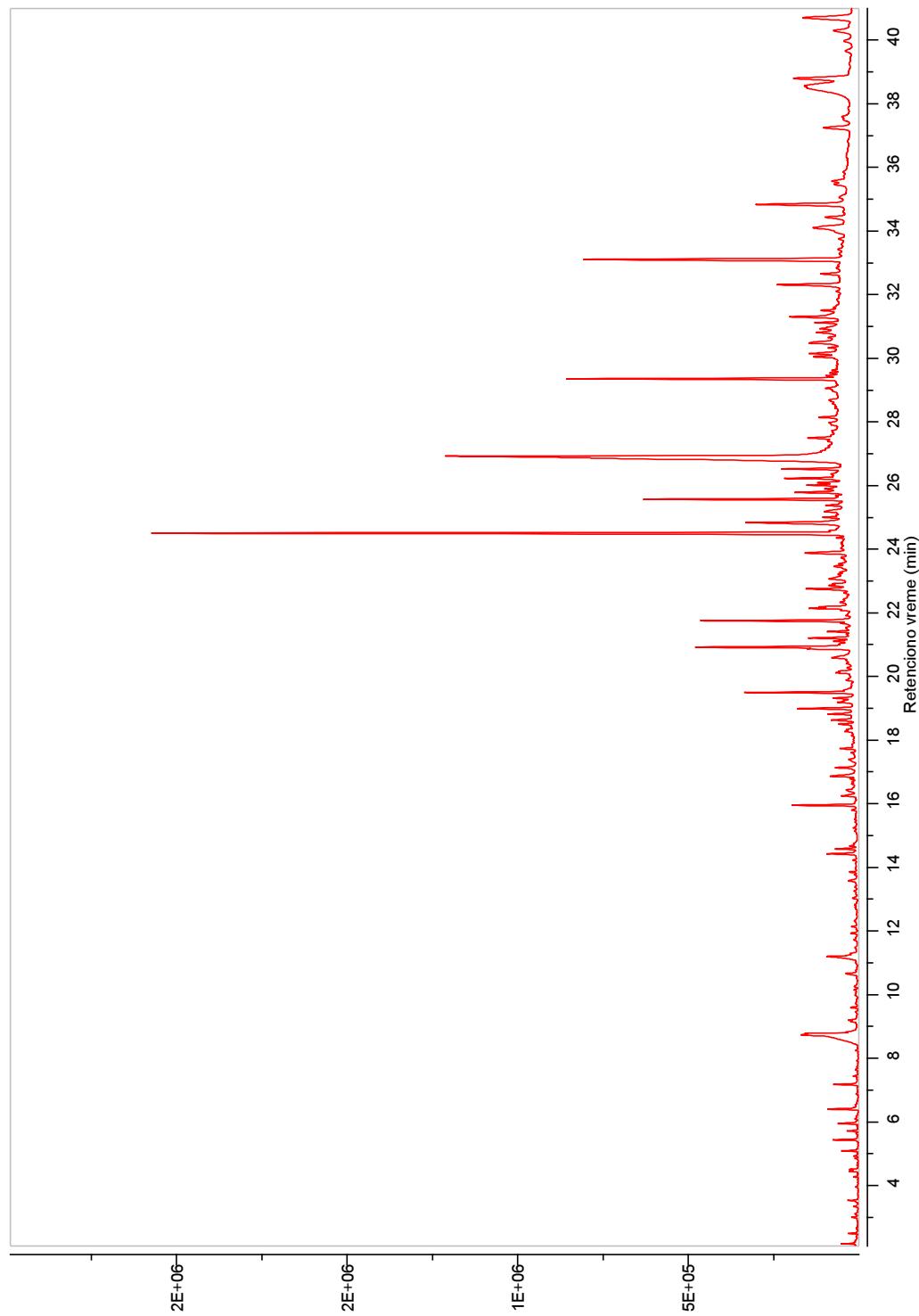
**9.7. TIC Hromatogram etarskog ulja nadzemnih delova vrste *G. robetianum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom *gerr-n*)**



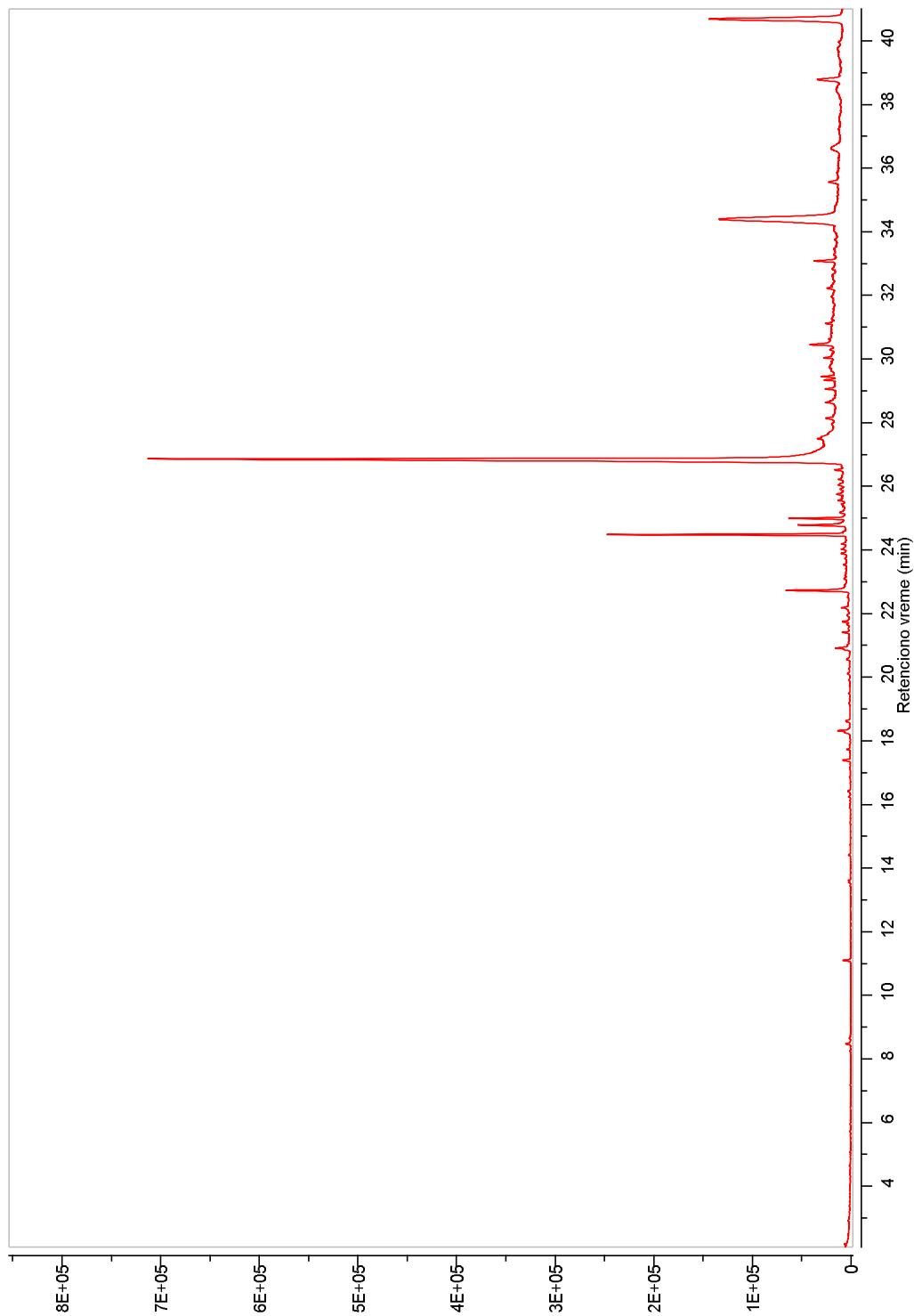
**9.8. TIC Hromatogram etarskog ulja korena vrste *G. robetianum*
(uzorci korena sa oznakom *gerr-k*)**



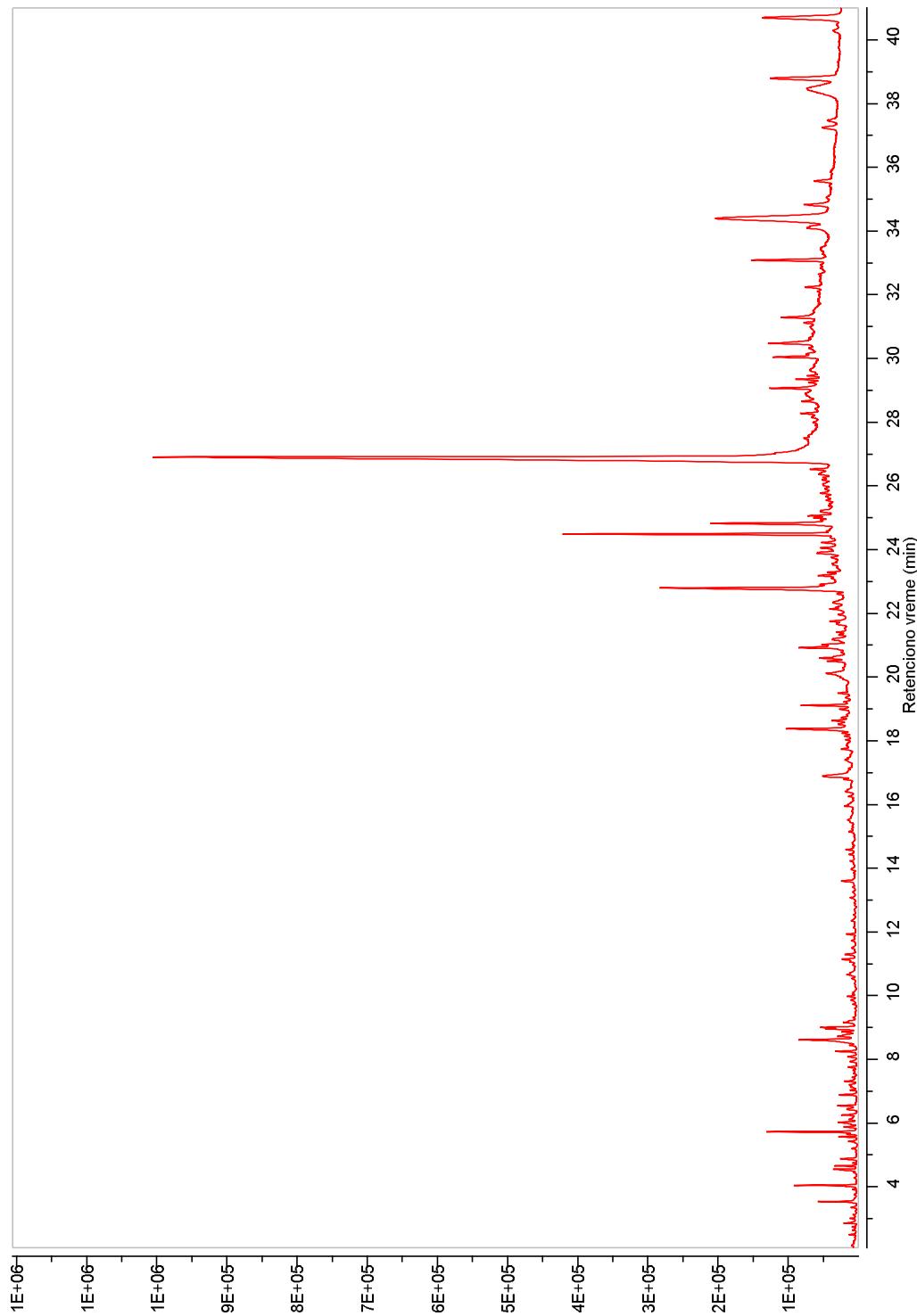
**9.9. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. columbinum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom gerc-n)**



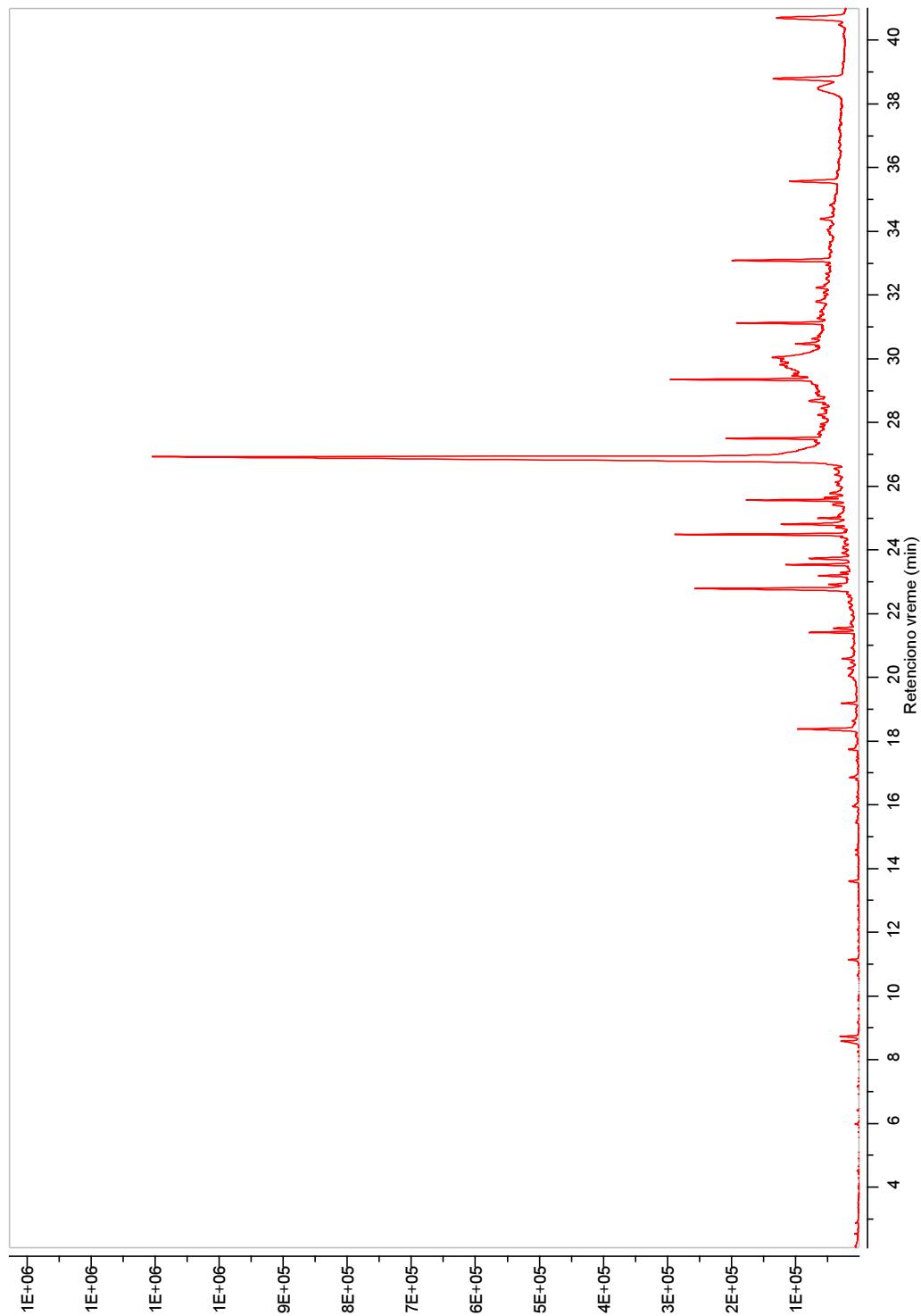
**9.10. TIC Hromatogram etarskog ulja korena vrste *G. columbinum*
(uzorci korena sa oznakom gerc-k)**



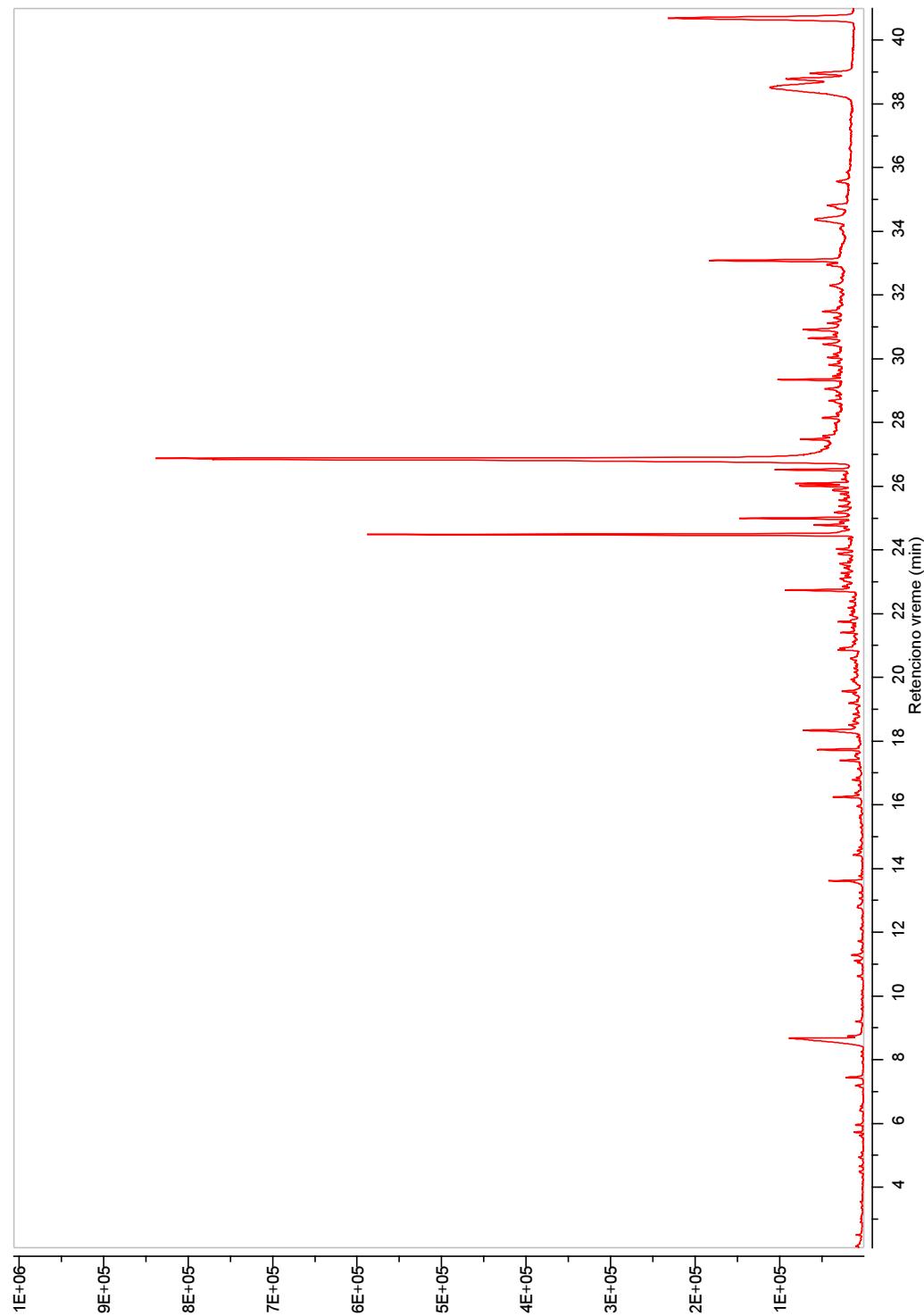
**9.11. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. lucidum*
(uzorci cele biljke sa oznakom *gerl-c*)**



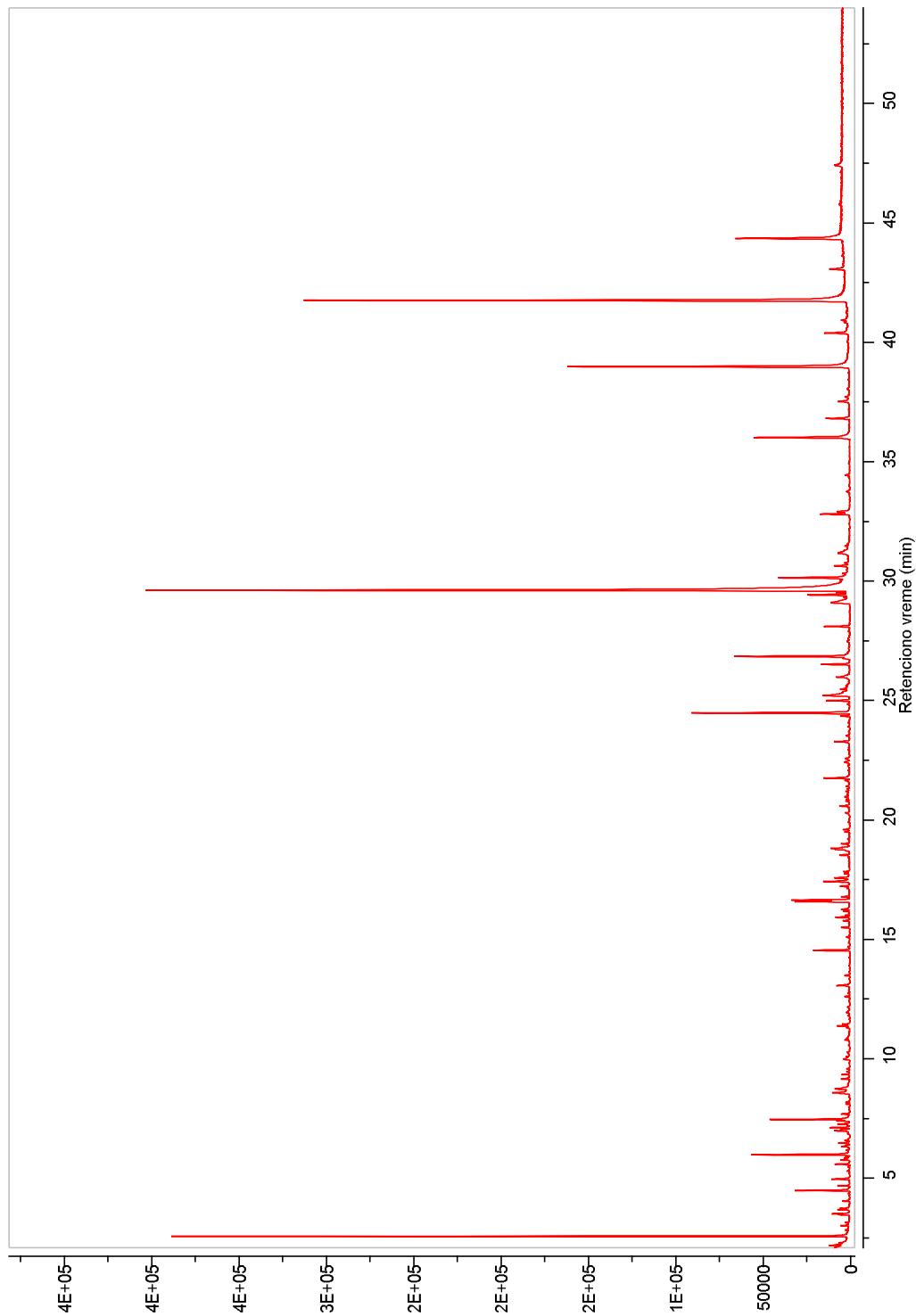
**9.12. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. purpureum*
(uzorci cele biljke sa oznakom *gerp-c*)**



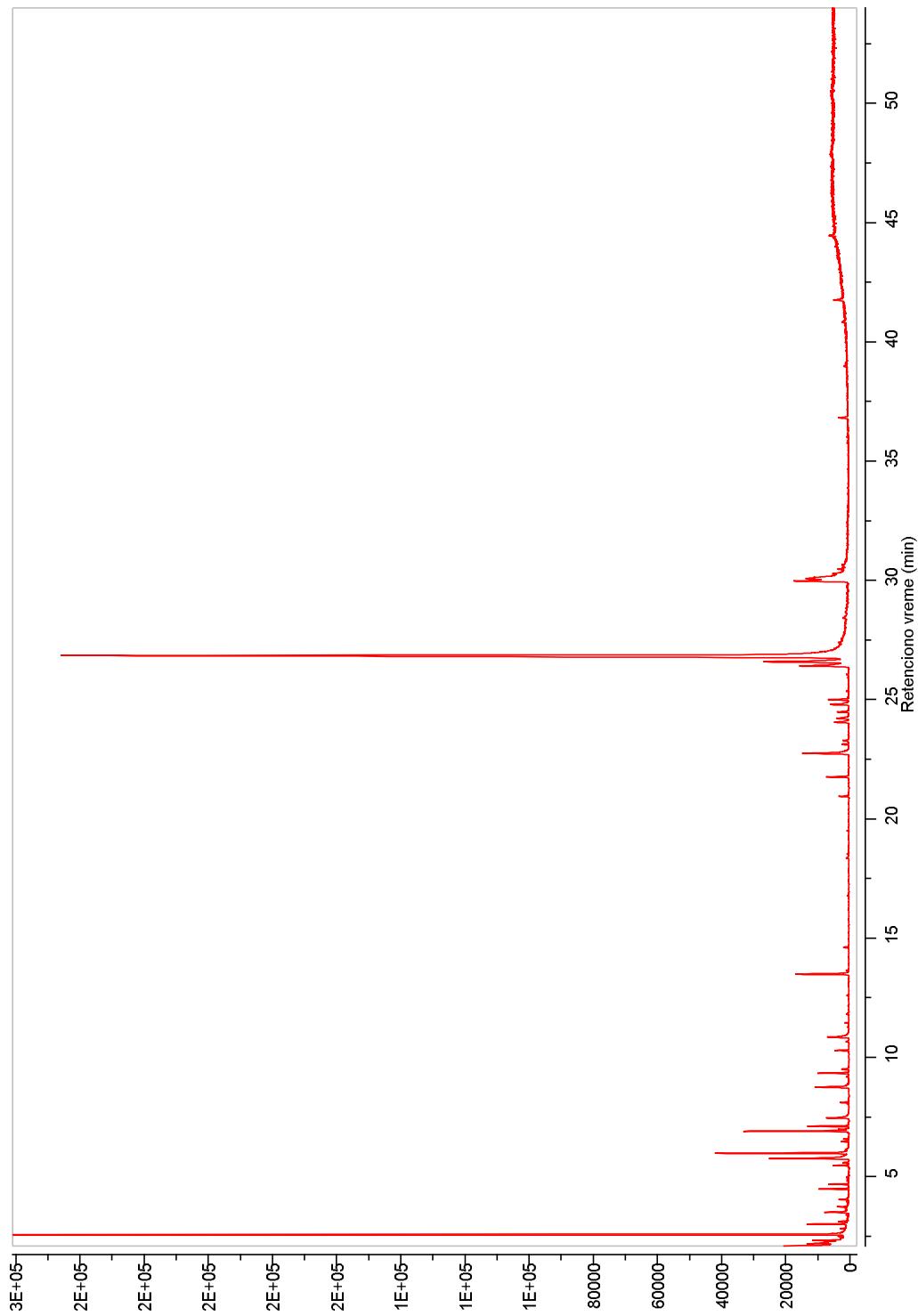
**9.13. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. phaeum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom gerph-n1)**



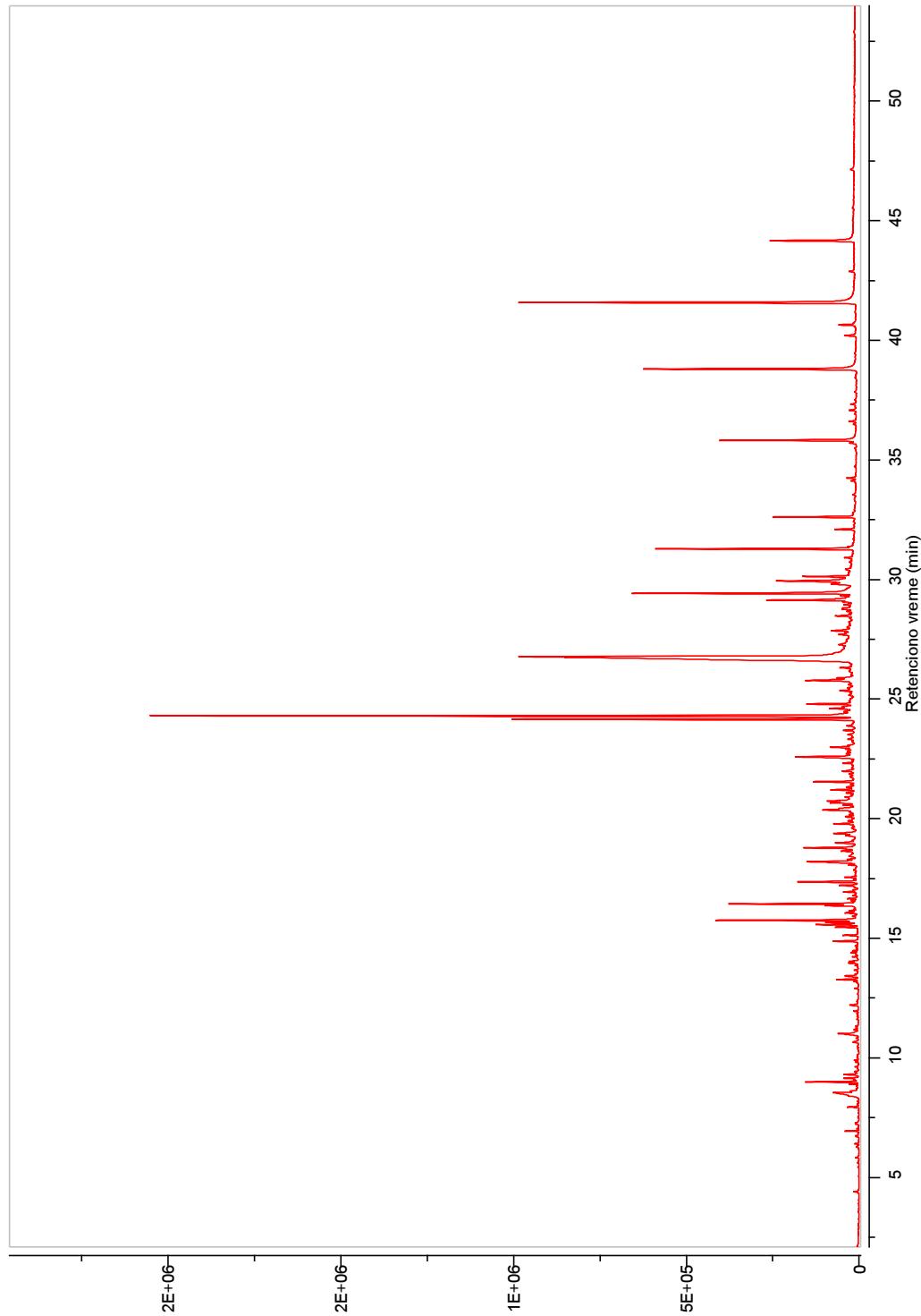
**9.14. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. phaeum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom gerph-n2)**



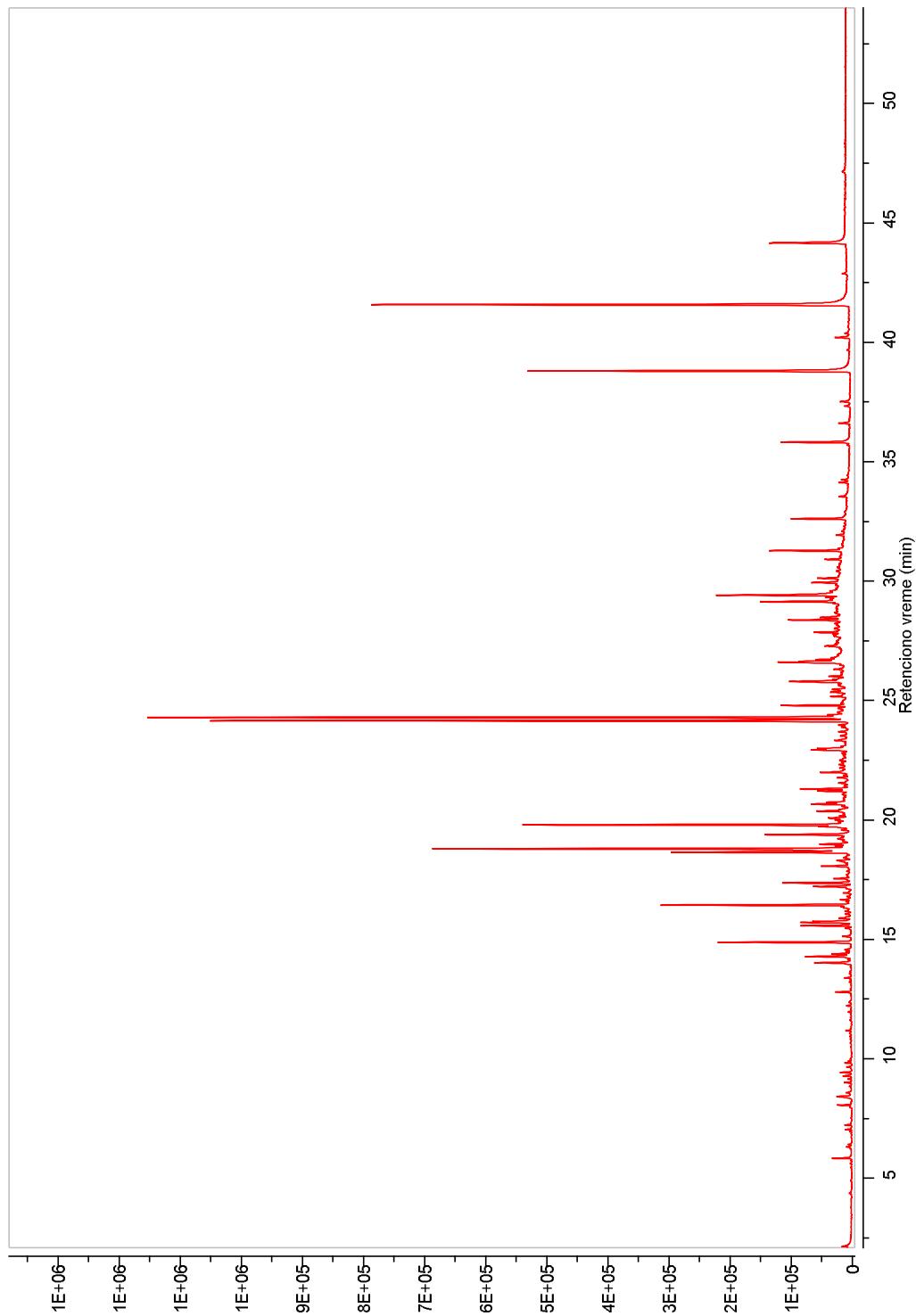
**9.15. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *G. phaeum*
(uzorci rizoma sa oznakom gerph-r2)**



