



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милена З. Живковић Стошић

**ИДЕНТИФИКАЦИЈА И СИНТЕЗА
ОДАБРАНИХ САСТОЈАКА ВОСКОВА
БИЉНИХ ВРСТА *Primula veris* L.,
Primula acaulis (L.) L. (Primulaceae) И
Liriodendron tulipifera L. (Magnoliaceae)**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Milena Z. Živković Stošić

**IDENTIFICATION AND SYNTHESIS OF
SELECTED WAX CONSTITUENTS OF
PLANT SPECIES *Primula veris* L.,
Primula acaulis (L.) L. (Primulaceae) AND
Liriodendron tulipifera L. (Magnoliaceae)**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

МЕНТОР:

др Нико Радуловић, редовни професор

Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

Департман за хемију

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Гордана Стојановић, редовни професор

Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

Департман за хемију

др Бојан Златковић, редовни професор

Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

Департман за биологију и екологију

др Милан Декић, ванредни професор

Државни универзитет у Новом Пазару

Департман за природно-математичке науке

др Марија Генчић, доцент

Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

Департман за хемију



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:	Милена З. Живковић Стошић
Ментор, МН:	Нико С. Радуловић
Наслов рада, НР:	Идентификација и синтеза одабраних састојака воскова биљних врста <i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L. (Primulaceae) и <i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Magnoliaceae)
Језик публикације, ЈП:	Српски
Језик извода, ЈИ:	Српски/енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	10 поглавља, 340 страна, 232 цитата, 81 слика, 43 табеле, 3 шеме, 53 прилога
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија, органске синтезе
Кључне речи, ПО:	<i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L., <i>Liriodendron tulipifera</i> L., восак, кутикула, испирак, биосинтеза, органска синтеза, алкани, алкени, бензил-естри масних киселина, алдехиди, алканони, 1-фенил-1,3-алкадирил-диацетати, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетати, 1-фенил-1,3-алкадиони, 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони, дуголанчани алкохоли, дуголанчане масне киселине, хидрокси-кетони
УДК	547.916 : 582.689.2 547.916 : 582.677.1
Чува се, ЧУ:	Библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део је рађен у Лабораторији за органску анализу и синтезу, Департман за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу.
Извод, ИЗ:	У овом раду приказани су резултати анализа хемијског састава испирака биљних врста <i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L. и <i>Liriodendron tulipifera</i> L. Показано је да су узорци испитиваних <i>Primula</i> врста богати дуголанчаним рачвастим алканима. По први пут, у узорцима природног порекла, идентификовано је 19 нових дуголанчаних <i>n</i> -, <i>iso</i> - и <i>anteiso</i> -бензил-естара масних киселина, као и 8 <i>iso</i> - и 6 <i>anteiso</i> -2-алканона. Биосинтеза већих количина парних <i>iso</i> -алкана и 2-алкана, као и <i>iso</i> -непарних бензил-естара јединствена је за <i>Primula</i> spp. Испирак врсте <i>P. veris</i> садржавао је нове: 16 <i>syn</i> -1-фенил-1,3-алкадирил-диацетата, 7 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, 8 1-фенил-1,3-алкадиона и 10 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона, <i>n</i> -, <i>iso</i> - и <i>anteiso</i> -низа. Идентификовано је 79 <i>n</i> -, <i>iso</i> - и <i>anteiso-sec</i> -алкохола од којих је 66 ново, и 77 засићених дуголанчаних <i>n</i> -, <i>iso</i> -, <i>anteiso</i> -, 2-метил- и 3-метил-масних киселина. Све дуголанчане 2-метил- и 3-метилкиселине су по први пут нађене у биљном царству. Присуство бензил-естара у воску снижава тачку топљења, чиме се повећава пермеабилност кутикуле, и смањује штетан утицај UV-C-зрачења. У испирку цветова <i>L. tulipifera</i> , поред најзаступљенијег палмитона, присутни су <i>n</i> -алкани и (<i>E</i>)- <i>n</i> -алкени, региоизомерни алк(ен)али, алканони и (<i>Z</i>)-алк(ен)-1-оли. Положај двогубе везе одређен је анализом масених спектра диметил-дисулфидних адуката. Где је било могуће, конфигурација двогубе везе одређена је NMR анализом производа циклопропанације. Идентификована су (10- и 11)-хидрокси-16-хентриаконтанони на основу анализе масених спектра триметилсиллил-деривата хидрокси-кетона, као и <i>bis</i> (триметилсиллил)деривата хентриаконтандиола. GC-MS анализом узорка испирка листова <i>L. tulipifera</i> утврђено је да је главни састојак палмитон, док је засебном GC-MS анализом испирака латица, чашичних листића и тучка са прашницима утврђено је да се палмитон доминантно налази на површини латица и чашичних листића.
Датум прихватања теме, ДП:	15.3.2019.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: др Гордана Стојановић, редовни професор Члан: др Бојан Златковић, редовни професор Члан: др Милан Декић, ванредни професор Члан: др Марија Генчић, доцент Члан, ментор: Др Нико Радуловић, редовни професор



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 :	Milena Z. Živković Stošić										
Mentor, MN :	Niko S. Radulović										
Title, TI :	Identification and synthesis of selected wax constituents of plant species <i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L. (Primulaceae) and <i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Magnoliaceae)										
Language of text, LT :	Serbian										
Language of abstract, LA :	Serbian/English										
Country of publication, CP :	Serbia										
Locality of publication, LP :	Serbia										
Publication year, PY :	2022										
Publisher, PB :	author's reprint										
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33										
Physical description, PD :	10 chapters, 340 pages, 232 references, 81 figures, 43 tables, 3 schemes, 53 appendices										
Scientific field, SF :	Chemistry										
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis										
Subject/Key words, S/KW :	<i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L., <i>Liriodendron tulipifera</i> L., plant wax, cuticle, washings, biosynthesis, organic synthesis, alkanes, alkenes, fatty acid benzyl esters, aldehydes, alkanones, <i>syn</i> -1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, 3-oxo-1-phenylalkane-1-yl acetates, 1-phenylalkane-1,3-diones, 1-hydroxy-1-phenylalkane-3-ones, long-chain alkanols, long-chain fatty acids, hydroxyketones										
UC	547.916 : 582.689.2 547.916 : 582.677.1										
Holding data, HD :	library										
Note, N :	The experimental part of this thesis was done in the Laboratory of organic analysis and synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš.										
Abstract, AB :	This doctoral dissertation presents the chemical composition of the washings of <i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L. and <i>Liriodendron tulipifera</i> L. The studied <i>Primula</i> species were rich in long-chain branched alkanes. For the first time, 19 new long-chain <i>n</i> -, <i>iso</i> -, and <i>anteiso</i> -benzyl alkanoates, as well as 8 <i>iso</i> - and 6 <i>anteiso</i> -2-alkanones were identified in samples of natural origin. Even-numbered <i>iso</i> -alkanes and 2-alkanones, and <i>iso</i> -odd-numbered fatty acid benzyl esters, are unique for <i>Primula</i> spp. Washings of <i>P. veris</i> contained new: 16 <i>syn</i> -1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, 7 3-oxo-1-phenylalkane-1-yl acetates, 8 1-phenylalkane-1,3-diones, and 10 1-Hydroxy-1-phenylalkane-3-ones, with <i>n</i> -, <i>iso</i> - and <i>anteiso</i> -chain-termini. Also, 79 <i>n</i> -, <i>iso</i> -, and <i>anteiso-sec</i> -alcohols were identified (66 new), and 77 long-chain <i>n</i> -, <i>iso</i> -, <i>anteiso</i> -, 2-methyl-, and 3-methylfatty acids. All long-chain 2-methyl- and 3-methyl acids were found in the Plant Kingdom for the first time. Benzyl esters lower the wax melting point, which increases the permeability of the cuticle, and reduce the harmful effects of UV-C radiation. Washings of <i>L. tulipifera</i> flowers, among the most abundant palmitone, contained <i>n</i> -alkanes, (<i>E</i>)- <i>n</i> -alkenes, regioisomeric alk(en)als, alkanones, and (<i>Z</i>)-alk(en)-1-ols. Double bond regiochemistry was inferred from DMS adducts MS. Where possible, the configuration was inferred from the NMR analysis of cyclopropanation adducts. 10/11-Hydroxy-16-hentriacontanones were identified based on the analysis of trimethylsilyl derivatives of hydroxy-ketone and <i>bis</i> (trimethylsilyl) derivatives of hentriacontanediols MSes. GC-MS analysis of <i>L. tulipifera</i> leaf washings samples revealed that the main constituent was palmitone, while separate GC-MS analyses of petals, sepals, and pistils with anthers, revealed palmitone to be predominant on the petal and sepal surfaces.										
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	March 15 th , 2019										
Defended on, DE :											
Defended Board, DB :	<table border="1"> <tr> <td>President:</td> <td>PhD Gordana Stojanović, Full Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Bojan Zlatković, Full Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Milan Dekić, Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Marija Genčić, Assistant Professor</td> </tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td> <td>PhD Niko Radulović, Full Professor</td> </tr> </table>	President:	PhD Gordana Stojanović, Full Professor	Member:	PhD Bojan Zlatković, Full Professor	Member:	PhD Milan Dekić, Associate Professor	Member:	PhD Marija Genčić, Assistant Professor	Member, Mentor:	PhD Niko Radulović, Full Professor
President:	PhD Gordana Stojanović, Full Professor										
Member:	PhD Bojan Zlatković, Full Professor										
Member:	PhD Milan Dekić, Associate Professor										
Member:	PhD Marija Genčić, Assistant Professor										
Member, Mentor:	PhD Niko Radulović, Full Professor										

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Нико Радуловић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департман за хемију

Наслов:

Идентификација и синтеза одабраних састојка воскова биљних врста *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) и *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae)

Резиме:

У овом раду приказани су резултати анализа хемијског састава испирака биљних врста *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. и *Liriodendron tulipifera* L. Показано је да су узорци испитиваних *Primula* врста богати дуголанчаним рачвастим алканима. По први пут, у узорцима природног порекла, идентификовано је 19 нових дуголанчаних *n*-, *iso*- и *anteiso*-бензил-естара масних киселина, као и 8 *iso*- и 6 *anteiso*-2-алканона. Биосинтеза већих количина парних *iso*-алкана и 2-алканона, као и *iso*-непарних бензил-естара јединствена је за *Primula* spp. Испирак врсте *P. veris* садржавао је нове: 16 *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата, 7 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, 8 1-фенил-1,3-алкадиона и 10 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона, *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа. Идентификовано је 79 *n*-, *iso*- и *anteiso-sec*-алкохола од којих је 66 ново, и 77 засићених дуголанчаних *n*-, *iso*-, *anteiso*-, 2-метил- и 3-метил-масних киселина. Све дуголанчане 2-метил- и 3-метилкиселине су по први пут нађене у биљном царству. Присуство бензил-естара у воску снижава тачку топљења, чиме се повећава пермеабилност кутикуле, и смањује штетан утицај UV-C-зрачења. У испирку цветова *L. tulipifera*, поред најзаступљенијег палмитона, присутни су *n*-алкани и (*E*)-*n*-алкени, региоизомерни алк(ен)али, алканони и (*Z*)-алк(ен)-1-оли. Положај двогубе везе одређен је анализом масених спектра диметил-дисулфидних адуката. Где је било могуће, конфигурација двогубе везе одређена је NMR анализом производа циклопропанаације. Идентификована су (10- и 11-)хидрокси-16-хентриаконтанони на основу анализе масених спектра триметилсиллил-деривата хидрокси-кетона, као и *bis*(триметилсиллил)деривата хентриаконтандиола. GC-MS анализом узорка испирка листова *L.*

tulipifera утврђено је да је главни састојак палмитон, док је засебном GC-MS анализом испирака латица, чашичних листића и тучка са прашницима утврђено је да се палмитон доминантно налази на површини латица и чашичних листића.

Научна област:

Хемија

Научна
дисциплина:

Органска хемија и биохемија, органске синтезе

Кључне речи:

Primula veris L., *Primula acaulis* (L.) L., *Liriodendron tulipifera* L., восак, кутикула, испирак, биосинтеза, органска синтеза, алкани, алкени, бензил-естри масних киселина, алдехиди, алканони, 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетати, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетати, 1-фенил-1,3-алкадиони, 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони, дуголанчани алкохоли, дуголанчане масне киселине, хидрокси-кетони

УДК:

547.916 : 582.689.2
547.916 : 582.677.1

CERIF
класификација:

P 003 Хемија, P 004 Биохемија, метаболизам, P 340 Липиди, стероиди, мембране, P 351 Структурна хемија, P 390 Органска хемија

Тип лиценце

Креативне

заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

PhD, Niko Radulović, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Chemistry

Title:

Identification and synthesis of selected wax constituents of plant species *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) and *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae)

Abstract:

This doctoral dissertation presents the chemical composition of the washings of *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. and *Liriodendron tulipifera* L. The studied *Primula* species were rich in long-chain branched alkanes. For the first time, 19 new long-chain *n*-, *iso*-, and *anteiso*-benzyl alkanooates, as well as 8 *iso*- and 6 *anteiso*-2-alkanones were identified in samples of natural origin. Even-numbered *iso*-alkanes and 2-alkanones, and *iso*-odd-numbered fatty acid benzyl esters, are unique for *Primula* spp. Washings of *P. veris* contained new: 16 *syn*-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, 7 3-oxo-1-phenylalkan-1-yl acetates, 8 1-phenylalkane-1,3-diones, and 10 1-Hydroxy-1-phenylalkan-3-ones, with *n*-, *iso*- and *anteiso*-chain-termini. Also, 79 *n*-, *iso*-, and *anteiso-sec*-alcohols were identified (66 new), and 77 long-chain *n*-, *iso*-, *anteiso*-, 2-methyl-, and 3-methylfatty acids. All long-chain 2-methyl- and 3-methyl acids were found in the Plant Kingdom for the first time. Benzyl esters lower the wax melting point, which increases the permeability of the cuticle, and reduce the harmful effects of UV-C radiation. Washings of *L. tulipifera* flowers, among the most abundant palmitone, contained *n*-alkanes, (*E*)-*n*-alkenes, regioisomeric alk(en)als, alkanones, and (*Z*)-alk(en)-1-ols. Double bond regiochemistry was inferred from DMDS adducts MS. Where possible, the configuration was inferred from the NMR analysis of cyclopropanation adducts. 10/11-Hydroxy-16-hentriacontanones were identified based on the analysis of trimethylsilyl derivatives of hydroxy-ketone and *bis*(trimethylsilyl) derivatives of hentriacontanediols MSes. GC-MS analysis of *L. tulipifera* leaf washings samples revealed that the main constituent was palmitone, while separate GC-MS analyses of petals, sepals, and pistils with anthers, revealed palmitone to be predominant on the petal and sepal surfaces.

Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis
Key Words:	<i>Primula veris</i> L., <i>Primula acaulis</i> (L.) L., <i>Liriodendron tulipifera</i> L., plant wax, cuticle, washings, biosynthesis, organic synthesis, alkanes, alkenes, fatty acid benzyl esters, aldehydes, alkanones, <i>syn</i> -1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, 3-oxo-1-phenylalkan-1-yl acetates, 1-phenylalkane-1,3-diones, 1-hydroxy-1-phenylalkan-3-ones, long-chain alkanols, long-chain fatty acids, hydroxyketones
UDC:	547.916 : 582.689.2 547.916 : 582.677.1
CERIF Classification:	P 003 Chemistry, P 004 Biochemistry, metabolism, P 340 Lipids, steroids, membranes, P 351 Structure chemistry, P 390 Organic chemistry
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за органску анализу и синтезу, Департмана за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу.

Најискреније се захваљујем свом ментору, др Нику Радуловићу, на указаном поверењу, несебичној помоћи и подршци, како током израде докторске дисертације, тако и током докторских и основних студија.

Најсрдачније се захваљујем и члановима комисије, др Гордани Стојановић, др Бојану Златковићу, др Милану Декићу и др Марији Генчић, на корисним сугестијама и саветима који су значајно допринели квалитету дисертације.

Захваљујем се и колегама из групе, на предусетљивости и сарадњи током израде ове докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем другарици и колегиници др Ани Бијелић, на несебичној подршци, као и куму маст. инж. арх. Николи Арсићу на моралној, а и техничкој подршци.

Велику захвалност дугујем својим породицама Живковић и Стошић, а посебну, супругу Ивици и сину Огњену, на безграничној љубави и разумевању.

ОЗНАКЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

Номенклатура

Me или CH ₃	Метил
Ac или CH ₃ CO	Ацетил
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> (протеин носач ацил-групе)
CoA	<i>Coenzyme A</i> (коензим А)
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (никотинамид-аденин-динуклеотид)
NADP	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат)
<i>n</i>	нормални низ
<i>iso</i>	рачvasti низ са метил-групом у (ω-1) положају
<i>anteiso</i>	рачvasti низ са метил-групом у (ω-2) положају
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>m</i>	<i>meta</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
ax	аксијални
eq	екваторијални
<i>E</i>	<i>Entgegen</i> (стереодескриптор)
<i>Z</i>	<i>Zusammen</i> (стереодескриптор)

Реагенси и растварачи

AcOH	Сирћетна киселина
CDCl ₃	Деутерохлороформ
Et ₂ O	Диетил-етар
EtOAc	Етил-ацетат
EtOH	Етанол

MeOH	Метанол
MeONa	Натријум-метоксид
DCC	<i>N,N'</i> -DiCyclohexylCarbodiimide (<i>N,N'</i> -дициклохексилкарбодиимид)
DMAP	<i>4-(DiMethylAmino)Pyridine</i> (4-(диметиламино)пиридин)
TMS	<i>TetraMethylSilane</i> (тетраметилсилан)
TMSCl	<i>TriMethylSilyl Chloride</i> (триметилхлорсилан)
LDA	<i>Lithium diisopropylamide</i> (литијум-диизопропиламид)
DMDS	<i>Dimethyl disulfide</i> (диметил-дисулфид)
THF	<i>Tetrahydrofuran</i> (тетрахидрофуран)

Хроматографија и масена спектрометрија

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i> (аутоматизовани систем за идентификацију и деконволуцију масених спектра)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (гасна хроматографија-масена спектрометрија)
HP	<i>Hewlett-Packard</i>
[M] ⁺	Молекулски јон
RI	<i>Retention Index</i> (ретенциони индекс)
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (танкослојна хроматографија)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> (укупни јонски хроматограм)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом)
UV	<i>UltraViolet</i>
UV-Vis	<i>UltraViolet-Visible spectroscopy</i> (спектроскопија у UV и Vis области)
ν	Фреквенција/таласни број валенционе вибрације
δ	Фреквенција/таласни број деформационе вибрације

λ_{\max} Таласна дужина максимума апсорпције

Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија

1D	једнодимензионални
2D	дводимензионални
s	<i>singlet</i> (синглет)
d	<i>doublet</i> (дублет)
dd	<i>doublet of doublets</i> (дублет дублета)
ddd	<i>doublet of doublet of doublets</i> (дублет дублета дублета)
dddd	<i>doublet of doublet of doublet of doublets</i> (дублет дублета дублета дублета)
t	<i>triplet</i> (триплет)
tt	<i>triplet of triplets</i> (триплет триплета)
dq	<i>doublet of quartets</i> (дублет квартета)
ddq	<i>doublet of doublet of quartets</i> (дублет дублета квартета)
dqd	<i>doublet of quartet of doublets</i> (дублет квартета дублета)
tdd	<i>triplet of doublet of doublets</i> (триплет дублета дублета)
ddqd	<i>doublet of doublet of quartet of doublets</i> (дублет дублета квартета дублета)
q	<i>quartet</i> (квартет)
quint	<i>quintet</i> (квинтет)
non	<i>nonuplet</i> (нонулет)
m	<i>multiplet</i> (мултиплет)
br	<i>broad signal</i> (широки сигнал)
^{13}C NMR	<i>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> (нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија угљеника-13)
DEPT	енг. <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
gHMQC	енг. <i>Gradient-enhanced Heteronuclear Multiple Quantum</i>

Coherence

¹ H NMR	<i>Hydrogen-1 Nuclear Magnetic Resonance</i> (протонска нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>J</i>	Константа купловања
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>
δ	Хемијско померање у NMR спектру

Опште скраћенице

c	Концентрација
ACL	<i>Average Chain Length</i> (просечна дужина угљоводоничног низа)
CPI	<i>Carbon Preference Index</i> (угљенични преференцијални индекс)

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
2.	ЦИЉЕВИ РАДА.....	5
3.	ОПШТИ ДЕО	9
3.1.	Карактеристике кутикуле	10
3.1.1.	Контрола транспирације код биљака	12
3.1.2.	Контрола губитка и уноса материја	12
3.1.3.	Одбијање воде и честица.....	13
3.1.4.	Фотосинтеза и UV-зрачење.....	13
3.1.5.	Хемијски састав кутикуле	14
3.1.6.	Механичка својства кутикуле	15
3.2.	Систематика рода <i>Primula</i> L.	16
3.2.1.	<i>Primula veris</i> L.	17
3.2.2.	<i>Primula acaulis</i> (L.) L.	19
3.3.	Секундарни метаболити рода <i>Primula</i>	20
3.3.1.	Флавоноидни егзудати рода <i>Primula</i>	20
3.3.2.	Нефлавоноидни састојци егзудата рода <i>Primula</i>	27
3.4.	Систематика рода <i>Liriodendron</i> L.	28
3.4.1.	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	29
3.5.	Секундарни метаболити биљне врсте <i>Liriodendron tulipifera</i>	30
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	33
4.1.	Хемикалије и растварачи.....	34
4.2.	Методе анализе и раздвајања	34
4.2.1.	Гасна хроматографија куплована са масеном спектрометријом (GC-MS)	34
4.2.2.	Нуклеарно-магнетна резонантна (NMR) спектроскопија	35
4.2.3.	Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR)	36
4.2.4.	Ултразубичаста спектроскопија (UV)	36
4.2.5.	Елементна микроанализа	37
4.2.6.	Одређивање тачке топљења	37
4.2.7.	Танкослојна хроматографија	37
4.2.8.	<i>Dry-flash</i> хроматографија	37
4.2.9.	Молекулско моделирање.....	38
4.3.	Биљни материјал и припрема узорака.....	38
4.3.1.	Биљни материјал.....	38
4.3.2.	Припрема испирака биљног материјала	39
4.3.3.	Хроматографско раздвајање хлороформских испирака листова и цветова <i>P. veris</i> и <i>P. acaulis</i> , и испирка цветова <i>L. tulipifera</i>	41
4.3.4.	Идентификација и/или квантификација одабраних састојака <i>P. veris</i> , <i>P. acaulis</i> и <i>L. tulipifera</i>	46
4.4.	Опис синтетских корака	47
4.4.1.	Општа синтеза естара по Штеглиху.....	47
4.4.2.	Синтеза бензил-докозаноата (бензил-бехената) Штеглиховом синтезом естара	47

4.4.3.	Припрема модел-смеше бензил-естара.....	48
4.4.4.	Синтеза 2-пентакозанона	49
4.4.5.	Редукција 1-фенилбута-1,3-диона литијум-алуминијум-хидридом и естерификација добијених производа.....	49
4.4.6.	Синтеза 1-јод-2-метилбутана.....	51
4.4.7.	Синтеза <i>syn</i> - и <i>anti</i> -1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (<i>syn</i> - и <i>anti</i> -8a).....	51
4.4.8.	Синтеза бензилиден-деривата <i>syn</i> - и <i>anti</i> -12a	52
4.4.9.	Синтеза 1-фенил-1,3-нонадиона, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиона и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиона (29a-c)	52
4.4.10.	Синтеза <i>syn</i> - и <i>anti</i> -1-фенил-1,3-нонадиил-диацетата, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата (9a-c)	55
4.4.11.	Општа процедура реакције силиловања	56
4.4.12.	Алдолне адиције.....	56
4.4.13.	Хидроксилација <i>n</i> -алкана	58
4.4.14.	α -Метиловање метил-естара дуголанчаних масних киселина.....	60
4.4.15.	Синтеза метил-3-метилтетрадеcanoата	61
4.4.16.	Општа процедура дериватизације диметил-дисулфидом	63
4.4.17.	Општа процедура <i>Simmons-Smith</i> -ове реакције циклопропанаације	63
4.5.	Припрема раствора за одређивање термалних особина воскова.....	64
5.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	65
5.1.	Епикутикуларни алкански профил врста <i>P. veris</i> (P-1) и <i>P. acaulis</i> (P-2).....	66
5.1.1.	Гаусова расподела релативних количина површинских алкана <i>P. veris</i> (P-1) и <i>P. acaulis</i> (P-2)	79
5.2.	Анализа састојака хроматографских фракција 2 и 3 <i>P. veris</i> (P-1) и <i>P. acaulis</i> (P-2)	85
5.2.1.	Дуголанчани бензил-естри испирака воскова <i>P. veris</i> и <i>P. acaulis</i> (фракција 2)	85
5.2.2.	Дуголанчани 2-алканони испирака воскова <i>P. veris</i> и <i>P. acaulis</i> (фракција 3).....	96
5.2.3.	Веза између структуре молекула и ретенционог индекса	104
5.2.4.	Термалне особине састојака воскова: алкани и бензил-естри масних киселина.....	109
5.2.5.	Потенцијална UV-заштитна улога бензил-естара масних киселина врста <i>Primula</i>	113
5.2.6.	Дуголанчани алкани, бензил-естри масних киселина и 2-алканони у испирцима <i>P. acaulis</i> (P-3 – P-6) и <i>P. veris</i> (P-7)	114
5.2.7.	Различита заступљеност парних, односно непарних <i>iso</i> -хомолога испитиваних врста рода <i>Primula</i>	121
5.3.	Анализа састојака фракције 4 испирка <i>P. veris</i> (P-1).....	124
5.3.1.	1-Фенил-1,3-алкадиил-диацетати у испирцима <i>P. veris</i>	126
5.3.2.	3-Оксо-1-фенилалкил-ацетати.....	156
5.3.3.	1-Фенил-1,3-алкадиони	163
5.3.4.	1-Фенил-1-хидрокси-3-алканони.....	169
5.3.5.	Секундарни алкохоли са положајем хидроксилне групе од 2 до 10.....	171
5.3.6.	Слободне масне киселине	190
5.3.7.	Процена релативног односа количина одабраних састојака фракције 4 помоћу ¹ H NMR спектроскопије и њихов садржај по површини органа.....	204

5.4. Анализа састојака фракције 1 испирка цветова <i>L. tulipifera</i> (P-8): алкани и алкени.....	205
5.5. Анализа састојака фракција 2 и 3 испирка цветова <i>L. tulipifera</i> (P-8): алдехиди и кетони.....	213
5.6. Анализа састојака фракција 5 и 6 испирка цветова <i>L. tulipifera</i> (P-8): примарни алкохоли и масне киселине.....	217
5.7. Анализа састојака фракције 8 испирка цветова <i>L. tulipifera</i> (P-8).....	226
5.8. Анализа састојака испирка листова <i>L. tulipifera</i> (P-8)	229
5.9. Заступљеност палмитона у различитим деловима цвета узорка P-9 <i>L. tulipifera</i>	229
6. ИЗВОД	231
7. SUMMARY	237
ЛИТЕРАТУРА.....	242
ПРИЛОЗИ	269
БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ.....	314
ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ	321
ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	322
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	323

1. УВОД

Надземни делови биљака су прекривени липофилним слојем чија је примарна улога да штити биљку од губитка воде (Riederer & Schreiber, 2001; Kerstiens, 1996), као и од других штетних спољашњих утицаја. На пример, поменути слој омогућава биљци бољу заштиту од спора патогених микроорганизама и различитих механичких честица (Müller, 2006; Krauss et al., 1997). Овај липофилни слој (восак) је сложеног састава и углавном га чине једињења са дугим угљоводоничним ланцима као што су алкани и класе монофункционалних једињења, где је функционална група на крају или у близини краја ланца (алдехиди, примарни алкохоли, естри итд.). Угљоводонични ланац ових једињења је углавном неразгранат (*n*-низ), а уколико и постоји рачвање у ланцу, обично је то метил-рачва у положајима ω -1, односно ω -2, при чему су ова рачваста једињења углавном присутна у малим количинама. Мали је број класа једињења у восковима за које су детектована једињења која имају рачвасти низ: то су најчешће примарни алкохоли, масне киселине и њихови естри (Jetter et al., 2006). До сада, еколошка улога оваквих егзудата биљака није у потпуности разјашњена, али сама чињеница да се они налазе на површини биљке и у директном су контакту са спољашњом средином, указује на њихову могућу заштитну улогу: прва су линија одбране од напада инсеката и патогена, као и од штетног ултраљубичастог зрачења (Colombo et al., 2017; Berim & Gang, 2016). Транспорт воде и хранљивих материја из спољашње средине у биљку одређен је физичким карактеристикама воска, као што су тачка топљења и пермеабилност (Hamilton, 2004; Merk et al., 1998; Schönherr et al., 1979). Када температура расте, липиди се топе и постају пермеабилнији, па се повећава губитак воде. Температура при којој долази до губитка воде (критична температура - T_c) је у вези са тачком топљења (T_m) кутикуларних липида (Gibbs & Rajpurohit, 2010; Rourke & Gibbs, 1999). Како је восак смеша великог броја једињења различитих структура, потребно је разумети на који начин ова једињења заједно штите биљку. Претходна истраживања су показала да дужина ланца, присуство различитих функционалних група и њихов количински однос у смеси доприносе пермеабилној структури воска (Gibbs, 2002; Patel et al., 2001).

Количина светлости коју биљка апсорбује у току дана је значајна за њен правилан развој, као што је и заштита од UV-зрачења присутног у сунчевој светлости (UV-A и UV-B), као и заштита од зрачења на таласним дужинама испод 280 nm – UV-C (Hamilton, 2004; Stapleton, 1992). Сви типови UV-зрачења могу изазвати оштећења ткива биљака, а

ако дође до оштећења генетског материјала, може доћи до мутација и/или поремећаја физиолошких процеса (Stapleton, 1992).

Род *Primula* L. (јагорчевина) представља највећи род фамилије Primulaceae Vent., обухватајући више од 400 зељастих биљака које су распрострањене у умереним и хладним деловима северне хемисфере (Colombo et al., 2017). Поред других особина, распрострањеност врста рода *Primula* може бити подржана њиховом способношћу да успешно настајују станишта са различитим климатским и орографским словима, на пример, велика надморска висина, ниске температуре, висок ниво инсолације итд. (Zhang et al., 2013; Richards, 2003). Представници рода *Primula* цветају у раним пролећним месецима, односно на самом почетку вегетативне сезоне, и често се срећу на територији Републике Србије. У пролеће, јагорчевине су међу првим врстама које тада, упркос колебању климатских фактора, ниским ноћним температурама и високом нивоу сунчевог зрачења, улазе у фазу свог вегетативног и генеративног развоја. Познато је да биљке из рода *Primula* продукују фаринозне егзудате (конзистенције налик на брашно) на површини својих надземних делова, који су богати метоксилованим и хидроксилованим флавоноидима. Иако су егзудати јагорчевина до сада више пута испитивани, нефлавоидне компоненте углавном нису биле главна тема тих испитивања. Претрагом литературе, утврђено је да воскови биљних врста рода *Primula* са територије Републике Србије до сада нису испитивани.

Биљне врсте фамилије Magnoliaceae су примарно широко распрострањене у тропским, суптропским и делимично умереним подручјима свих континената изузев Европе и Африке. Из ове фамилије потичу многе цењене орнаменталне, пре свега парковске врсте дрвећа и жбуња. Ледено доба, померање континената и формирање планинских ланаца довели су до изолације појединих врста ове породице, што је водило развоју морфолошких, анатомских и физиолошких карактеристика које су им омогућиле опстанак и неометан развој у различитим климатским подручјима. *Liriodendron tulipifera* L. познат као тулипановац или лалино дрво, једна је од две биљне врсте рода *Liriodendron* L. Ова врста потиче из Северне Америке, али се као гајена биљка може наћи свуда у свету. *Liriodendron tulipifera* је врста терцијарне старости која, у складу са својим реликтним пореклом, у природи расте на топлијим стаништима и на нижим надморским висинама. Истовремено, ова врста показује добру отпорност на ниске температуре и може да опстане

на просторима са знатно суровијим климатским условима, на пример, издржава мразеве и до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sakai, 1971). Отпорност ове старе врсте би могла да буде повезана са слојем заштитног воска који се налази на површини биљних органа, али до сада воскови биљне врсте *L. tulipifera* испитивани су само једном и то они са површине листова (Gülz et al., 1992).

2. ЦИЉЕВИ РАДА

Ранија испитивања састава воскова биљних врста *Primula* су показала да су они најбогатији несупституисаним флавоном, као и серијом метоксилованих и/или хидроксилованих флавона, са једном или више поменутих група (Berim & Gang, 2016; Bhutia & Valant-Vetschera, 2012). Међутим, остали нефлавоноидни састојци воска нису детаљно испитивани: један дитерпен (Elser et al., 2016), два дихидрохалкона (Bhutia et al., 2013) и четири халкона (Valant-Vetschera et al., 2009; Budzianowski & Wollenweber, 2007; Ahmad et al., 1992; Wollenweber et al., 1989) наведени су до сада у литератури. Интересантна је чињеница да су алкани из воска врста рода *Primula* до сада само једном проучавани, тачније, одређен је релативни однос алкана, масних киселина, примарних и секундарних алкохола са површине латица врсте *Primula acaulis* (L.) L. (Jetter, 2006).

Све ове наведене чињенице су нас навеле да извршимо прелиминарну анализу воскова надземних делова биљних врста *Primula veris* L. и *P. acaulis*, листова и цветова заједно, а потом и одвојено. Први резултати су показали да се на површини ових биљака поред флавоноида, могу наћи алкани, алдехиди, кетони, алкохоли (са различитим положајима хидроксилне групе) и масне киселине. Анализа воскова засебних биљних органа (лист и цвет), дала нам је информацију да је површина листова богатија флавоноидним компонентама, а површина цветова алканима и другим класама секундарних метаболита који немају флавоноидну структуру.

У литератури је доступан само један научни рад који се бави испитивањем састава воска са површине листа биљне врсте *L. tulipifera* У том узорку воска је детектован 16-хентриаконтанон (23%) као најзаступљенији састојак, а остали састојци су алкани, масне киселине, алкохоли и естри (Gülz et al., 1992). Све ово нас је навело да извршимо анализу воска са површине ове биљне врсте (листова и цветова, засебно), а прелиминарни резултати дали су нам информацију да су поред 16-хентриаконтанона, као доминантног састојка, биле присутне следеће класе органских једињења: алкани, алкени, као и дуголанчани засићени и незасићени алкохоли, алдехиди, кетони и масне киселине.

На основу свих ових сазнања, циљеви докторске дисертације су изоловање и одређивање квалитативног и квантитативног састава воскова који покривају надземне делове следећих биљних врста: *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae), и *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae). Наведене врсте показују добру отпорност и развијају се при просечно нижим температурама ваздуха, у раним пролећним месецима,

када су услови за листање и цветање других биљака још увек неповољни. Такође циљ је и одређивање структуре и синтеза потенцијално нових једињења у восковима, или модел-једињења која би могла да послуже за њихову идентификацију, као и њихова детаљна спектрална карактеризација. Биће примењене нове реакције дериватизације за одређивање регио- и стереохемије одабраних састојака воска. Ове информације ће допринети бољем разумевању функције воска, односно улоге у заштити од штетних спољашних утицаја. Постављени су следећи конкретни циљеви:

1. Изоловање воскова са површине биљних врста (листова и цветова) *P. veris*, *P. acaulis* и *L. tulipifera* (биљни материјал је, када је то било могуће, сакупљан са више различитих локација);
2. Препаративно хроматографско раздвајање испирака на колони силика-гела и детаљна анализа фракција помоћу гасне хроматографије са масеном детекцијом (GC-MS) – изоловање чистих састојака воска или добијање једноставнијих смеша;
3. Одређивање структуре једињења комбинацијом већег броја спектралних метода;
4. Детаљна интерпретација NMR спектралних података (потпуна асиганција ^1H и ^{13}C NMR сигнала);
5. Синтеза одабраних секундарних метаболита и сродних једињења и деривата, као и изомера и хомолога, у циљу добијања стандарда за идентификацију;
6. Одређивање тачног положаја и конфигурације двогубе везе, као и положаја хидроксилне групе алкохола на основу реакција дериватизације;
7. Поредбена анализа заступљености одређених класа једињења присутних на површини биљних органа (листа и цвета, засебно) на основу добијених резултата, као и посебан осврт на садржај једињења која садрже разгранати угљоводонични низ;
8. Одређивање апсорпције УВ-светлости изолованих и/или синтетисаних једињења, као и фракција воска у циљу утврђивања њихове потенцијалне заштите улоге од овог зрачења;
9. Одређивање тачке топљења изолованих и/или синтетисаних једињења, смеша једињења, као и фракција воска;
10. Одређивање еутектичке тачке одређених смеша једињења које моделују восак или неку фракцију воска.

Планирана истраживања била су спроведена коришћењем следећих метода:

1. Изоловање воскова – кратким испирањем биљног материјала хлороформом које је потпомогнуто ултразвуком;
2. Анализа састојака воскова – гасна хроматографија са масеном детекцијом (GC-MS);
3. Изоловање, раздвајање и пречишћавање – *dry-flash* хроматографија;
4. Спектрална и структурна карактеризација – нуклеарна магнетна спектроскопија угљеника и водоника (^1H - и ^{13}C -NMR, једно- и дводимензионална: NOESY и градијентни HSQC, HMBC и ^1H - ^1H COSY, као и вишепулсни DEPT-90, DEPT-135 и експерименти селективног хомонуклеарног декупловања);
5. Одређивање положаја хидроксилне групе алкохола/киселина: дериватизација (силиловање) фракције богате дуголанчаним алкохолима/киселинама у комбинацији са гасном хроматографијом са масеном детекцијом;
6. Одређивање положаја двоструке везе: дериватизација диметил-дисулфидом у комбинацији са гасном хроматографијом са масеном детекцијом; као и конфигурације двоструке везе – циклопропанација по *Simmons-Smith*-у у комбинацији са гасном хроматографијом са масеном детекцијом и ^1H нуклеарном магнетном спектроскопијом;
7. Ултраљубичаста-видљива спектроскопија (UV-Vis), масена спектрометрија (MS), микроанализа угљеника и водника; инфрацрвена спектроскопија (IR) су додатно коришћени у одређивању структуре једињења.