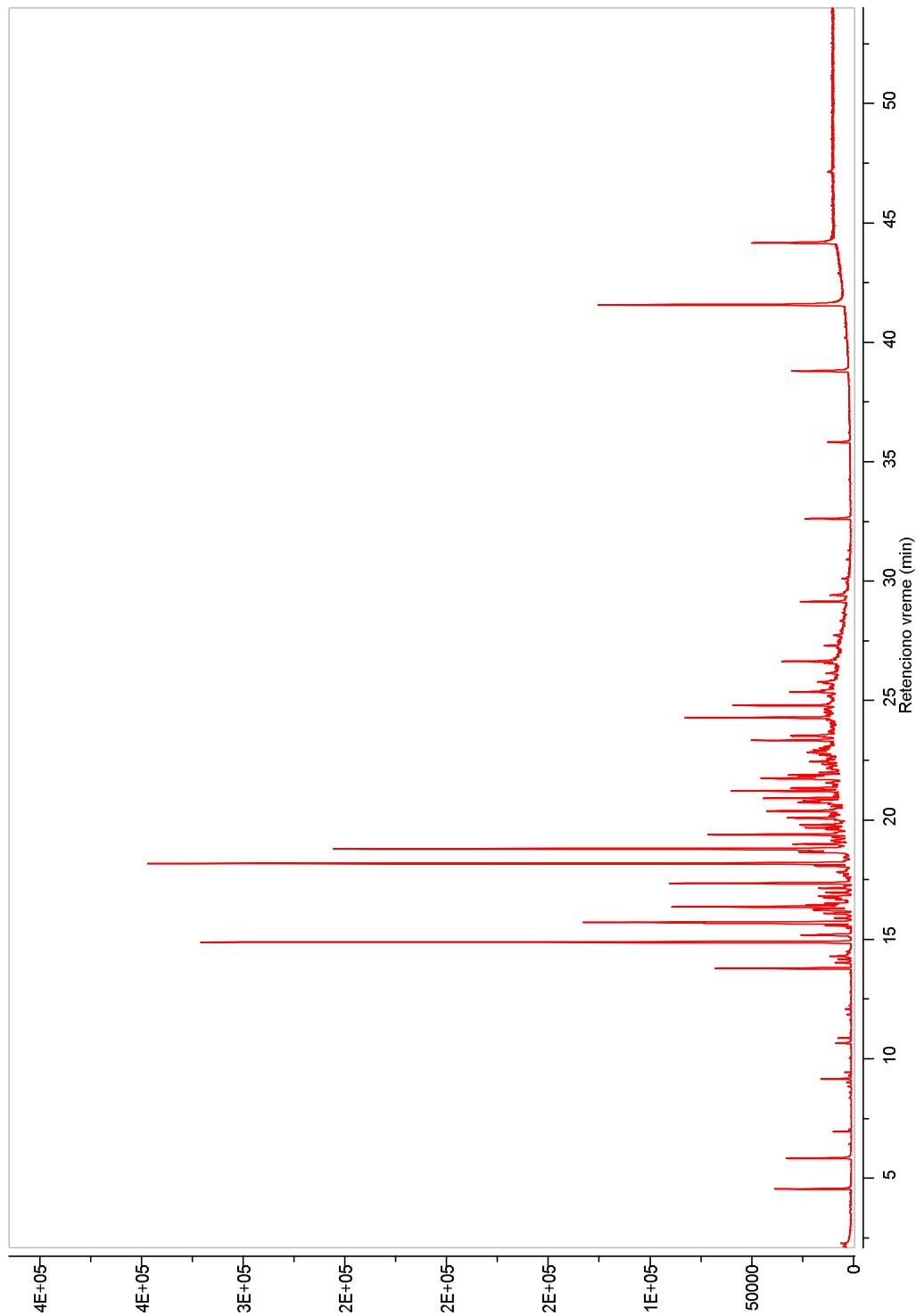
**9.16. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *E. cicutarium*
(uzorci celih biljaka sa oznakom eroct-c1)**



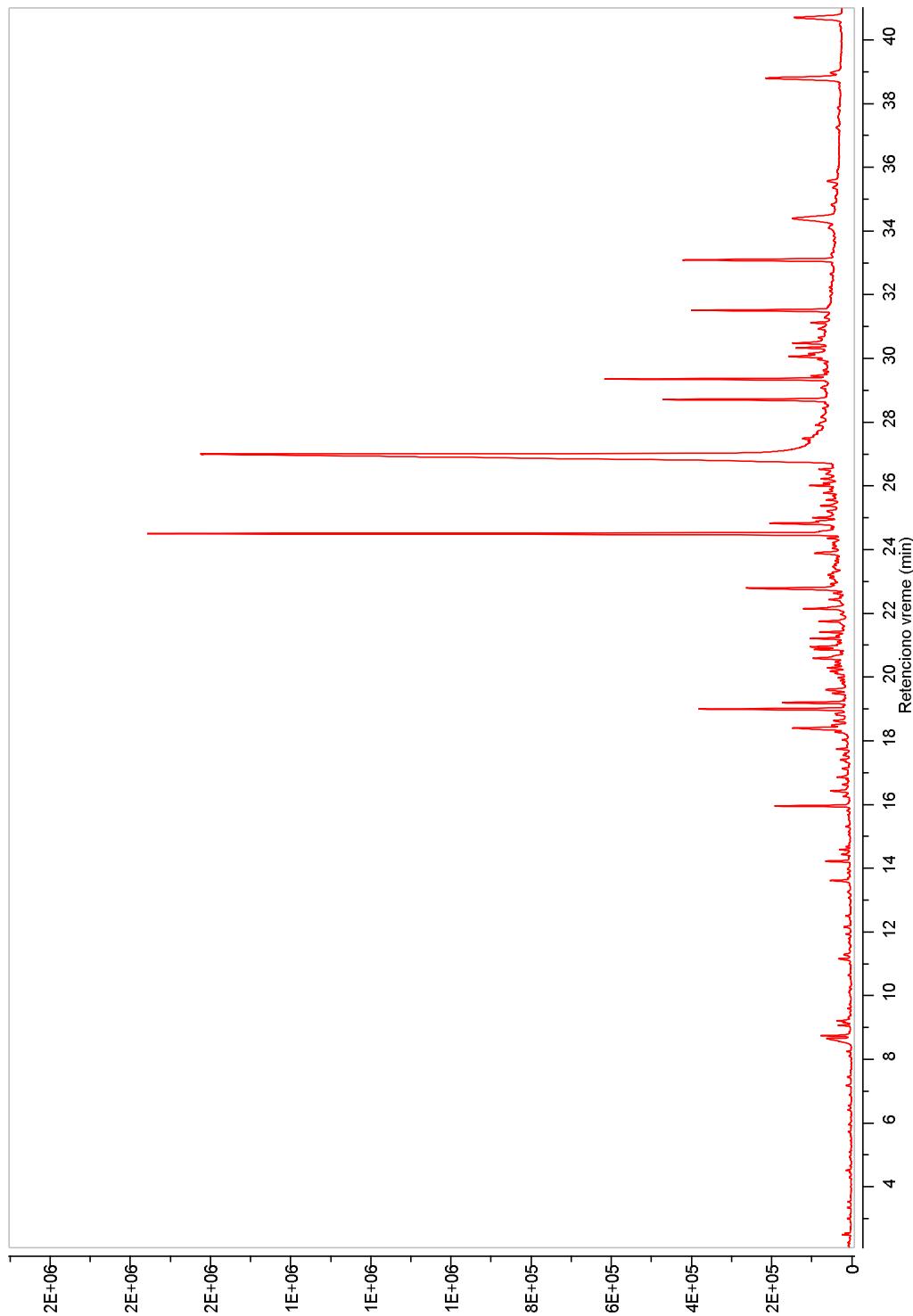
**9.17. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *E. ciconium*
(uzorci celih biljaka sa oznakom erocn-c)**



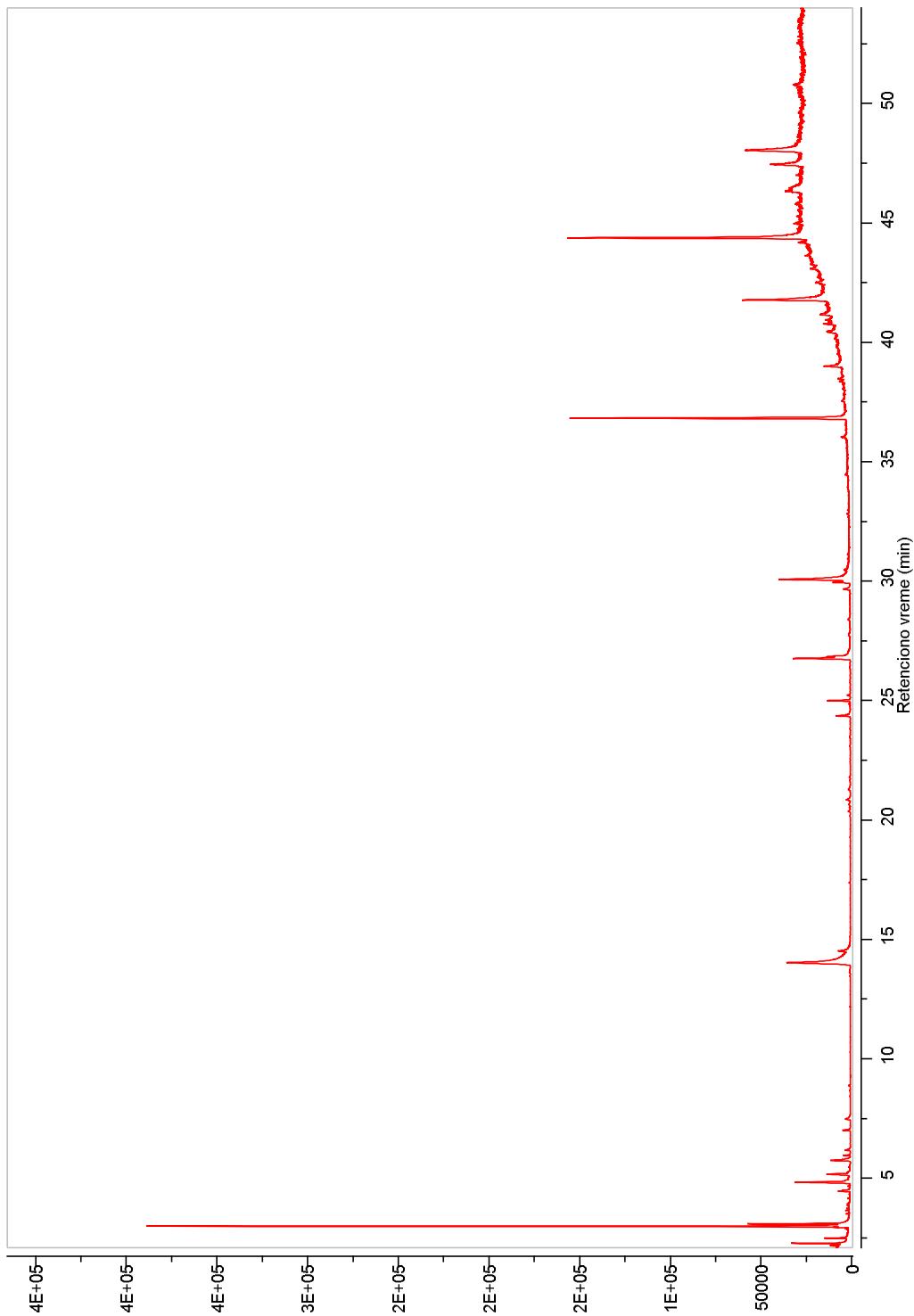
**9.18. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *E. absinthoides*
(uzorci celih biljaka sa oznakom eroab-c)**



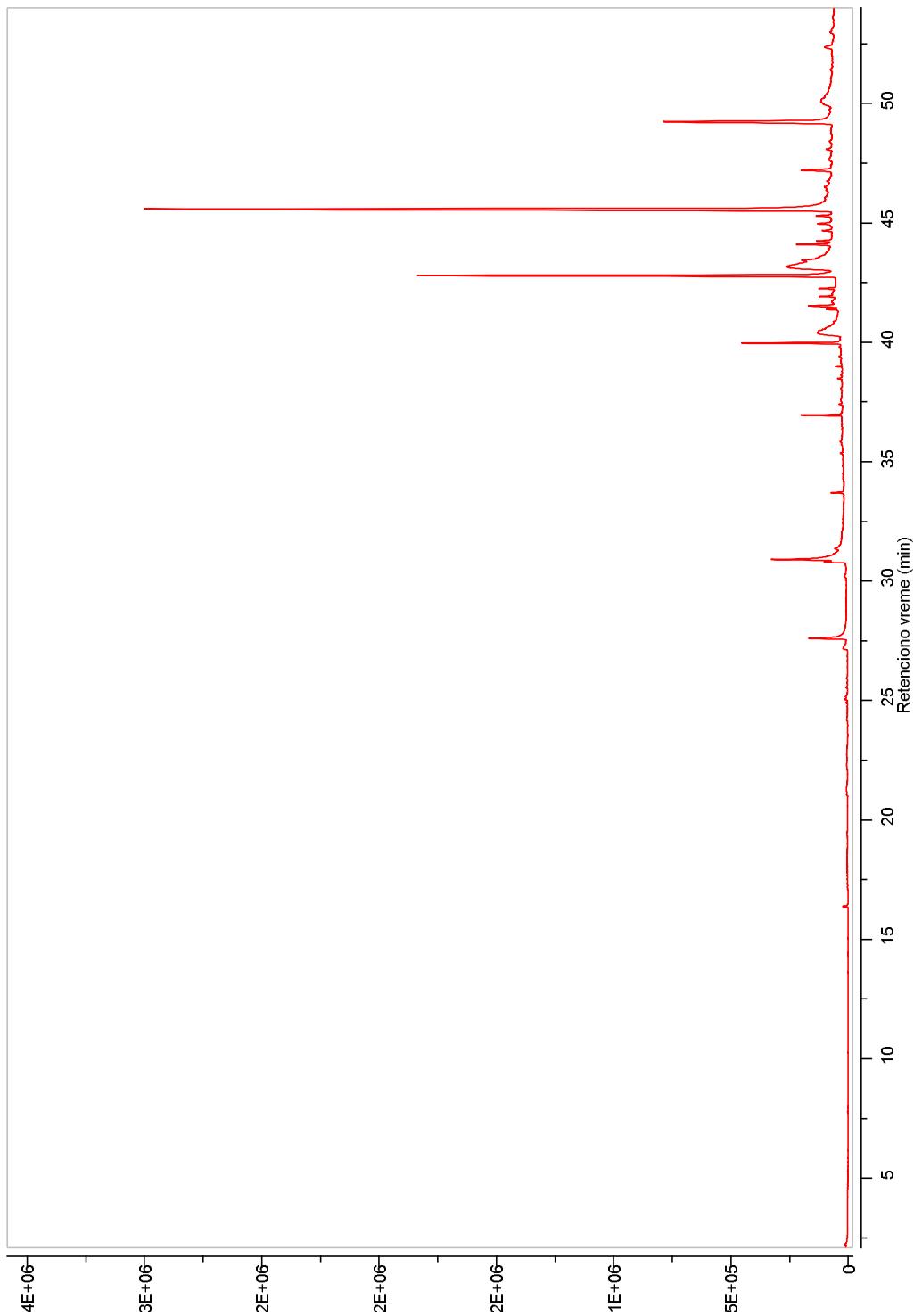
**9.19. TIC Hromatogram etarskog ulja vrste *E. cicutarium*
(uzorci celih biljaka sa oznakom eroct-c2)**



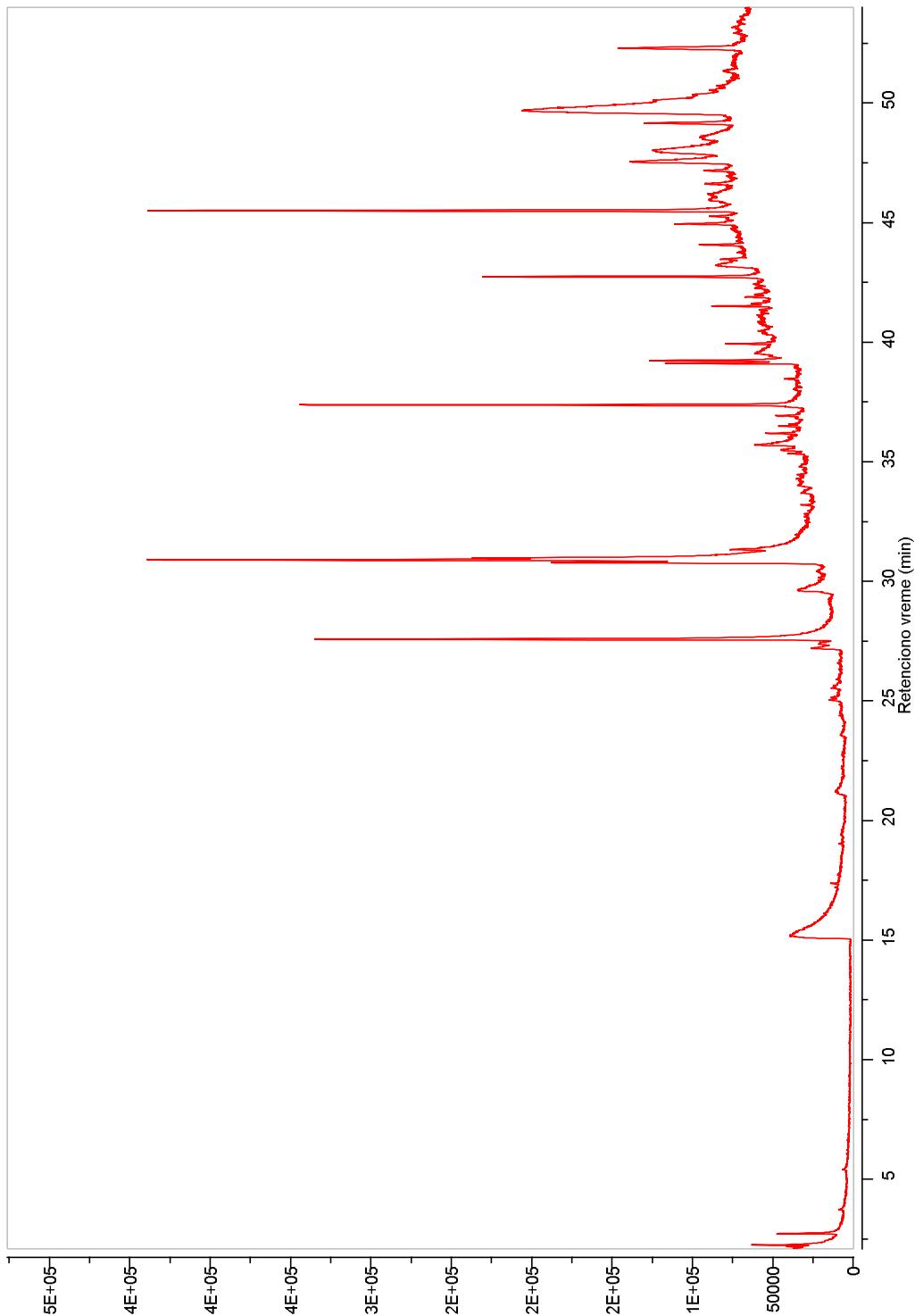
**9.20. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste *E. diffusum*
(uzorci celih biljaka sa oznakom eryd-c1)**

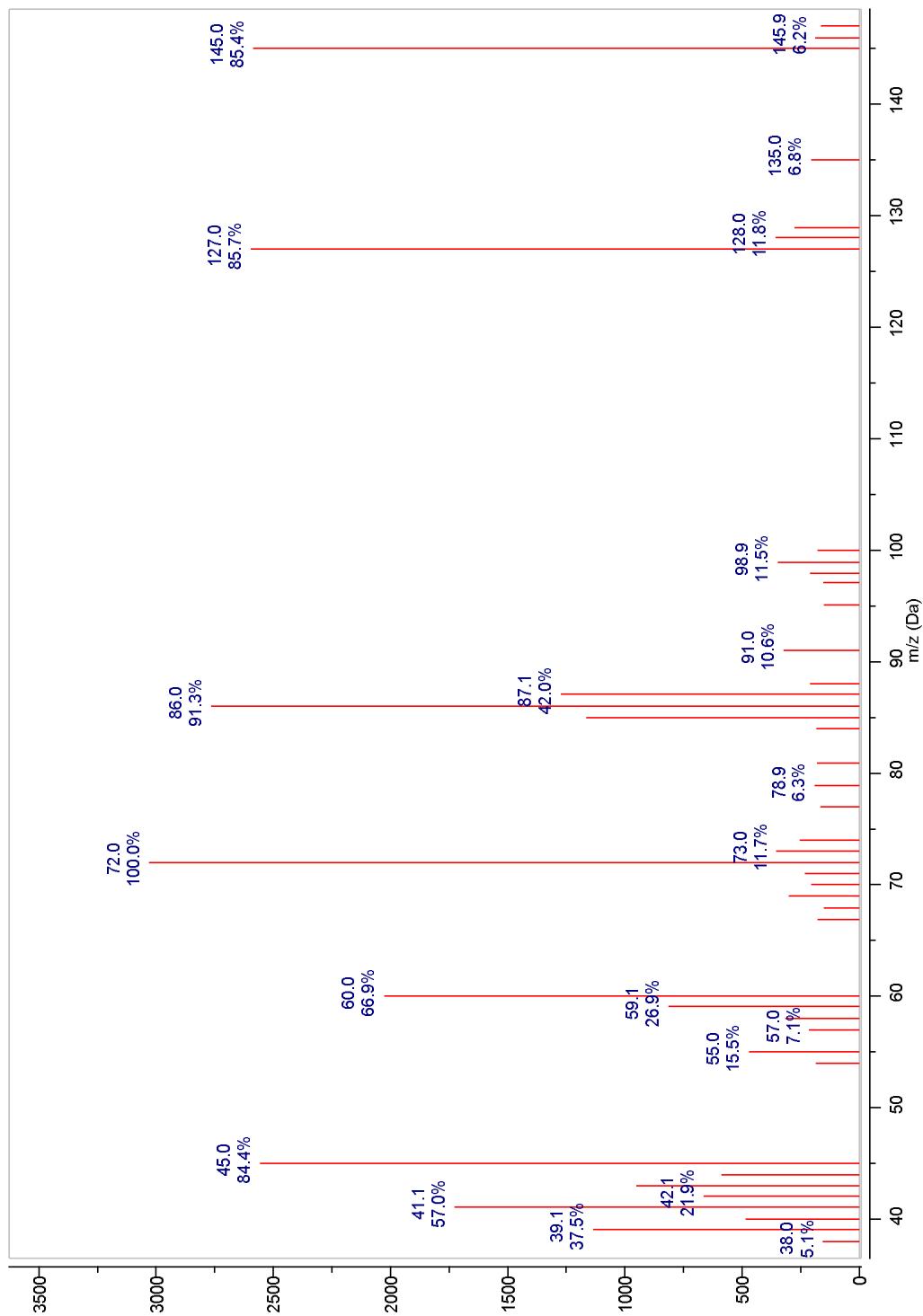


**9.21. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste *E. diffusum*
(uzorci nadzemnih delova sa oznakom eryd-n2)**

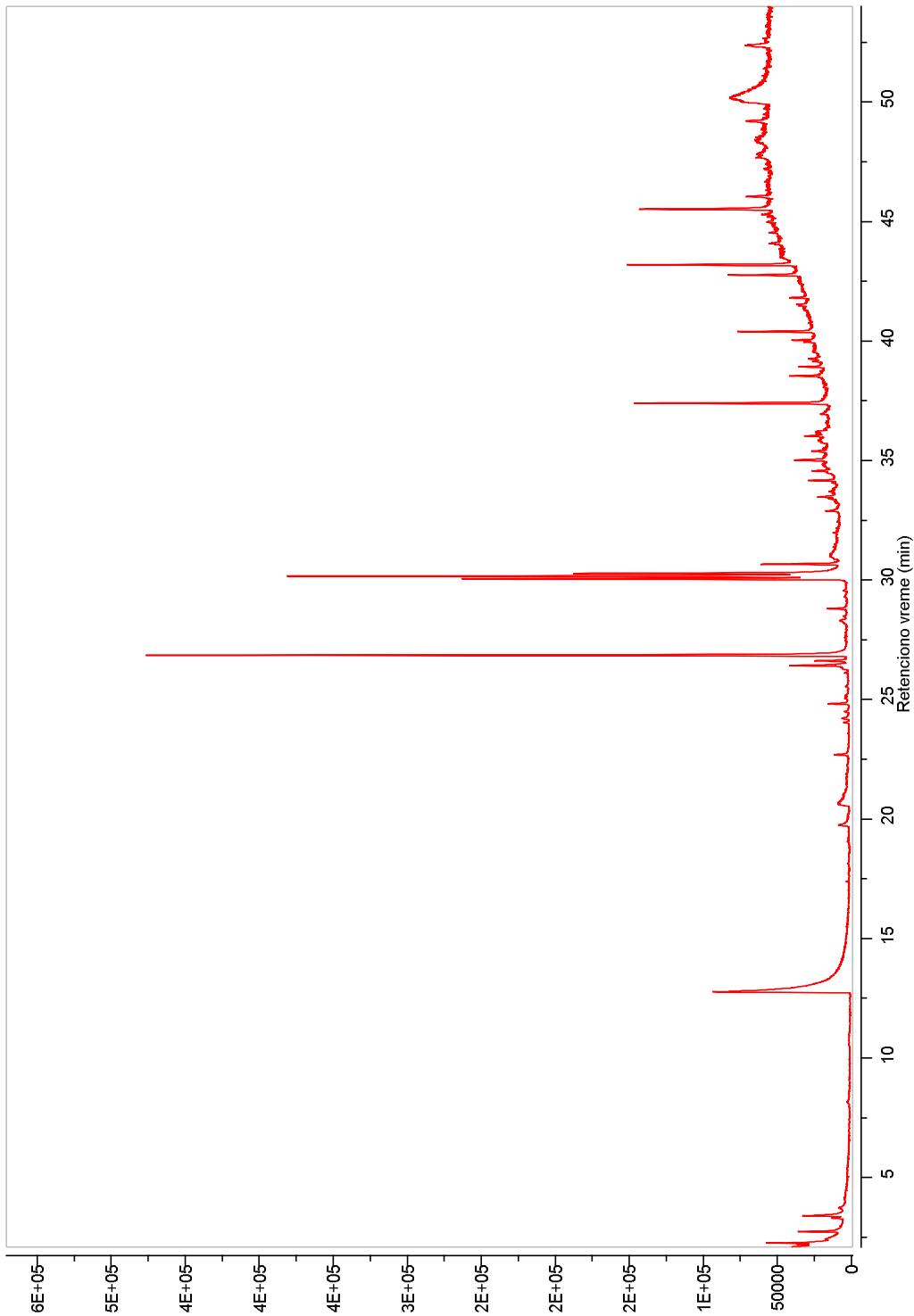


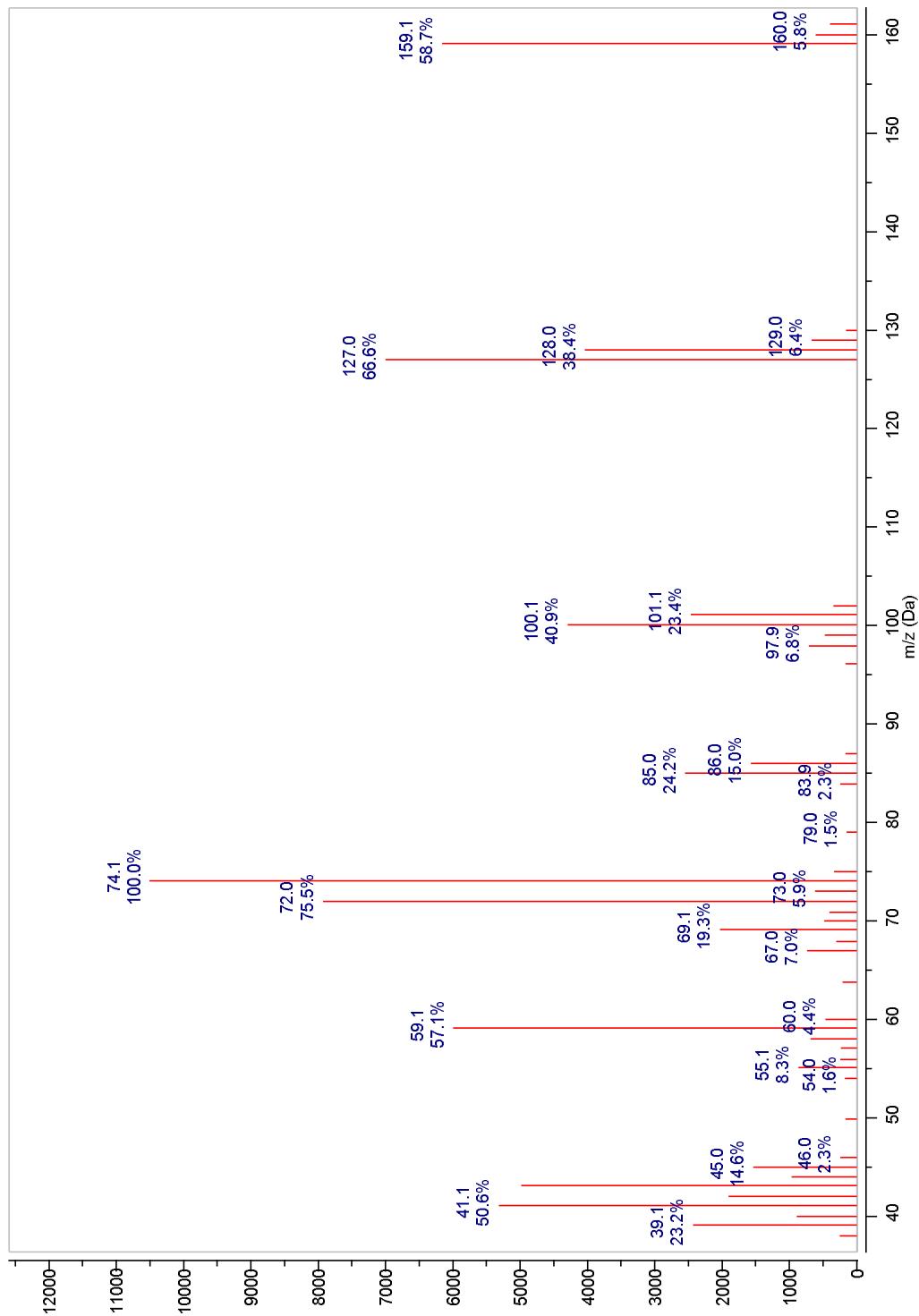
**9.22. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste *E. diffusum*
(uzorci korena sa oznakom eryd-k2)**