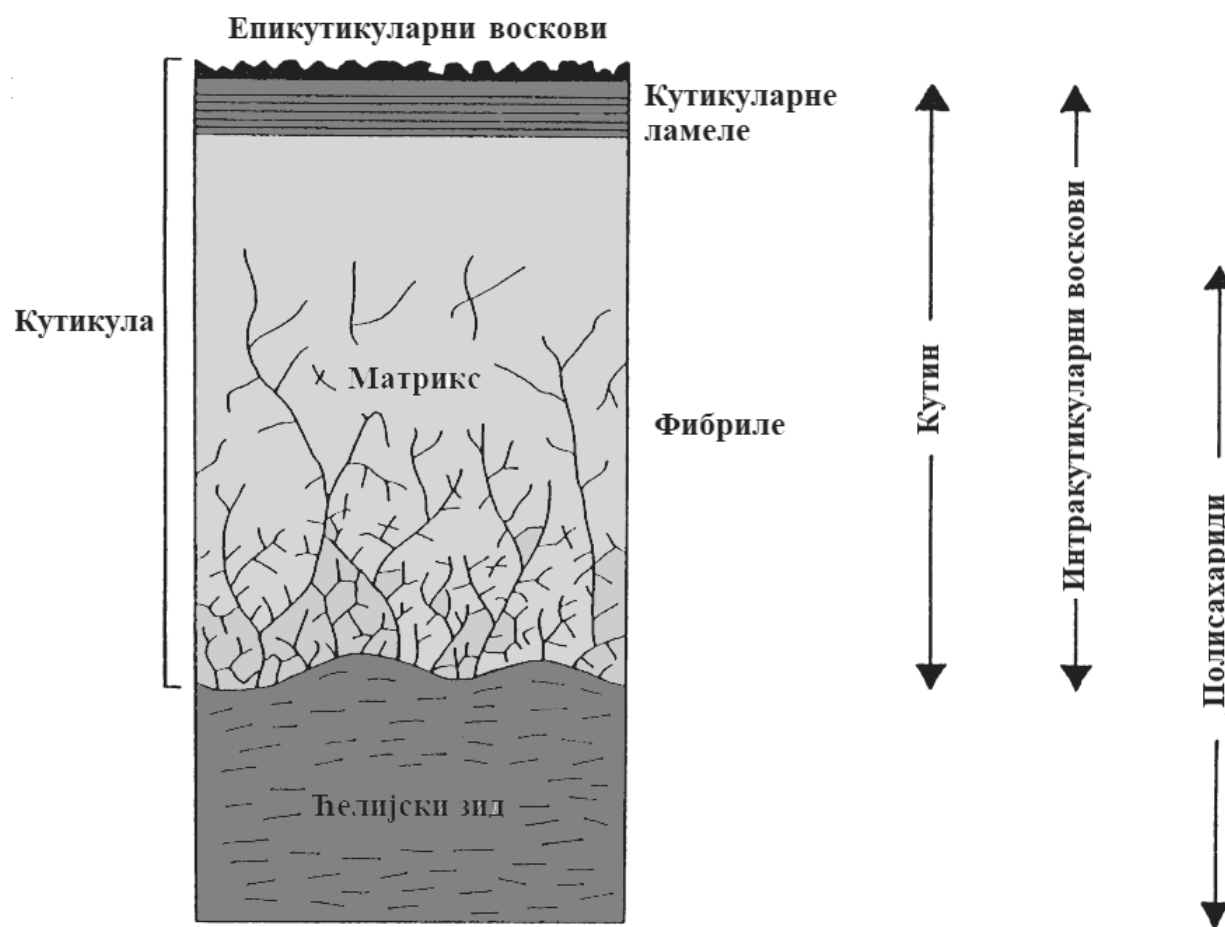
3. ОПШТИ ДЕО

3.1. Карактеристике кутикуле

Кутикула је присутна код биљака које настањују копнена станишта, при чему се као површински, заштитни слој развија на површини готово свих надземних органа биљке. То је нежива структура са бројним функцијама које су од есенцијалног значаја за живот биљке. Кутикула је делимично провидан слој липида, који се налази између биљке и спољашње средине. На основу растворљивости у органским растварачима, може се закључити да се биљна кутикула састоји из 1) кутина и 2) кутикуларног воска. Кутикуларни восак је смеша липофилних једињења која се добија екстракцијом/испирањем површине биљака у органским растварачима. Восак је распоређен кроз целу кутикулу, па један део воска заједно са кутином чине кутински матрикс и овај восак се назива интракутикуларни восак. Други део воска је наталожен на спољашњу површину кутина и тај восак се назива епикутикуларни восак. Кутин се састоји од ω -хидрокси-киселина и њихових деривата који су међусобно повезани естарским везама градећи на тај начин полимере велике масе. Због своје полимерне структуре кутин се не може растворити у органским растварачима. Постоје две групе мономерних јединица које учествују у изградњи кутина, C_{16} , коју чине, на пример, 16-хидроксипалмитинска и 9,16-дихидроксипалмитинска или 10,16-дихидроксипалмитинска киселина и C_{18} , коју чине, на пример, 18-хидроксиолеинска, 9,10-епокси-18-хидроксистеаринска и 9,10,18-трихидроксистеаринска киселина (Jetter et al., 2006, Holloway, 1994).

Само епидермалне ћелије надземних биљних органа способне су да синтетишу састојке кутикуле (слика 3.1.1; Holloway, 1994). Прва и основна функција кутикуле је да спречи губитак воде из ћелија биљака. Заправо, спољашњи слој кутикуле, који чине епикутикуларни воскови, главна је заштита биљке од губитка воде, и он доприноси да површина биљке буде чиста и сува. Поред тога, умањује апсорпцију краткоталасног зрачења и не дозвољава микроорганизмима и инсектима да се лако вежу и/или прилепе за биљку, осим код биљака које са одређеним организмима живе у симбиози. Такође, има и улогу да спречи међусобно слепљивање органа повезаних са репродукцијом, у цветним пупољцима (Jetter et al., 2006). Кутикула је на листовима присутна како на горњој (адаксијалној) тако и на доњој (абаксијалној) површини, а облаже околинину отвора стоме и

покрива слободне, унутрашње површине епидермалних ћелија субстоматалних шупљина и међућелијског простора (Osborn & Taylor, 1990). Стоме су отвори који се налазе на површини листова и регулишу промет гасова и водене паре из спољашње средине у унутрашњост листа. Микроструктура површине листова разликује се међу биљкама, а адаксијална и абаксијална површина листова једне биљке може бити другачија, што зависи од епидермалних карактеристика, као и од присуства или одсуства трихома (длачица) на површини листа. Све ове карактеристике површине биљних органа се могу визуализовати помоћу електронског микроскопа (Jetter et al., 2006; Harr et al., 1991).



Слика 3.1.1. Шематски приказ грађе кутикуле (Holloway, 1994)

3.1.1. Контрола транспирације код биљака

Као што је већ поменуто, једна од главних карактеристика виших биљака је способност да контролишу количину воде која се задржава у или излази из ћелија, па да би одржала своју функционалност, биљка мора да успостави равнотежу између транспирационог губитка воде и апсорпције воде путем корена. Свако нарушавање ове равнотеже може довести до нарушавања основних функција у биљци, а и до њеног сушења. Транспирацију са листова, стабљике, цветова и плодова контролишу заједно кутикула и стоме. Слаба пропустљивост кутикуле омогућава бољу контролу губитка воде, помоћу стома (Jetter et al., 2006).

3.1.2. Контрола губитка и уноса материја

Кутикула је главни надземни слој за размену поларних растворених материја, липофилних органских једињења, гасова и водене паре између спољашње средине и унутрашњости биљке. Сва липофилна једињења са малом испарљивошћу или она која су у раствору морају да прођу кроз кутикулу да би ушла или изашла из плодова, цветова, стабљика или листова. Ова органска једињења могу бити секундарни метаболити биљке, природна или синтетичка једињења (загађивачи, средства за заштиту биљака). Са тачке гледишта применљивости, апсорпција и уношење средстава за заштиту биљака је од велике важности. Када су стоме затворене (што је у просеку око 12 h у току једног дана), кутикула потпуно ограничава губитак и узимање гасова и пара из атмосфере преко површине биљке. Ова појава се односи на водену пару, као и на гасове као што су угљен-диоксид, кисеоник, неоргански загађивачи ваздуха и испарљива органска једињења попут терпена (Kerstiens, 1994; Kerstiens et al., 1992; Lenzian & Kerstiens, 1991). За паре изразито липофилних једињења, размена се доминантно одвија кроз кутикулу. Постоји веза између контролисане размене гасова од стране кутикуле и стома, и фотосинтезе. Показано је на нетакнутим листовима са намерно запушеним стомама да је значајно умањен транспорт угљен-диоксида, тј. да је размена угљен-диоксида и воде кроз кутикулу значајно мања у односу на размену кроз стоме (Jetter et al., 2006; Boyer et al., 1997).

3.1.3. Одбијање воде и честица

После кише, површина листова многих биљака није прекривена слојем воде, већ само капљицама воде. Кутикуларне површине многих биљних врста, а углавном њихови млађи делови, одбијају воду и већину водених раствора. Ово је корисно јер вода на површини листа може имати неколико негативних последица по биљку и то: 1 – доводи до испирања електролита и поларних органских раствора из унутрашњости биљке и 2 – ствара погодне услове за колонизацију од стране потенцијално штетних микроба, као што су фитопатогени и/или паразити, бактерије или гљиве. Површина неких биљних врста је таква да могу, не само да одбијају воду и водене растворе, већ и микроскопске честице као што су прашина, споре и микроби. Овакво самочишћење се заснива на физичко-хемијским својствима површине листа. Капљице воде које се формирају, сливају се низ листове и тако уклањају честице са њихове површине. Овај феномен се назива „лотос ефекат“, а постоје чак и истраживања за примену овог ефекта у индустрији (Jetter et al., 2006; Wagner et al., 2003).

3.1.4. Фотосинтеза и UV-зрачење

Да би се у биљци неометано одвијао процес фотосинтезе потребно је зрачење у опсегу таласних дужина од 400 до 800 nm. Фотосинтеза такође зависи и од распореда пигмената у ћелији, као и од саме структуре мембране ћелија. Прекомерна количина светлости може неповољно утицати на процес фотосинтезе. Кутикула штити биљку од зрачења: густо омотач епикутикуларних кристала воска појачава расипање и рефлексију светлости, тако да до биљке допире довољно зрачења, потребног за неометано одвијање процеса фотосинтезе. Други део електромагнетног зрачења који пада на површину биљака је UV-зрачење у опсегу таласних дужина од 280 до 400 nm. Прекомерно зрачење доводи до оштећења фотосинтетског апарата и других виталних делова биљне ћелије. Кутикула, често заједно са спољашњим епидермалним ћелијским зидом, може допринети смањењу зрачења коме је изложена биљка и тиме заштити осетљива унутрашња ткива биљке (Jetter et al., 2006).

3.1.5. Хемијски састав кутикуле

Својства кутикуле зависе од хемијског састава слоја епикутикуларног воска, који може бити аморфне или кристалне структуре. Количина воска која прекрива биљку може бити различита, и креће се у опсегу од 5 до 500 μg по cm^2 . Епикутикуларни воскови су растворљиви у неполярним органским растварачима, као што су хлороформ и диетил-етар, и стога се могу лако изоловати за анализу и идентификацију састојака. Састав воска је специфичан за одређену биљну врсту, али се може и променити током њеног развоја. Воскови који прекривају површину биљних органа углавном се састоје од неполярних дуголанчаних серија једињења које не садрже функционалну групу (алкани) или које имају једну функционалну групу близу или на крају ланца (1- или 2-алканоли, алдехиди, 2-алканони, естри итд.). Угљоводонични ланац ових класа једињења је углавном линеаран, а ређе се јављају и рачvasti хомолози, *iso*- и/или *anteiso*-низа, који су много мање заступљени у односу на линеарне хомологе. До сада су једино идентификовани рачvasti примарни алкохоли, масне киселине и њихови естри (Dekić et al., 2019; Busta & Jetter, 2017; Jetter et al., 2006). У восковима су углавном заступљени линерани хомолози са парним или непарним бројем угљеникових атома: алкани (C_{16} - C_{35}), 1-алканоли (C_{18} - C_{36}), алифатичне киселине (C_{14} - C_{36}), естри (C_{32} - C_{72}), β -дикетони (C_{29} - C_{33}), кетони (C_{23} - C_{33}), секундарни алкохоли (C_{21} - C_{33} ; Holloway, 1994). У биљним восковима је често доминантна једна класа једињења, на пример, алкани на површини врста *Brassica* spp., *Pisum sativum* и *Saccharum officinarum*, 1-алканоли на површини листова *Pisum sativum* (абаксијална површина) и многих трава, кетони у *Allium* spp., секундарни алкохоли у *Papaver* spp. и β -дикетони у *Eucalyptus* spp. и *Dianthus* spp. Микрокристална структура епикутикуларног воска зависи од његовог хемијског састава. На пример, воскови који имају висок садржај алкана формирају штапићасте кристале, воскови са високим садржајем β -дикетона кристалишу као кратке цевчице, а воскови са доминантним 1-алканолима формирају плочасте кристале. Уколико је у воску доминантно само једно једињење, кристална структура воска зависиће од типа кристализације тог једињења. У восковима са површине листова биљне врсте *Liriodendron tulipifera* доминантан је 16-хентриаконтанон, као и у восковима са површине врсте *Allium porrum*, па ови воскови формирају кристале у облику плочица (Jetter et al., 2006; Rhee et al., 1998; Holloway, 1994).

3.1.6. Механичка својства кутикуле

Код многих врста, спољашњи слојеви који су прекривени липидима представљају водонепропусну баријеру. Ово је посебно важно за биљке и зглавкаре (инсекте и пауке). Кутикула код биљака, а епикутукула код артропода својом физичком структуром, као и распоредом и саставом кутикуларних липида, одређује степен водонепропусности. Количина и састав липида у кутикули су специфични за врсту, али и старост јединке. Ово паралелно развиће хемијских, структурних и физичких својстава спољашњих слојева је изузетан пример конвергентне еволуције у две веома различите групе организама, као што су биљке и зглавкари. Развиће липидних површинских транспирационих баријера је изванредан еволуциони напредак, а процена је да је отприлике 80% свих врста на земљи прекривено слојем који је сличан кутикули. Претпоставља се да следеће особине тих површинских слојева томе доприносе: 1 – воскови су пластични и стога могу да прате раст и кретање, и 2 – воскови су вишекомпонентне, кристалне или аморфне материје које имају својства самоизлечења, на тај начин што омогућавају затварање малих оштећења нанетих на површину биљака или зглавкара (Jetter et al., 2006; Holloway, 1994).

Неоштећена кутикула има кључну улогу у расту и развоју биљака. Код врста које имају дефектну кутикулу, долази до повећаног губитка воде, а, у исто време, и до морфолошких промена биљних органа. Интеракција биљака са бактеријама, квасцима и гљивицама одвија се на површини биљке, преко кутикуле. Интеракција микроорганизама са биљком зависи од физичких и хемијских карактеристика кутикуле и огледа се у препознавању домаћина, адхезији и исхрани микроорганизама, као и у доступности течне воде. Поред тога, кутикула може пружити механичку заштиту од инвазије микроба (Jetter et al., 2006).

Механичка својства биљне кутикуле се огледају и у пружању физичке потпоре биљној структури, дајући чврстину ћелијским зидовима, а самим тим и биљним ткивима. Механички значај кутикуле се у хортикултури огледа у томе да добро развијена кутикула спречавања пуцање плодова. Повећање унутрашњег притиска, услед упијања воде преко корена или површине плода, може довести до развоја пукотина. Ове пукотине смањују

нутритивну вредност плодова, а самим тим и економску исплативост код биљака чији се плодови користе у исхрани (Knoche et al., 2002; Emmons & Scott, 1997).

3.2. Систематика рода *Primula* L.

Род *Primula* је најбројнији и најраспрострањенији род фамилије Primulaceae Vent. са више од 400 биљних врста које углавном насељавају северну хемисферу. Преко 300 биљних врста овог рода расте на Хималајима и у западној Кини, око 30 у Европи, а око 20 врста расте у Северној Америци (Colombo et al., 2017).

Биљне врсте овог рода су вишегодишње или врло ретко једногодишње биљке. У Србији расте само 5 врста: *P. veris*, *P. acaulis*, *P. elatior*, *P. minima* и *P. auricula*. Корен ових биљака је ваљкаст, а листови се налазе у приземним розетама на дршкама или су седећи, целог обода или режњевито усечени. Цветови су правилног облика и налазе се у штитастих цвастима, а ређе су појединачни. Чашица је подељена на пет делова, а круница је тањираста или левкаста, са пет плиће или дубље усечених режњева. Прашници се налазе у круничној цеви на кратким концима, док се у плоднику налази већи број семених заметака. Чаура пуца на врху помоћу пет зубаца (Николић, 1972). Филогенетска позиција рода *Primula* представљена је у табели 3.2.1.

Табела 3.2.1. Филогенетска позиција¹ рода *Primula* L.

Таксономска категорија	Таксон
<i>Regnum</i>	Plantae
<i>Divisio</i>	Tracheophyta
<i>Subdivisio</i>	Spermatophytina
<i>Classis</i>	Magnoliopsida
<i>Superordo</i>	Asteranae
<i>Ordo</i>	Ericales
<i>Familia</i>	Primulaceae Vent.
<i>Genus</i>	<i>Primula</i> L.

¹ Flora Europaea, <https://eunis.eea.europa.eu/references/1780/species>

3.2.1. *Primula veris* L.

Primula veris, са народним именима јагорчевина, јаглика, јагорчика, јагличе, игличе и јаглац (Коњевић & Татић, 2006), расте на ливадама, на сунчаним и сувим падинама, као и на светлим шумским и жбунастим стаништима. Ова биљка је један од првих весника пролећа (лат. *primus* – први, *veris* – пролећни). *Primula veris* је вишегодишња зељаста биљка са кратким, косим и неразгранатим ризомом, из кога изнад саме земље избија розета од неколико приземних листова, а затим и цветно стабло, висине 15 – 30 cm, прекривено жлездастим длакама са црвенкастим главицама, са цветовима. Листови су јајасти или издуженог облика, постепено или нагло прелазе у лисну дршку; на наличју су маљави или длакави, зелени или беличасти. Цветови су сакупљени у штитасте цвасти, смештене на врху цветне стабљике. Чашица је проширена или широко звонаста, а може бити краћа, једнаке дужине или дужа од круничне цеви. Круница је звонаста са 5 режњева на врху, жуте боје, а на ждрелу цеви се налази пет црвенкастих пега (слика 3.2.1). Плод *P. veris* је овална чаура, дужине 5 – 10 mm, са танким зидовима, и упола је краћа од чашице. Ова биљна врста се сматра лековитом, а у неким земљама (нпр. у Енглеској и Холандији) се користи и у исхрани. Према фармакопеји Ph.Jug.IV официнална дрога је корен (*Primulae radix*), а користи се и цвет (*Primulae flos*) са или без чашице (Којић et al., 1998; Николић, 1972). Јагорчевина се употребљава за израду галенских препарата (декокоти, инфузи, тинктуре и екстракти) који делују као секретолитици и експекторанси, али и као седативи, хипнотици и благи диуретици. Користи се код бронхитиса, кашља и астме, а такође и код несанице, нервозе и хистерије. У рано пролеће младо лишће јагорчевине може се користити као салата и за спремање неких јела, јер садржи витамин С (до 5%). У народној медицини уљем од јагорчевине се лече контузије и болови у мишићима (Kišgeci, 2005; Туцаков, 1990).



Слика 3.2.1. Изглед биљне врсте *Primula veris* (фотографија лево – аутор: Нико Радуловић, локација: Копаоник; фотографија десно – аутор: Владимир Ранђеловић, локација: Јахорина)

3.2.2. *Primula acaulis* (L.) L.

Primula acaulis, са народним именима бело игличе, јегличе, јаговина (Коњевић & Татић, 2006), је вишегодишња биљка са кратким ризомом и кореном, 5 – 15 cm висине. Листови су јој на наличју длакави, на лицу голи, а у пупољку наборани. Касније су обрнуто јајасто издужени, на врховима заобљени, да би при основи постепено прешли у прилично кратку, сужену крилату дршку. Листови су за време цветања 3 – 6 cm дугачки, а касније се увећавају и неправилно су назубљени. Ова биљна врста има велики број цветова, до 25, и налазе се у лисној розети (слика 3.2.2). Приперци су много краћи од дугачке цветне дршке. Чашица је ваљкастог облика, угласта, до мање од половине усечена, са линеарно-троугластим зупцима. Круница је жуте боје, ретко беле. Осушена круница је често зеленкаста. Цев крунице је нешто дужа од чашице, а ждрело садржи пет троугластих наранџастих мрља. Обод крунице је тањираст, ширине 2,5 – 3 cm. Чаура је овална, а семе мрко и брадавичаво. Станиште *P. acaulis* су светле листопадне шуме, шибљаци, воћњаци, долине потока, и ливаде (Николић, 1972).



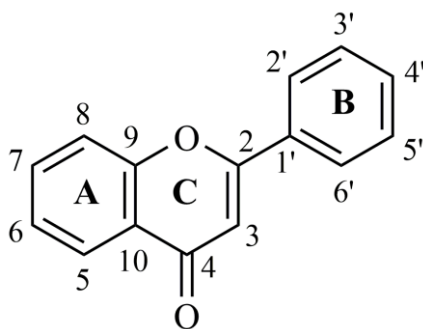
Слика 3.2.2. Изглед биљне врсте *P. acaulis* (аутор фотографије: Ивица Стошић, локација: село Горња Слатина)

3.3. Секундарни метаболити рода *Primula*

3.3.1. Флавоноидни егзудати рода *Primula*

Флавоноидни егзудати представљају секрете биљака који се углавном састоје од флавоноида који се налазе на површини биљних органа и производе их биљке које поседују жлездане трихоме, који се такође налазе на површини биљке (Wagner et al., 2004). Жлездани трихоми могу да синтетишу, чувају и по потреби излучују велике количине различитих класа метаболита, као што су терпени, алкалоиди, флавоноиди, итд. (Budzianowski & Wollenweber, 2007; Spring et al., 2003).

Флавоноиди су бројна класа секундарних метаболита биљака, а основа њихове структуре је скелет C₆-C₃-C₆ (слика 3.3.1), па тако више биљке представљају природни извор флавоноида. До данас је познато преко девет хиљада флавоноида и подељени су на неколико класа једињења: флавони, изофлавоноиди, флаванолни, флавандиоли, флаванони, антоцијанини, итд. Структурна разлика ових класа зависи од структуре прстена C, као и од броја и структуре супституената везаних за флавоноидни скелет (Lee et al., 2005; Williams & Grayer, 2004; Iwashina, 2000).



Слика 3.3.1. Флавоноидни скелет

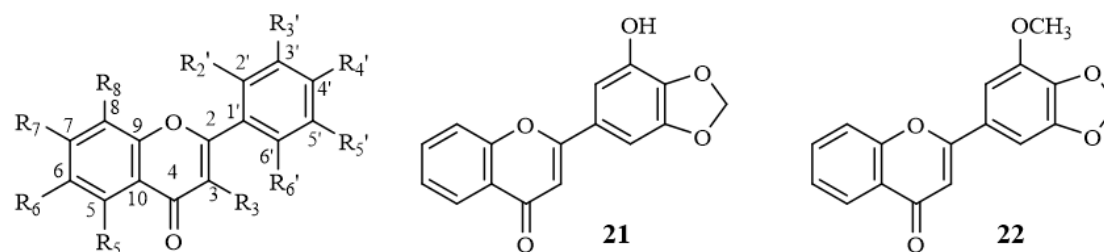
Флавоноиди имају различите функције у биљци, па тако они представљају биљне пигменте, имају UV-заштиту, као и заштиту од слободних радикала и патогена (Steinkellner et al., 2007; Harborne & Williams, 2000). Такође је познато да флавоноиди могу бити корисни за здравље људи јер имају антиоксидантну, антиинфламаторну и антипролиферативну активност (Werner et al., 2010; Korkina, 2007). Утврђено је и да превенирају високи крвни притисак, успоравају старење, а поседују и антибактеријску

активност (Yazaki et al., 2009). Зато што имају широк структурни диверзитет, веома су распрострањени у биљкама, а и хемијски су стабилни, флавоноиди се налазе међу првим једињењима која су коришћена у таксономским истраживањима (Essokne et al., 2012).

Биљне врсте фамилије Primulaceae богате су флавоноидима, међу којима је први изолован флавон (**1**) 1915. године из врсте *Primula pulverulenta* (Müller, 1915). Касније је откривено да се флавон (**1**) налази у око 35 биљних врста рода *Primula* и *Dionysia*. Флавоноиди кемпферол (3,5,7,4'-тетрахидроксифлавонол, **26**) и кверцетин (3,5,7,3',4'-пентахидроксифлавонол, **28**) присутни су у изобиљу у биљним врстама ове фамилије, углавном слободни, на пример, идентификовани су у хидролизату листова врста *P. capitata* и *P. ioessa*, као и хидролизату цветова *P. auricula* (слика 3.3.2 и табела 3.3.1; Li et al., 2020; Harborne, 1968), док су у ретким случајевима кемпферол (**26**) и кверцетин (**28**) везани у облику гликозида, као на пример за генциобиозу у врсти *P. sinensis* (Harborne & Sherratt, 1961; Harborne, 1965). У фамилији Primulaceae, понекад постоји таксономски проблем поделе таксона између родова *Primula*, *Cortusa* и *Dionysia*. Познато је да хемијски карактери могу бити од помоћи у биљној систематици, нпр. присуство антоцијанина, флавонола и других фенолних једињења је искоришћено у те сврхе и у роду *Primula*. У одређеним случајевима флавоноидни гликозиди из листова и цветова врста *Primula* се могу се користити за идентификацију врсте. Кемпферол-3-генциобиоза, изолована из цветова врсте *P. sinensis*, карактеристична је за род *Primula*, јер је заступљена у преко 70% биљних врста овог рода као састојак цвета, а такође је често присутна и у листовима. Рутин (кверцетин-3-О-рутинозид), изолован из врста *P. chionantha* и *P. pulverulenta*, широко је распрострањен у роду *Primula*, као састојак листова. Неки хидроксифлавоноли су део жутог цветног пигмента, нпр. госсипетин (3,5,7,8,3'-пентахидроксифлавонол, **29**) је значајан таксономски маркер рода *Primula*. 3',4'-Дихидроксифлавонол (**11**) има карактеристичну флуоресценцију и лако се може детектовати у хидролизату листова, па такође представља битан таксономски маркер, јер је заступљен у око 70% биљних врста рода *Primula*. Такође се може наћи и у родовима *Dionysia* и *Cortusa*, али није детектован ни у једној биљној врсти других родова фамилије Primulaceae.

Флавонол (**1**) је најчешћи састојак егзудата биљних врста рода *Primula* и присутан је у скоро свим врстама овог рода. Неке биљне врсте рода *Primula*, као што је *P. tibetica*, *P. glabra* и *P. involucrata*, од флавоноида садрже само флавонол (**1**). Али, на пример *P. elatior*

садржи **1** само у траговима, док су његови хидроксиловани и метоксиловани деривати много више заступљени. Врста *P. edelbergii* садржи само 8-метокси-5-хидроксифлавоон (**16**) али не садржи **1**. С друге стране, егзудат *P. sikkimensis* поред **1** садржи и 5,8,2'-трихидроксифлавоон (**23**), и они су једини детектовани флавоноиди у овој врсти. Флавоноиди су углавном део егзудата листова, нпр. у ацетонским испирцима листова врста *P. japonica* и *P. pulverulenta* идентификовани су 2',5'-дихидроксифлавоон (**10**) и 5'-ацетокси-2'-хидроксифлавоон (**14**, Wollenweber & Mann, 1988), а 5,2',5'-трихидроксифлавоон (**24**) је изолован из *P. pulverulenta* (Wollenweber et al., 1989). 2'-Метоксифлавоон (**3**) и 2'-метокси-5-хидроксифлавоон (**17**) изоловани су са површине листова врста *P. kewensis*. 6-Метокси-5-хидроксифлавоон (**15**), који није присутан у другим биљним врстама, детектован је у воску *P. pulverulenta*. Интересанто је то да је 4',5'-метилендиокси-3'-хидроксифлавоон (**21**) детектован једино у узорку *P. elatior* (Apel et al., 2017; Bhutia, 2013; Bhutia & Valant-Vetschera, 2012; Wollenweber & Mann, 1986). На слици 3.3.2. и у табели 3.3.1 дат је литературни преглед флавоноида присутних у шездесет биљних врста рода *Primula* (Bhutia, 2013; Bhutia et al., 2013; Bhutia et al., 2012; Bhutia & Valant-Vetschera, 2012; Vitalini et al., 2011; Valant-Vetschera et al., 2009; Budzianowski & Wollenweber, 2007; Iinuma et al., 2006; Budzianowski et al., 2005; Tokalov et al., 2004; Huck et al., 2000): флавоон (**1**), 5-хидроксифлавоон (примулетин, **2**), 2'-хидроксифлавоон (**3**), 2'-метоксифлавоон (**4**), 3'-метоксифлавоон (**5**), 3,5-дихидроксифлавоон (**6**), 5,8-дихидроксифлавоон (**7**), 5,2'-дихидроксифлавоон (**8**), 8,2'-дихидроксифлавоон (**9**), 2',5'-дихидроксифлавоон (**10**), 3',4'-дихидроксифлавоон (**11**), 2',5'-диметоксифлавоон (**12**), 3',4'-диметоксифлавоон (**13**), 5'-ацетокси-2'-хидроксифлавоон (**14**), 6-метокси-5-хидроксифлавоон (**15**), 8-метокси-5-хидроксифлавоон (**16**), 2'-метокси-5-хидроксифлавоон (**17**), 4',5'-диметокси-3'-хидроксифлавоон (**18**), 8,2'-диметокси-5-хидроксифлавоон (**19**), 4'-метокси-3',5'-дихидроксифлавоон (**20**), 4',5'-метилендиокси-3'-хидроксифлавоон (**21**), 4',5'-метилендиокси-3'-метоксифлавоон (**22**), 5,8,2'-трихидроксифлавоон (**23**), 5,2',5'-трихидроксифлавоон (**24**), 3',4',5'-триметоксифлавоон (**25**), 3,5,7,4'-тетрахидроксифлавоон (кемпферол, **26**), 5,6,2',6'-тетраметоксифлавоон (запотин, **27**), 3,5,7,3',4'-пентахидроксифлавоон (кверцетин, **28**), 3,5,7,8,3'-пентахидроксифлавоон (госипетин, **29**) и 5,6,2',3',6'-пентаметоксифлавоон (**30**).



	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	R _{6'}
Флаван (1)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
5-Хидроксифлаван (примулетин, 2)	H	OH	H	H	H	H	H	H	H	H
2'-Хидроксифлаван (3)	H	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
2'-Метоксифлаван (4)	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	H
3'-Метоксифлаван (5)	H	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	H
3,5-Дихидроксифлаван (6)	OH	OH	H	H	H	H	H	H	H	H
5,8-Дихидроксифлаван (7)	H	OH	H	H	OH	H	H	H	H	H
5,2'-Дихидроксифлаван (8)	H	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H
8,2'-Дихидроксифлаван (9)	H	H	H	H	OH	OH	H	H	H	H
2',5'-Дихидроксифлаван (10)	H	H	H	H	H	OH	H	H	OH	H
3',4'-Дихидроксифлаван (11)	H	H	H	H	H	H	OH	OH	H	H
2',5'-Диметоксифлаван (12)	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
3',4'-Диметоксифлаван (13)	H	H	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
5'-Ацетокси-2'-хидроксифлаван (14)	H	H	H	H	H	OH	H	H	OAc	H
6-Метокси-5-хидроксифлаван (15)	H	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	H	H
8-Метокси-5-хидроксифлаван (16)	H	OH	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H
2'-Метокси-5-хидроксифлаван (17)	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	H
4',5'-Диметокси-3'-хидроксифлаван (18)	H	H	H	H	H	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H
8,2'-Диметокси-5-хидроксифлаван (19)	H	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
4'-Метокси-3',5'-дихидроксифлаван (20)	H	H	H	H	H	H	OH	OCH ₃	OH	H
5,8,2'-Трихидроксифлаван (23)	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	H	H
5,2',5'-Трихидроксифлаван (24)	H	OH	H	H	H	OH	H	H	OH	H
3',4',5'-Триметоксифлаван (25)	H	H	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
3,5,7,4'-Тетрахидроксифлаван (кемпферол, 26)	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
5,6,2',6'-Тетраметоксифлаван (запотин, 27)	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
3,5,7,3',4'-Пентахидроксифлаван (кверцетин, 28)	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
3,5,7,8,3'-Пентахидроксифлаван (госипетин, 29)	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H	H
5,6,2',3',6'-Пентаметоксифлаван (30)	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃

Слика 3.3.2. Флавоноиди присутни у биљним врстама рода *Primula*

Табела 3.3.1. Флавоноиди заступљени у бильним врстама (на површини листова и цветова) рода *Primula*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
<i>P. verticillata</i>	•	•	•	•			•	•		•	•																						
<i>P. boveana</i>	•	•	•	•																													
<i>P. gaubeana</i>	•		•																														
<i>P. kewensis</i>	•	•	•	•	•		•				•							•															
<i>P. florindae</i>	•	•	•	•			•	•			•													•									
<i>P. ioessa</i>	•	•	•				•	•																•		•							
<i>P. waltonii</i>	•	•	•				•	•			•													•									
<i>P. alpicola</i>	•	•	•				•	•			•													•									
<i>P. nutans</i>	•	•	•								•	•																					
<i>P. capitata</i>	•	•	•	•			•	•	•	•	•		•	•	•		•		•							•		•					
<i>P. denticulata</i>	•	•	•				•	•																									
<i>P. vialii</i>	•	•	•	•			•	•			•																•						
<i>P. auriculata</i>	•	•	•				•	•																									
<i>P. luteola</i>	•	•	•				•	•																									
<i>P. farinosa</i>	•	•	•			•	•	•			•																						
<i>P. frondosa</i>	•	•	•				•	•																									
<i>P. halleri</i>	•	•	•	•			•	•			•							•															
<i>P. mistassinica</i>	•	•	•				•	•																									
<i>P. yuparensis</i>	•	•	•				•																										
<i>P. chionantha</i> subsp. <i>melanops</i>	•	•	•				•	•			•																						
<i>P. chionantha</i> subsp. <i>sinopurpurea</i>	•	•	•				•	•			•																						
<i>P. elatior</i>	•			•	•							•	•						•		•	•				•						•	
<i>P. cockburniana</i>	•	•	•				•	•	•	•	•																						
<i>P. bulleyana</i> subsp. <i>beesiana</i>	•	•	•					•	•	•	•																						
<i>P. bulleyana</i>	•	•	•	•				•	•	•	•																						
<i>P. japonica</i>	•	•	•	•							•	•																					
<i>P. pulverulenta</i>	•	•	•					•	•	•	•																						
<i>P. marginata</i>	•	•	•				•																										
<i>P. simensis</i>	•		•	•	•		•							•	•																		
<i>P. albenensis</i>	•		•		•		•							•																			
<i>P. auricula</i>	•	•	•				•	•			•																						
<i>P. palinuri</i>	•	•	•					•	•	•	•													•			•						
<i>P. rusbyi</i>	•	•	•					•	•	•	•																						
<i>P. forrestii</i>	•	•	•				•	•																•	•								
<i>P. malacoides</i>	•	•	•				•	•		•	•			•										•	•	•							
<i>P. polyneura</i>	•	•		•	•								•	•																			
<i>P. sinensis</i>	•	•	•								•					•																	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>P. dickieana</i>	●	●		●	●						●			●			●													
<i>P. sikkimensis</i>	●																						●							
<i>P. firmipes</i>	●			●															●				●				●			
<i>P. rosea</i>	●	●		●										●			●													
<i>P. specuicola</i>	●	●												●																
<i>P. darialica</i>	●	●						●						●																
<i>P. tibetica</i>	●																													
<i>P. involucrata</i>	●																													
<i>P. glomerata</i>	●	●					●			●				●									●							
<i>P. megalocarpa</i>	●	●					●	●		●				●																
<i>P. macrophylla</i>	●	●					●	●						●									●							
<i>P. glabra</i>	●																													
<i>P. bellidifolia</i>	●						●				●			●																
<i>P. primulina</i>	●						●							●																
<i>P. prolifera</i>	●				●			●						●																
<i>P. bracteosa</i>	●	●					●							●																
<i>P. calderiana</i>	●						●	●		●	●			●									●							
<i>P. forbesii</i>	●	●						●		●				●																
<i>P. hirsuta</i>	●			●			●							●																
<i>P. glaucescens</i>	●	●					●							●																
<i>P. edelbergii</i>																	●													
<i>P. veris</i>	●		●	●	●							●		●					●		●		●			●		●		●
<i>P. acaulis</i>	●	●		●	●									●	●				●	●						●				●

3.3.1.1. Флавоноиди биљних врста *P. veris* и *P. acaulis*

Анализом егзудата листова, добијеног екстракцијом рефлуктовањем у смеси хлороформа и метанола култивисане биљне врсте *P. veris*, идентификовано је следећих 10 флавона: флавон (**1**), 2'-хидроксифлаван (**3**), 2'-метоксифлаван (**4**), 3'-метоксифлаван (**5**), 2',5'-диметоксифлаван (**12**), 3',4'-диметоксифлаван (**13**), 4',5'-диметокси-3'-хидроксифлаван (**18**), 4',5'-метилендиокси-3'-метоксифлаван (**22**), 3',4',5'-триметоксифлаван (**25**), и 5,6,2',6'-тетраметоксифлаван (запотин, **27**, слика 3.3.2; табела 3.3.1; Budzianowski et al., 2005).