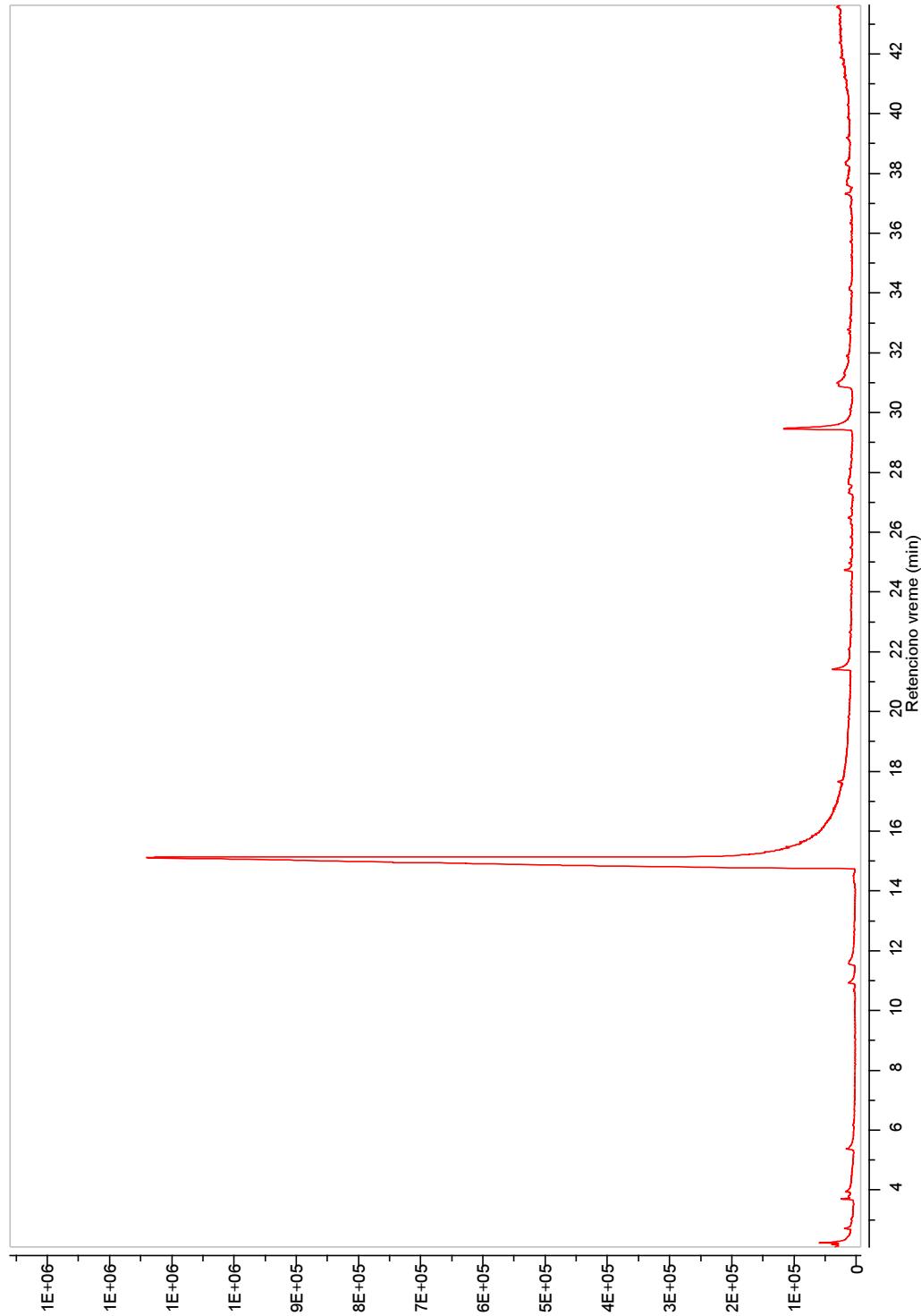


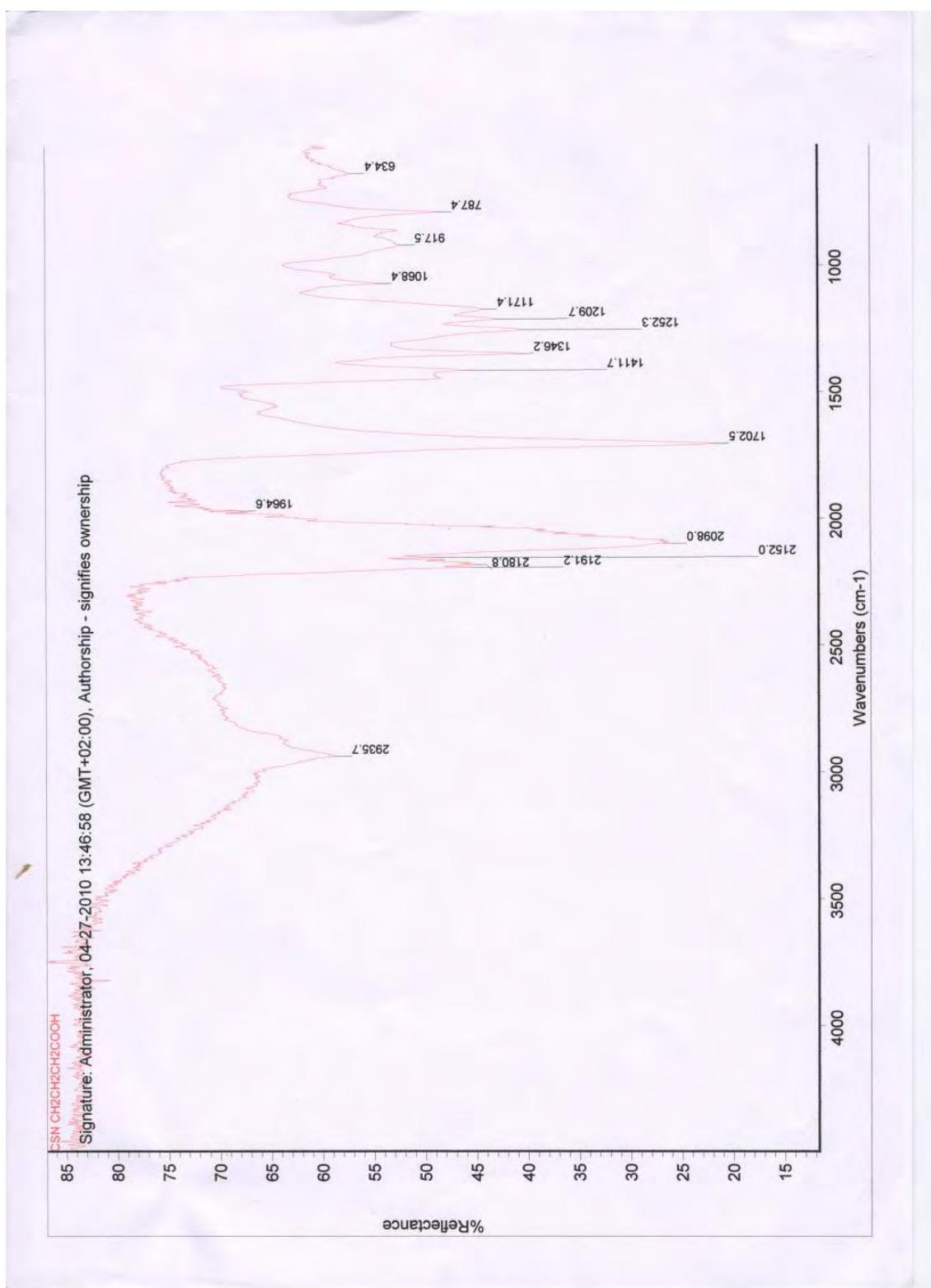
9.23. MS spektar 4-izotiocijjanatobutanske kiseline (156)

9.24. TIC Hromatogram autolizata korena *E. diffusum* (*eryd-k2*): reakcija derivatizacije detektovane kiseline 156 u metil-estar 157 u reakciji sa diazometanom

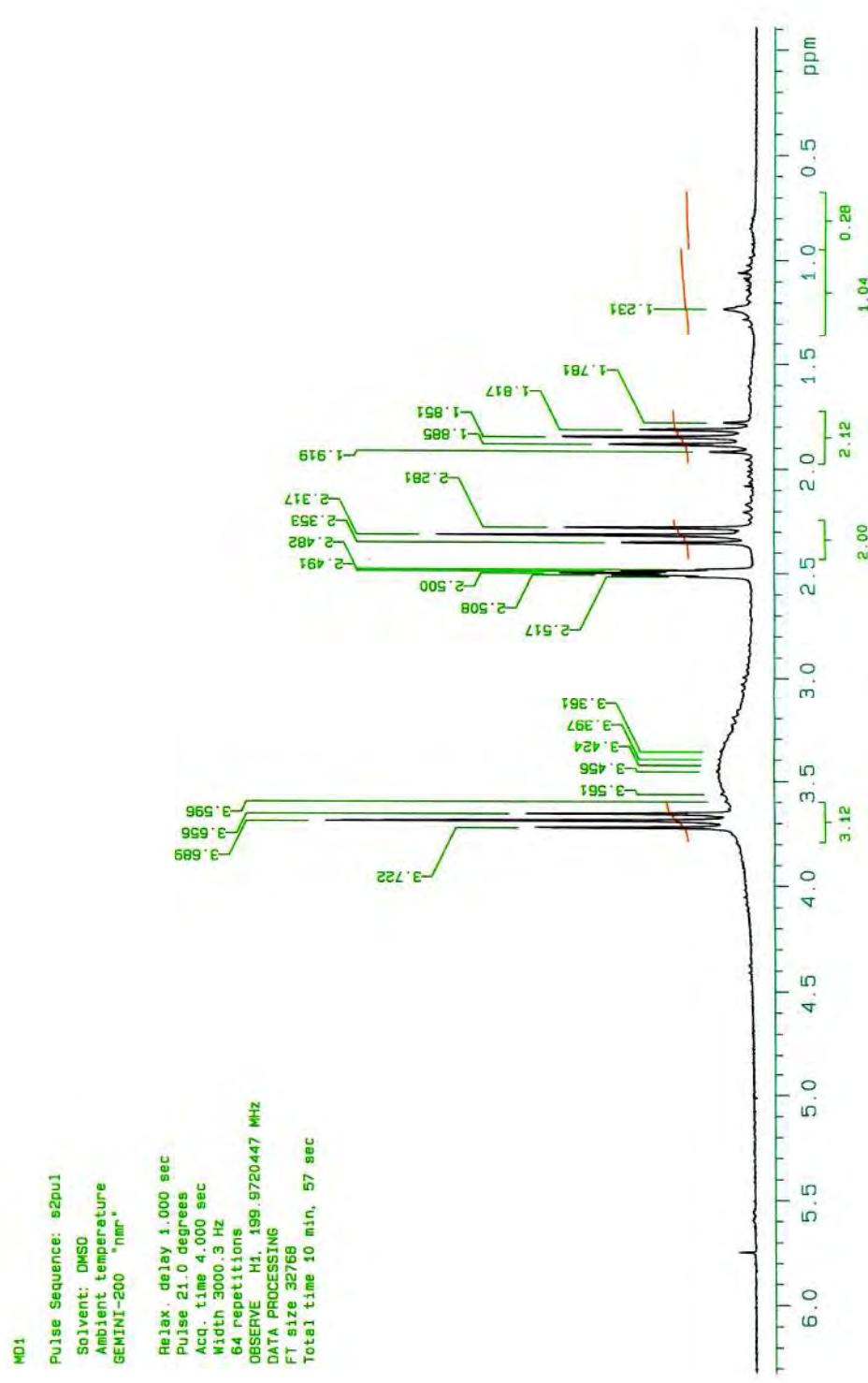


9.25. MS spektar metil-esta 4-izotiocijanatobutanske kiseline (157)

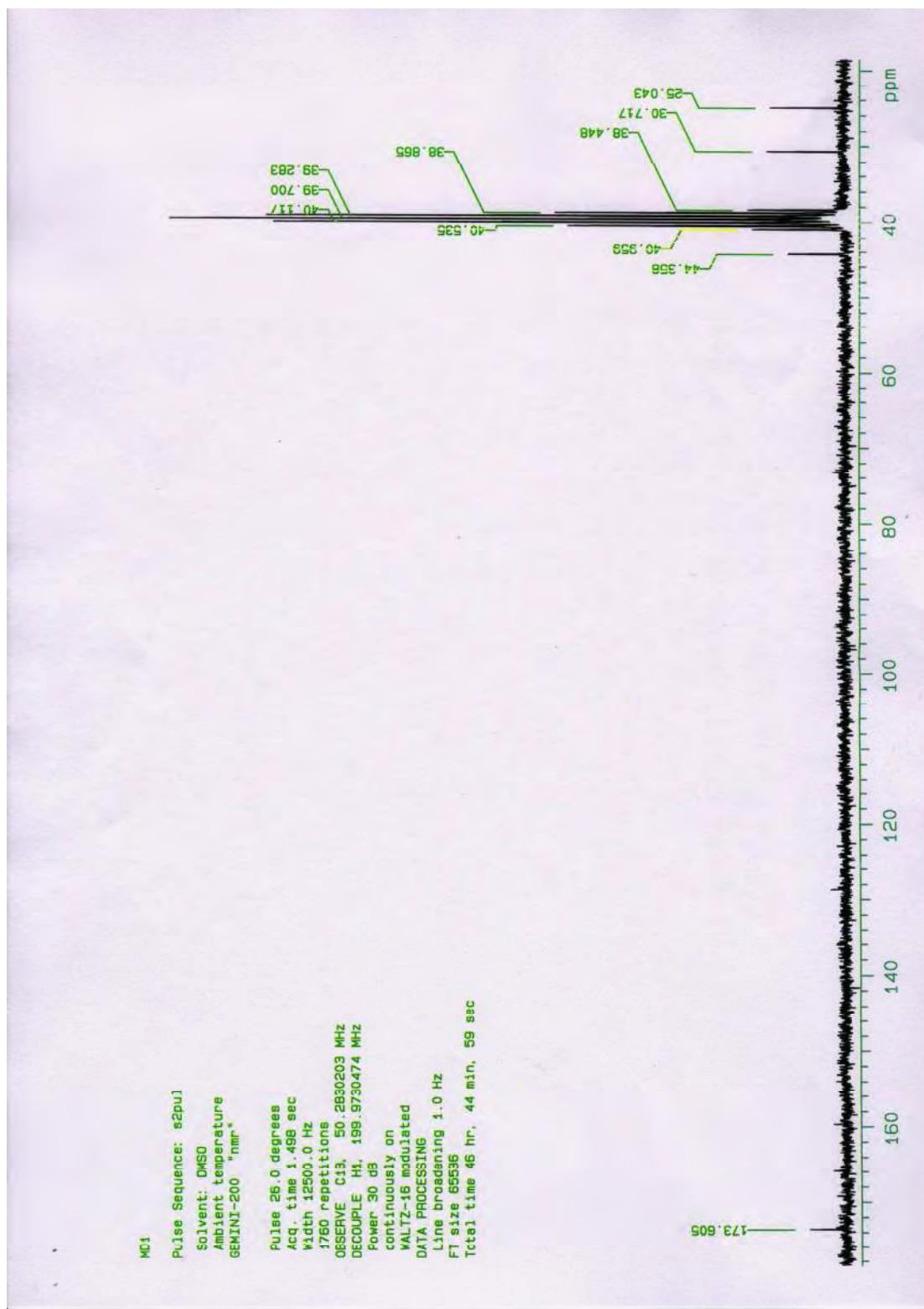
9.26. TIC Hromatogram sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline (156)

9.27. IR spektar sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline (156)

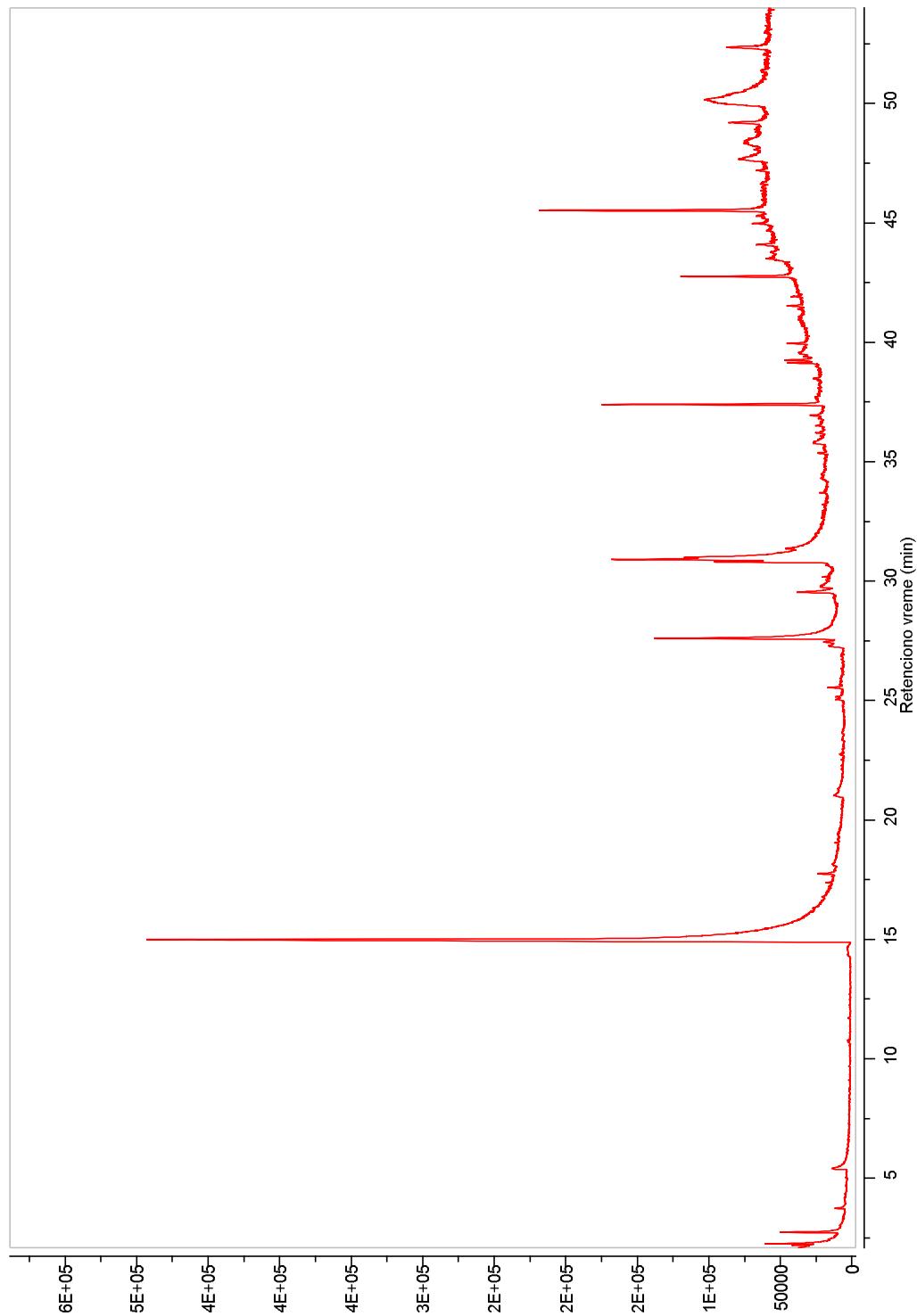
9.28. ^1H NMR spektar sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline (156)



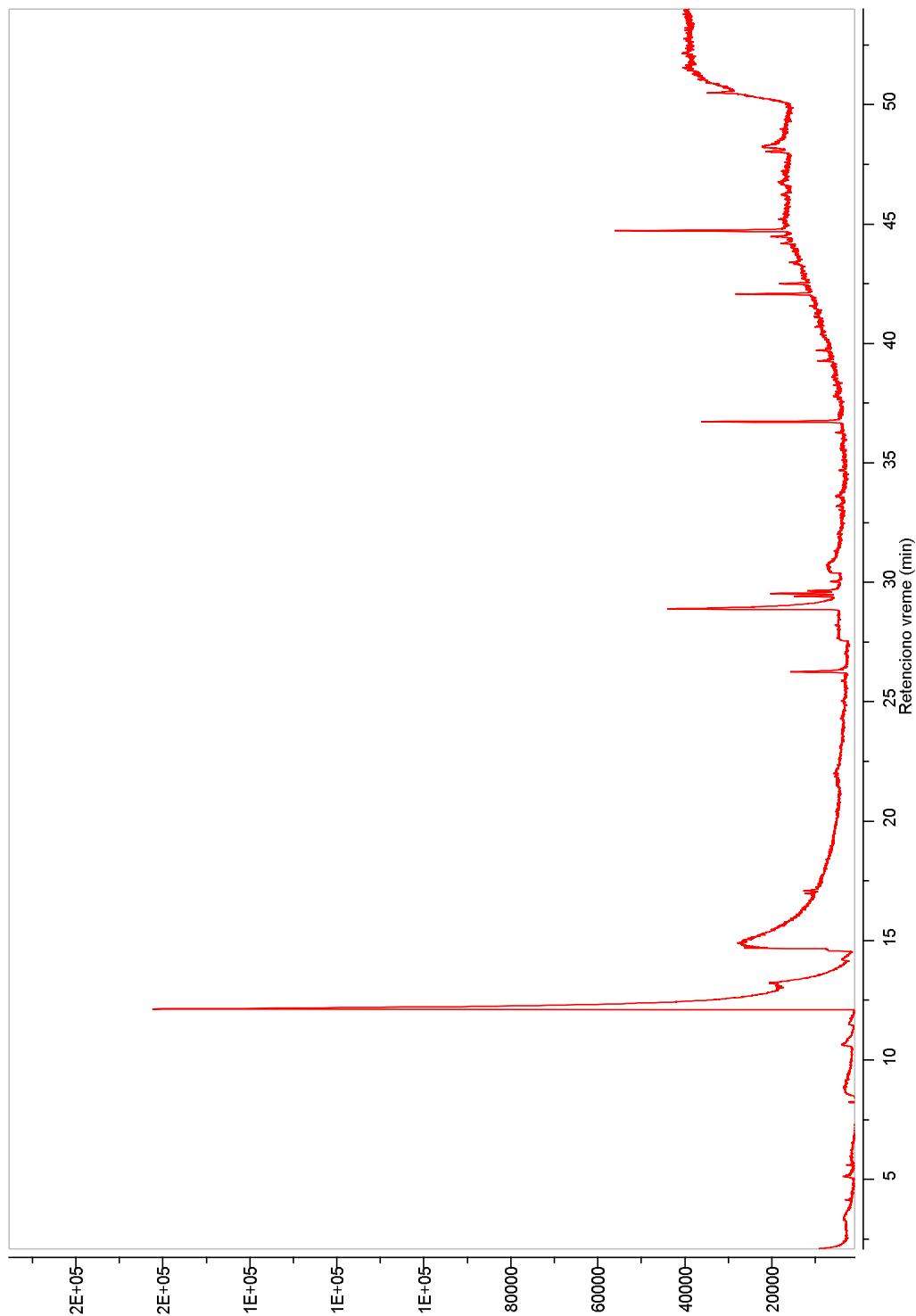
9.29. ^{13}C NMR spektar sintetisane 4-izotiocijanatobutanske kiseline (156)



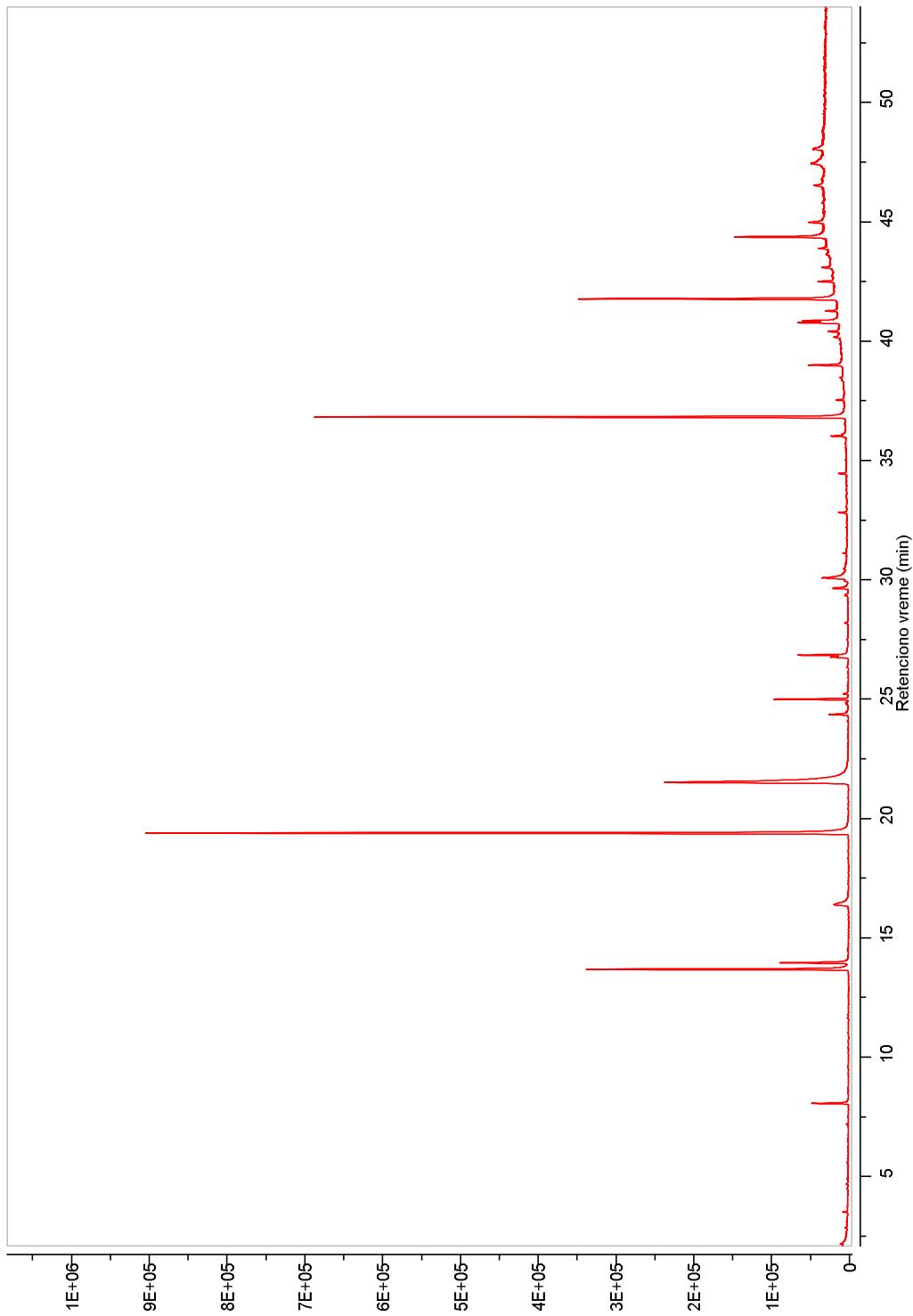
**9.30. TIC Hromatogram koinjekcije sintetisanog jedinjenja 156 sa autolizatom
korena *E. diffusum***



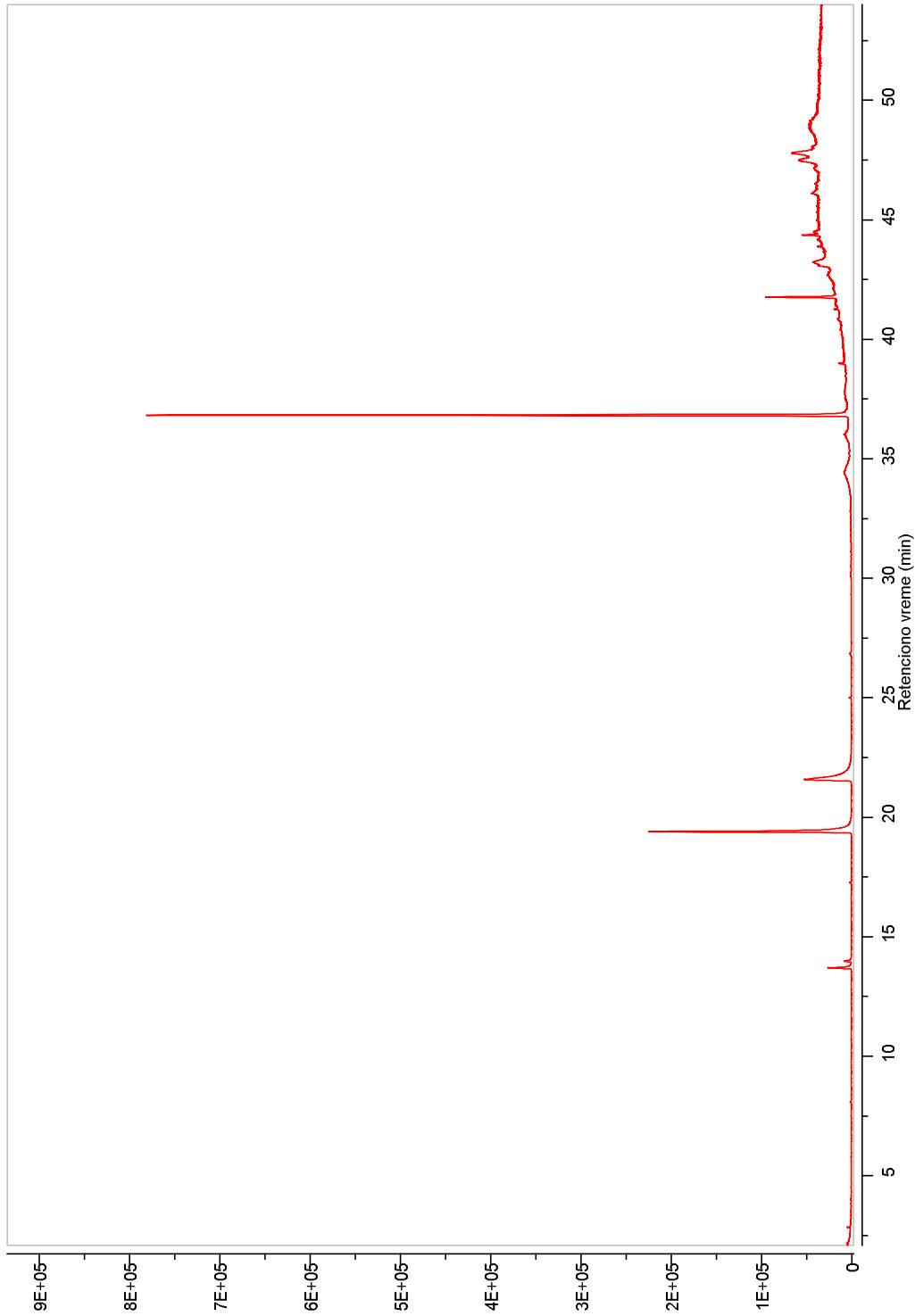
9.31. TIC Hromatogram autolizata korena *E. diffusum* dobijenog po modifikovanoj proceduri

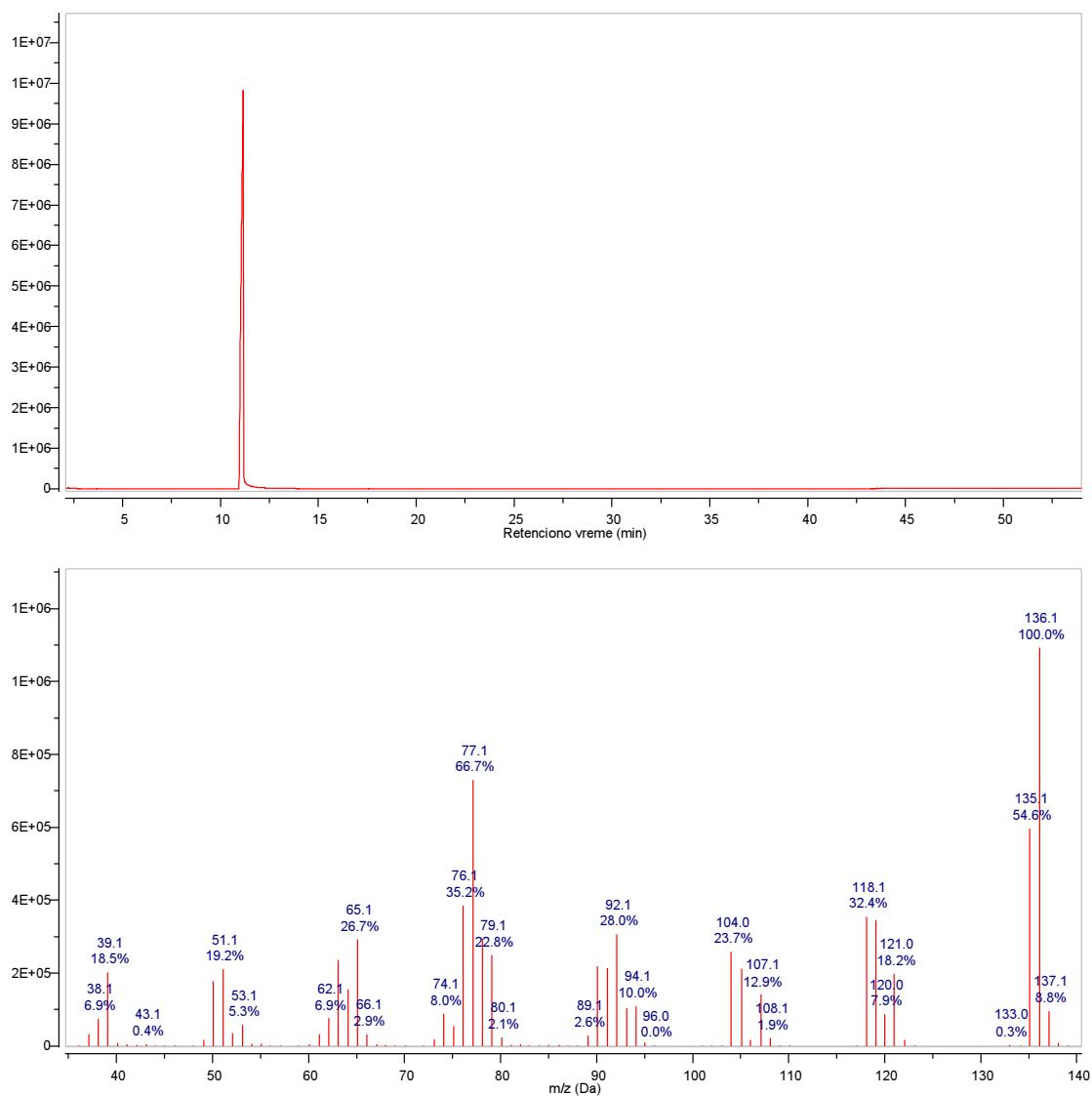


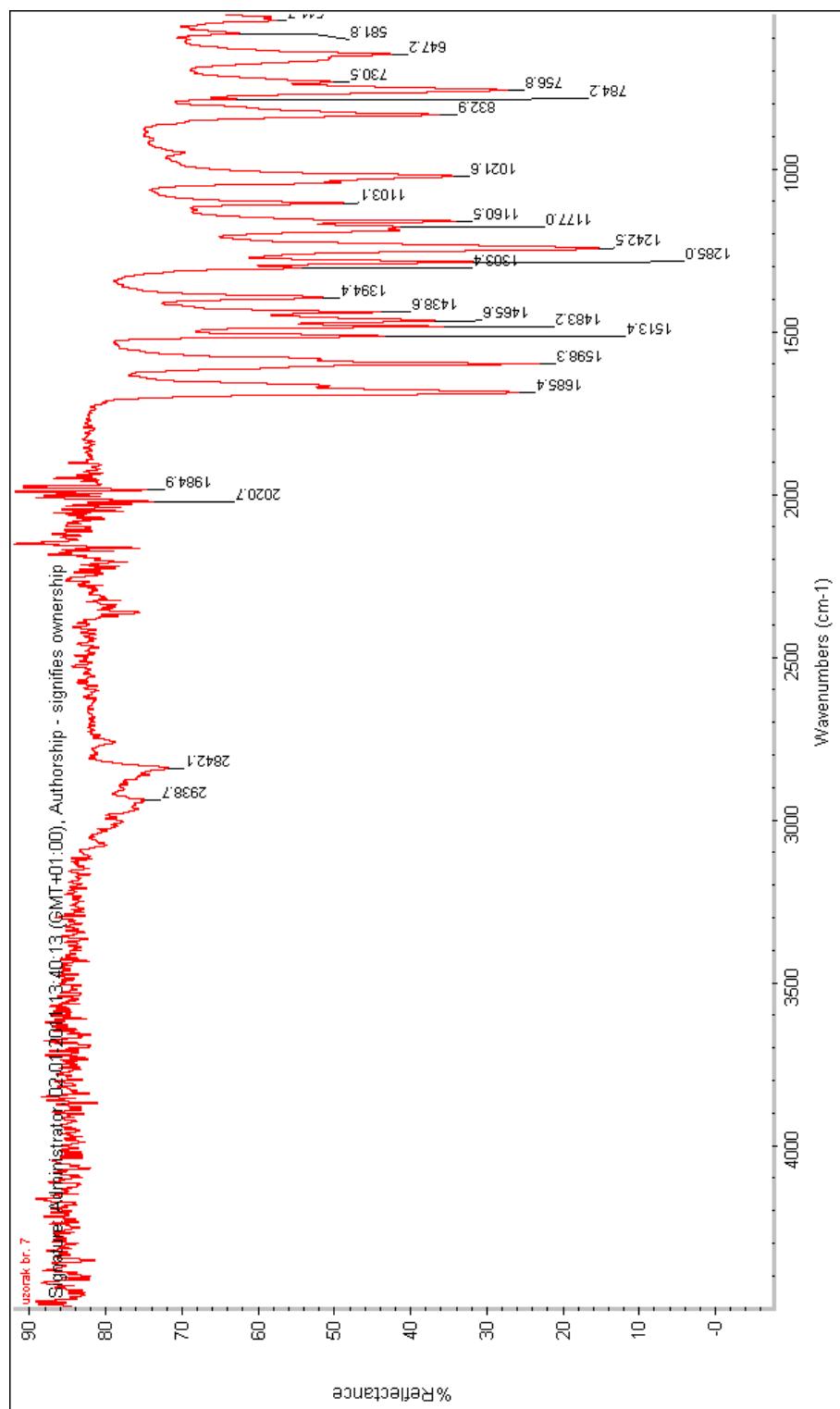
**9.32. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste *H. petraea*
(uzorci celih biljaka sa oznakom *horp-c1*)**