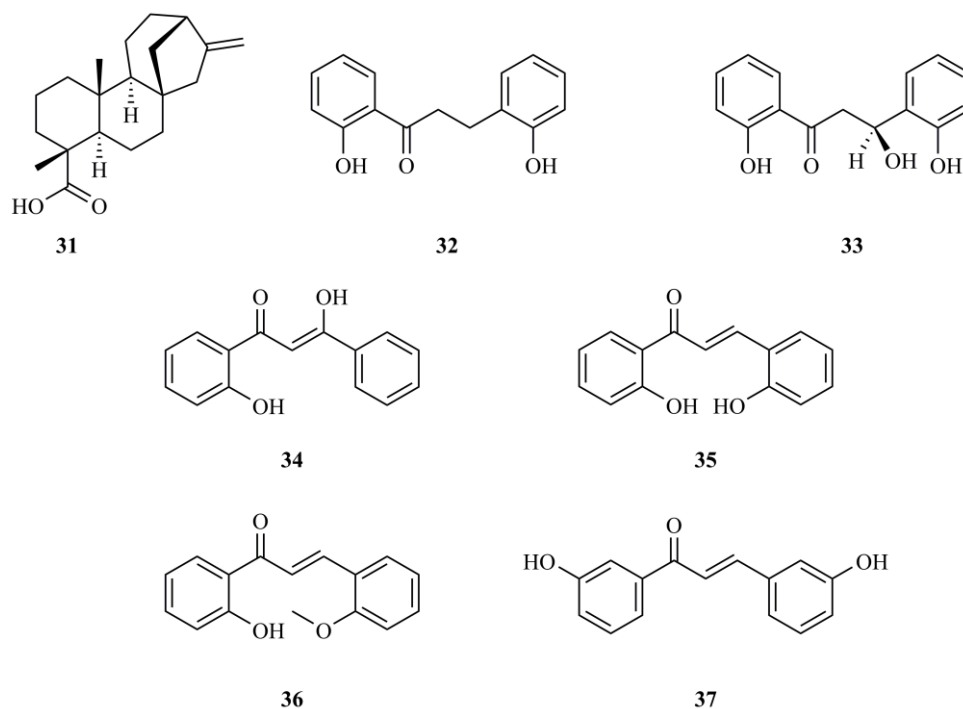
Испирањем листова *P. veris* ацетоном, на собној температури, добијени су следећи флавоноиди (ApeI et al., 2017; Bhutia et al., 2012): 4',5'-диметокси-3'-хидроксифлаван (**18**), 2'-хидроксифлаван (**3**), 3',4'-диметоксифлаван (**13**), 3',4',5'-триметоксифлаван (**25**), 2',5'-диметоксифлаван (**12**), 2'-метоксифлаван (**4**), 3'-метоксифлаван (**5**), флавон (**1**), 4'-метокси-3',5'-дихидроксифлаван (**20**) и 3,5,7,8,3'-пентахисроксифлаван (госипетин, **29**, слика 3.3.2). Аналогним поступком у испирку листова *P. acaulis* идентификовани су следећи флавоноиди: флавон (**1**), 2'-метоксифлаван (**4**), 5'-ацетокси-2'-хидроксифлаван (**14**), 3'-метоксифлаван (**5**), 4',5'-диметокси-3'-хидроксифлаван (**18**), 3',4'-диметоксифлаван (**13**), 3',4',5'-триметоксифлаван (**25**), 5-хидроксифлаван (**2**), 2'-метокси-5-хидроксифлаван (**17**) и 3,5,7,8,3'-пентахисроксифлаван (госипетин, **29**, табела 3.3.1 и слика 3.3.2; ApeI et al., 2017; Bhutia et al., 2012).

Huck и сарадници су у мацерату цветова *P. veris* идентификовали 3',4',5'-триметоксифлаван (**25**; слика 3.3.2). Поред тога, идентификовали су и два монометоксифлавона, један диметоксифлаван и два пентаметоксифлавона, али због ниског садржаја нису снимљени NMR спектри, па није одређен положај метокси-група у молекулима (Huck et al., 2000). Поред 3',4',5'-триметоксифлавона (**25**), у испирцима *Primulae flos* идентификовани су кверцетин (**28**) и његови деривати, као и кемпферол (**26**) (El Morchid et al., 2014; Budzianowski et al., 2005; Harborne & Baxter, 1993).

3.3.2. Нефлавоноидни састојци егзудата рода *Primula*

Поред флавоноида, у егзудатима биљних врста рода *Primula* идентификована су следећа једињења:

- један дитерпен у егзудату врсте *P. minima* (**31**, ент-каур-16-ен-19-ска киселина, Elser et al., 2016),
- два дихидрохалкона у егзудату врсте *P. glutinosa* (**32**, 1,3-bis(2-хидроксифенил)-1-пропанон и **33**, (S)-3-хидрокси-1,3-bis(2-хидроксифенил)-1-пропанон, Bhutia et al., 2013),
- четири халкона (**34**, 2',β-дихидроксихалкон, у егзудатима врста *P. palinuri* и *P. pulverulenta*, **35**, 2,2'-дихидроксихалкон, у егзудатима врста *P. nutans*, *P. denticulata*, *P. bulleyana*, *P. vulverulenta*, *P. palinuri*, *P. forrestii* и *P. polyneura*, **36**, 2-метокси-2'-хидроксихалкон, у егзудату врсте *P. palinuri* (Valant-Vetschera et al., 2009; Budzianowski & Wollenweber, 2007; Wollenweber et al., 1989) и **37**, 3,3'-дихидроксихалкон у егзудату врсте *P. macrophylla*, (слика 3.3.3, Ahmad et al., 1992)).



Слика 3.3.3. Нефлавоноидни састојци егзудата врста рода *Primula*

3.4. Систематика рода *Liriodendron* L.

Ред Magnoliales садржи 6 фамилија: Annonaceae, Myristicaceae, Magnoliaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae и Himantandraceae. На основу молекуларних филогенетских студија (Parks & Wendel, 1990), фамилија Magnoliaceae обухвата два рода, *Magnolia* (225 врста) и *Liriodendron*. Роду *Liriodendron* припадају две врсте, *Liriodendron tulipifera* L., која расте на истоку Северне Америке и *L. chinense*, која расте у Кини и Вијетнаму. Име рода потиче од грчких речи *λίρα* - лира (односи се на листове) и *δένδρον* - дрво, док епитет врсте („*tulipifera*“) на латинском значи онај који носи лале. Дрвеће овог рода се лако препознаје по листовима који су карактеристични и обликом подсећају на лиру, а у већини случајева имају четири режња са равном ивицом. Стабло може бити високо и до 40 m услед конкуренције и издуженог раста у гушћим састојнама, док је углавном нешто ниже ако расте на отвореном пољу. Дебло је обично стубасто, и формира компактну, купасту круну витких грана. Образује плитак коренов систем, углавном хоризонтално раширен, са много жиличастих коренова, па захтева доста простора. Филогенетска позиција рода *Liriodendron* и врсте *L. tulipifera* у царству Plantae је приказана у табели 3.4.1 (<https://www.britannica.com/plant/Magnoliaceae>).

Табела 3.4.1. Филогенетска позиција² рода *Liriodendron* и биљне врсте *Liriodendron tulipifera* L.

Таксономска категорија	Таксон
<i>Regnum</i>	Plantae
<i>Divisio</i>	Tracheophyta
<i>Subdivisio</i>	Spermatophytina
<i>Classis</i>	Magnoliopsida
<i>Superordo</i>	Magnolianaes
<i>Ordo</i>	Magnoliales
<i>Familia</i>	Magnoliaceae
<i>Genus</i>	<i>Liriodendron</i> L.
<i>Taxon</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.

² Flora Europaea, <https://eunis.eea.europa.eu/references/1780/species>

3.4.1. *Liriodendron tulipifera* L.

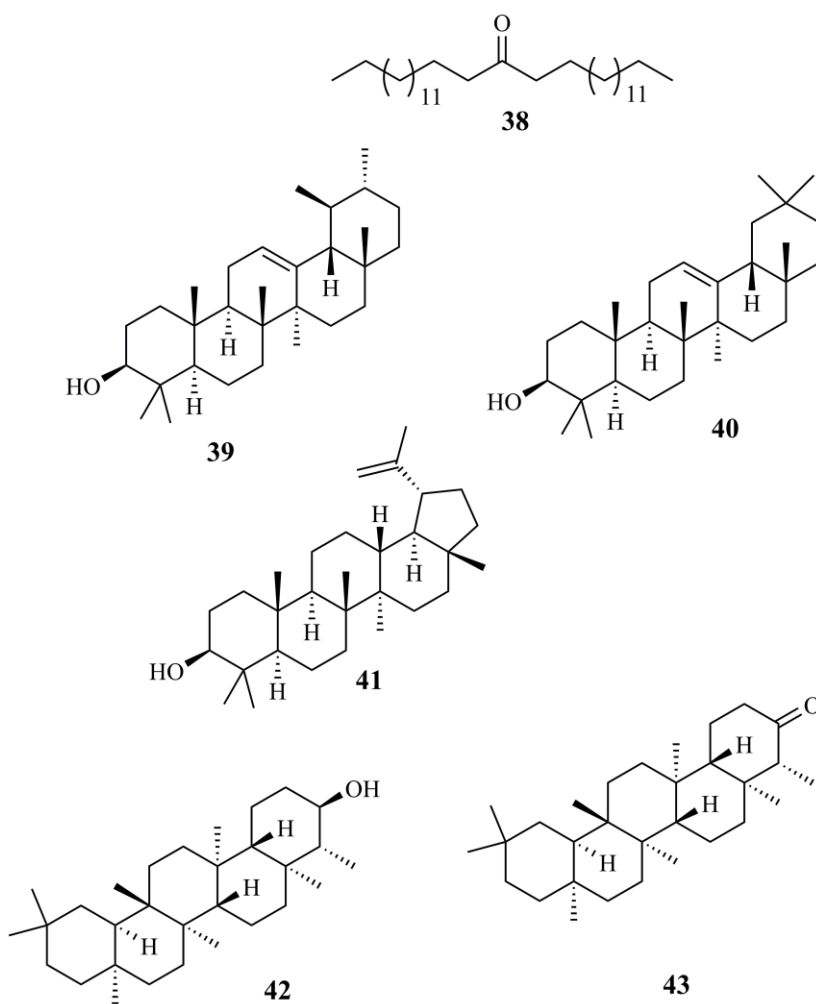
Liriodendron tulipifera, лалино дрво или тулипановац (слика 3.4.1) је листопадно дрво, које може достићи висину од 30 до 40 m и пречник дебла и до 2 m. Гаји се широм света као декоративна и парковска врста. Стабло лалиног дрвета може да се користи за израду намештаја, а у мањој мери се користи и за израду папира. Када је дрво младо, кора стабла и грана је глатка и тамнозелена, а касније потамни и постане смеђа, док текстура постаје хрпава. Листови су 7 – 12 cm дугачки, равних ивица, са 4 режња. Светлозелене су боје, а у јесен пожуте. Цветови су жутозелене боје, дугачки око 5 cm и почињу са цветањем у пролеће. Имају 6 круничних листића, са црвеним мрљама по средини и 4 чашична листића. Збирни плод је конусног облика, дужине око 5 cm и сазрева од августа до октобра. Праве плодове представљају орашице које су смештене унутар одрвенелог конусног плода. Ова биљна врста је релативно отпорна на мраз, па тако одрасла стабла могу да издрже температуру и до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, док младе јединке мрзну на температури од -12 до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Најбоље се развија на влажним, киселим до слабо алкалним земљиштима. Може достићи старост и до 400-500 година (<https://www.britannica.com/plant/Magnoliaceae>).



Слика 3.4.1. Изданак са цветом и листовима врсте *Liriodendron tulipifera* (аутор фотографија: Милан Стојковић, локација: парк „Светог Саве“, Ниш)

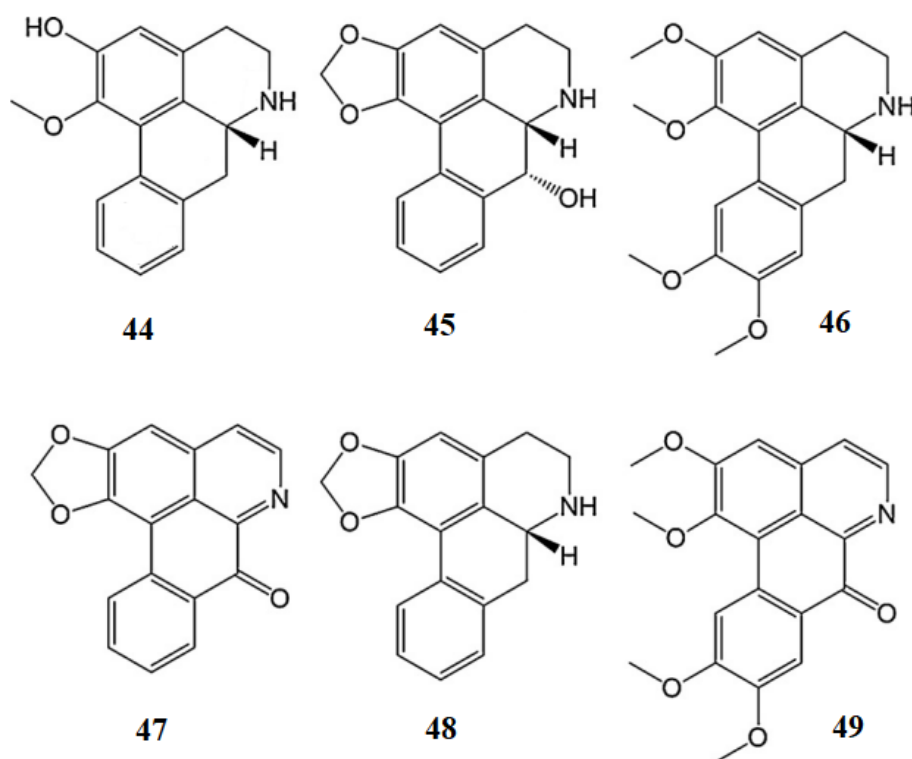
3.5. Секундарни метаболити биљне врсте *Liriodendron tulipifera*

У хлороформском испирку свежих листова врсте *L. tulipifera* идентификоване су масне киселине (које представљају 23% воска), алкохоли (23%), алдехиди (12%), алкани (8%), естри (7%) и бензил-естри (1%), и 16-хентриаконтанон (палмитон, **38**), који је доминантан састојак и чини 23% воска. У воску су идентификовани и тритерпеноли (укупно 11%), α -амирин (**39**), β -амирин (**40**) и лупеол (**41**), који су били заступљени у међусобном односу 1:2:2. Такође су идентификовани фриделанол (**42**) и фриделанон (**43**) са око 1% заступљености (слика 3.5.1; Gülz et al., 1992).



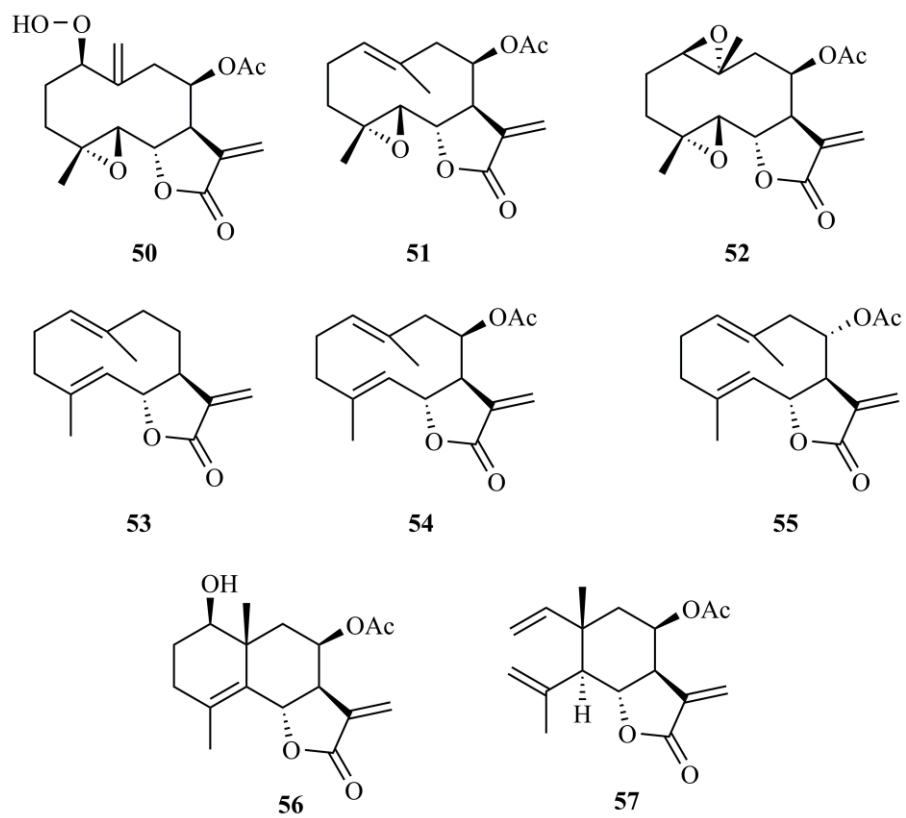
Слика 3.5.1. Једињења присутна у хлороформском испирку свежих листова *L. tulipifera*: 16-хентриаконтанон (палмитон; **38**), α -амирин (**39**), β -амирин (**40**), лупеол (**41**), фриделанол (**42**) и фриделанон (**43**)

Liriodendron tulipifera спада међу прве биљне врсте у којима је откривено да се апорфински алкалоиди и лактони налазе заједно. Идентификовано је шест алкалоида који су изоловани перколацијом из стабла: асимилобин (**44**, Leboeuf et al., 1982; Chen-Loung et al., 1976a), норушинсунин (**45**, Chen-Loung et al., 1976b), норглауцин (**46**, Cava et al., 1973), лириоденин (**47**, Costa et al., 2009; Harrigan et al., 1994), анонаин (**48**, Leboeuf et al., 1982) и оксоглауцин (**49**, Singh et al., 2007; Chen-Loung et al., 1976a).



Слика 3.5.2. Алкалоиди детектовани у стаблу врсте *L. tulipifera*

Такође су идентификована три лактона, пероксиферолид (**50**), липиферолид (**51**) и епитулипдиенолид-диепоксид (**52**), који су изоловани из листова екстракцијом етанолом (слика 3.5.2; Graziose et al., 2011; Muhammad & Hufford, 1989; Doskotch et al., 1975). Из корена ове биљне врсте изоловани су лактони: костунолид (**53**), тулипинолид (**54**), епитулипинолид (**55**), γ -лириоденолид (**56**) и епитулипдиенолид (**57**; слика 3.5.3; Rowe & Conner, 1979; Doskotch et al., 1975).



Слика 3.5.3. Лактони детектовани у стаблу врсте *L. tulipifera*

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

4.1. Хемикалије и растварачи

Све хемикалије коришћене у раду су биле *p.a.* чистоће и набављене од следећих компанија: *Acros Organics* (Морис Плејнс, Њу Џерзи, САД), *Sigma Aldrich* (Сент Луис, Мисури, САД), *Alfa Aesar* (Ворд Хил, Масачусетс, САД), *Merck* (Дармштат, Немачка), *Fluka* (Ној-Улм, Немачка), *Carl Roth* (Карлсруе, Немачка), *Tokyo Chemical Industry Co.* (Токио, Јапан), Центрохем (Стара Пазова, Србија) и Зорка (Шабац, Србија). Сви растварачи су предестиловани пре коришћења, док су остале хемикалије коришћене без претходног пречишћавања.