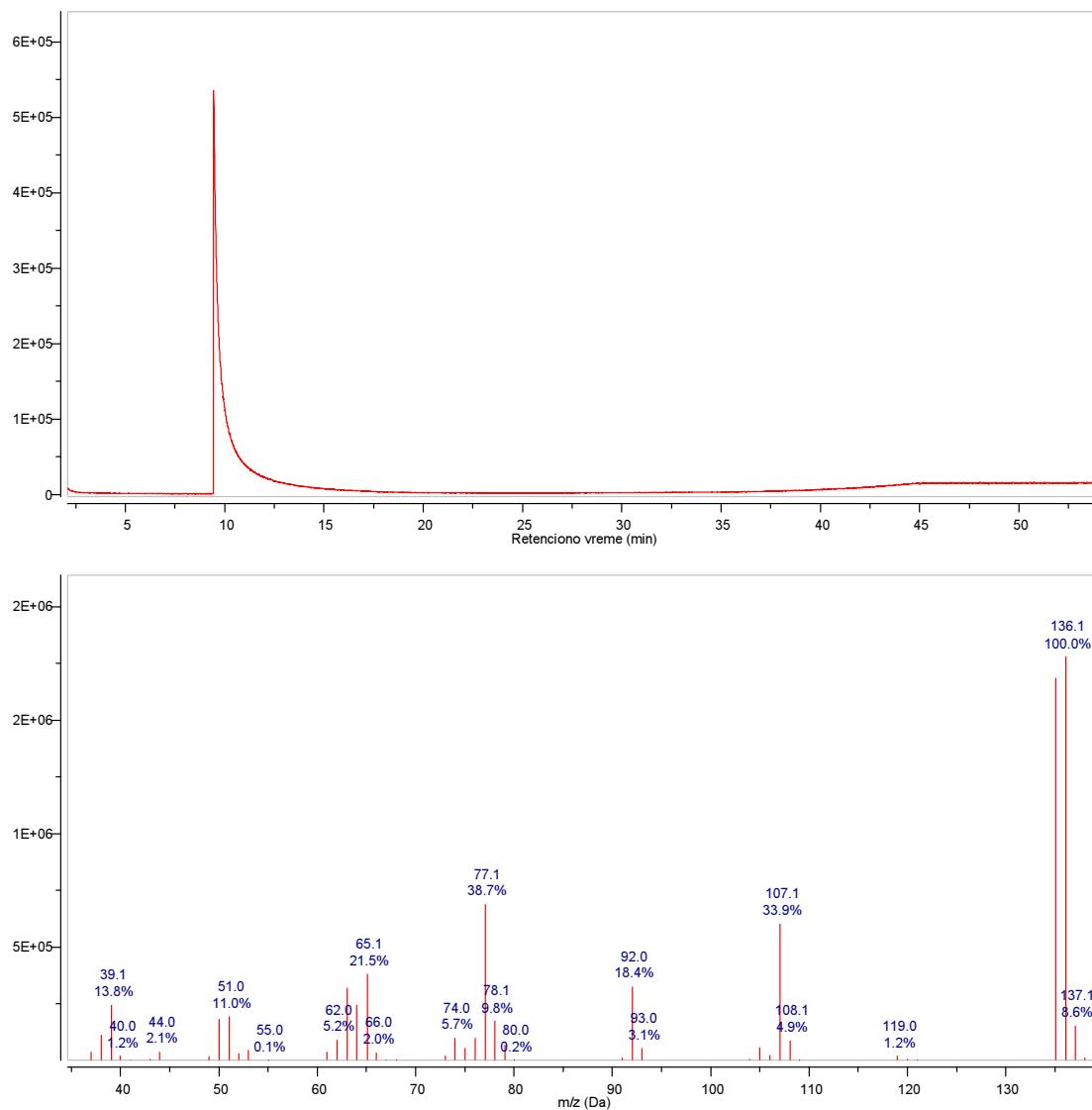


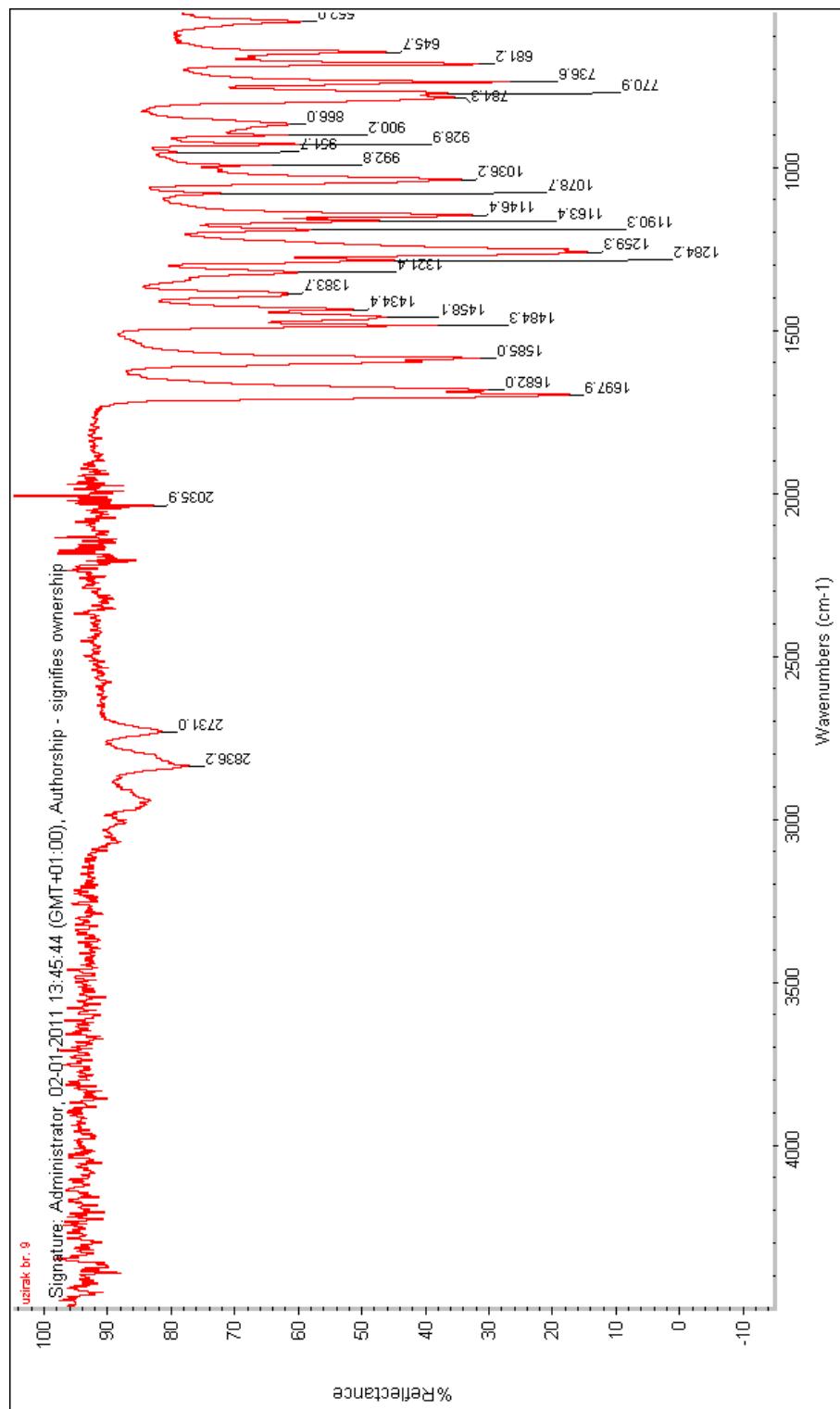
**9.33. TIC Hromatogram etarskog ekstrakta autolizata vrste *H. petraea*
(uzorci celih biljaka sa oznakom *horp-c2*)**



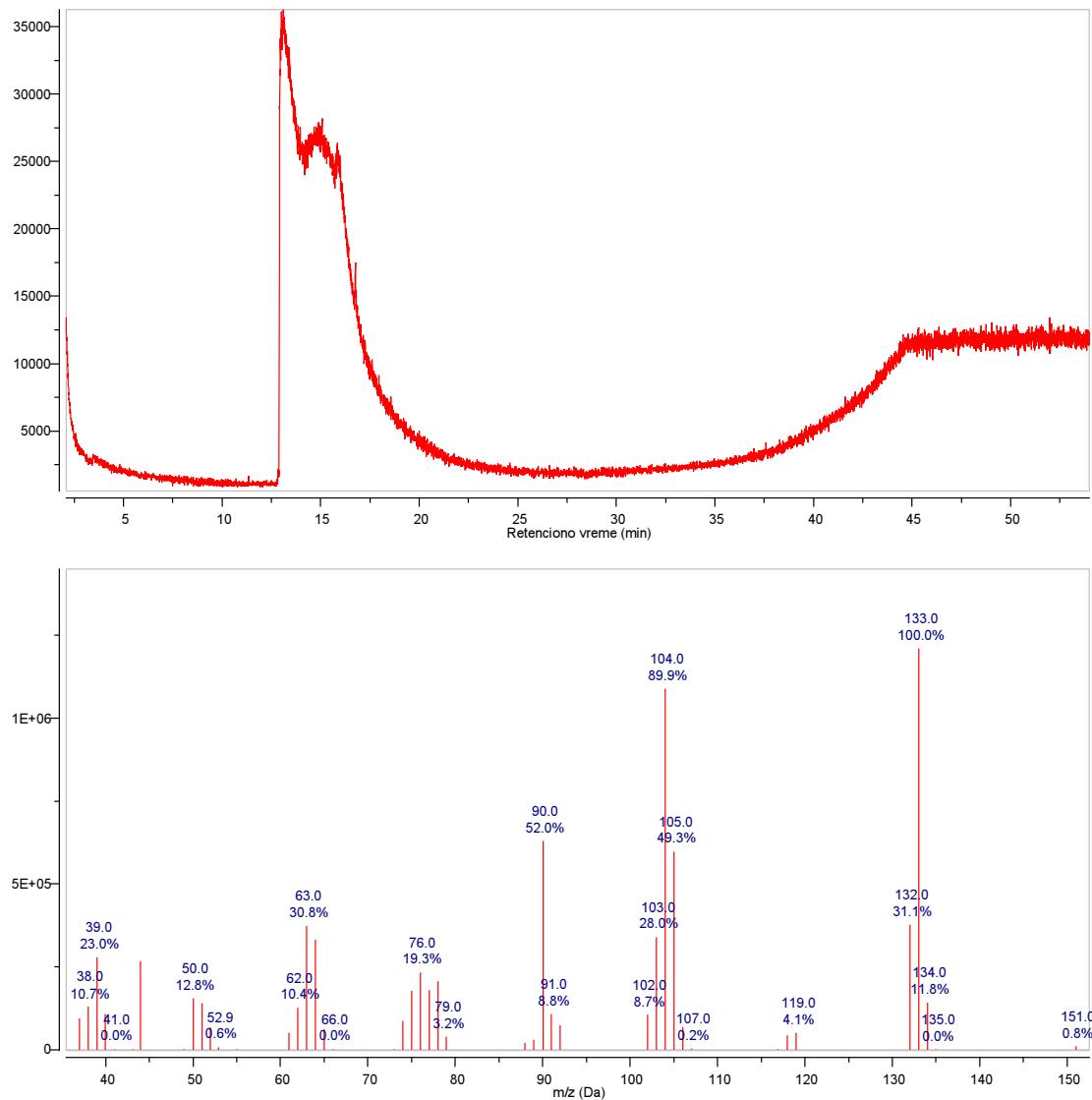
9.34. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzaldehyda (159a)

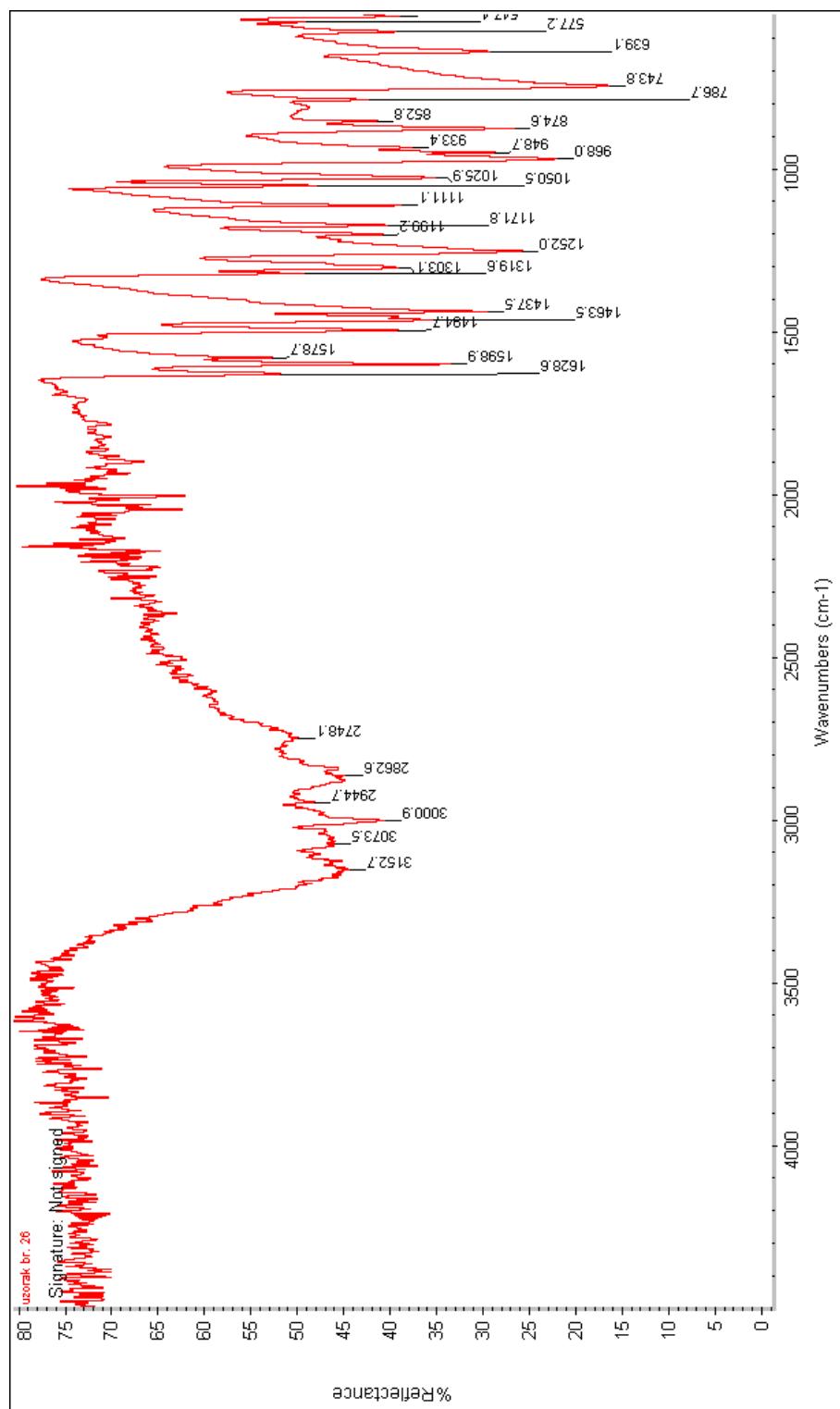
9.35. IR Spektar 2-metoksibenzaldehyda (159a)

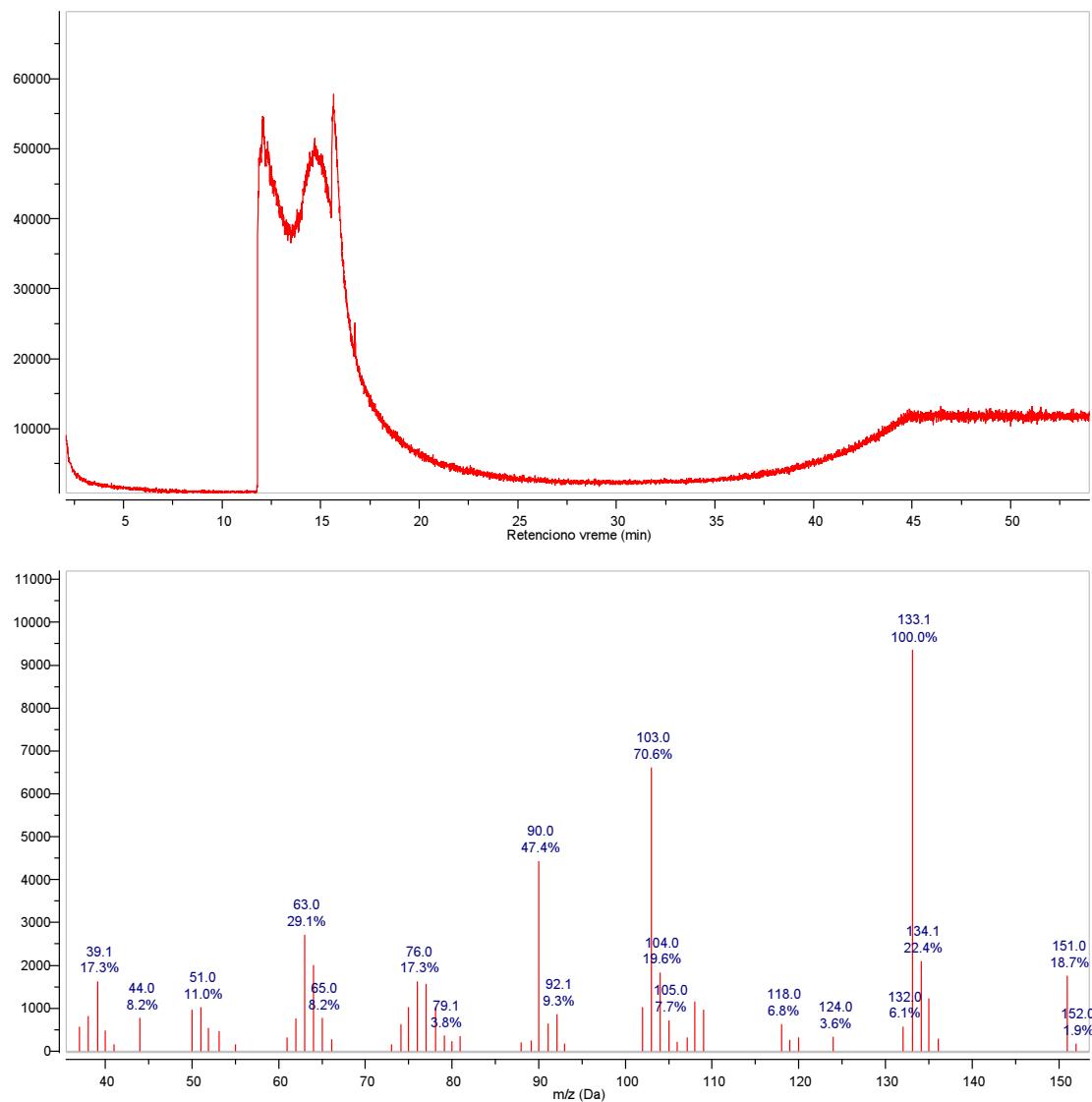
9.36. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksibenzaldehida (159b)

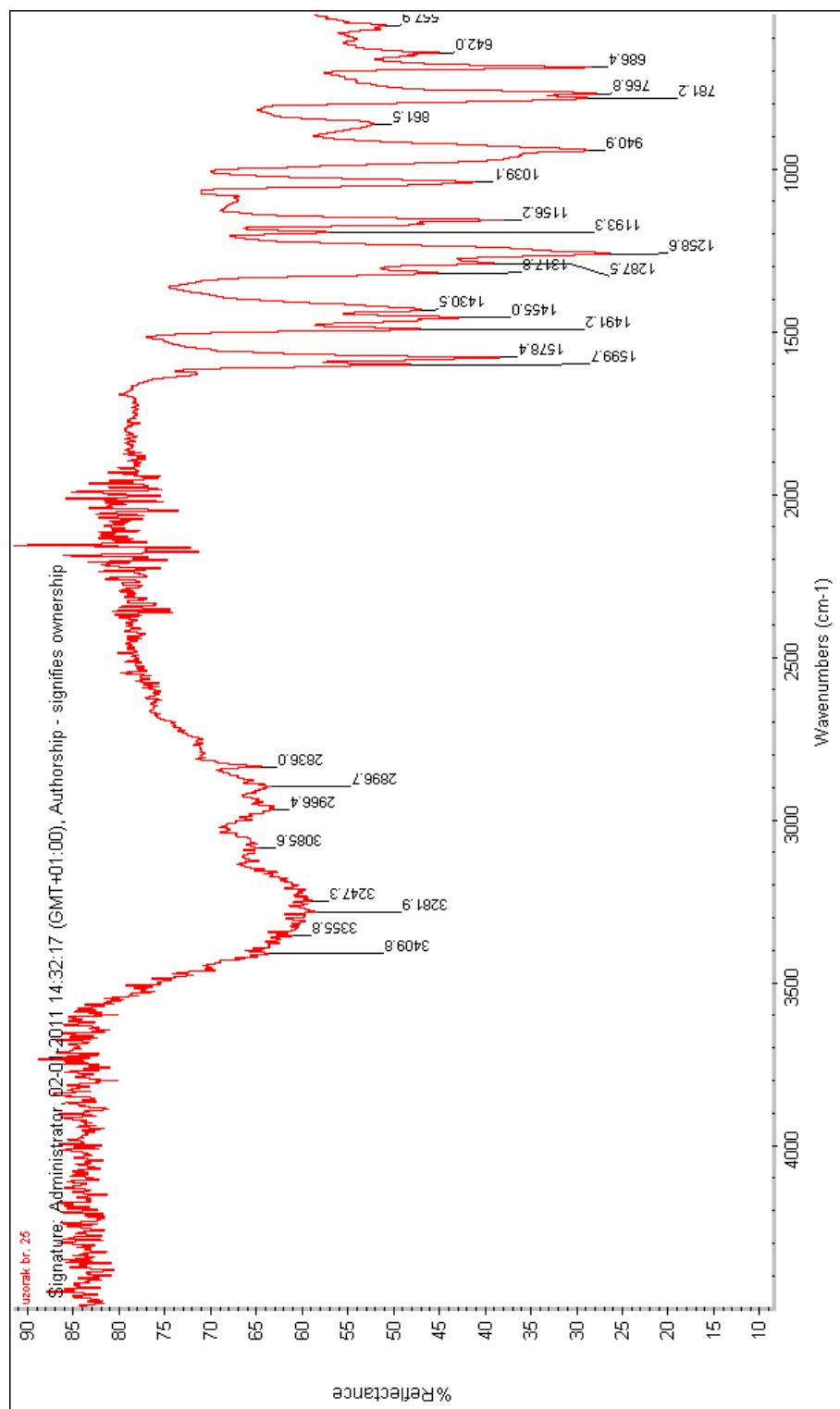
9.37. IR Spektar 3-metoksibenzaldehyda (159b)

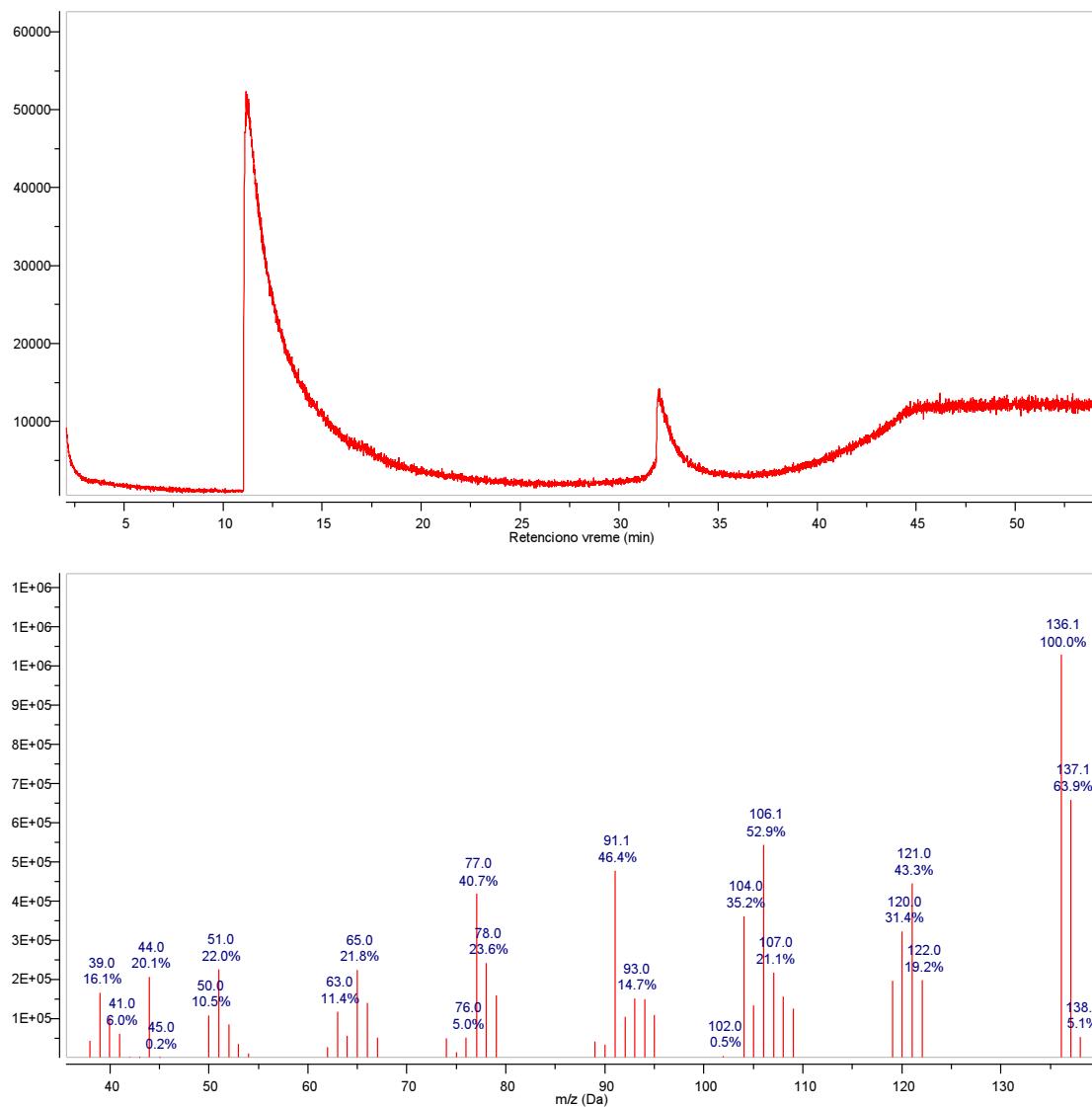
9.38. TIC Hromatogram i MS spektar smeše (E)- i (Z)-oksima 2-metoksibenzaldehida (160a)

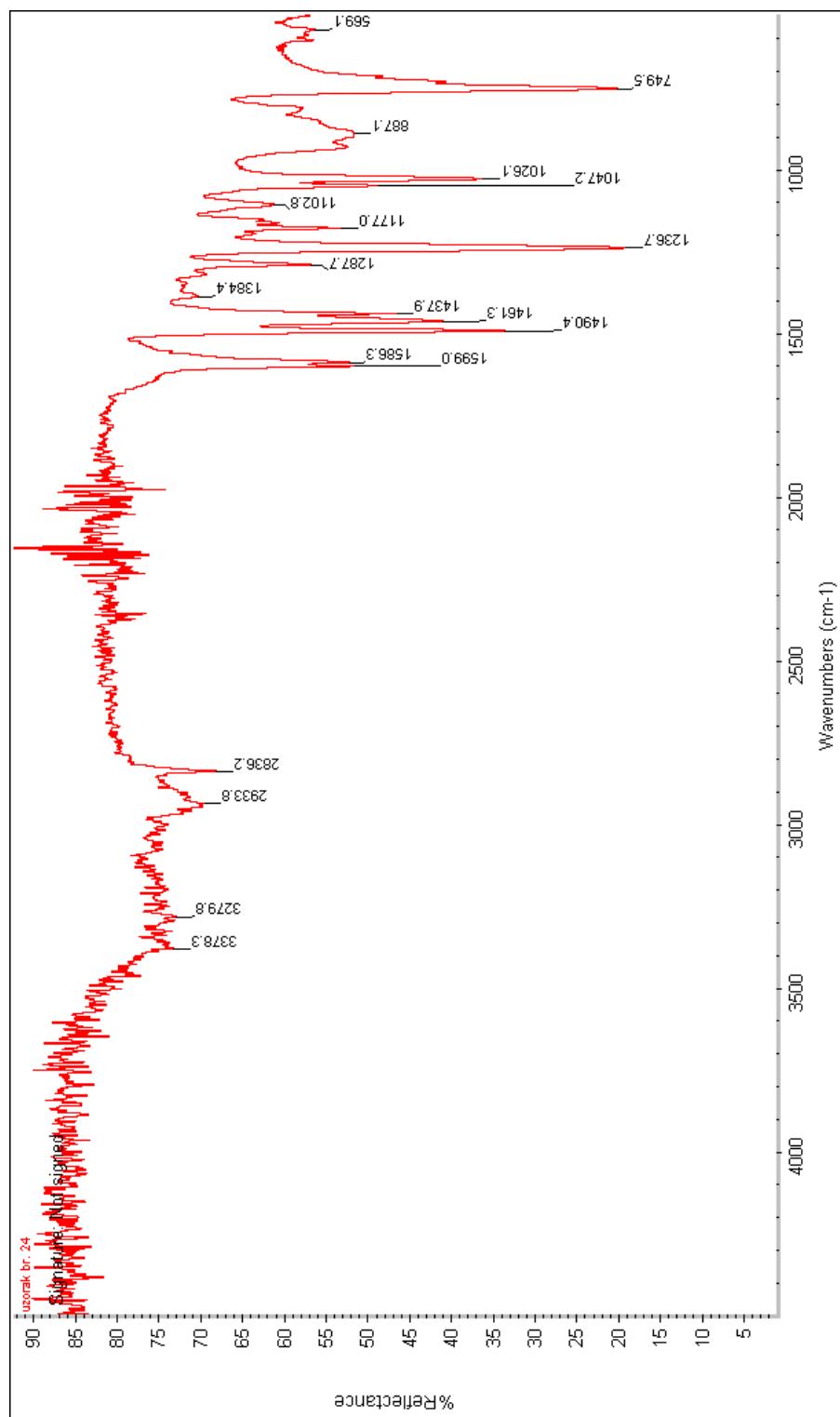


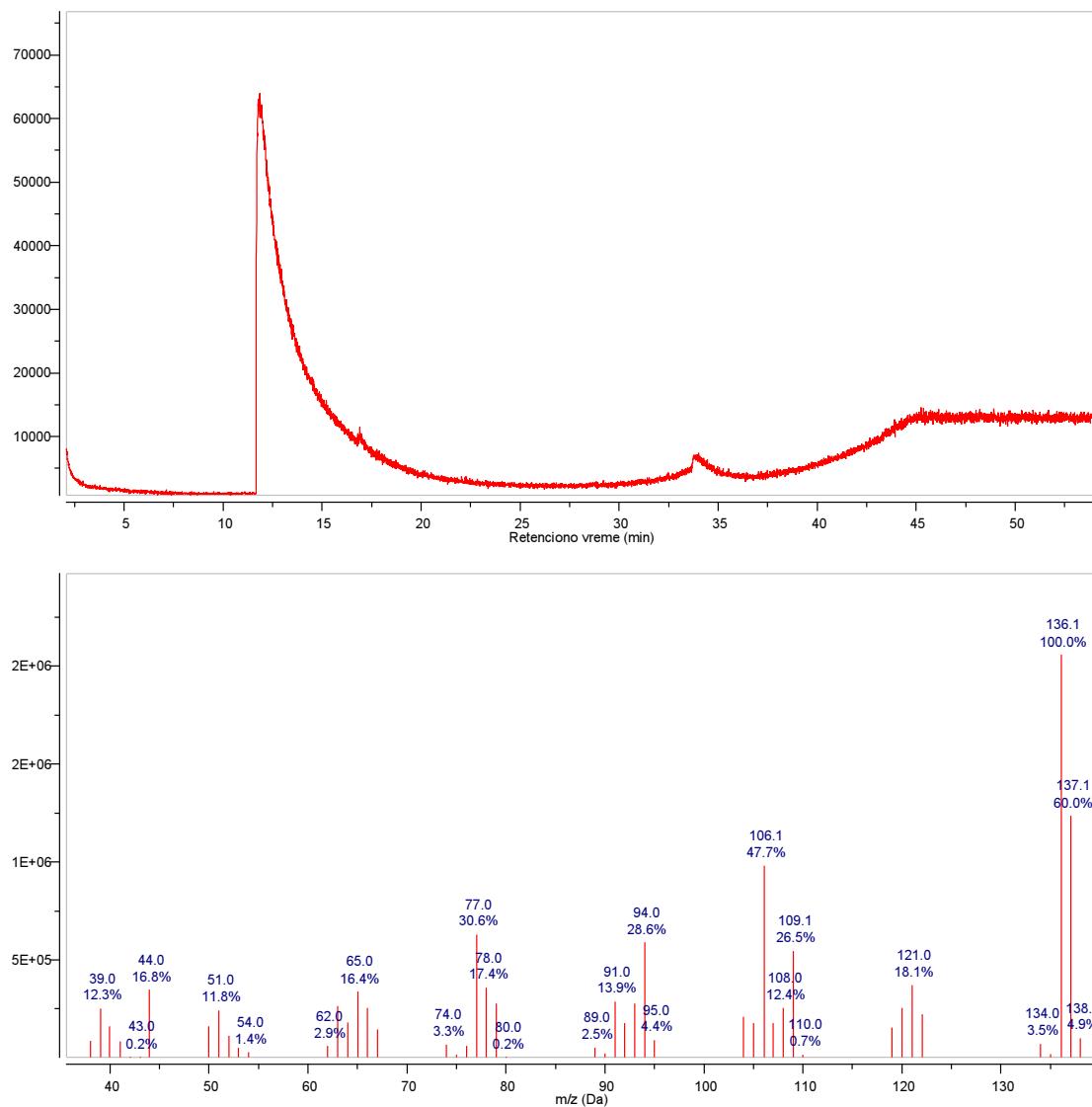
9.39. IR Spektar smeše (E)- i (Z)-oksima 2-metoksibenzaldehida (160a)