4.2. Методе анализе и раздвајања

4.2.1. Гасна хроматографија куплована са масеном спектрометријом (GC-MS)

Анализа састојака испирака и хроматографских фракција, и састава реакционих смеша, као и праћење тока реакција, вршени су гасном хроматографијом куплованом са масено-спектрометријском детекцијом (GC-MS). Ова анализа (3 ињектовања) изведена је коришћењем *Hewlett-Packard* 6890N гасног хроматографа, на капиларној колони DB-5MS (5% фенилметилполисилоксан и 95%-диметилполисилоксан, димензија 30 mm × 0,25 mm, дебљина филма 0,25 μm, *Agilent Technologies*, САД), а који је директно повезан са 5975B масеним детектором. Јонизација је вршена електронима енергије 70 eV. Масени скен је бележен у интервалу m/z 35-750 (брзина скенирања 5 скенова у секунди), а време скенирања је било 0,34 секунде. Режим рада инструмента: температура ињектора и трансфер линије су одржаване на 250° и 320 °C; коришћена су два температурна програма – програм 1: температура пећи је програмирана линеарно од 70° до 315 °C брзином од 5 °C/min, након тога је температура одржавана 30 min на 315 °C; програм 2: линеарно програмирање од 200° до 315 °C брзином од 1 °C/min, а након тога изотермално 30 min на 315 °C. Хелијум је коришћен као носећи гас, са константним протоком од 1,0 ml/min за програм 1 и 1,5 ml/min за програм 2; ињектован је 1 μl раствора узорка (10 mg је растворено у 1 ml CHCl₃ или Et₂O) у *split* режиму (40:1). Релативна заступљеност састојака испирака и хроматографских фракција одређена је на основу релативних односа површина пикова, без коришћења корекционих фактора, осим у случају одређивања процента

алкана, бензил-естара, 2-алканона и метил-естара масних киселина, чија је квантификација описана у поглављу 4.3.4. Квантификација секундарних алканолa идентификованих у фракцији 4 одређена је интеграљењем хроматограма парцијалних јонских струја најзаступљенијег фрагментног јона, при чему релативни проценти класа алкохола нису међусобно упоредиви (на пример за 3-алканоле и 4-алканоле, итд.).

4.2.1.1. Анализа хроматограма и обрада података

Добијени хроматограми, анализирани су помоћу *MSD ChemStation* (вер. D.03.00.611, *Agilent Technologies*, Санта Клара, САД), *AMDIS* (енгл. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, вер. 2,68; DTRA/NIST) и *NIST MS Search* софтвера (вер. 2.0D, Национални институт за стандарде и технологију, САД). *AMDIS* је коришћен за деконволуцију масених скенова, тј. екстракцију масених спектра из преклопљених пикова, док је *NIST MS Search* употребљаван за претрагу доле наведених библиотека масених спектра. Линеарни ретенциони индекси анализата одређени су коињекцијом са хомологом серијом *n*-алкана од C₈-C₄₀ (Van Den Dool & Kratz, 1963).

Хемијски састав испитиваних узорака испирака, хроматографских фракција и реакционих смеша одређен је упоређивањем експериментално добијених линеарних ретенционих индекса састојака са литературним вредностима, поређењем масених спектра са спектрима познатих једињења из библиотека *Wiley Registry of Mass Spectral Data 10th Edition*, *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 14*, *MassFinder 2.3*, *Adams* (Adams, 2017) и MS библиотеке *OSA* (енгл. *Organic Synthesis and Analysis*) истраживачке групе на Департману за хемију, ПМФ-а у Нишу. Где год је било могуће, вршена је и анализа узорака коињекцијом са одговарајућим стандардом.

4.2.2. Нуклеарно-магнетна резонантна (NMR) спектроскопија

Једнодимензионални (¹H и ¹³C) NMR спектри снимљени су на спектрометру *Bruker Avance III* (*Bruker Corporation, Fällanden*, Швајцарска, на 400 MHz за ¹H и 100,6 MHz за ¹³C). Дводимензионални (¹H-¹H COSY, NOESY, gHSQC и gHMBC) и вишепулсни (DEPT-

90/135) NMR спектри и експерименти селективног ^1H хомонуклеарног декупловања снимљени су применом пулсних секвенци доступних у Брукеровој библиотеци секвенци. Сви спектри снимљени су на $25\text{ }^\circ\text{C}$ у деутерисаном хлороформу (CDCl_3), а као унутрашњи стандард коришћен је тетраметилсилан (TMS, Me_4Si). Вредности хемијских померања су дате у δ (ppm) јединицама у односу на TMS ($\delta_{\text{H}}=0,00$) за ^1H NMR спектре или у односу на резидуални CHCl_3 ($\delta_{\text{H}}=7,26$ ppm), односно $^{13}\text{CDCl}_3$, ($\delta_{\text{C}}=77,16$ ppm) за ^{13}C NMR спектре и хетеронуклеарне 2D NMR спектре. Константе купловања (J) изражене су у херцима (Hz). Маса од 10 до 20 mg супстанце растворена је у 1 ml CDCl_3 , 0,7 ml тог раствора пребачено је у 5 mm *Wilmad* 528-TR-7 NMR кивету. Добијени спектрални подаци, обрађени су *MestreNova* софтвером (v.11.0.3-18688, *Mestrelab Research S.L.*, Ла Коруња, Шпанија).

4.2.2.1. ^1H NMR симулације

^1H NMR симулације су коришћене за прецизно одређивање вредности хемијских померања, δ_{H} , и константи купловања, J , протона једињења, идентификованих и синтетских, помоћу *MestreNova* софтверског пакета (v.11.0.3-18688, *Mestrelab Research S.L.*, Ла Коруња, Шпанија).

4.2.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR)

FTIR инфрацрвени спектри синтетисаних једињења снимани су у танком слоју (*neat*) на инструменту *Thermo Nicolet*, модел 6700 (*Waltham*, Масачусетс, САД).

4.2.4. Ултраљубичаста спектроскопија (UV)

UV спектри синтетисаних једињења снимљени су на инструменту UV-1800 UV-Vis спектрофотометру (*Shimadzu*, Кјото, Јапан). Као растварачи коришћени су *n*-хексан и ацетонитрил одговарајуће чистоће.

4.2.5. Елементна микроанализа

Елементна микроанализа угљеника и водоника синтетисаних чистих једињења је извршена на микроанализатору *Carlo Erba 1106*. Добијени резултати су се добро слагали са израчунатим вредностима.

4.2.6. Одређивање тачке топљења

Тачке топљења чврстих синтетисаних супстанци, смеше алкана, смеше алкана и бензил-бехената и смеше алкана и бензил-естара добијених синтезом из пчелињег воска одређене су на апарату за одеђивање тачке топљења *MPM-HV2 (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Немачка)*. Добијене вредности нису кориговане.

4.2.7. Танкослојна хроматографија

Танкослојна хроматографија (енг. *Thin-Layer Chromatography, TLC*) вршена је на алуминијумским плочама са претходно нанесеним слојем силика-гела 40 F₂₅₄ (*Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Немачка*). Као елуент су коришћене смеше *n*-хексана и диетил-етра, различитих поларности. Мрље на TLC-плочама визуализоване су помоћу UV-лампе (254 nm) и 50%-тним (*v/v*) воденим раствором сумпорне киселине или раствором фосфомолибденске киселине (12 g) у етанолу (250 ml), након чега су плоче кратко загреване до појаве мрља.

4.2.8. *Dry-flash* хроматографија

За препаративно раздвајање састојака испирака, као и за пречишћавање синтетисаних једињења, коришћена је апаратура за *dry-flash* хроматографију, која се састојала од колоне силика-гела 60 (величина честица: 35-70 μm ; *Acros Organics, Geel, Белгија*), напакване на синтерованом стакленом левку средње порозности, и стандардне

боце за вакуум филтрацију. Смеша *n*-хексана и диетил-етра је коришћена као елуент (под градијентним или изократским условима).

4.2.9. Молекулско моделирање

Процена стабилности за одабране молекуле остварена је на основу израчунавања садржаја енергије (енталпије настајања) коришћењем ММ+ модела у оквиру *Chem 3D* (*Chem Office 2016*) софтверског пакета. Вредности су изражене у kJ/mol.

4.3. Биљни материјал и припрема узорака

4.3.1. Биљни материјал

Биљни материјал анализираних врста родова *Primula* и *Liriodendron* сакупљен је на територији централне, југоисточне и источне Србије и на Великом Кавказу (*Tufandag*) на територији северног Азербејџана. Њихови латински називи су усклађени са сајтом *Flora Europaea* <https://eunis.eea.europa.eu/references/1780/species>. Хербарски примерци депоновани су у хербаријуму Природно-математичког факултета у Нишу, *Herbarium Moesiacum Niš* (HMN), где је ботаничар потврдио њихов идентитет, а заведени су под следећим бројевима: 13906, 14437, 14438, 14439, 14440, 14441, 15652, 15653, 15654. У табели 4.3.1. приказани су подаци о локацији и времену сакупљања биљног материјала за анализу.

Табела 4.3.1. Порекло и период сакупљања испитиваних биљних врста

Ознака биљне врсте	Латински назив	Локација	Период сакупљања
P-1	<i>Primula veris</i> L.	Сува планина, Девојачки гроб, југоисточна Србија	мај 2015.
P-2	<i>P. acaulis</i> (L.) L.	Лесковац, село Горња Слатина, југоисточна Србија	април 2015.
P-3	<i>P. acaulis</i> (L.) L.	Велики Кавказ, <i>Tufandag</i> , северни Азербејџан	јул 2015.
P-4	<i>P. acaulis</i> (L.) L.	Сува планина, Девојачки гроб, југоисточна Србија	март 2016.
P-5	<i>P. acaulis</i> (L.) L.	Лесковац, село Горња Слатина, југоисточна Србија,	март 2016.
P-6	<i>P. acaulis</i> (L.) L.	Зајечар, село Велики Извор, источна Србија	март 2016.
P-7	<i>P. veris</i> L.	Копаоник, Козница, централна Србија	мај 2021.
P-8	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	Ниш, Парк „Светог Саве“, југоисточна Србија	мај 2016.
P-9	<i>L. tulipifera</i> L.	Ниш, Парк „Светог Саве“, југоисточна Србија	мај 2017.

4.3.2. Припрема испирака биљног материјала

Свеж биљни материјал (листови и цветови) најпре је очишћен од прашине лаганим протресањем биљке. Воскови са површине цветова и листова спрани су излагањем ултразвуку приликом потапања у хлороформ, на собној температури. Листови и цветови (заједно или засебно) потапани су не дуже од 5 s. Хлороформски испирци су профилирани кроз микрофилтер (*Syringe Econofilter 25/0,45 µm regenerated cellulose (RC)*, *Agilent Technologies*, Санта Клара, САД), да би се уклонио сав нерастворни материјал, а затим су осушени анхидрованим $MgSO_4$, а хлороформ је уклоњен помоћу ротационог вакуум-упаривача. Узорци испирака, као и узорак уконцентрованог растварача анализирани су GC-MS-ом да би се потврдило да није дошло до контаминације узорака

испирака током описаног поступка обраде биљног материјала. У табели 4.3.2. приказане су масе анализираниог свежег биљног материјала, као и масе испирака.

Табела 4.3.2. Подаци о добијеним масама испирака и анализираниог биљног материјала.

Ознака биљне врсте	Анализирани делови биљке	Маса биљног материјала (g)	Маса испирка (mg)	Маса испирка по површини биљних органа ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
P-1	цветови и листови	775	926 ± 25	69
P-2	цветови и листови	400	735 ± 10	98
P-3	листови	150	96 ± 3	30
P-4	цветови	320	112 ± 3	61
	листови	200	43 ± 8	17
P-5	цветови и листови	200	360 ± 5	103
P-6	цветови	140	624 ± 12	361
	листови	240	435 ± 10	151
P-7	цветови ^a	98	147 ± 3	45
	листови	104	607 ± 11	250
P-8	цветови	80	416 ± 8 ^a	287 ^a
	листови	100	354 ± 7	93
P-9	тучак са прашницима	122	220 ± 5	*
	латице	80	467 ± 9	168,48
	чашични листићи	30	180 ± 4	234,01

^a Приликом припреме испирка цветова, тучак и прашници нису одвајани од остатка цвета, већ су испрани заједно.

* 8,15 mg испирка по маси једног цвета, јер није одређена површина тучка и прашника.

4.3.2.1. Одеђивање површине листова и цветова

Површина листа сваке врсте израчуната је на основу дигиталне фотографије листа помоћу *AutoCAD(LT)* софтвера (v.22.0.72.0, 2018), док је милиметарски папир коришћен као скала за мерење.

4.3.3. Хроматографско раздвајање хлороформских испирака листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*, и испирка цветова *L. tulipifera*

Хлороформски испирци листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*, и хлороформски испирак цветова *L. tulipifera* су подвргнути фракционацији помоћу *dry-flash* хроматографије. Састојци су елуирани градијентно, од најнеполарнијих до најполарнијих, најпре чистим *n*-хексаном, затим смешама *n*-хексана и диетил-етра и на крају чистим диетил-етром. Сакупљано је по 100 ml елуента, а ток хроматографије је праћен танкослојном хроматографом, док је поларност повећавана за 5%, *v/v*. Добијене хроматографске фракције су спојене на основу TLC и/или GC-MS анализа. Све фракције добијене на крају су анализирани помоћу GC-MS-а, а неке од њих и NMR спектроскопијом (шеме 4.3.1, 4.3.2 и 4.3.3).

Хроматографске фракције испирака цветова и листова *P. veris* (P-1; шема 4.3.1):

- **Фракција 1:** алкани; 77,2 mg; елуент: *n*-хексан.
- **Фракција 2:** бензил-естри масних киселина - 17,3 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (90:10, *v/v*); R_f~0,41 (20%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 3:** 2-алканони и алдехиди - 8,3 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (85:15, *v/v*); R_f~0,41 (20%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 4:** 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетати, 3-оксо-1-фенил-1-алкил-ацетати, 1-фенил-1,3-алкадиони, 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони, *sec*-алканоли и масне киселине (нормалног и разгранатог низа); 12,2 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (85:15, *v/v*); R_f~0,45 (30%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 5:** 1-алканоли; 30,3 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (80:20, *v/v*); R_f~0,39 (40%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракције 7-10 и 12:** флавор и полиметоксиловани флаворни карактеристични за површинске воскове рода *Primula*; 670,8 mg; елуент: од смеше, *n*-хексан–Et₂O 75:25, *v/v*, до чистог Et₂O, R_f~0,42 (50%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).

Састојци неких фракција (6, 11 и 13-15), чија је маса износила укупно 95 mg, нису анализирани.

Хроматографске фракције испирака цветова и листова *P. acaulis* (P-2; шема 4.3.2):

- **Фракција 1:** алкани; 34,8 mg; елуент: *n*-хексан.
- **Фракција 2:** бензил-естри масних киселина; 7,0 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (90:10, *v/v*); R_f~0,42 (20%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 3:** 2-алканони; 12,7 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (85:15, *v/v*); R_f~0,40 (20%, *v/v*, Et₂O у *n*-хексану).

- **Фракција 5:** 1-алканоли; 58,4 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (75:25, v/v); R_f~0,39 (40% Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракције 8-10 и 12:** флавор и полиметоксиловани флаворни; 470,2 mg; елуент: од смеше, *n*-хексан–Et₂O 70:20, v/v, до чистог Et₂O, R_f~0,42 (50% Et₂O у *n*-хексану). Састојци неких фракција (4, 6, 7, 13 и 14), чија је маса укупно износила 90 mg, нису анализирани.

Хроматографске фракције испирака цветова *L. tulipifera* (P-8; шема 4.3.3):

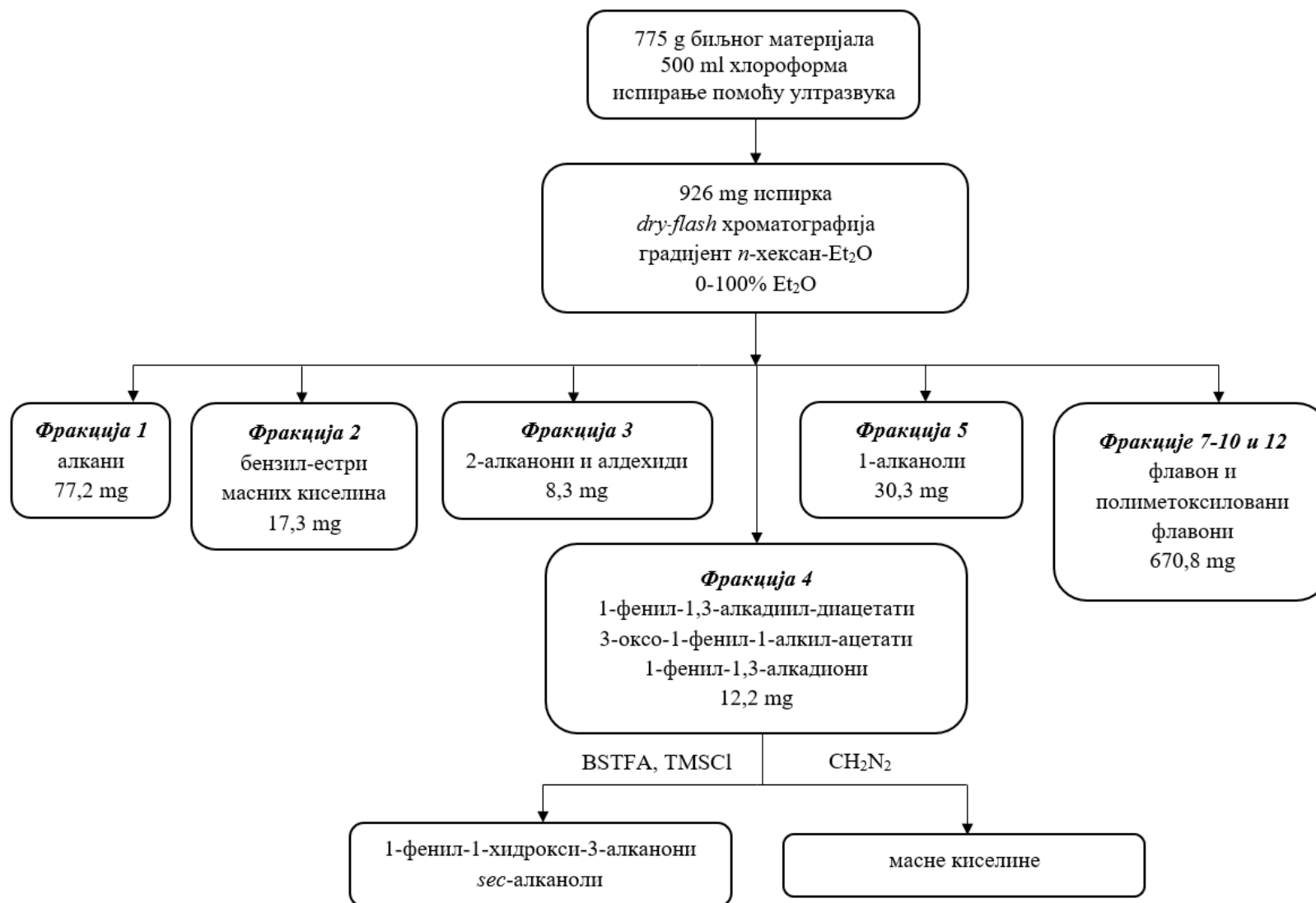
- **Фракција 1:** *n*-алкани и *n*-алкени; 15,2 mg; елуент: *n*-хексан.
- **Фракција 2:** алдехиди (засићени и незасићени) и кетони (засићени); 62,7 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (95:5, v/v); R_f~0,42 (20%, v/v, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 3:** алдехиди (засићени и незасићени) и кетони (засићени); 42,7 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (90:10, v/v); R_f~0,41 (20%, v/v, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 5:** примарни алкохоли (засићени и незасићени) и слободне масне киселине; 32,9 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (85:15, v/v); R_f~0,43 (30%, v/v, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 6:** примарни алкохоли (засићени и незасићени) и слободне масне киселине; 98,5 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (80:20, v/v); R_f~0,45 (35%, v/v, Et₂O у *n*-хексану).
- **Фракција 8:** 10-хидрокси-16-хентриаконтанон и 11-хидрокси-16-хентриаконтанон; 30,5 mg; елуент: *n*-хексан–Et₂O (70:30, v/v); R_f~0,44 (45%, v/v, Et₂O у *n*-хексану).