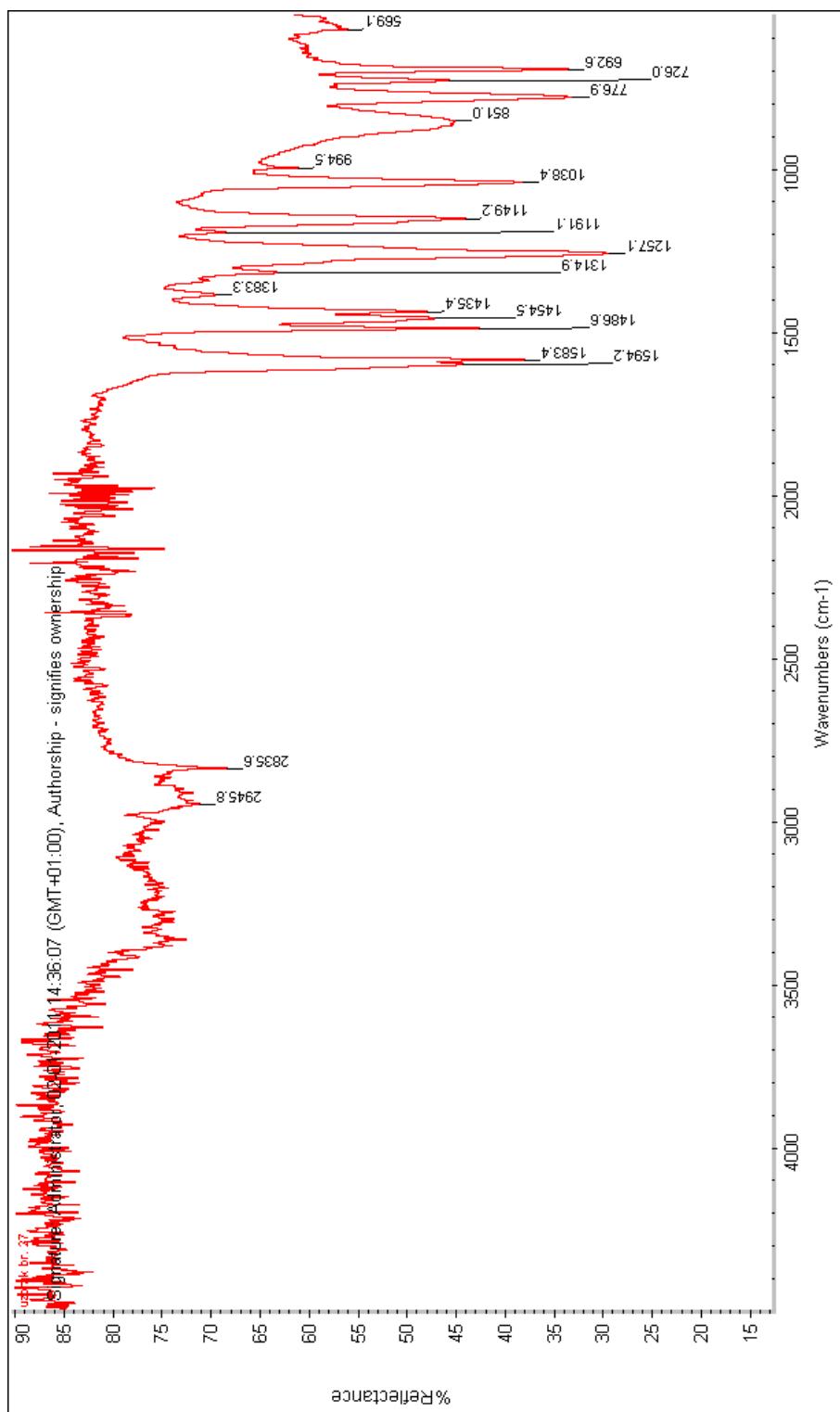
9.40. TIC Hromatogram i MS spektar smeše (E)- i (Z)-oksima 3-metoksibenzaldehida (160b)

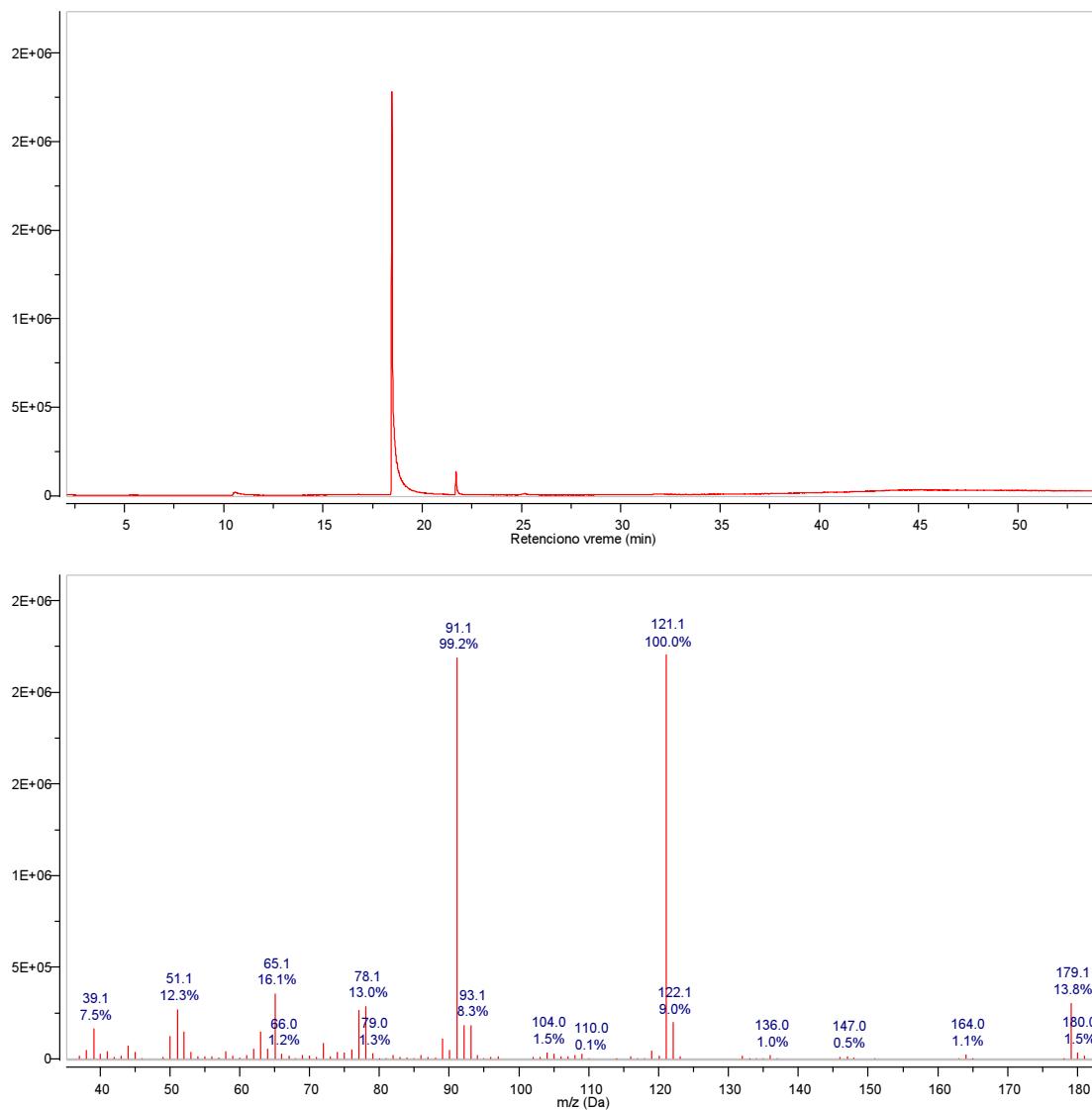
9.41. IR Spektar smeša (E)- i (Z)-oksimra 3-metoksibenzaldehida (160b)

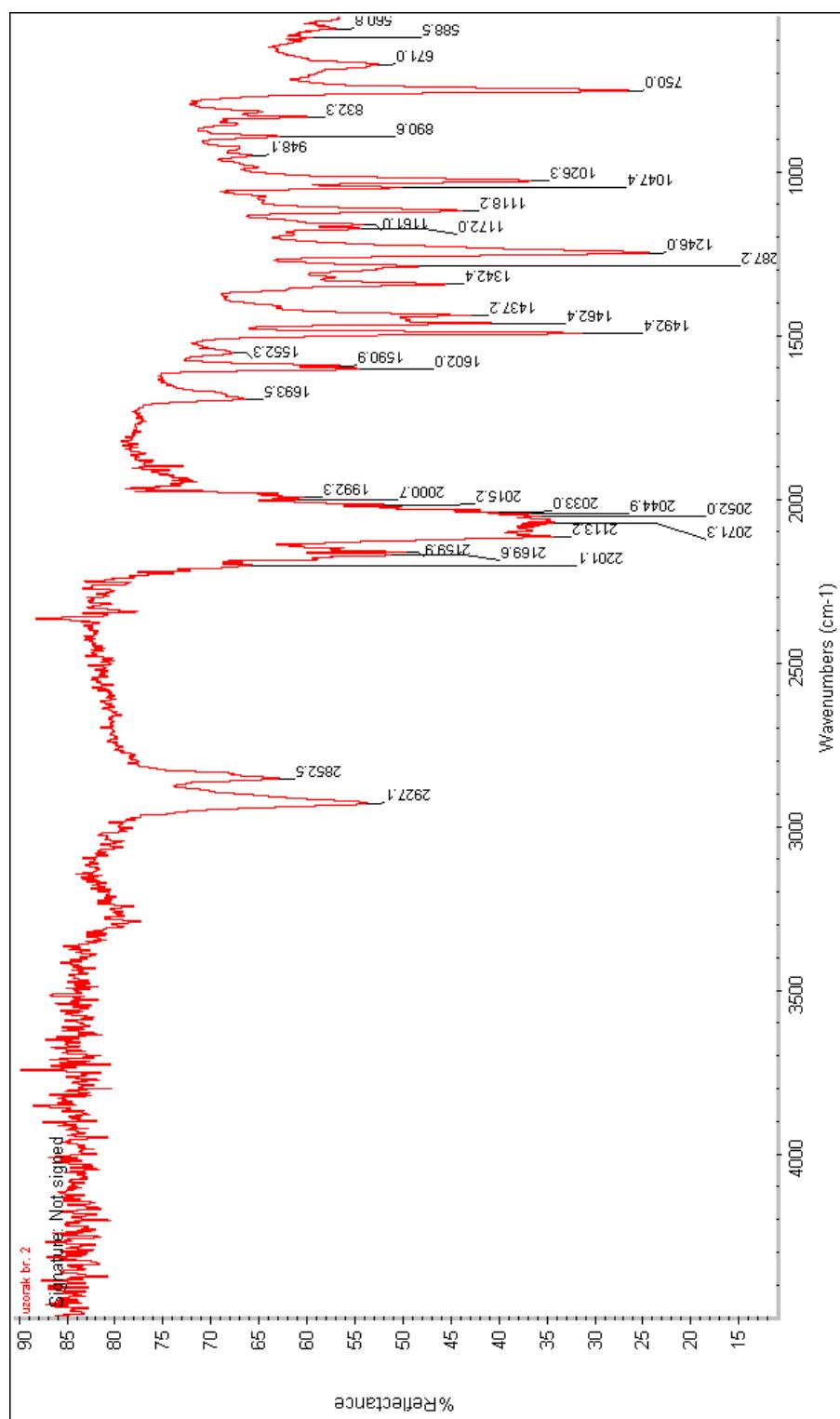
9.42. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzil-amina (161a)

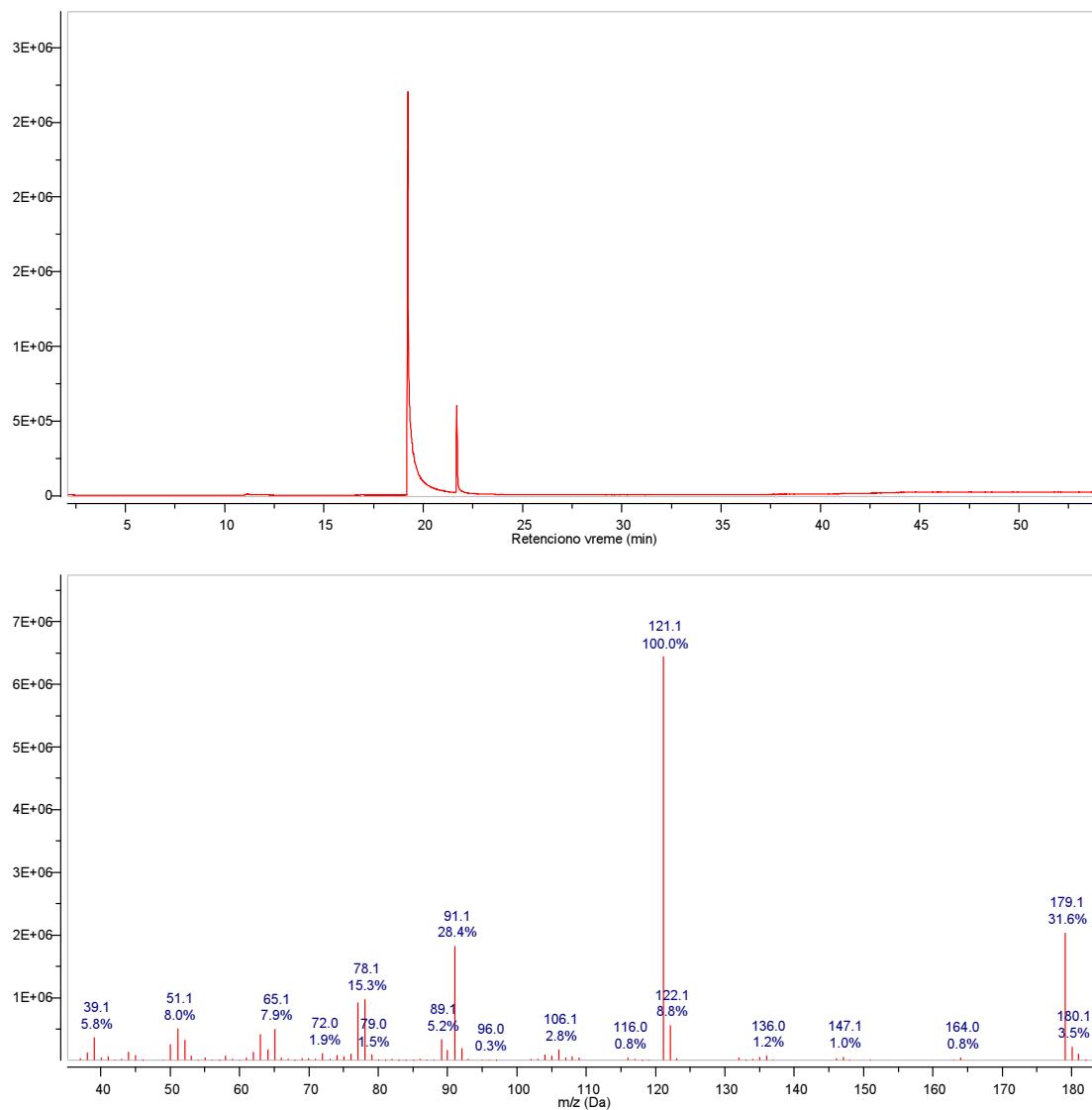
9.43. IR spektar 2-metoksibenzil-amina (161a)

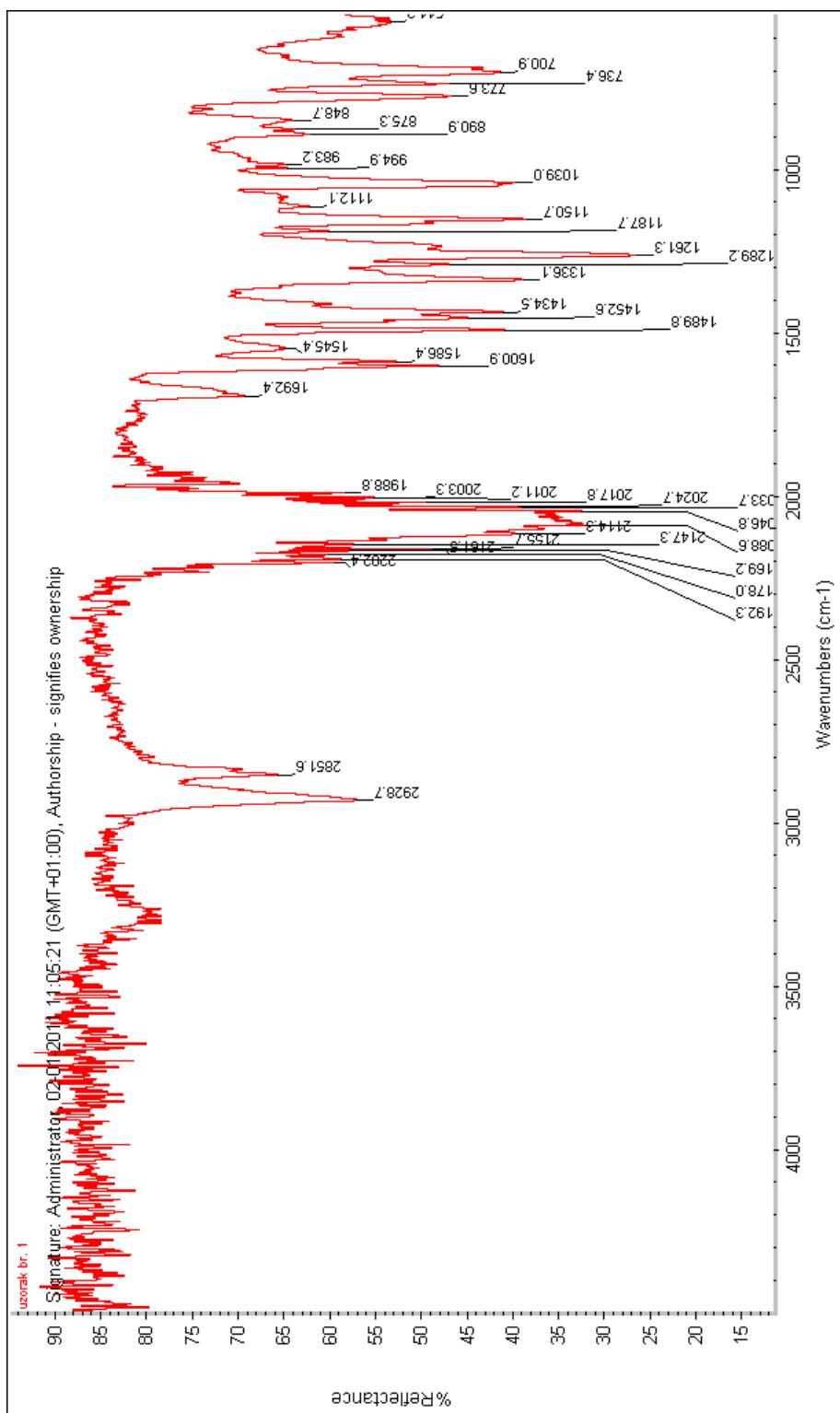
9.44. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksibenzil-amina (161b)

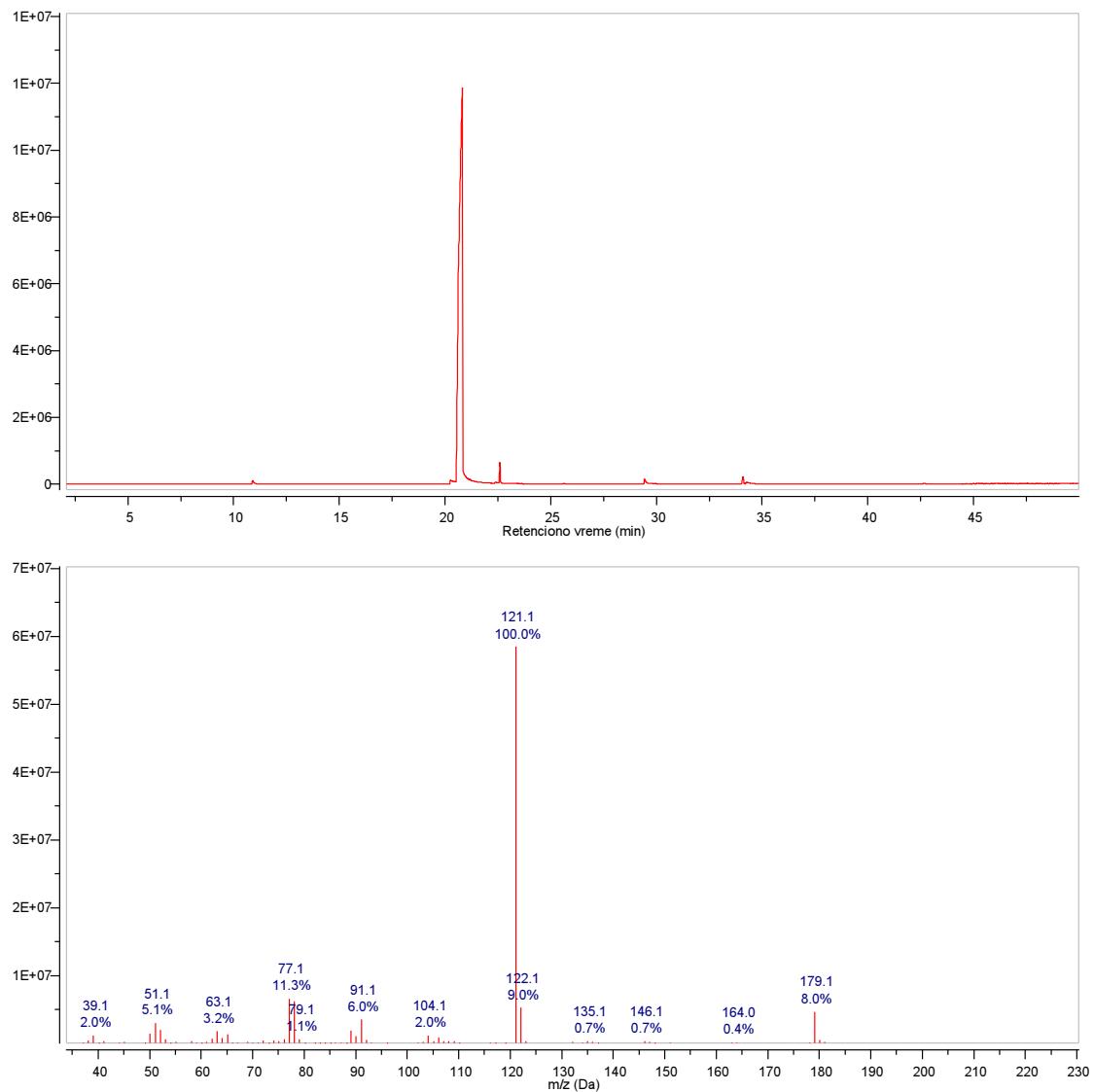
9.45. IR spektar 3-metoksibenzil-amina (161b)

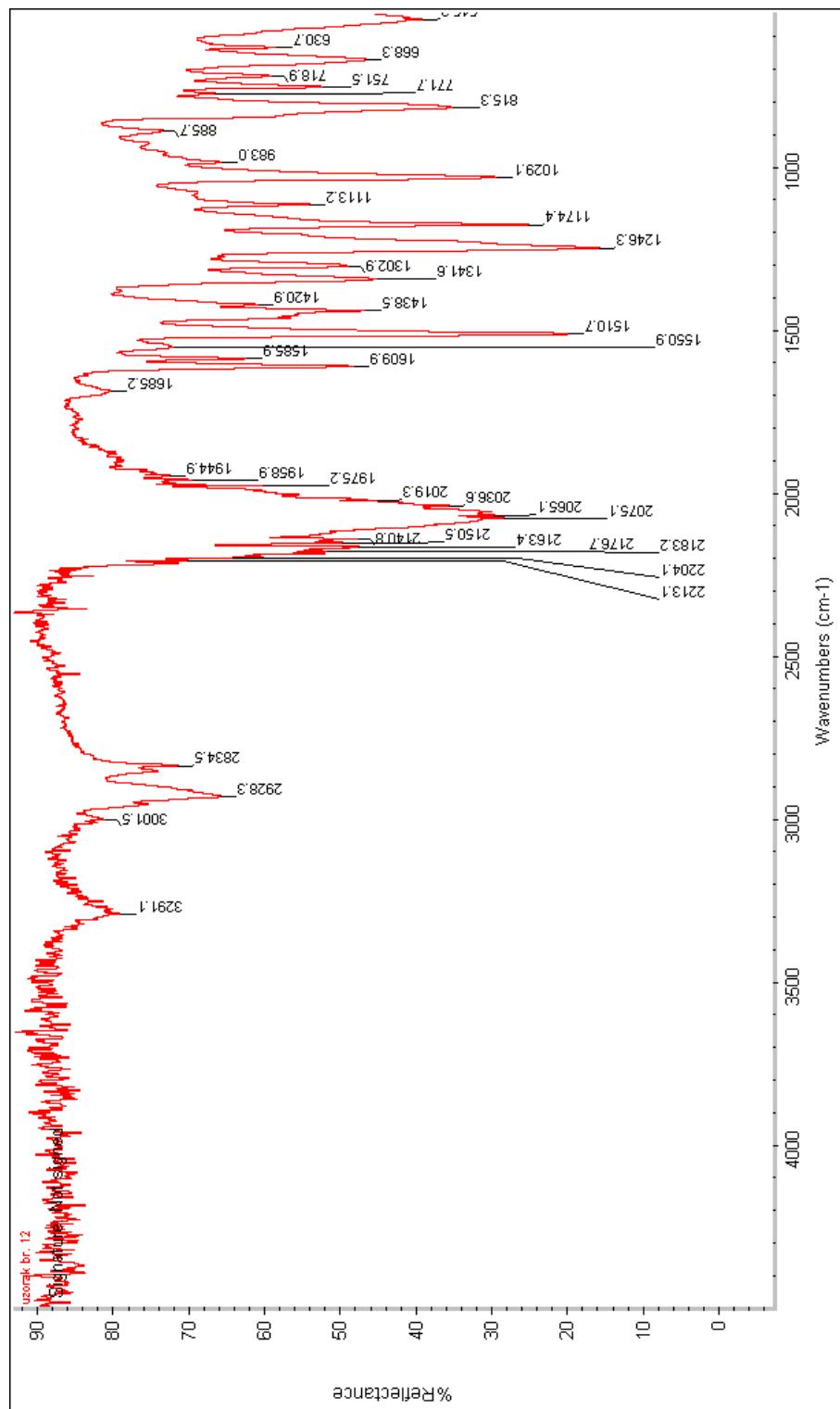
9.46. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzil-izotiocijanata (162a)

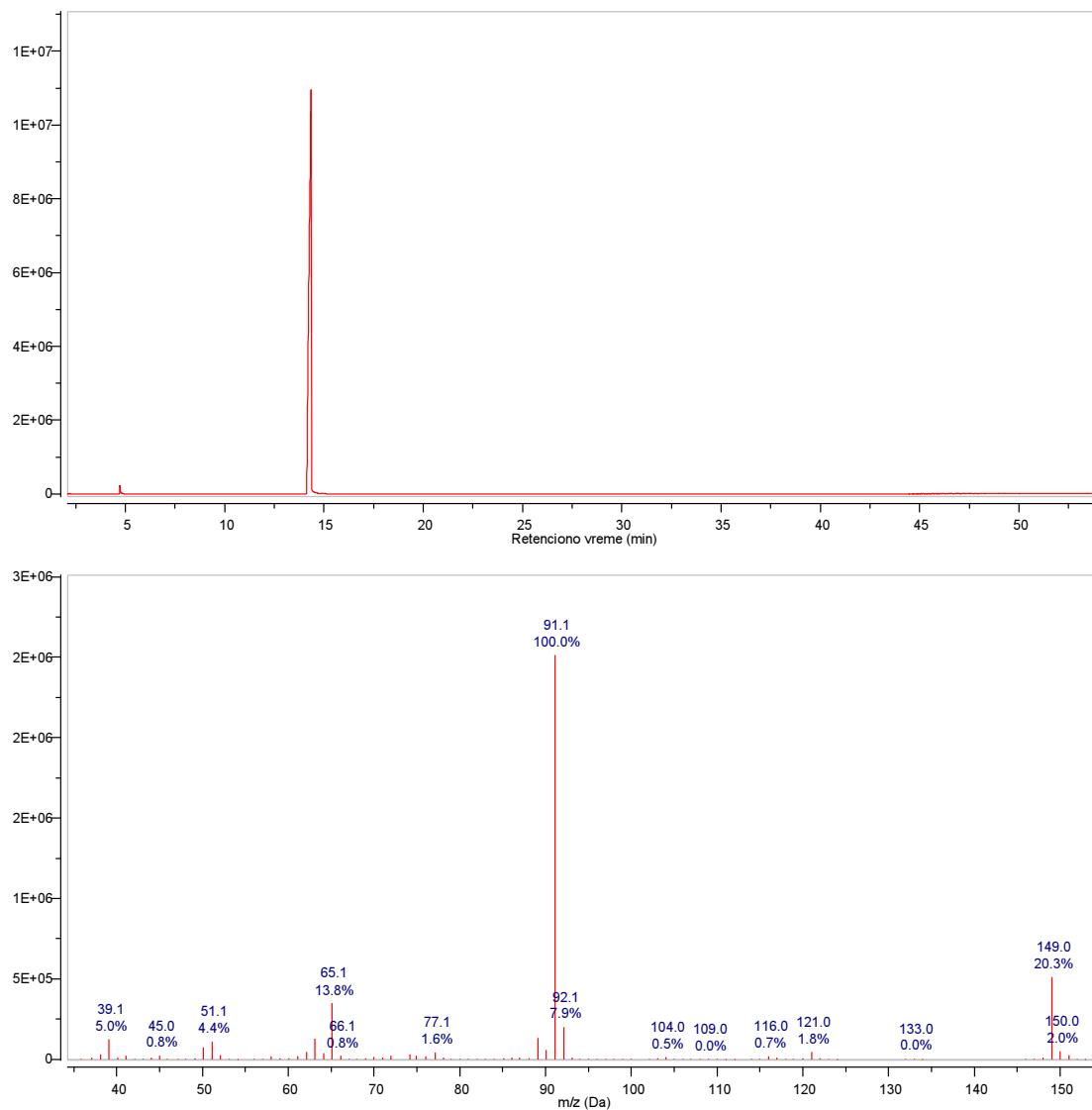
9.47. IR spektar 2-metoksibenzil-izotiocijanata (162a)

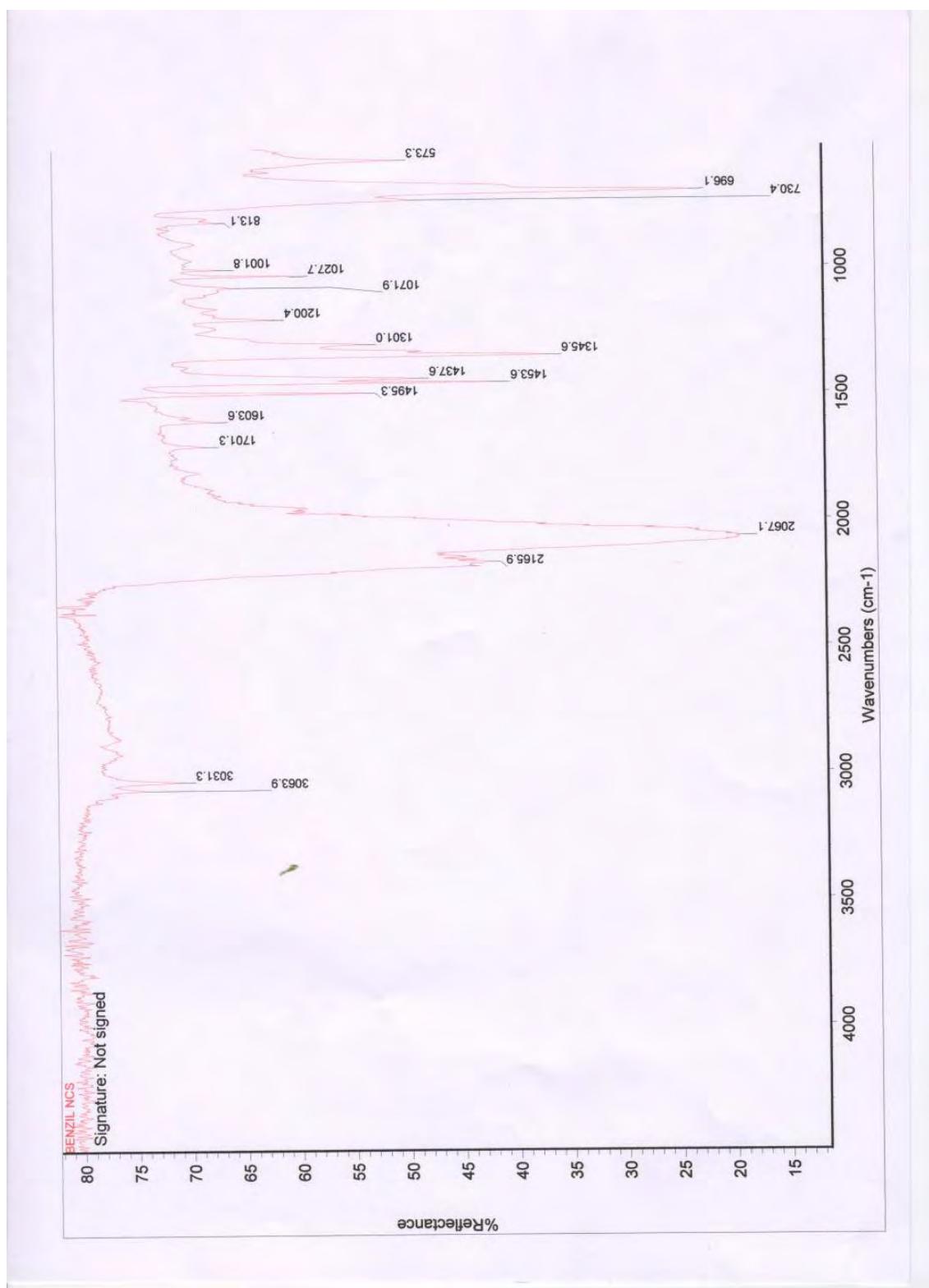
9.48. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksibenzil-izotiocijanata (162b)

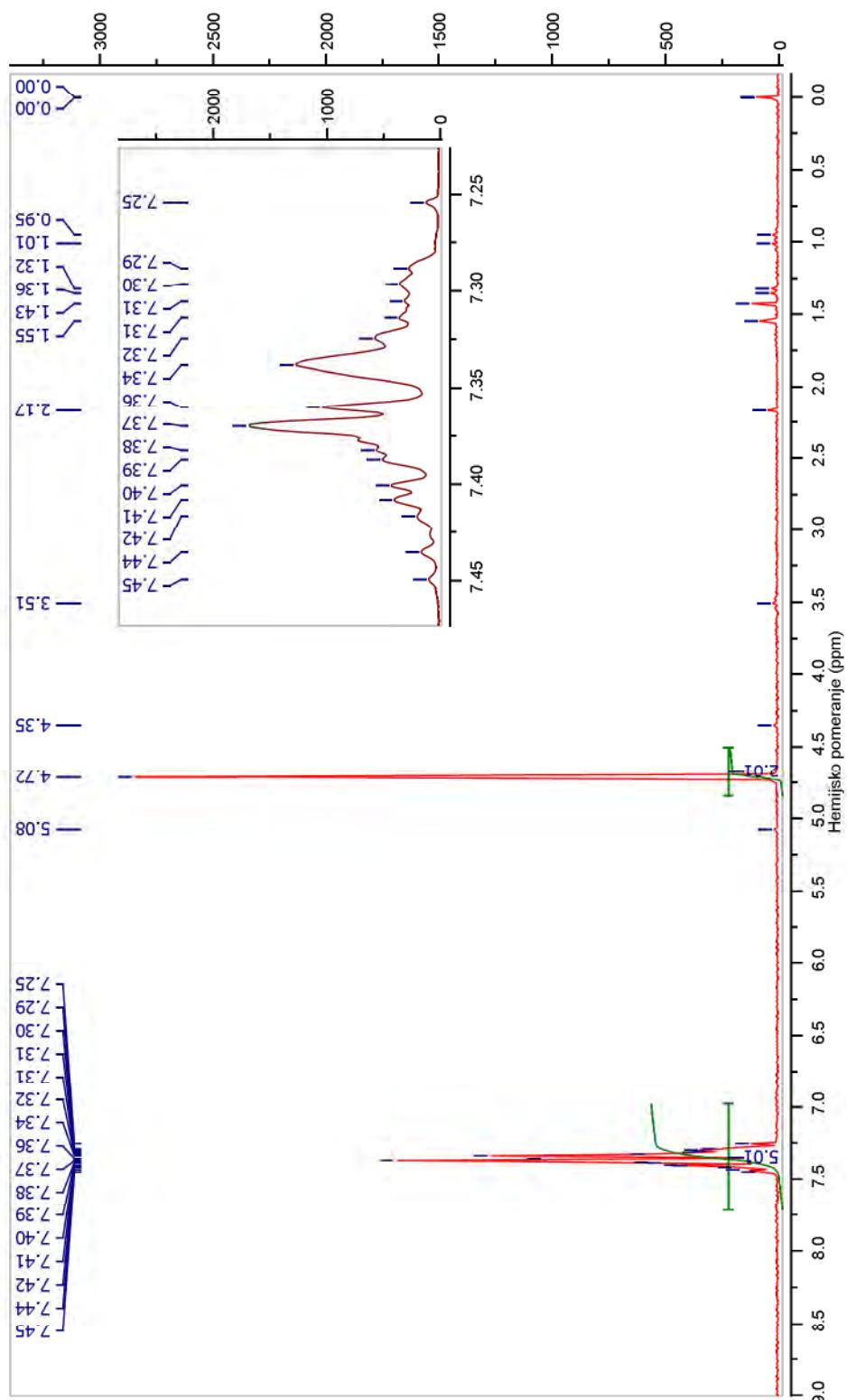
9.49. IR spektar 3-metoksibenzil-izotiocijanata (162b)

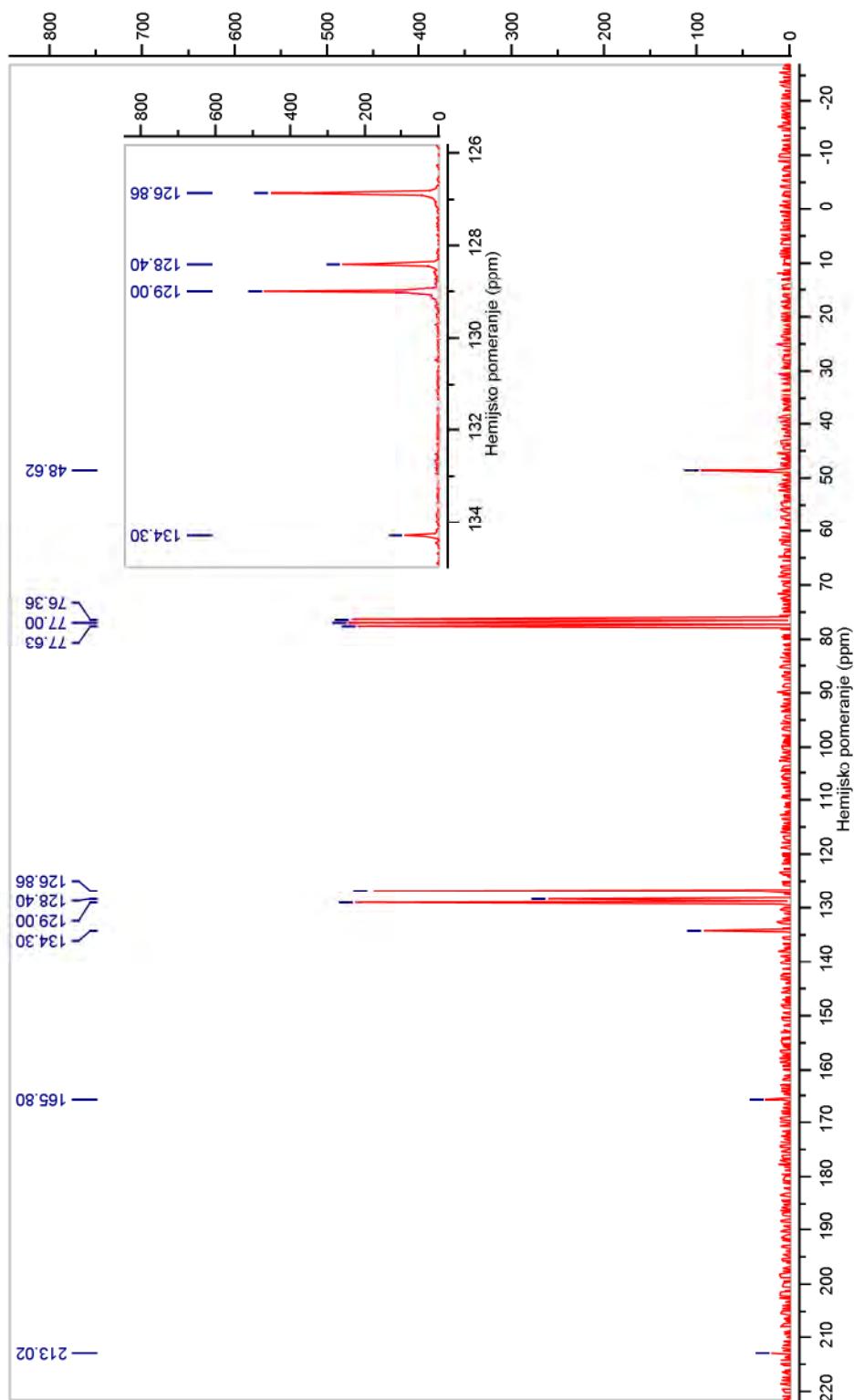
9.50. TIC Hromatogram i MS spektar 4-metoksibenzil-izotiocijanata (162c)

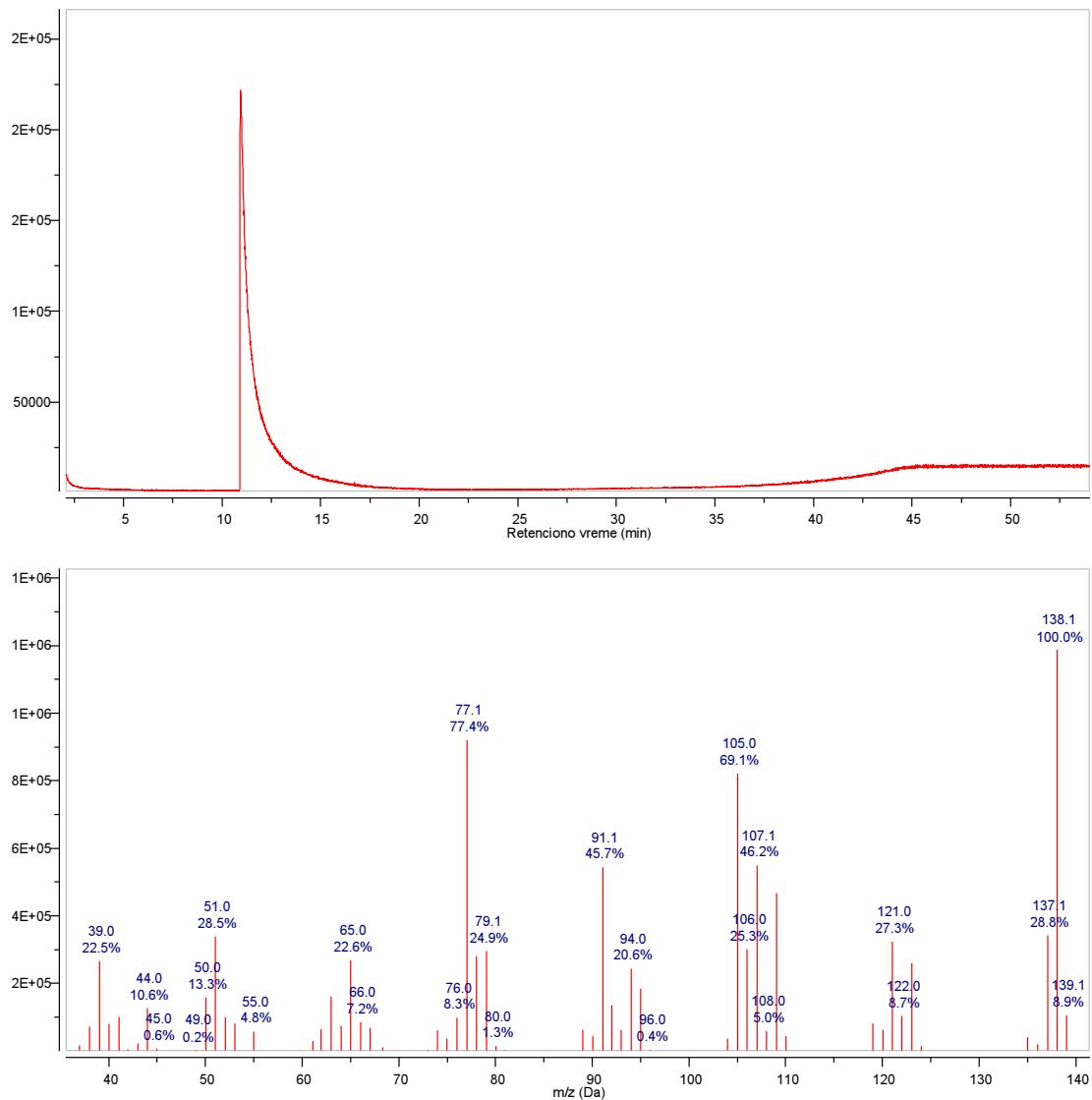
9.51. IR spektar 4-metoksibenzil-izotiocijanata (162c)

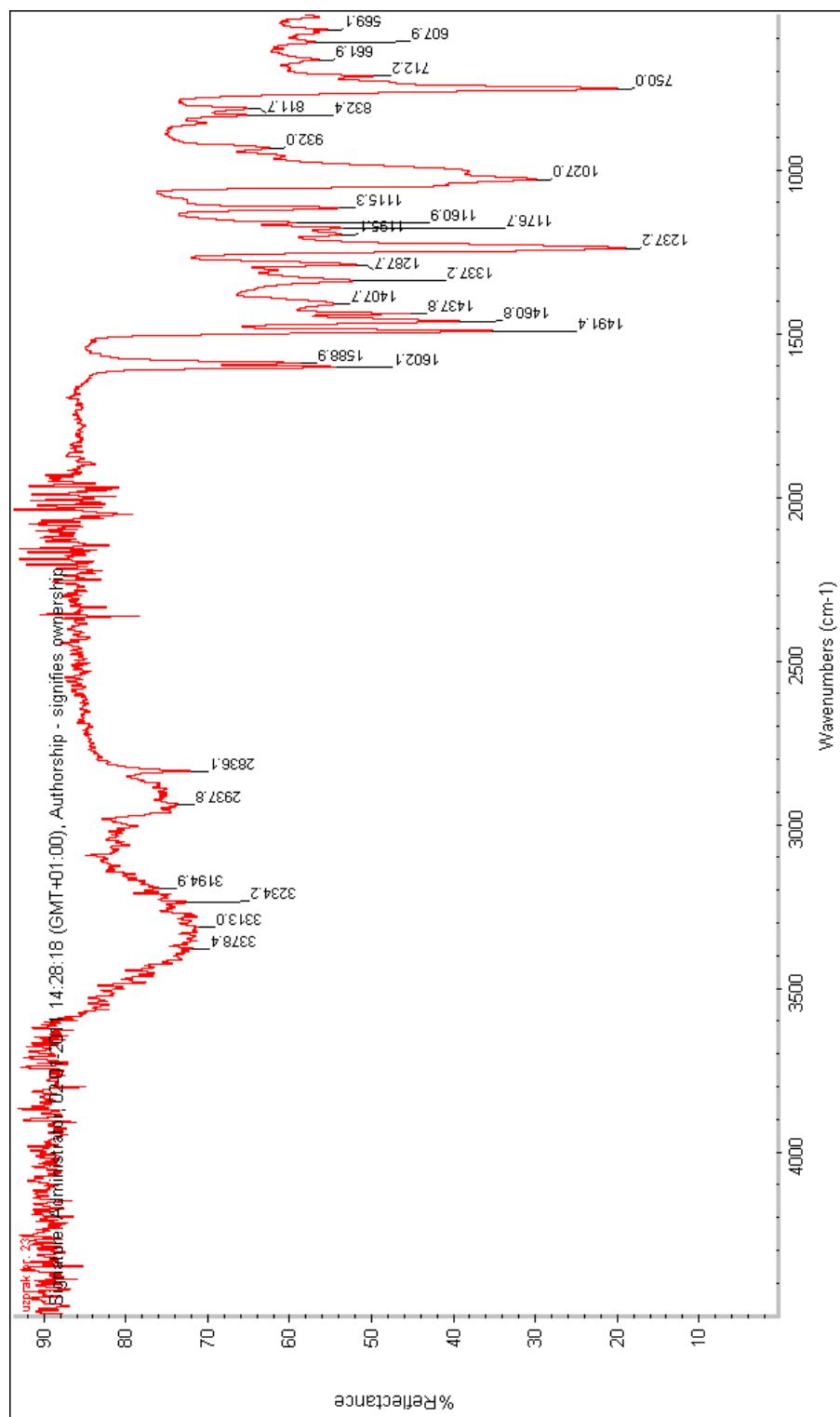
9.52. TIC Hromatogram i MS spektar benzil-izotiocijanata (162d)

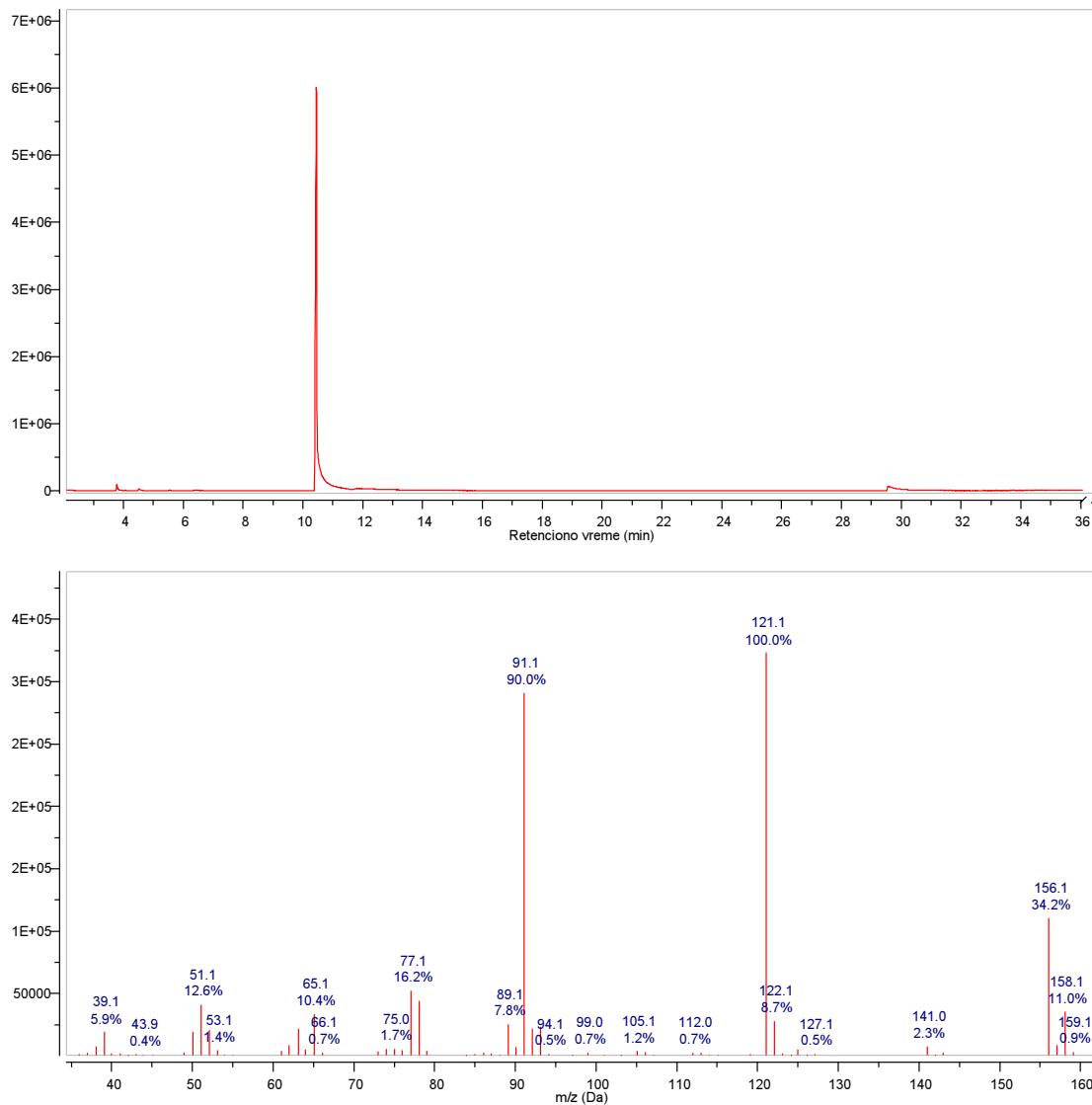
9.53. IR spektar benzil-izotiocijanata (162d)

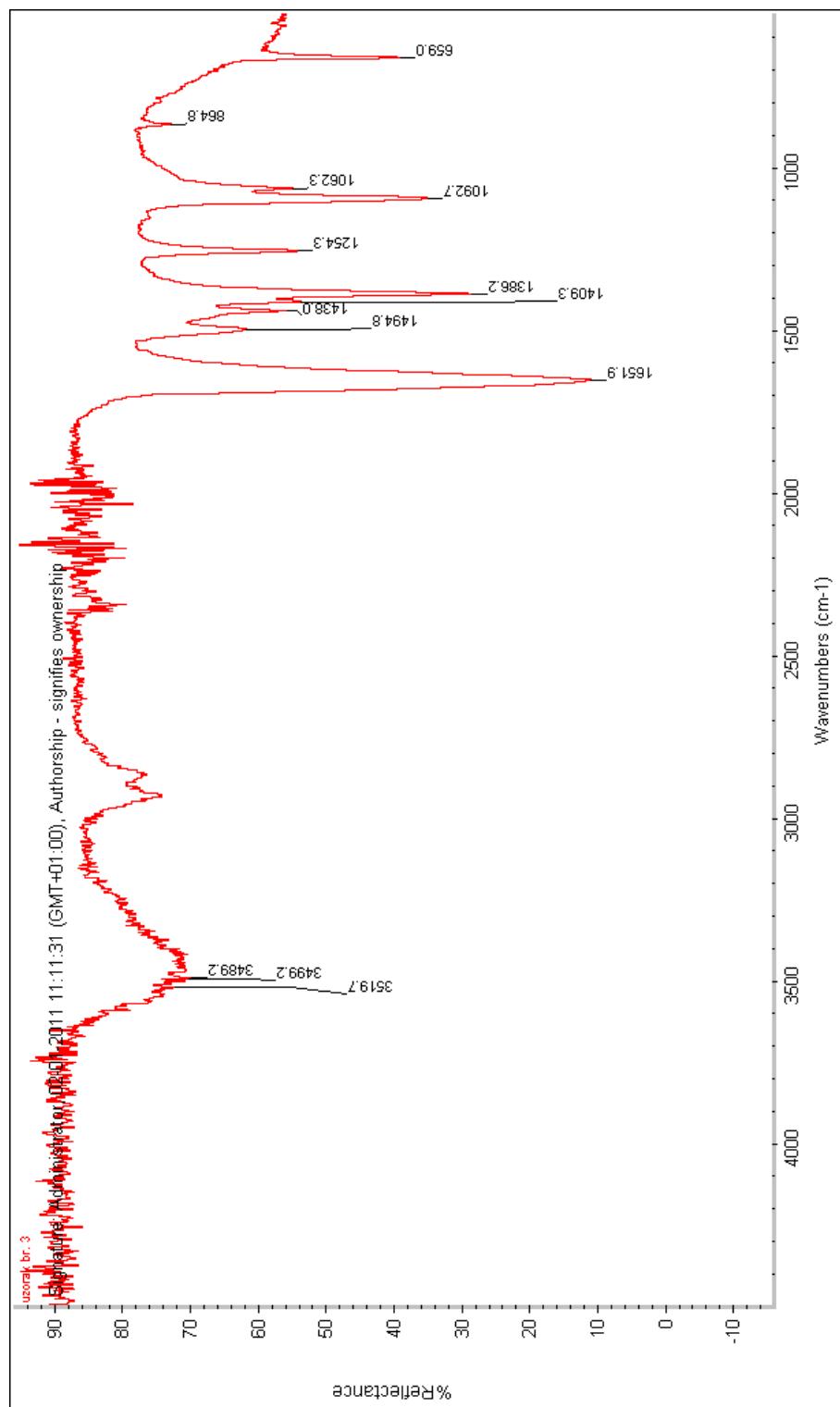
9.54. ^1H NMR spektar benzil-izotiocijanata (162d)

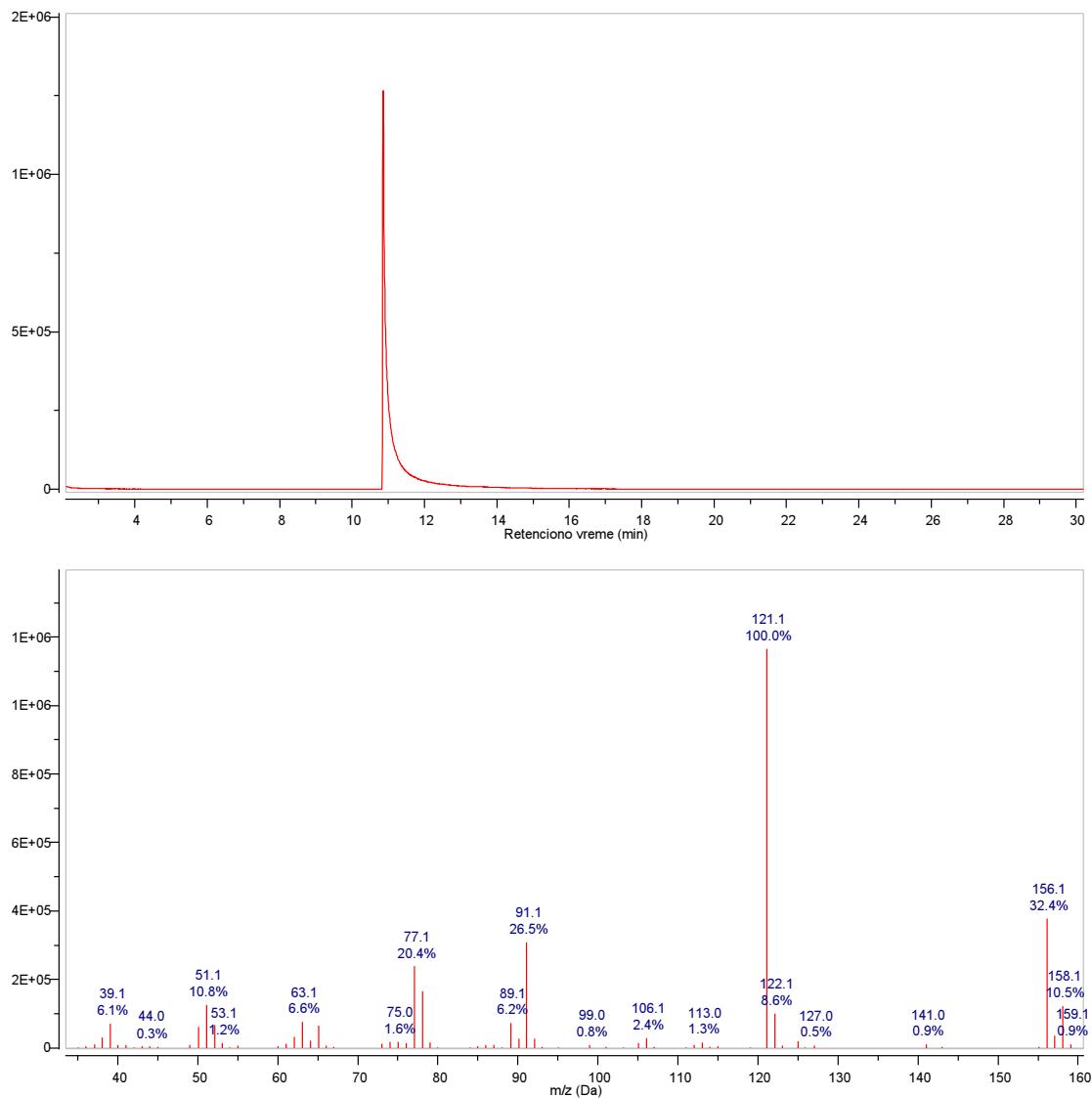
9.55. ^{13}C NMR spektar benzil-izotiocijanata (162d)

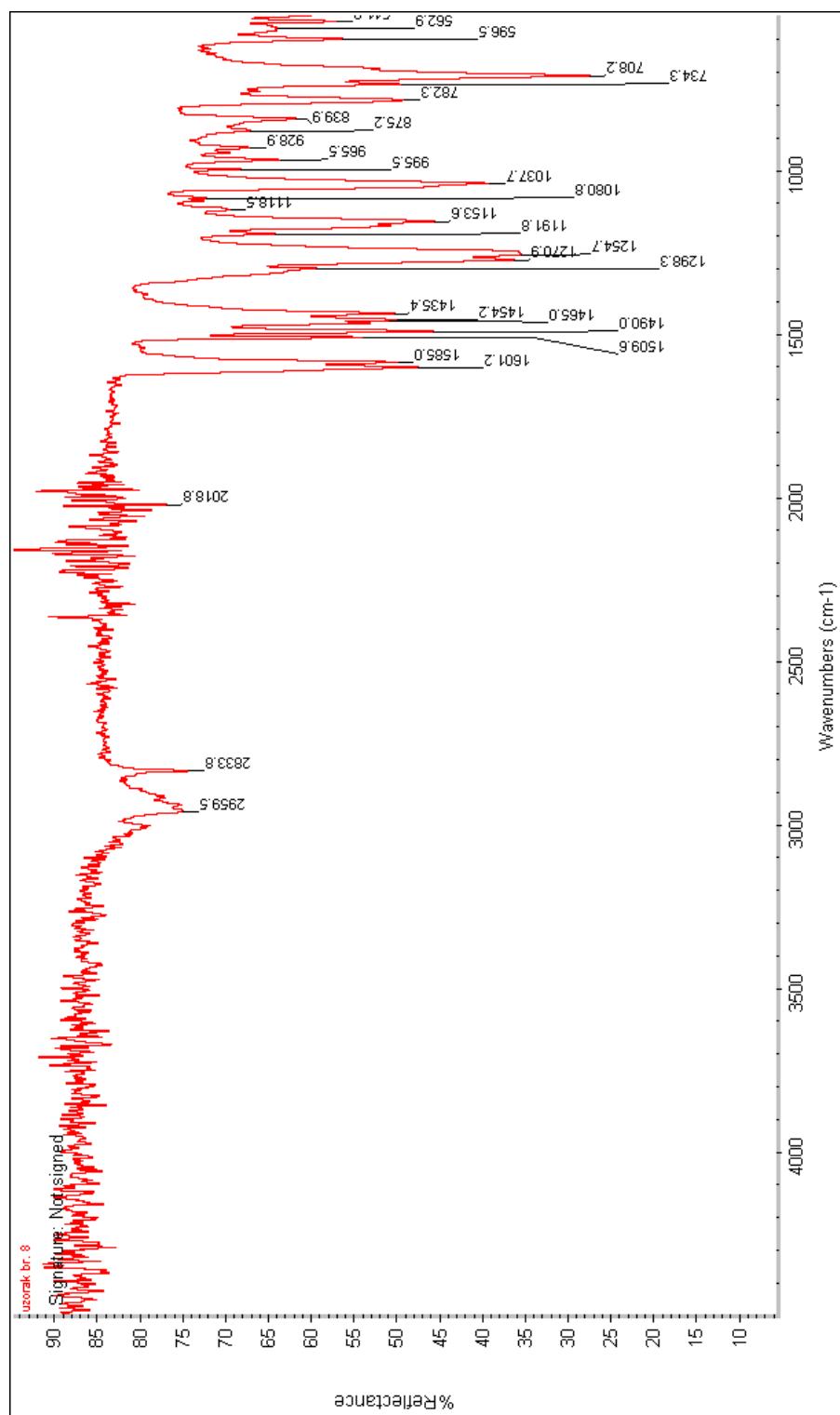
9.56. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzil-alkohola (163a)

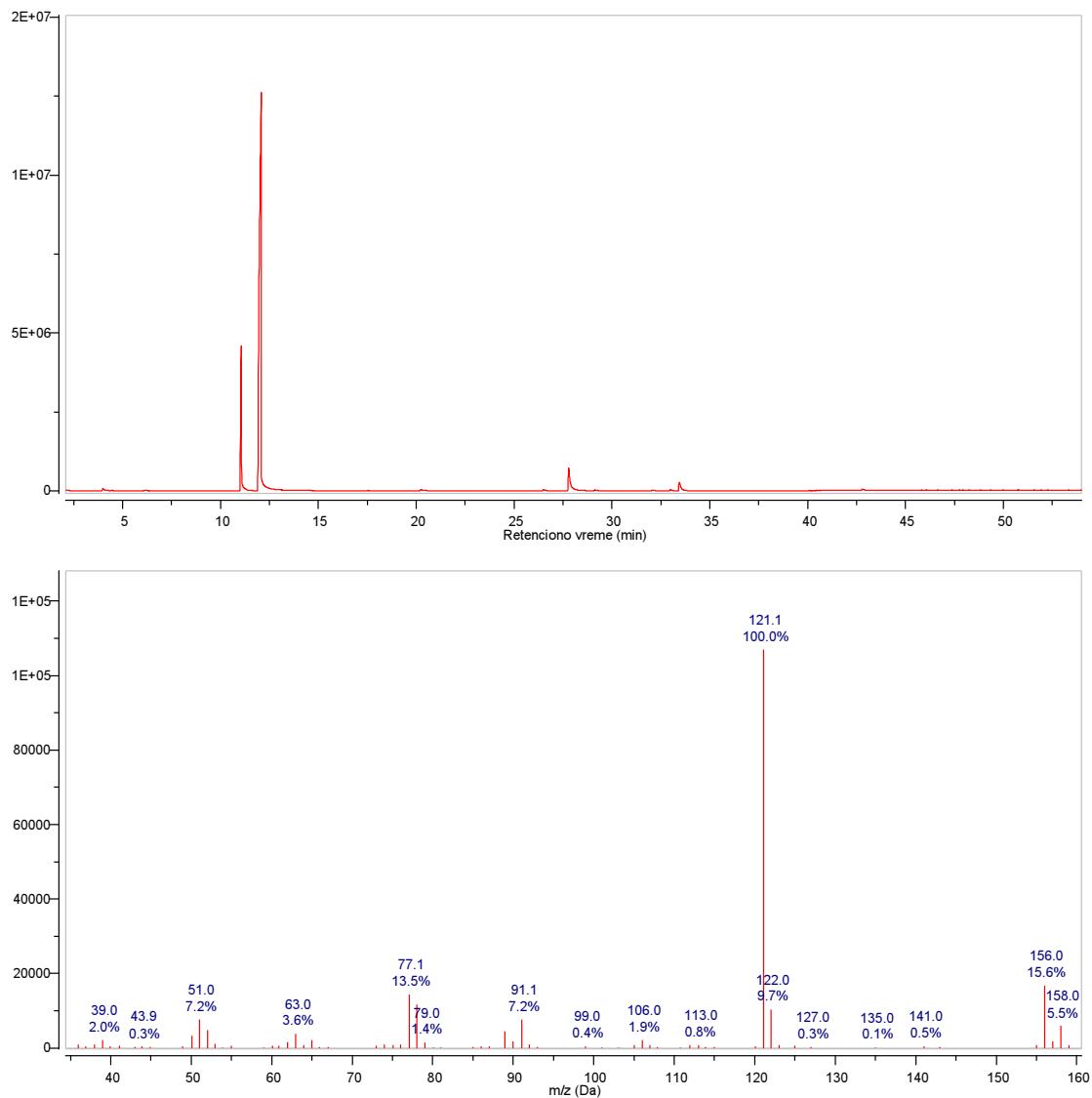
9.57. IR spektar 2-metoksibenzil-alkohola (163a)