Региоизомерни (10- и 11-)хидрокси-16-хентриаконтанони:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, *J*=7,4 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1,27 (m, 42H, 21 x CH₂), 1,32 (m, 4H, CH₂CH(OH)CH₂), 1,56 (m, 4H, CH₂CH₂COCH₂CH₂), 2,40 (m, 4H, CH₂COCH₂), 3,57 (m, 1H, CH(OH)); ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 14,2 (2 x CH₃), 22,7, 25,6, 29,1-29,9 (21 x CH₂), 24,1 (CH₂CH₂COCH₂CH₂), 36,8 (CH₂CH(OH)CH₂), 42,6 (CH₂COCH₂), 71,8 (CH(OH)), 210,6 (CH₂COCH₂).

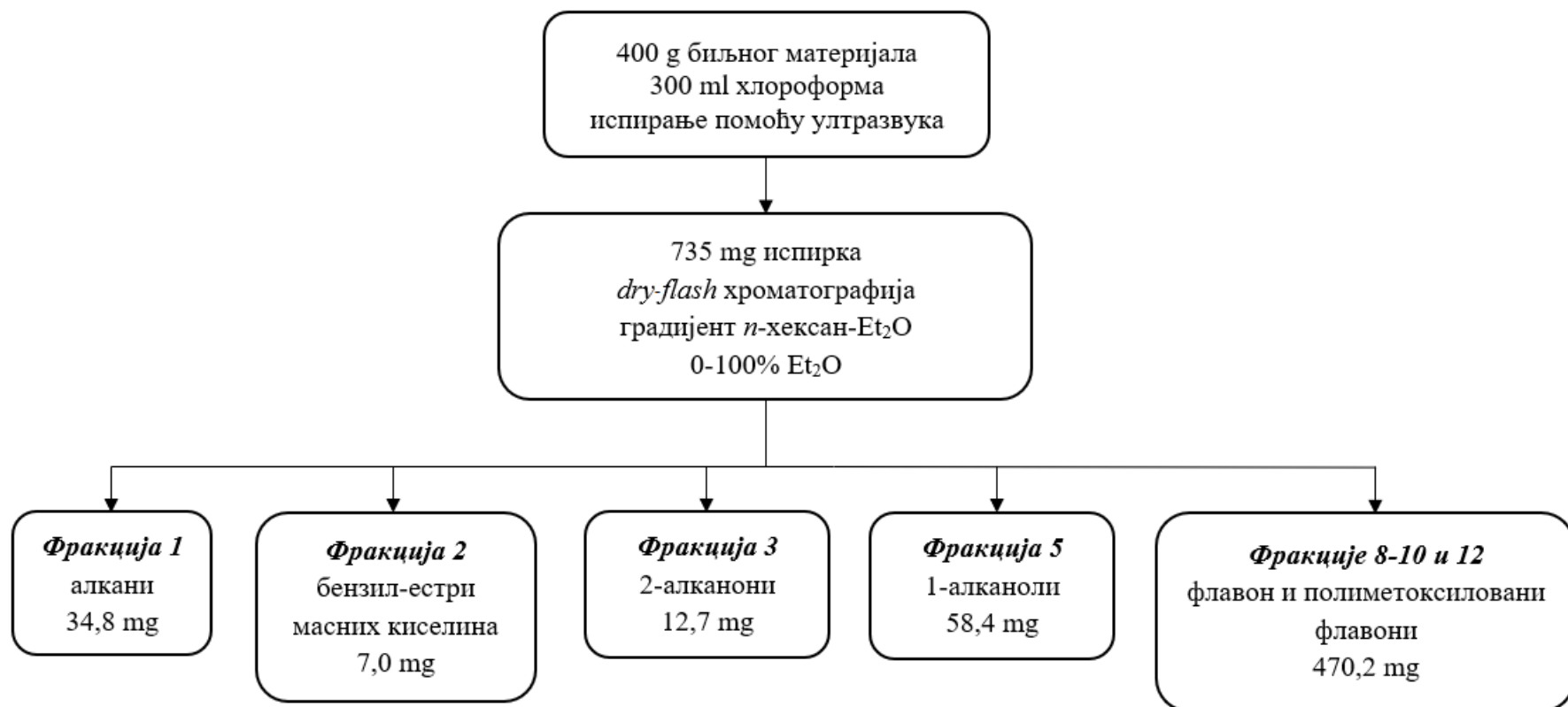
Пошто су фракције 2 и 3 биле истог састава, оне су спојене. Фракције 5 и 6 су такође спојене, јер су и оне биле истог састава. Састојци неких фракција (4, 7, и 9-12), чија је укупна маса износила 70 mg, нису анализирани.

Испирак цветова и листова *P. veris* (P-1)

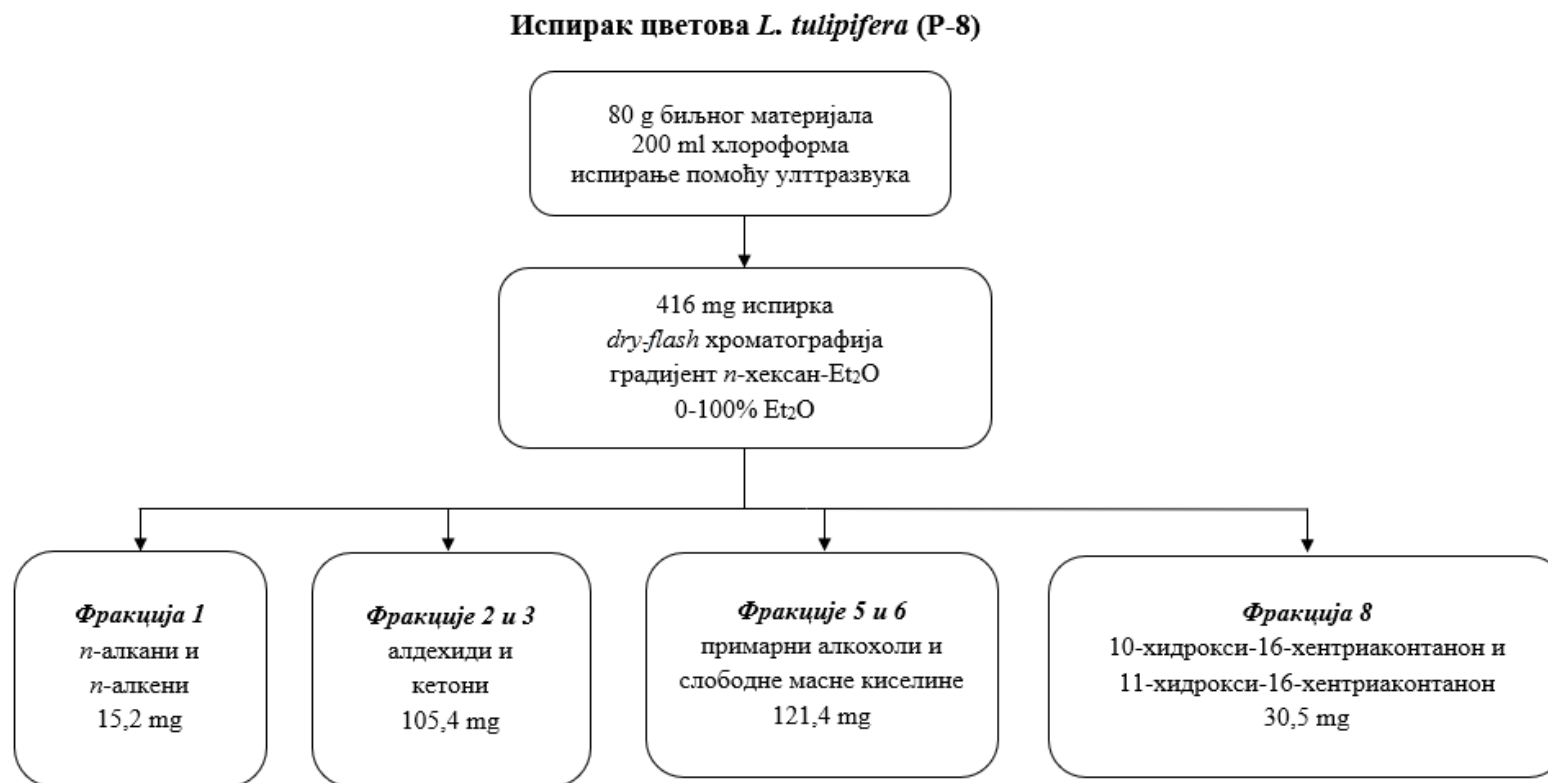


Шема 4.3.1. Раздвајање и анализа хлороформског испирка *P. veris* (P-1)

Испирак цветова и листова *P. acaulis* (P-2)



Шема 4.3.2. Раздвајање хлороформског испирка *P. acaulis* (P-2)



Шема 4.3.3. Раздвајање хлороформског испирка *L. tulipifera* (P-8)

4.3.4. Идентификација и/или квантификација одабраних састојака *P. veris*, *P. acaulis* и *L. tulipifera*

Квалитативна анализа састојака *P. veris*, *P. acaulis* и *L. tulipifera* испирака површинских воскова базирана је на барем три од наведених пет критеријума (Živković Stošić et al., 2021; Radulović & Živković Stošić, 2021):

- 1 – слагање вредности линеарних ретенционих индекса (RI) или вредности ΔRI^3 за одговарајуће рачвасте изомере;
- 2 – поређење масених спектра детектованих једињења са литературним;
- 3 – GC-коинјекција узорака са стандардима;
- 4 – дериватизација узорака;
- 5 – NMR анализа, симулација и поређење добијених података са литературним.

Масене фрагментације свих идентификованих једињења дате су у табелама у прилогу.

Алкани, бензил-естри, 2-алканони и масне киселине (њихови одговарајући метил-естри) у хроматографским фракцијама, као и у испирцима (израженим по површини листа) квантификовани су интегралњем површина испод пикова у GC-хроматограмима. Коришћени стандарди, *n*-додекан, бензил-бехенат, 2-пентакозанон и метил-палмитат, ињектовани су у седам различитих концентрација у циљу конструисања калибрационих права ($C=f(A)$), где је *C* – концентрација стандарда, а *A* – површина испод пика у гасном хроматограму која одговара стандарду у датој концентрацији. GC-MS анализа сваког узорка поновљена је у три пута. Параметри коришћени за конструисање калибрационих права дати су у табели у прилогу.

³ ΔRI вредност се односи на региоизомере и представља разлику вредности ретенционог индекса изомера *n*-низа и ретенционог индекса рачвастог изомера (*iso*- или *anteiso*-низа); $\Delta RI = RI(n\text{-изомер}) - RI(iso\text{- или } anteiso\text{-изомер})$.

4.4. Опис синтетских корака

4.4.1. Општа синтеза естара по Штеглиху

Синтеза естара по Штеглиху је вршена на два начина, у зависности од тога да ли је естерификована једна киселина, или смеша киселина – поступак I), или алкохол, односно смеша алкохола – поступак II).

- I) Раствор киселине или смеше киселина (1,5 mmol), *N,N'*-дициклохексилкарбодиимида (DCC, 1,6 mmol), алкохола (4,5 mmol) и 4-(диметиламино)пиридина (DMAP, 0,15 mmol) у сувом тетраhydroфурану (20 ml) мешао се 24 h заштићен од атмосфере. Након тога, исталожена *N,N'*-дициклохексилуреа је одвојена филтрацијом. Додатна количина урее која је преостала у раствору издвојена је на следећи начин: најпре је филтрат уконцентриран на ротационом вакуум-упаривачу а издвојена уреа уклоњена филтрацијом; затим је у филтрат додат *n*-пентан и смеша охлађена на леденом купатилу (0 °C), а исталожена уреа је одвојена поновном филтрацијом.
- II) Естерификација је изведена на аналоган начин као и у случају I), с тим што је молски однос киселине и алкохола био обрнут: алкохол или смеша алкохола (1,5 mmol), а киселина (4,5 mmol).

4.4.2. Синтеза бензил-докозаноата (бензил-бехената) Штеглиховом синтезом естара

Бензил-бехенат је синтетисан коришћењем опште процедуре по Штеглиху (поступак синтезе је описан у поглављу 4.4.1.), из бехенске киселине (510 mg, 1,5 mmol) и бензил-алкохола (0,468 ml, 4,5 mmol) у сувом тетраhydroфурану (20 ml). Након изократске *dry-flash* хроматографије на силика-гелу коришћењем смеше *n*-хексана-Et₂O (97:3, v/v) као елуента, издвојен је чист естар (505 mg, принос 78,3%). Чистоћа естра потврђена је GC-MS и NMR анализом.

Бензил-бехенат; чврста кристална супстанца; т.т. 56,4 °C; λ_{\max} nm (log ϵ): 210 (4,0), *n*-хексан; FTIR-ATR (*neat*): 3020 – 3060 (ν (C_{Ar}-H)), 2955 (ν_{as} (CH₃)), 2916 (ν_{as} (CH₂)), 2848

($\nu_s(\text{CH}_2)$), 1734 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1472 ($\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$), 1462 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), 1389 ($\delta_s(\text{CH}_2)$), 1166 ($\nu(\text{C}-\text{O})$), 746, 730 ($\gamma(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$), 719, 696 ($\Phi(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (3H, t, $^3J(\text{H,H})=6,9$ Hz, C22-H), 1,19 – 1,33 (36 H, m, од C4-H до C21-H), 1,63 (2H, tt, $^3J(\text{H,H})=7,6$, 6,7 Hz, C3-H), 2,35 (2H, t, $^3J(\text{H,H})=7,6$ Hz, C2-H), 5,11 (2H, s, C1'-H), 7,29 – 7,41 (5H, m, од C2"-H до C6"-H); ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 14,1 (br q, $^1J(\text{C,H})=124,3$ Hz, C-22), 22,7 (br t, $^1J(\text{C,H})=125,2$ Hz, C-21), 24,9 (br t, $^1J(\text{C,H})=127,1$ Hz, C-3), 29,1 (C-4), 29,2 (C-19), 29,4, 29,5 и 29,6 – 29,7 (br t $^1J(\text{C,H})=124,7$ Hz, преклопљени сигнали, од C-5 до C-18), 31,9 (C-20), 34,3 (br t, $^1J(\text{C,H})=128,4$ Hz, C-2), 66,0 (tt, $^1J(\text{C,H})=147,1$ Hz, $^2J(\text{C,H})=3,8$ Hz C-1'), 128,1 (прекопљени сигнали, m, C-4"), 128,2 (преклопљени сигнали, m, C-3" и C-5"), 128,5 (br dd, $^1J(\text{C,H})=160,4$ Hz, $^2J(\text{C,H})=5,9$ Hz, C-2" и C-6"), 136,1 (m, C-1"), 173,7 (m, C-1); EIMS (70 eV) m/z (рел. инт.): 430 $[\text{M}]^+$ (1), 339 $[\text{M} - \text{PhCH}_2]^+$ (6), 321 $[\text{M} - \text{PhCH}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+$ (11), 303 $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{19}]^+$ (2), 108 $[\text{PhCH}_2\text{OH}]^+$ (86), 91 $[\text{PhCH}_2]^+$ (100), 71 $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$ (13), 57 $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$ (21), 43 $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$ (20); нађено: C 80,8; H 11,7, O 7,5; израчунато за $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$: C 80,87; H 11,70; O 7,43%; $R_f=0,37$ (n -хексан/ Et_2O , 24:1, v/v).

4.4.3. Припрема модел-смеше бензил-естара

Раствор натријум-метоксида је припремљен растварањем фино уситњеног натријума (2 g) у сувом метанолау (100 ml), а затим је пчелињи восак додаван у порцијама уз константно мешање. Након што се целокупна количина воска растворила, реакциона смеша је рефлугована 2 h, а онда је изливена преко смеше воде и леда и одмах екстрахована диетил-етром (3 × 100 ml). Органски слојеви су спојени и осушени анхидрованим MgSO_4 . После одвајања средства за сушење филтрацијом, органски растварач је уклоњен на ротационом вакуум-упаривачу. Узорак метанолизованог пчелињег воска (*ca.* 5 mg) је силилован (поступак силиловања је описан у поглављу 4.4.11) и директно анализиран GC-MS-ом да би се потврдило присуство и идентификовали присутни дуголанчани алкохоли.

Алкохоли добијени метанолизом изоловани су изократском *dry-flash* хроматографијом на силика-гелу (n -хексан- Et_2O , 88 : 12, v/v). Изолована смеша алкохола је оксидована Џонсовим реагенсом (Cryle et al., 2005). У ацетонски раствор смеше алкохола

(500 mg, ~0,1 M) полако је, уз мешање, на 0 °C, укапаван реагенс за оксидацију (8 N), до задржавања наранџасте боје раствора. Смеша је мешана 10 минута, након чега је додато 40 ml воде и одмах екстрахована хексаном (3 × 100 ml). Органски слојеви су спојени, осушени анхидрованим MgSO₄, а после одвајања средства за сушење филтрацијом, растварач је уклоњен на ротационом вакуум-упаривачу. Да би се потврдила квантитативност оксидације алкохола до одговарајућих киселина, део узорка алкохола (10 mg) је третиран CH₂N₂ (~3% Et₂O раствор, Pic-Tomic et al., 2015) и анализиран GC-MS-ом.

Добијена смеша дуголанчаних киселина (без претходног пречишћавања) је естерификована бензил-алкохолном коришћењем опште процедуре по Штеглиху (поступак синтезе је описан у поглављу 4.4.1). Након изократске *dry-flash* хроматографије (*n*-хексан-Et₂O, 97 : 3, v/v), добијена је смеша бензил-естара дужине бочног ланца *n*-C₆-C₃₂. Састав модел-смеше је одређен GC-MS-ом и дат у табели у прилогу.

4.4.4. Синтеза 2-пентакозанона

Синтеза 2-пентакозанона извршена је у три корака, почевши од ацетоацетата: алкиловање, хидролиза естра и декарбоксилација (Radulović et al., 2014a; принос: 46%). 1-Јоддокозан је синтетисан реакцијом између бехенил-алкохола и фосфор-тријодида, који је добијен *in situ* из црвеног фосфора и јода (Furniss et al, 1989; принос: 75%). Добијени спектрални подаци за 2-пентакозанон су у складу са претходно објављеним спектралним подацима за 2-тридеканон (Ma et al., 2011).