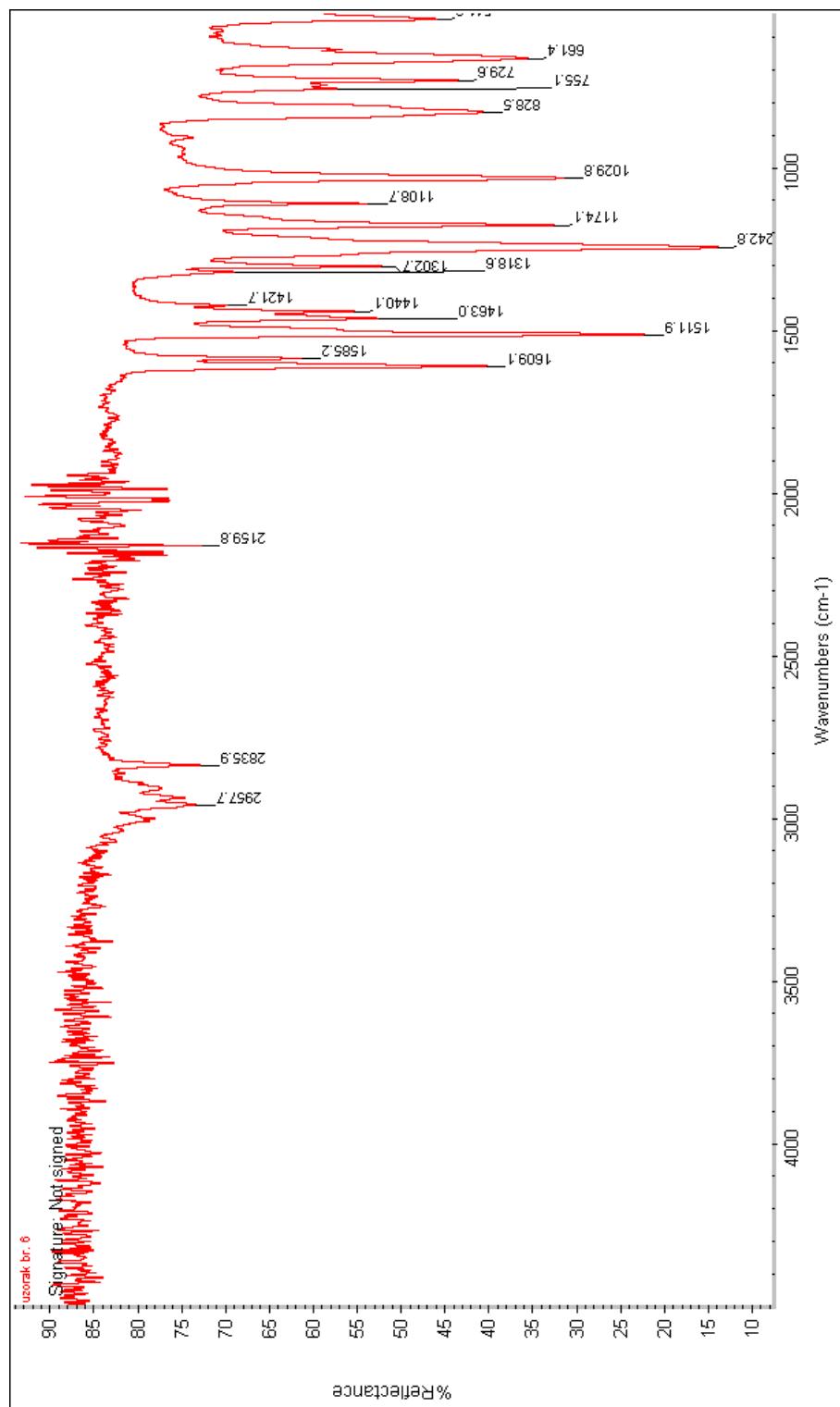
9.58. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzil-hlorida (165a)

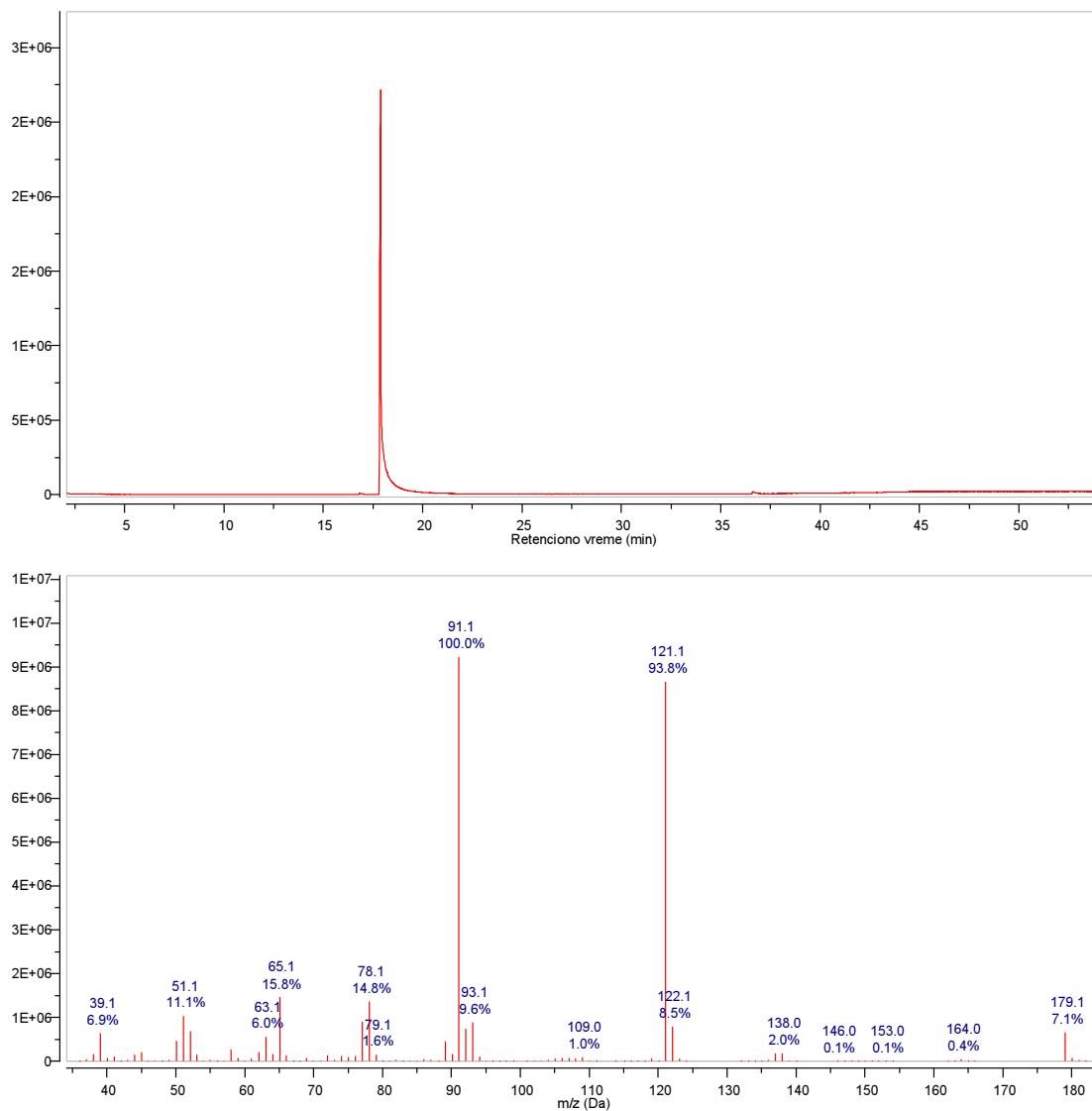
9.59. IR spektar 2-metoksibenzil-hlorida (165a)

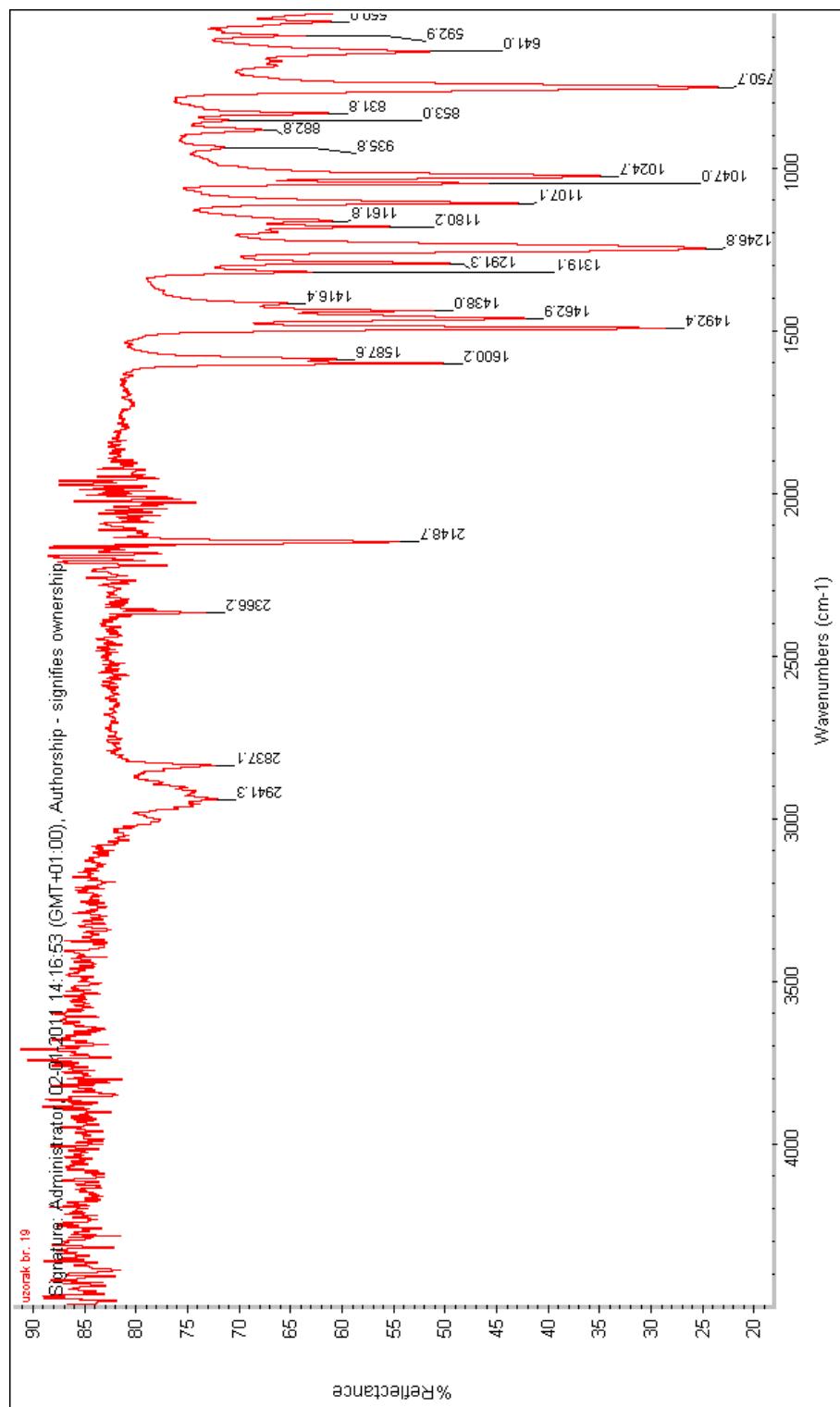
9.60. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksibenzil-hlorida (165b)

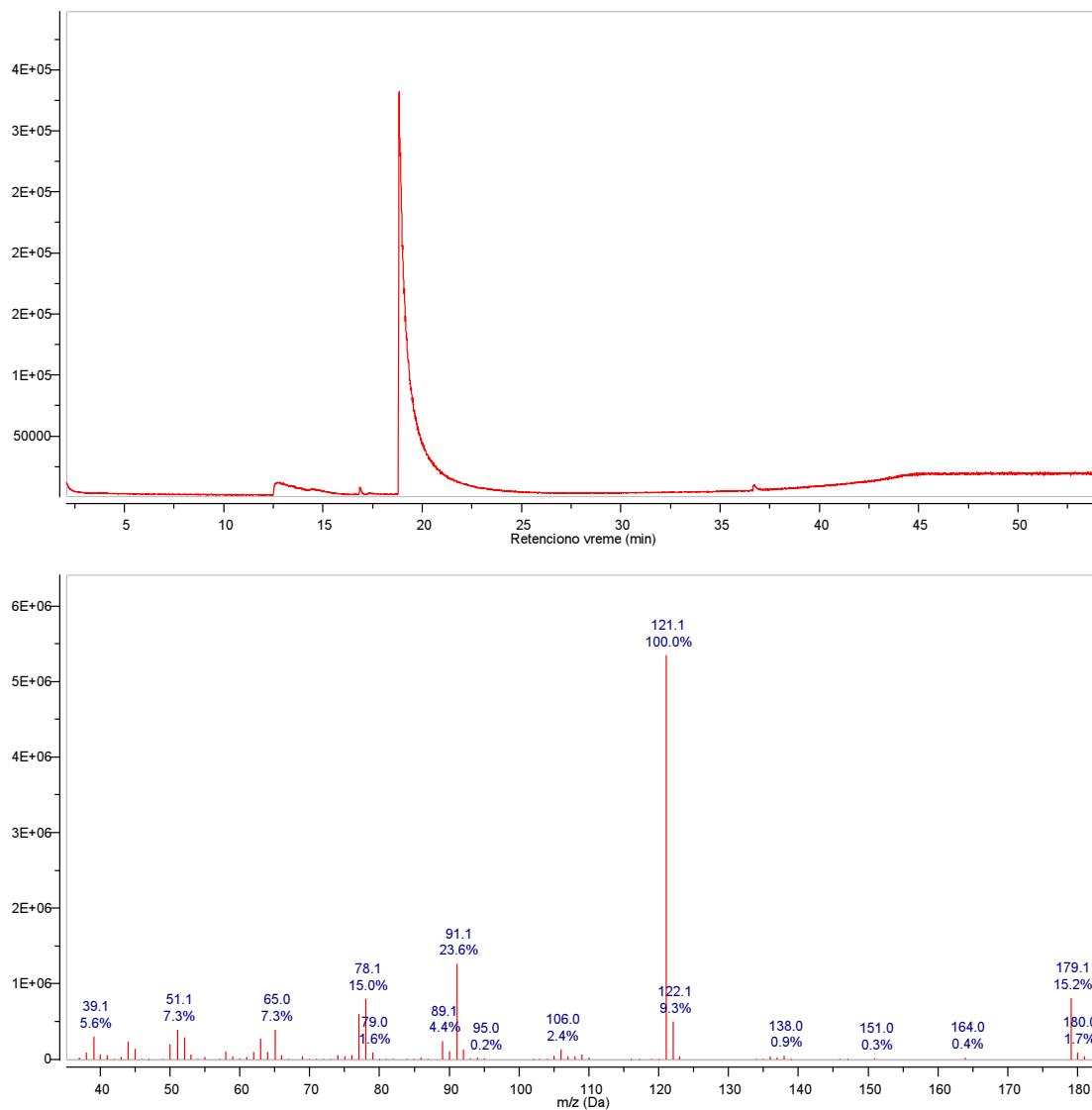
9.61. IR spektar 3-metoksibenzil-hlorida (165b)

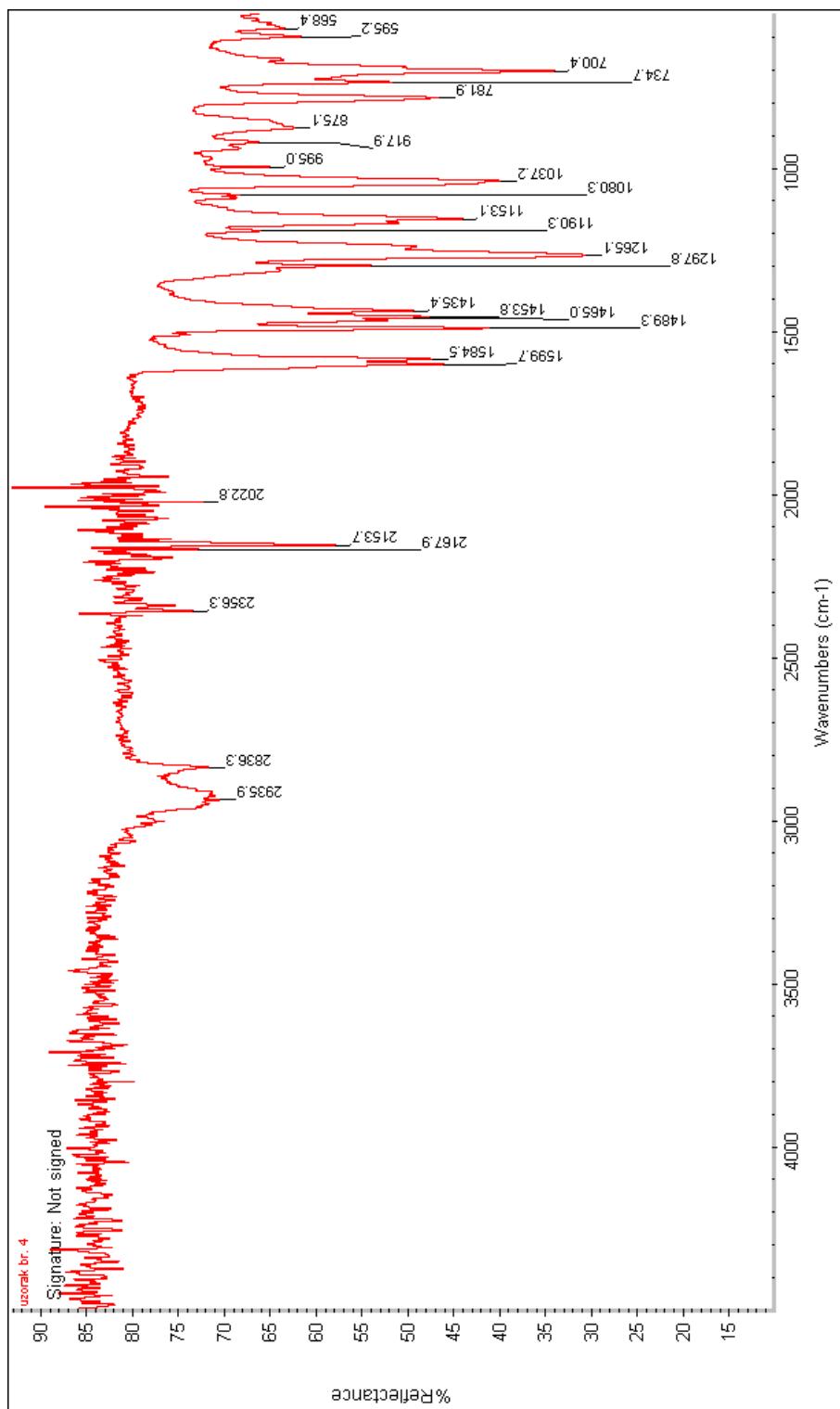
9.62. TIC Hromatogram i MS spektar 4-metoksibenzil-hlorida (165c)

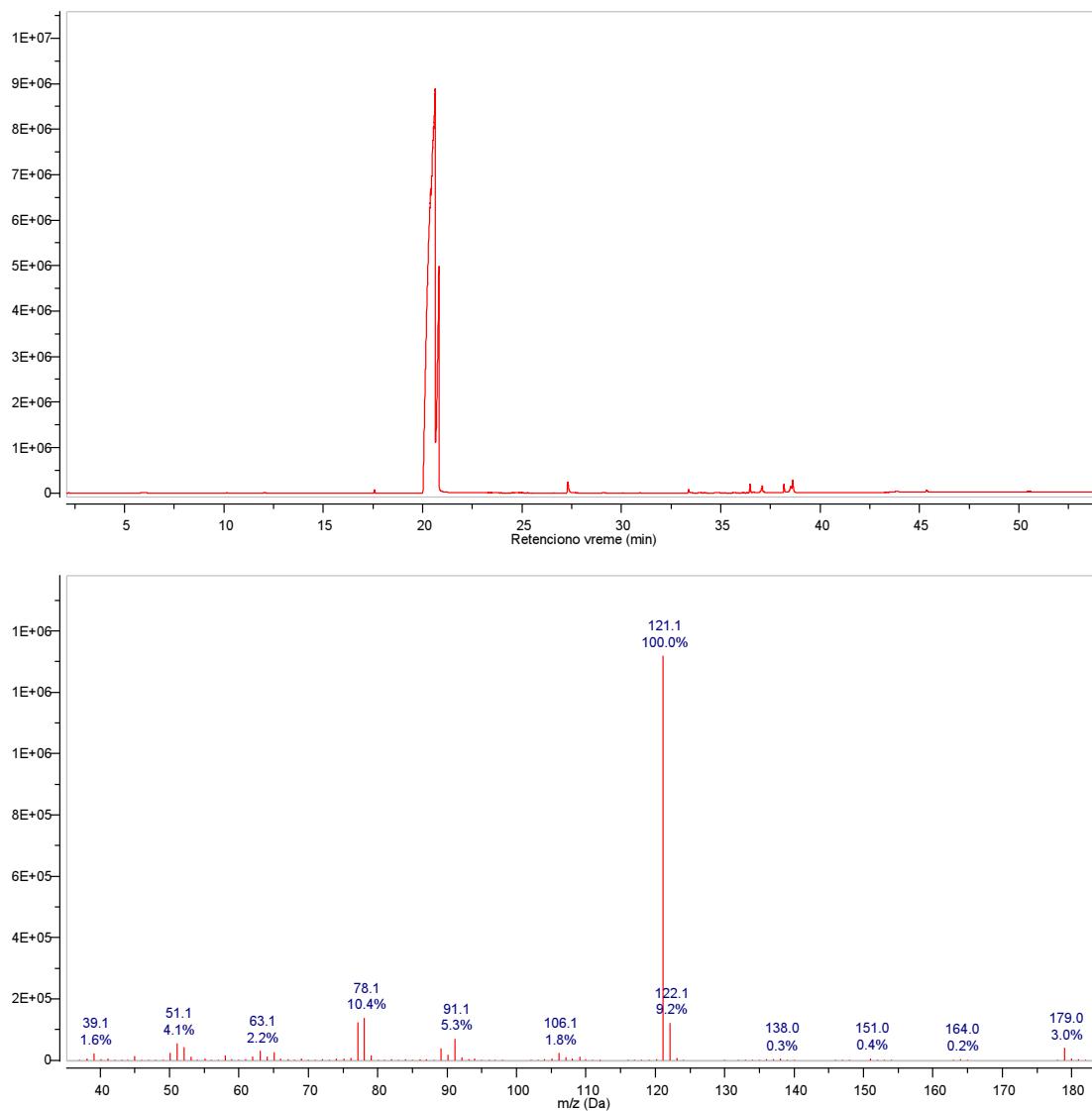
9.63. IR spektar 4-metoksibenzil-hlorida (165c)

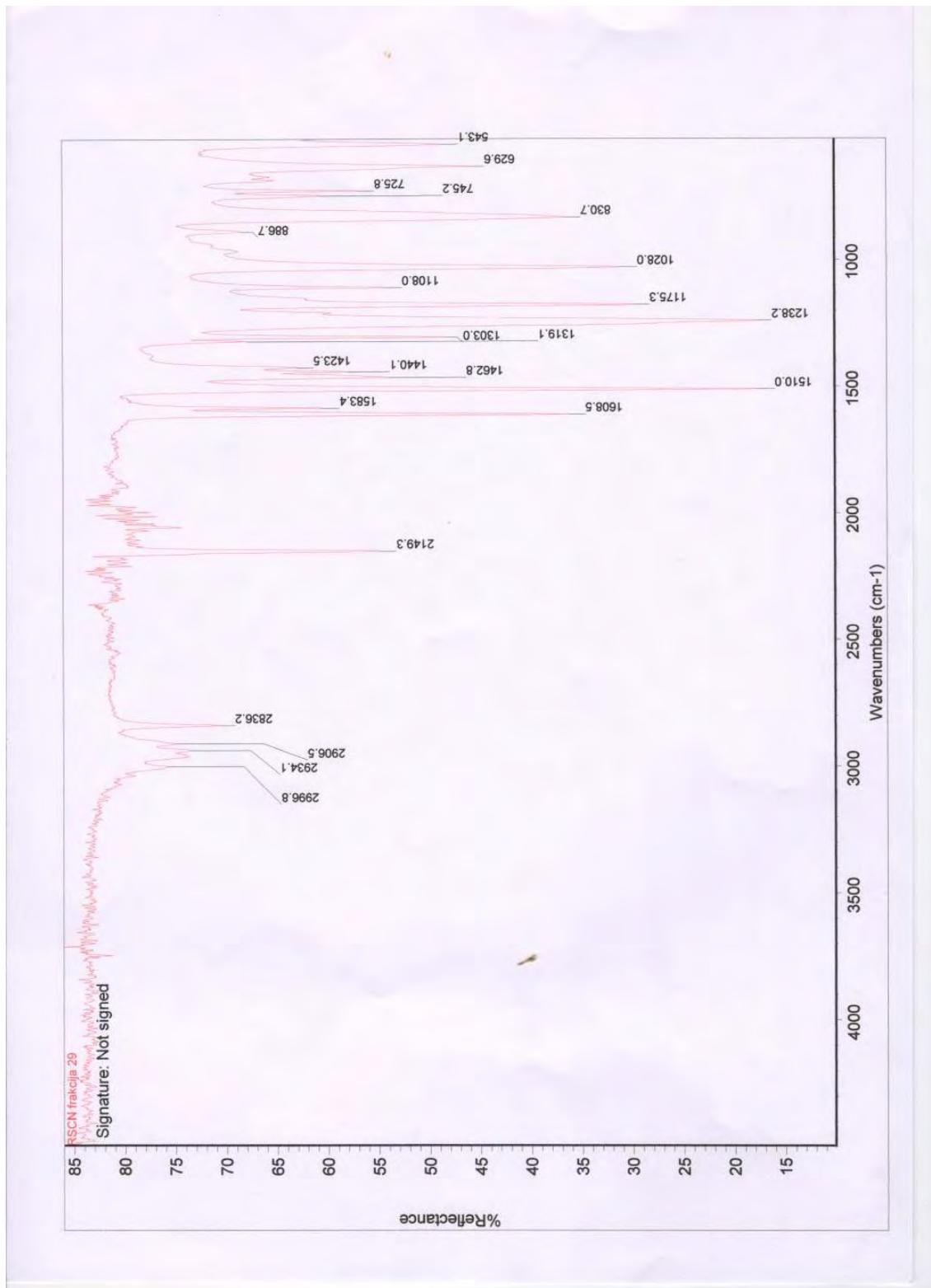
9.64. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksibenzil-tiocijanata (166a)

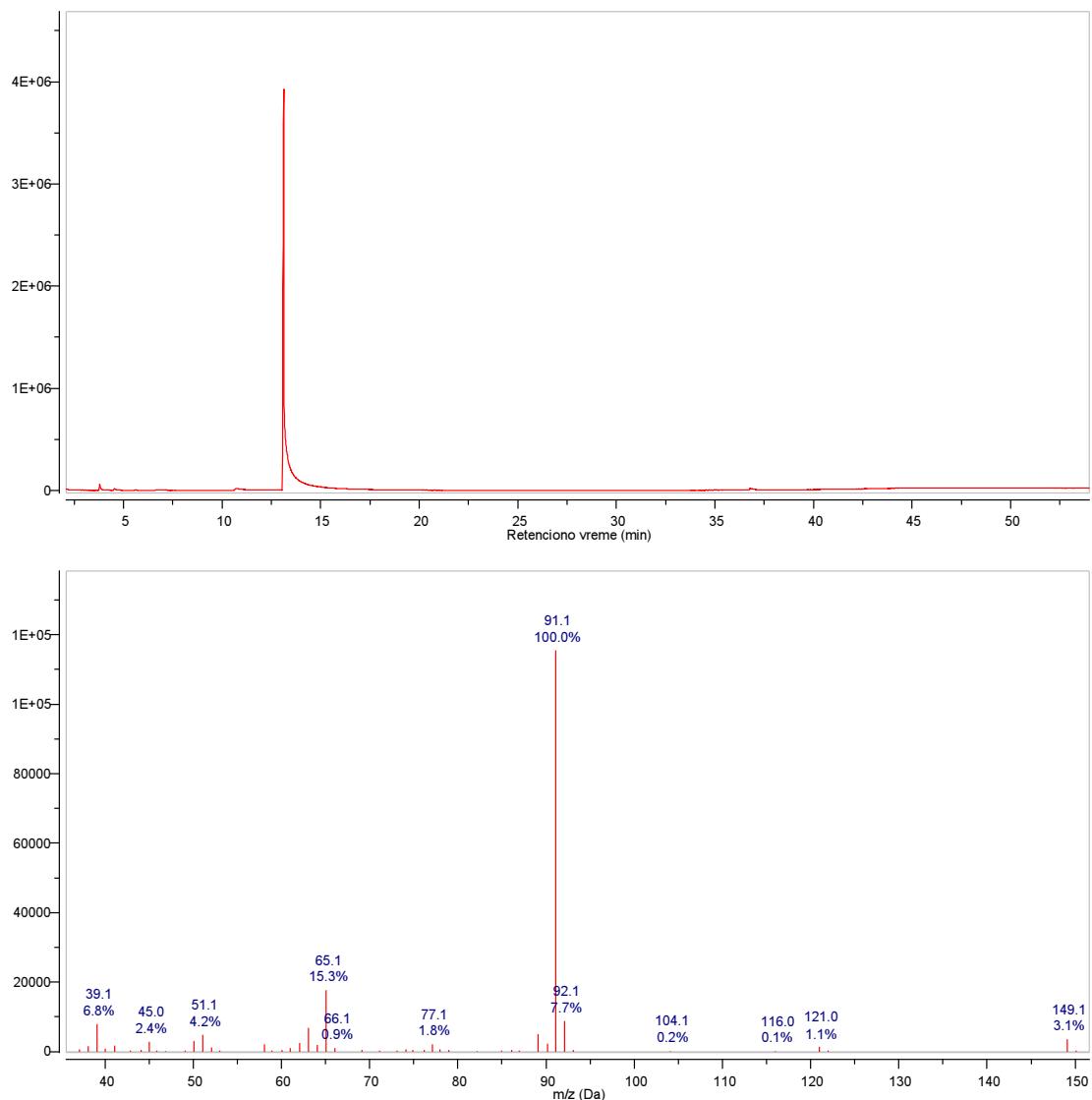
9.65. IR spektar 2-metoksibenzil-tiocijanata (166a)

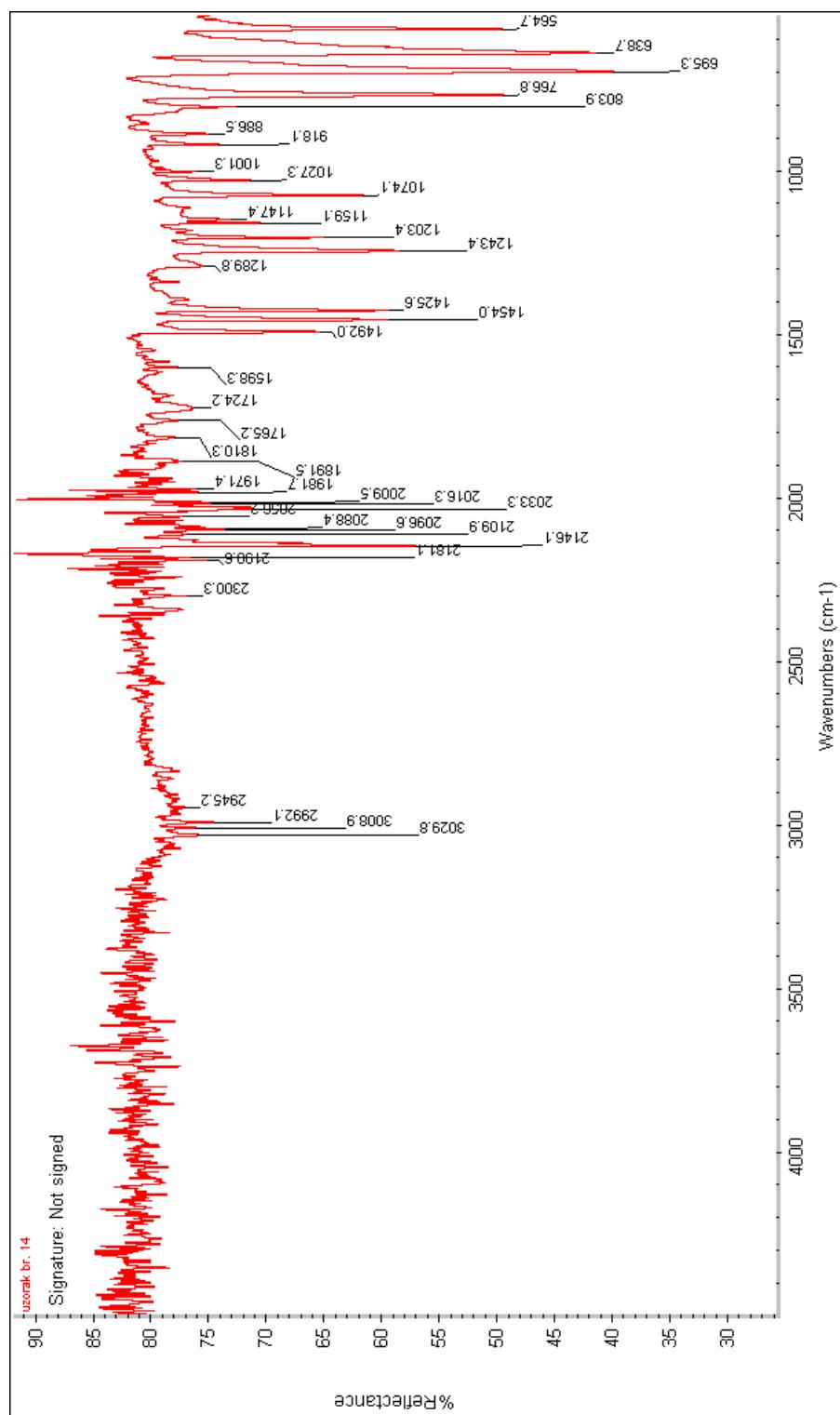
9.66. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksibenzil-tiocijanata (166b)

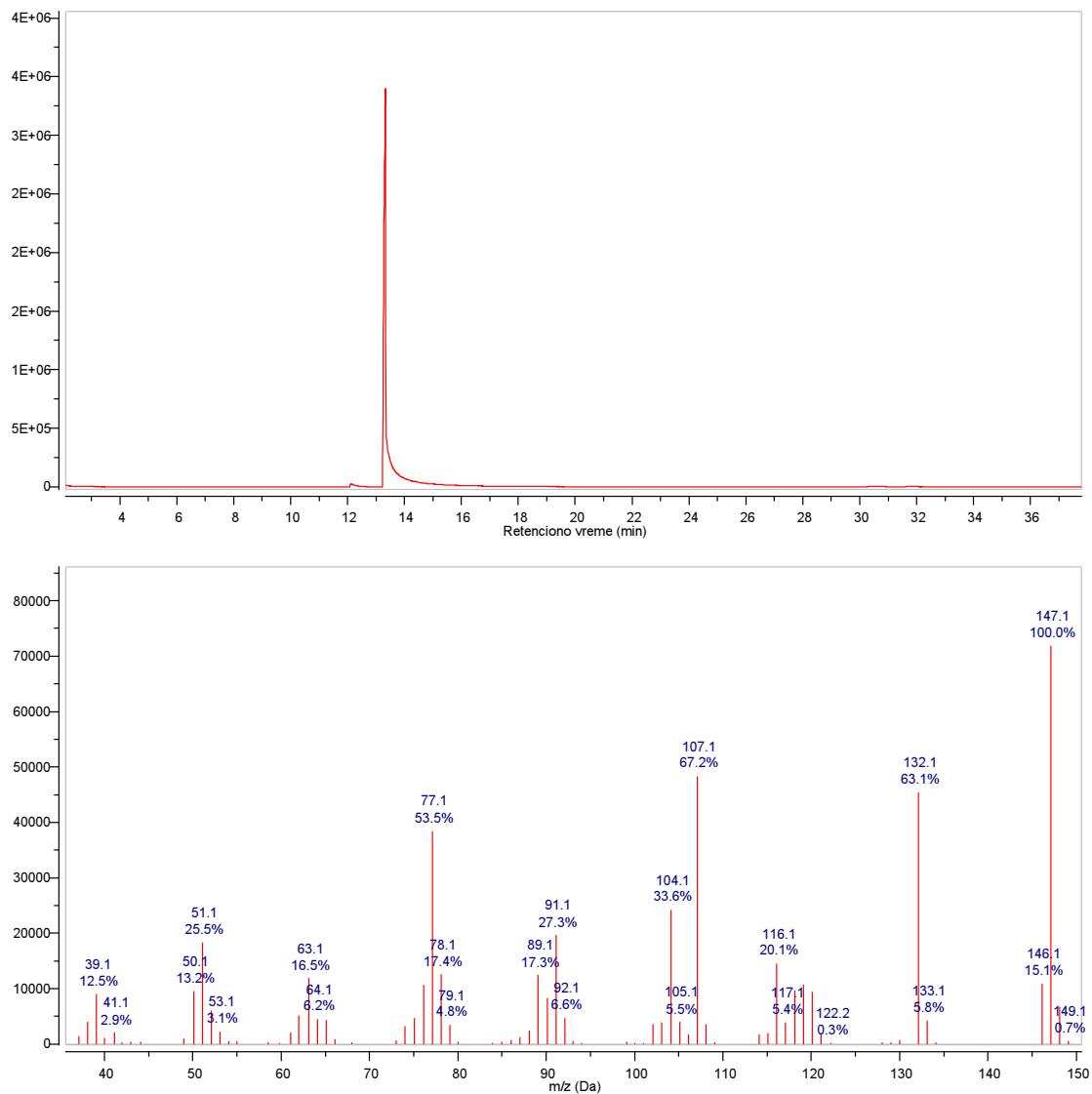
9.67. IR spektar 3-metoksibenzil-tiocijanata (166b)

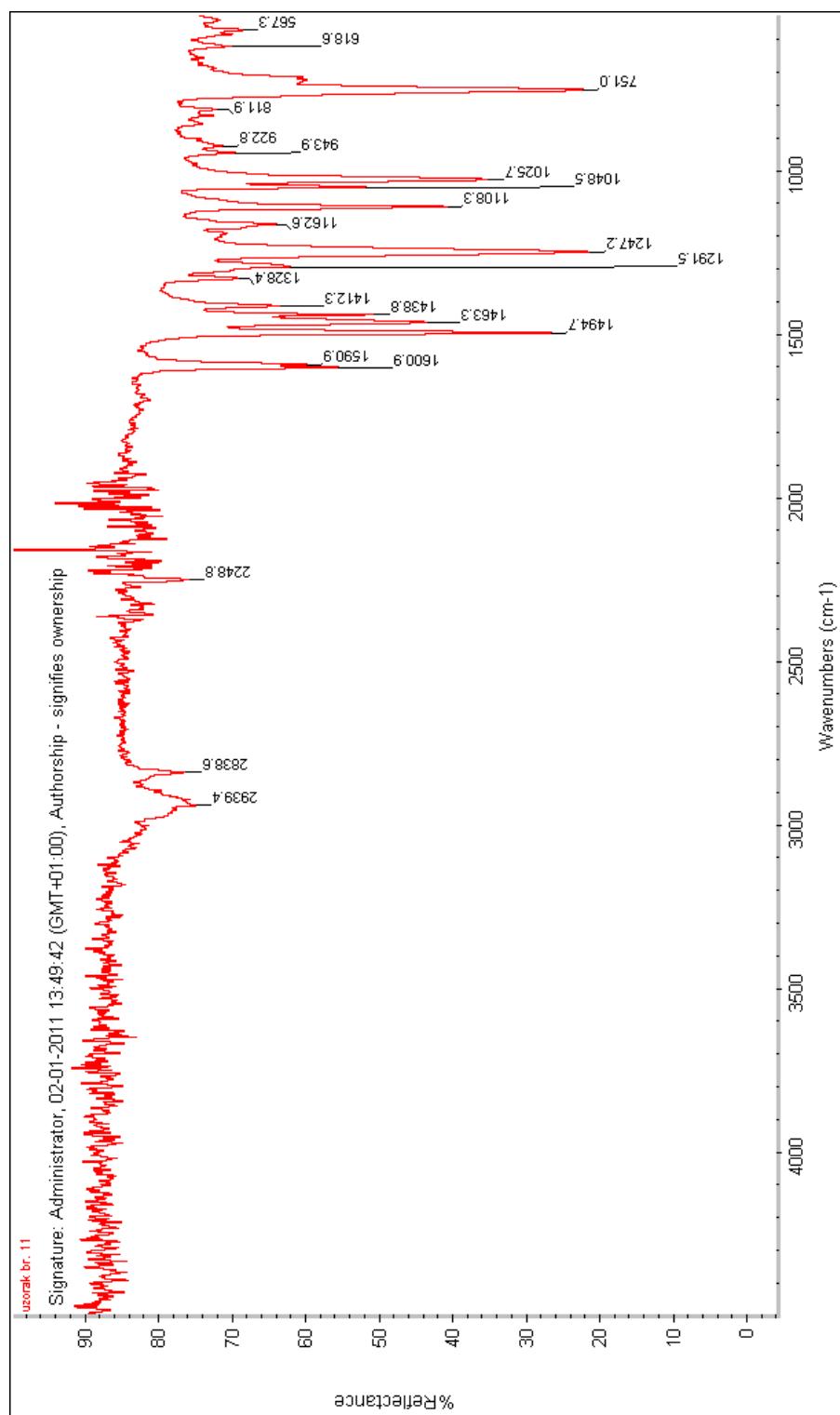
9.68. TIC Hromatogram i MS spektar 4-metoksibenzil-tiocijanata (166c)

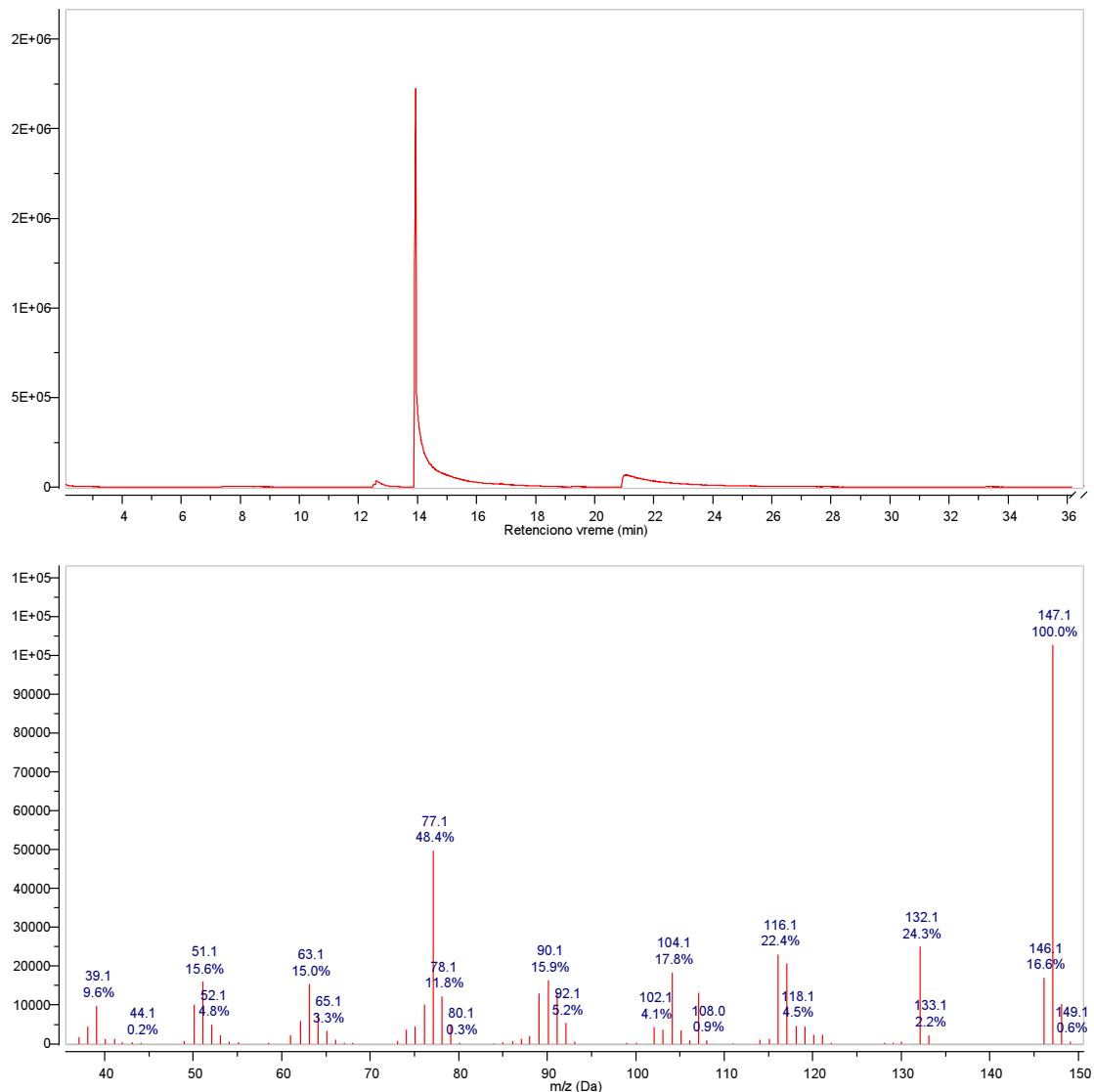
9.69. IR spektar 4-metoksibenzil-tiocijanata (166c)

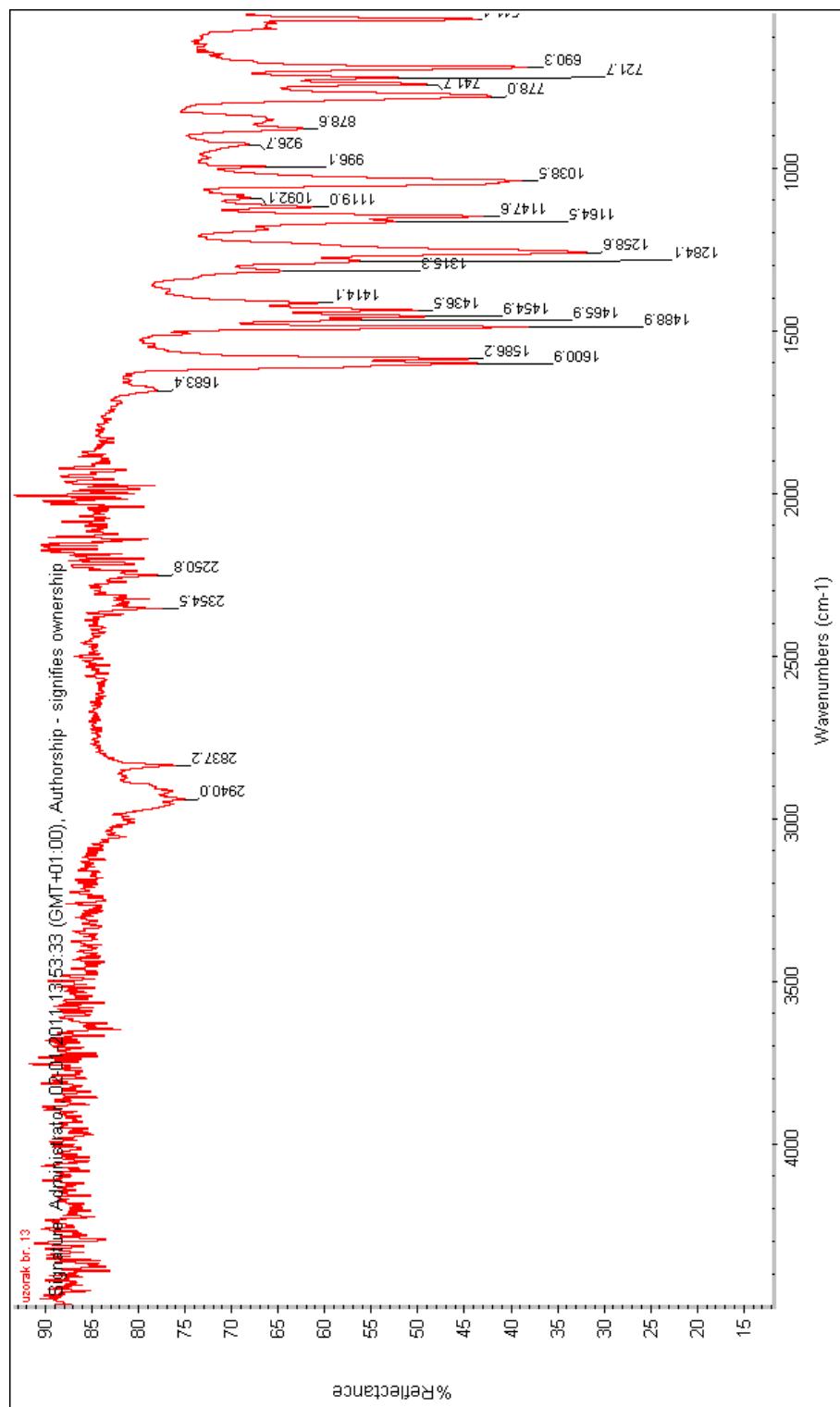
9.70. TIC Hromatogram i MS spektar benzil-tiocijanata (166d)

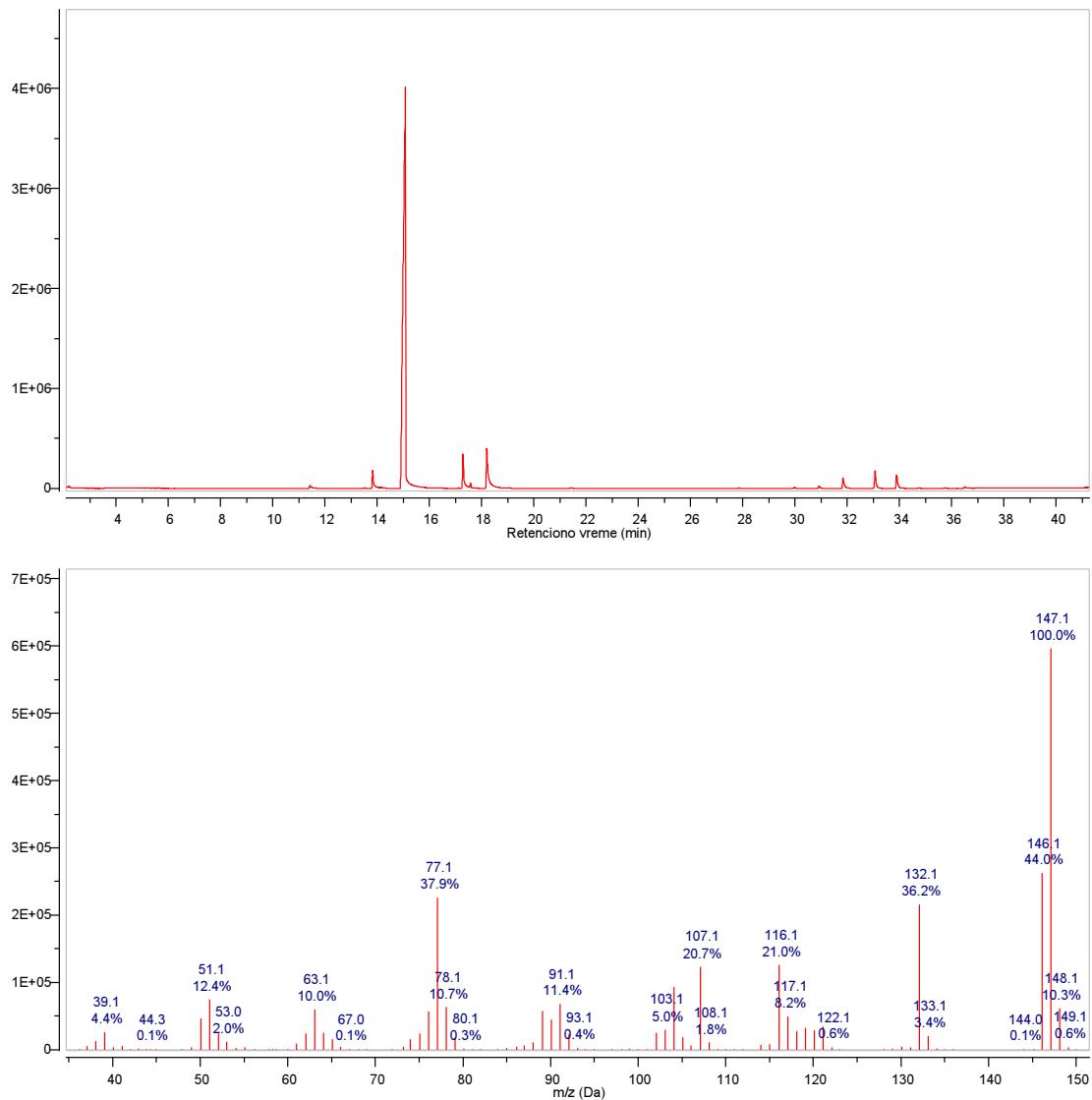
9.71. IR spektar benzil-tiocijanata (166d)

9.72. TIC Hromatogram i MS spektar 2-metoksifenilacetonitrila (167a)

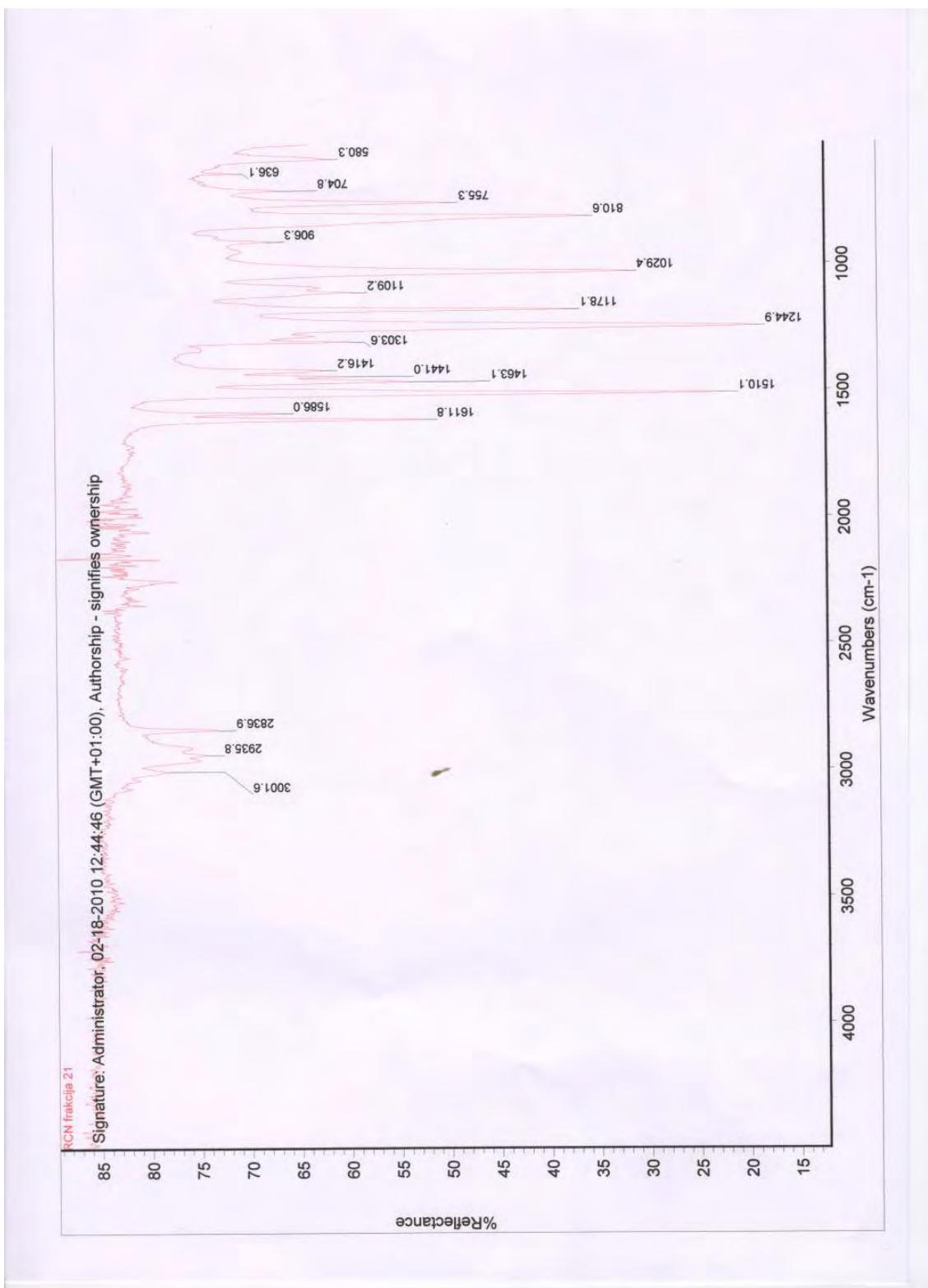
9.73. IR spektar 2-metoksifenilacetonitrila (167a)

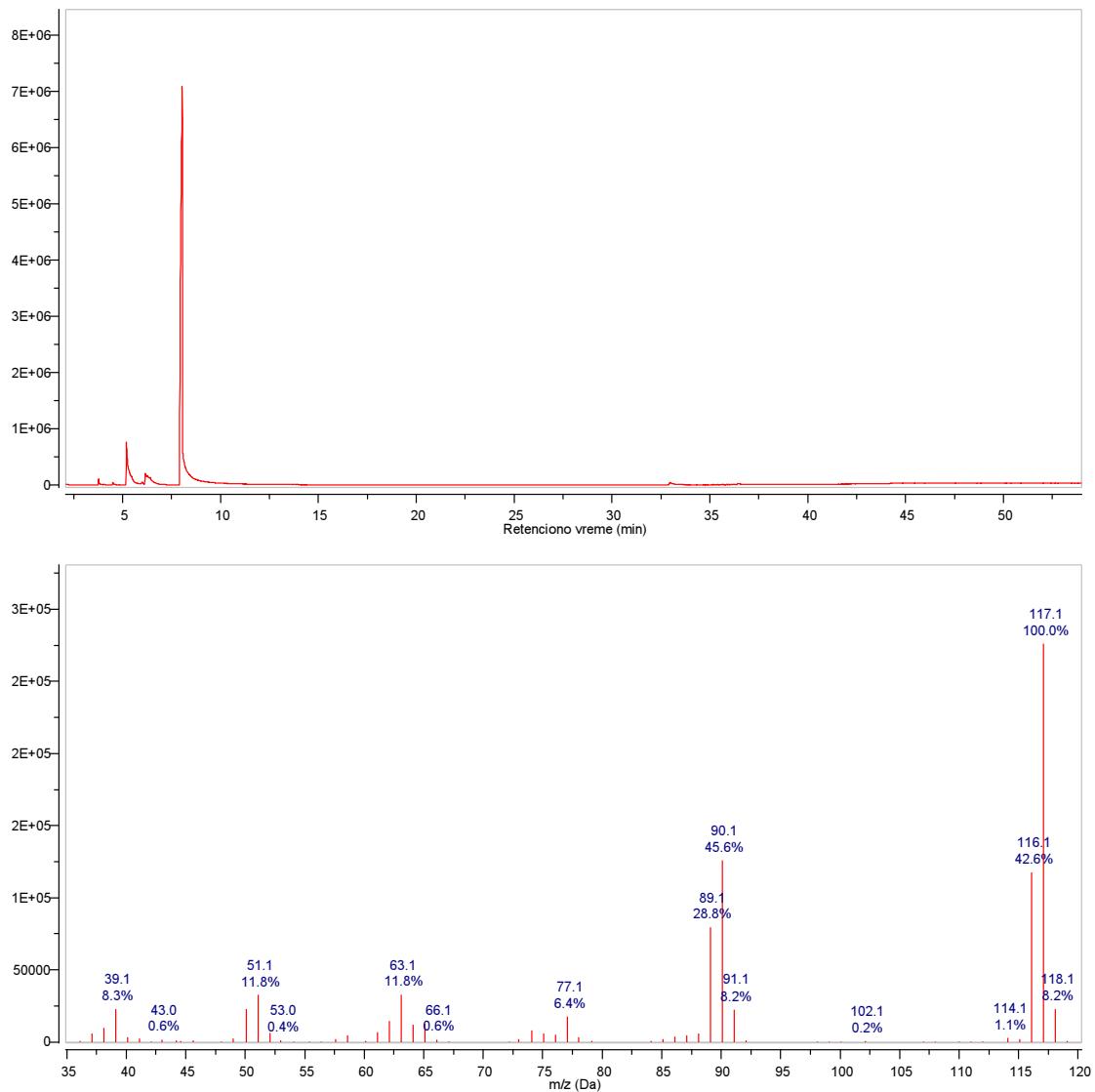
9.74. TIC Hromatogram i MS spektar 3-metoksifenilacetonitrila (167b)

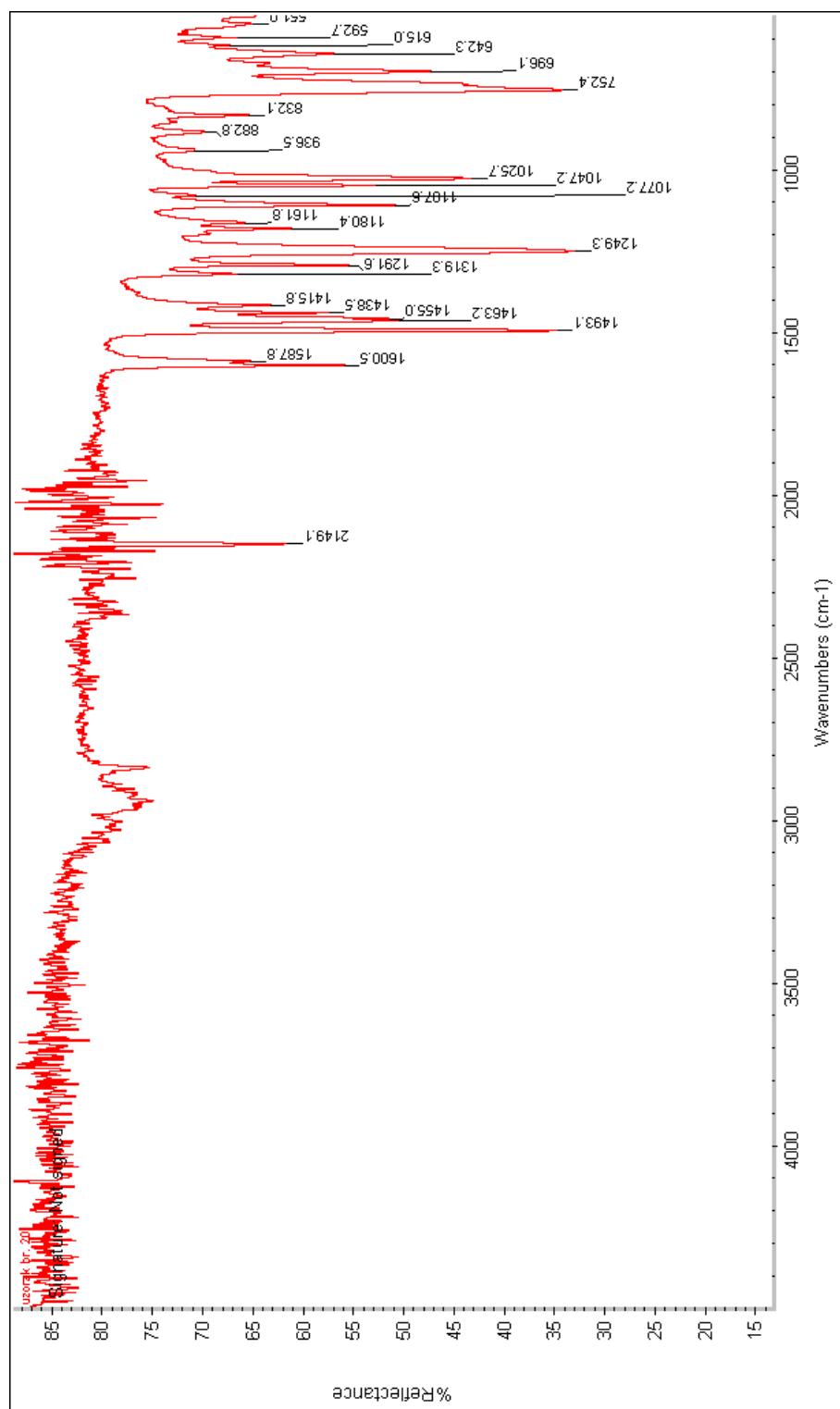
9.75. IR spektar 3-metoksifenilacetonitrila (167b)

9.76. TIC Hromatogram i MS spektar 4-metoksifenilacetonitrila (167c)

9.77. IR spektar 4-metoksifenilacetonitrila (167c)



9.78. TIC Hromatogram i MS spektar fenilacetonitrila (167d)

9.79. IR spektar fenilacetonitrila (167d)

**BIOGRAFIJA SA
BIBLIOGRAFIJOM**

Mr Milan Dekić je rođen 13.03.1980. godine u Lipljanu, gde je završio osnovnu i srednju školu sa odličnim uspehom. Na Odsek za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Prištini upisao se 1998. godine, gde je i diplomirao 2005. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 9,72 i ocenom 10 za izradu i odbranu diplomskog rada. Školske 2005/2006. godine upisao je poslediplomske studije na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, smer Organsko-biohemički, gde je 2008. godine odbranio magistarsku tezu.

Od 01.12.2007. god. zaposlen je na Državnom Univerzitetu u Novom Pazaru na radnom mestu saradnika u centru za naučno-istraživački rad, odnosno asistenta (od 16.09.2010. godine), gde učestvuje u izvođenju vežbi iz predmeta Organska hemija, Biohemija, Hemija prirodnih proizvoda, Viša organska hemija i Instrumentalna analitička hemija na studijskim programima Hemija, Prehrambena tehnologija i Biologija. Dana 15.09.2010. godine izabran je u zvanje istraživač-saradnik za užu naučnu oblast Organska hemija i biohemija na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu.

Iz oblasti doktorske disertacije objavljen je jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M_{22}), četiri rada u međunarodnim časopisima kategorije M_{23} i jedno saopštenje na međunarodnom skupu, štampano u izvodu (M_{34}).

Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Stojanović-Radić, Zorica Z.; A new antimicrobial glucosinolate autolysis product, 4-isothiocyanatobutanoic acid, from the diffuse wallflower (*Erysimum diffusum*): methyl 4-isothiocyanatobutanoate, a long unrecognized artifact of the isolation procedure? *Food Chemistry* (rad prihvaćen za štampu)

Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Stojanović-Radić, Zorica Z.; Zoranić, Suad K. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) Essential Oil: A Potent Agent Against *Bacillus subtilis*. *Chemistry & Biodiversity* (2010), 7(11), 2783-2800.

Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Stojanović-Radić, Zorica Z.; Palić, Radosav M. Volatile constituents of *Erodium cicutarium* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae) from Serbia. *Central European Journal of Biology* (2009), 4(3), 404-410.

Stojanović-Radić, Zorica Z.; Čomić, Ljiljana R.; Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Randjelović, Vladimir N.; Stefanović, Olgica. Chemical composition and antimicrobial activity of *Erodium* species: *E. ciconium* L., *E. cicutarium* L., and *E. absinthoides* Willd. (Geraniaceae). *Chemical Papers* (2010), 64(3), 368-377.

Radulović, Niko.; Dekić, Milan; Stojanović-Radić, Zorica; Palić, Radosav. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium*

columbinum L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turkish Journal of Chemistry* (rad prihvaćen za štampu) doi: 10.3906/kim-1002-43.

Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Stojanović-Radić, Zorica Z.; Palić, Radosav M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Volatile Oils of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae). *Medicinal Chemistry Research* (rad prihvaćen za štampu)

Radulović, Niko S.; Dekić, Milan S.; Stojanović-Radić, Zorica Z.; Palić, Radosav M. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) Essential Oil: A Potent Agent Against *Bacillus subtilis*. 41th International Symposium on Essential Oils (2010), Wroclaw, Poland.