4.4.5. Редукција 1-фенилбута-1,3-диона литијум-алуминијум-хидридом и естерификација добијених производа

1-Фенил-1,3-бутадион (500 mg, 3,1 mmol) је растворен у сувом тетраhydroфурану, а онда је LiAlH₄ додаван у малим порцијама (294 mg, то је маса која одговара моларном односу 1:5). Реакциона смеша је рефлуктована један сат, потом охлађена до собне температуре и додат су 10% (w/w) водени раствор NaOH и дестилована вода у вишку. Реакциона смеша је екстрахована Et₂O (3 x 25 ml), органски слојеви су спојени, испрани

засићеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованим $MgSO_4$, а након одвајања средства за сушење филтрацијом, растварач је уклоњен на ротационом вакуум-упаривачу на собној температури. GC-MS анализа реакционе смеше (добијено је 350 mg) указивала је на присуство фенил-акохола (два засићена и два незасићена), као и на присуство фенил-кетона, такође, два засићена и два незасићена. NMR анализа добијене смеше приказана је у табели 5.3.9 у поглављу Резултати и дискусија.

Смеша је, без претходног пречишћавања, подвргнута естерификацији сирћетном киселином по Штеглиху (на аналоган начин као што је описано у поглављу 4.4.1). Добијена смеша фенилбут(ен)ил-ацетата и фенил-кетона (два засићена и два незасићена) (330 mg) је раздвојена градијентном *dry-flash* хроматографијом, коришћењем Et_2O и *n*-хексана (од чистог *n*-хексана до чистог Et_2O , при чему је проценат диетил-етра повећаван за 5%, *v/v*; запремина фракције је износила 100 ml), а ток раздвајања састојака је праћен танкослојном хроматографијом. Добијене су три фракције, извршена је њихова GC-MS анализа, а проценат састојака одређен је интегралњем пикова у GC-хроматограмима:

Фракција 1 (5%, *v/v*, Et_2O у *n*-хексану, 64,5 mg): 4-фенил-2-бутанон (**5**, 0,1%), 1-фенил-1-бутанон (**4**, 31,8%), (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-он (**2**, 0,1%), 1-фенилбутил-ацетат (**12**, 32,9%), (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-он (**3**, 0,1%), (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-ил-ацетат (**10**, 15,6%), 4-фенил-2-бутил-ацетат (**13**, 0,3%), (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-ил-ацетат (**11**, 1,8%; слика 5.3.10).

Фракција 2 (10%, *v/v*, Et_2O у *n*-хексану, 161,5 mg): 1-фенил-1-бутанон (**4**, 0,5%), (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-он (**2**, 0,1%), 1-фенилбутил-ацетат (**12**, 28,7%), (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-он (**3**, 0,1%), (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-ил-ацетат (**10**, 52,2%), 4-фенил-2-бутил-ацетат (**13**, 5,1%), (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-ил-ацетат (**11**, 10,3%; слика 5.3.10).

Фракција 3: (10%, *v/v*, Et_2O у *n*-хексану, 62,1 mg): (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-он (**2**, 2,6%), 1-фенилбутил-ацетат (**12**, 2,7%), (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-ил ацетат (**10**, 21,0%), 4-фенил-2-бутил-ацетат (**13**, 18,0%), (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-ил-ацетат (**11**, 51,4%; слика 5.3.10)

Детаљна NMR анализа фракција 1 и 2 је приказана у табелама 5.3.9, 5.3.10 и 5.3.11.

4.4.6. Синтеза 1-јод-2-метилбутана

Раствору PPh_3 (820 mg, 3,12 mmol) у CH_2Cl_2 (20 ml) додат је претходно спршени ресублимовани јод (792 mg, 3,12 mmol), реакциона смеша је мешана 10 минута на собној температури, а затим је додат раствор 2-метил-1-бутанола (250 mg, 2,84 mmol) у дихлорметану (5 ml) и реакциона смеша је мешана 24 h. Након тога, реакциона смеша је разблажена диетил-етром (20 ml) и испрана 5% NaHCO_3 и засићеним раствором NaCl , а потом и осушена анхидрованим MgSO_4 . После одвајања средства за сушење филтрацијом, смеша органских растварача је уклоњена дестилацијом на ротационом вакуум-упаривачу. Сирови производ је пречишћен *dry-flash* хроматографијом коришћењем *n*-хексана као елуента. Маса добијеног 1-јод-2-метилбутана износила је 520 mg (принос: 92%).

4.4.7. Синтеза *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (*syn*- и *anti*-8a)

Смеша 1-фенил-1,3-бутадиона (200 mg, 1,23 mmol) и NaBH_4 (186 mg, 4,92 mmol) у анхидрованом метанолу (20 ml) је мешана на 0 °C један сат, након чега је уклоњено ледено купатило и мешање је настављено још сат времена на собној температури. Затим је у реакциону смешу лагано укапавана 1 M HCl да би се уништио вишак NaBH_4 и мешана још 12 h (преко ноћи). Након тога, реакциона смеша је екстрахована диетил-етром (2 × 50 ml). Спојени органски слојеви испрани су засићеним раствором NaCl , осушени анхидрованим MgSO_4 а органски растварач је упарен. Добијено је 185 mg смеше два диола у приносу од 90% (чистоћа узорка проверена је GC-MS и NMR анализом). *Syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиоли (*syn*- и *anti*-12a) су даље естерификовани по Штеглиху (на аналоган начин као што је описано у поглављу 4.4.1). Након изократске *dry-flash* хроматографије на силикагелу коришћењем смеше *n*-хексана- Et_2O (70 : 30, v/v) као елуента, добијени су безбојни течни естри (240 mg, принос: 86%). Чистоћа естара потврђена је GC-MS и NMR анализама.

Syn- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиоли (*syn*- и *anti*-12a), безбојна течност: широки GC-пик диола који елуирају у опсегу од $\text{RI}=1380$ до 1392; $R_f \sim 0,3$ (60%, v/v, диетил-етра у *n*-

хексану); нађено: С 72,2, Н 8,6, О 19,1; израчунато за $C_{10}H_{14}O_2$: С 72,3, Н 8,5, О 19,2%. MS подаци, као и 1H и ^{13}C NMR подаци, приказани су у табели у прилогу.

Syn- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетати (*syn*- и *anti*-**8a**), безбојна течност: RI=1631 (*syn*-**8a**) и 1617 (*anti*-**8a**); R_f ~0,4 (20%, v/v, диетил-етра у *n*-хексану); нађено: С 67,0, Н 7,2, О 25,7; израчунато за: $C_{14}H_{18}O_4$: С 67,2; Н 7,2; О 25,6%. 1H и ^{13}C NMR подаци су приказани у табели 5.3.4., док су MS подаци приказани у табели у прилогу.

4.4.8. Синтеза бензилиден-деривата *syn*- и *anti*-**12a**

Раствор диола (*syn*- и *anti*-**12a**, 22 mg, 0,133 mmol) у 0,7 ml деутерисаног хлороформа је помешан са бензалдехидом (141 mg, 1,33 mmol), и кратко изложен ултразвуку у циљу што хомогенијег мешања супстанци. Један део смеше (0,5 ml) је пребачен у NMR кивету, која је затворена парафилмом, а затим је снимљена серија 1H NMR спектра у одређеним временским интервалима (5, 30 и 60 min, 6, 12 и 24 h, и 5 и 7 дана након мешања диола и бензалдехида). Није било значајне разлике између спектра снимљених петог и седмог дана, тако да су поред 1H NMR спектра, снимљени и остали 1D и 2D спектри. 1H и ^{13}C NMR спектрални подаци идентификованих ацетала (бензилиден-деривата) су дати у табели 5.3.3.

4.4.9. Синтеза 1-фенил-1,3-нонадиона, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиона и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиона (**29a-c**)

Изомерни дикетони, 1-фенил-1,3-нонадион, 7-метил-1-фенил-1,3-октадион и 6-метил-1-фенил-1,3-октадион (**29a-c**), синтетисани су коришћењем 1-фенил-1,3-бутадиона као стартног једињења, продужавањем бочног низа 1-бромпентаном, 1-бром-3-метилбутаном или 1-јод-2-метилбутаном (у три посебне реакције), праћењем следеће процедуре: NaN (60 mg, 2,50 mmol) је суспендован у 10 ml сувог тетрахидрофурана под атмосфером азота; суспензија је охлађена на 0 °C, коришћењем леденог купатила, након чега је додат тетрахидрофурански раствор 1-фенил-1,3-бутадиона (300 mg, 1,85 mmol). Смеша је мешана 1 h, након чега је уклоњено купатило, а мешање је настављено још сат

времена. Затим је реакциона смеша поново охлађена на 0 °С, па је додат раствор *n*-BuLi у хексану (0,9 cm³, 2,3 moldm⁻³, 2,03 mmol). Мешање је настављено још наредних сат времена, па је реакциона смеша постепено загревана (у периоду од сат времена) до собне температуре. Након тога су додати 1-бромпентан, 1-бром-3-метилбутан или 1-јод-2-метилбутан (1,85 mmol) у поновно охлађени раствор (0 °С) двоструко депротонованог дикетона. Алкиловање је настављено наредних пола сата на 0 °С, а затим је смеша лагано загрејана до собне температуре, и мешана око сат времена, а ток реакције је праћен танкослојном хроматографијом. Након тога, реакција је обрађена додатком воде (на леденом купатилу) и екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви су испрани засићеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованим MgSO₄, а органски растварач је упарен на ротационом вакуум-упаривачу. Чисти дикетони су добијени након изократске *dry-flash* хроматографије на силика-гелу коришћењем *n*-хексан-Et₂O (98 : 2, v/v) као елуента: **29a** – 206,1 mg, принос: 48%, **29b** – 194,8 mg, принос: 45%, **29c** – 172,2 mg, принос: 40%. Чистоћа дикетона потврђена је GC-MS и NMR анализама. R_f вредности за све изомерне дикетоне су износиле ~0,5 (5%, v/v, Et₂O у *n*-хексану); λ nm (log ε, у ацетонитрилу) за све изомере су сличних вредности 306,5 (4,1) за **29a**, 245,5 (3,8) за **29b**, 196,5 (4,2) за **29c**; FTIR-ATR (*neat*) подаци за сва једињења су били сличних вредности: 3050 – 3100 (ν(C_{Ar}-H)), 2950 (ν(O-H---O)), 1595 (ν(C=O)), 1561 (ν(C=O---H)), 1478 (ν(C_{Ar}=C_{Ar})), 1415 (δ_s(CH₂)), 1360 (δ_s(CH₃)), 761 (γ(C_{Ar}-H)), 696 (Φ(C_{Ar}-C_{Ar})); нађено за **29a**: C 77,4, H 8,6, O 13,9, нађено за **29b**: C 77,5, H 8,7, O 13,7, нађено за **29c**: C 77,4, H 8,7, O 13,8, израчунато за C₁₅H₂₀O₂: C 77,5, H 8,7, O 13,8%. RI=1904 (**29a**), 1865 (**29b**), 1877 (**29c**). UV и FTIR-ATR спектри, као и MS подаци за дикетоне су дати у прилогу.

1-Фенил-1,3-нонадион (29a): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) *енол*: δ 2,45 (t, *J*=7,6 Hz, 2H, Ph(C=O)CH=C(OH)CH₂), 6,17 (s, 1H, Ph(C=O)CH=C(OH)CH₂), 16,21 (s, 1H, -OH) *кето*: δ 2,58 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂), 4,09 (s, 2H, Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 0,92 (t, *J*≈7 Hz, виртуелно купловање, 3H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,34 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,69 (pseudo quint, *J*≈7,7 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 7,45 (m, 2H, *Ph*), 7,52 (m, 1H, *Ph*), 7,88 (m, 2H, *Ph*).

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) енол: δ 39,3 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 96,1 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 183,5 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 197,0 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$); кето: δ 43,5 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 54,0 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 194,2 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 204,7 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 14,06 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 25,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31,6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 127,0, 128,6, 132,2, 135,1 (*Ph*).

7-Метил-1-фенил-1,3-октадион (29b): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) енол: δ 2,41 (t, $J=7,6$ Hz, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 6,17 (s, 1H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 16,21 (s, 1H, -OH) кето: δ 2,56 (t, $J=7,4$ Hz, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 4,08 (s, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 0,90 (d, $J=6,7$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,58 (pseudo non, $J\approx 6,7$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,69 (pseudo quint, $J\approx 7,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7,45 (m, 2H, *Ph*), 7,52 (m, 1H, *Ph*), 7,88 (m, 2H, *Ph*).

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) енол: δ 39,5 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 96,1 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 183,5 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 197,0 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$); кето: δ 43,7 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 54,1 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 194,0 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 204,6 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 22,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 23,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 28,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 38,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 127,0, 128,6, 132,9, 135,1 (*Ph*).

6-Метил-1-фенил-1,3-октадион (29c): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) енол: δ 2,43 (t, $J=7,6$ Hz, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 6,18 (s, 1H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 16,21 (s, 1H, -OH) кето: δ 2,59 (t, $J=7,4$ Hz, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 4,10 (s, 2H, $\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 0,89 (t, $J=7,25$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,91 (d, $J=6,2$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,20 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,38 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,41 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,50 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,72 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7,45 (m, 2H, *Ph*), 7,52 (m, 1H, *Ph*), 7,88 (m, 2H, *Ph*).

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) енол: δ 37,1 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 96,0 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 183,3 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 197,5 ($\text{Ph}(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$);

кето: δ 41,3 (Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂), 54,0 (Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂), 194,1 (Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂), 204,8 (Ph(C=O)CH₂(C=O)CH₂); померања осталих сигнала кето и енолног облика се нису разликовала: 11,3 (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 18,9 (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 29,2 (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 32,4 (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 34,1 (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 127,0, 128,6, 132,2, 135,1 (*Ph*).

4.4.10. Синтеза *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-нонадиил-диацетата, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата (**9a-c**)

Изомерни кетони, 1-фенил-1,3-нонадион, 7-метил-1,3-октадион и 6-метил-1,3-октадион (**29a-c**), редуковани су натријум-борхидридом (поступак редукције је описан у поглављу 4.4.7). Чистоћа диола (*syn*- и *anti*-) је проверена GC-MS и NMR анализама, а приноси су били следећи: 98% за 1-фенил-1,3-нонадиол (202,2 mg, *syn*- и *anti*-**13a**), 97% за 7-метил-1-фенил-1,3-октадиол (189,5 mg, *syn*- и *anti*-**13b**) и 93% за 6-метил-1-фенил-1,3-октадиол (160,3 mg, *syn*- и *anti*-**13c**); R_f вредности за све изомерне диоле су износиле ~0,3 (60%, v/v, диетил-етра у *n*-хексану); нађено за **13a**: C 76,0, H 10,2, O 13,7; нађено за **13b**: C 75,9; H 10,1, O 13,9; нађено за **13c**: C 76,1; H 10,2, O 13,6; израчунато за C₁₅H₂₄O₂: C 76,2, H 10,3, O 13,5%. RI=1959 (*syn*-**13a**), 1963 (*anti*-**13a**); 1916 (*syn*-**13b**), 1920 (*anti*-**13b**); 1924 (*syn*-**13c**), 1928 (*anti*-**13c**).

Диацетати, 1-фенил-1,3-нонадиил-диацетат, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетат и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетат (*syn*- и *anti*-**9a-c**), синтетисани су коришћењем опште процедуре по Штеглиху на аналоган начин описан у поглављу 4.4.1, естерификацијом диола **13a-c** сирћетном киселином. Чисти естри су изоловани након изократске *dry-flash* хроматографије на силика-гелу коришћењем смеше *n*-хексан-Et₂O (80:20, v/v) као елуента, а чистоћа естара је проверена GC-MS и NMR анализама. Приноси естара били су следећи: 224,8 mg (82%, *syn*- и *anti*-**9a**), 215,6 mg (84%, *syn*- и *anti*-**9b**) и 174,0 mg (80%, *syn*- и *anti*-**9c**); R_f вредности за све изомерне диацетате су износиле ~0,4 (20%, v/v, диетил-етра у *n*-хексану); λ nm (log ϵ , у ацетонитрилу): 207,0 (3,8 за **9a**), 192,0 (4,4 за **9b**), 168, 2 (3,7 за **9c**); FTIR-ATR (*neat*) подаци за све изомерне диацетате су били сличних вредности: 3080 – 3100 (ν (C_{Ar}-H)), 2953 (ν_{as} (CH₃)), 2925 (ν_{as} (CH₂)), 2868 (ν_s (CH₂)),

1736 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1495 ($\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$), 1410, 1456 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1369 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1229 ($\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O})$), 1019 ($\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{O})$), 759 ($\gamma(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$), 699 ($\Phi(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$); нађено за *syn*- и *anti*-**9a**: С 71,3, Н 8,6, О 20,0; нађено за *syn*- и *anti*-**9b**: С 71,2, Н 8,6, О 20,1; нађено за *syn*- и *anti*-**9c**: С 71,1, Н 8,7, О 20,1; израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$: С 71,2, Н 8,8, О 20,0%. RI=2043 (*syn*-**9a**), 2048 (*anti*-**9a**); 2004 (*syn*-**9b**), 2009 (*anti*-**9b**); 2010 (*syn*-**9c**), 2015 (*anti*-**9c**). UV и FTIR-ATR спектри, као и MS подаци за диацетате су дати у прилогу.

4.4.11. Општа процедура реакције силиловања

Одмерено је *ca.* 5 mg узорка у GC-вијалу, након чега је додато 100 μl пиридина, 100 μl *N*-метил-*N*-(триметилсилил)трифлуороацетамида (MSTFA) или *N,O*-*bis*(триметилсилил)трифлуороацетамида (BSTFA), и једна кап триметилсилил-хлорида. Вијала је затим затворена и загревана један сат на 60 °C. Након тога је узорак охлађен до собне температуре и 1 μl раствора триметилсилил-деривата у пиридину је ињектован на GC-колону; узорци триметилсилил-деривата анализирани су GC-MS-ом коришћењем програма 1: 70(0')/5 °C min^{-1} /315(30'), поглавље 4.2.1, укључујући и 7 минута неукључивања MS-детектора од тренутка ињектовања узорка.

4.4.12. Алдолне адиције

Кетон (2-тридеканон, 200 mg, 1 mmol, или ацетофенон, 125 mg, 1 mmol) је растворен у 10 ml сувог тетраhydroфурана под атмосфером N_2 , раствор је охлађен до -95 °C (смеша течног и чврстог ацетона; ацетон је охлађен течним азотом), а онда је у капима додат LDA (1,5 eq, 1,5 M раствор у циклохексану, 0,7 ml). Након 30 минута мешања, балон са реакционом смешом је подигнут изнад купатила, а мешање је настављено додатних 10 минута; балон је затим враћен у купатило и додат је раствор алдехида (бензалдехид 1 eq, 1 mmol, 106 mg, или нонанал 1 eq, 1 mmol, 142 mg) у сувом тетраhydroфурану и мешање је настављено на -95 °C наредних 30 минута. Након истека овог времена, реакциона смеша је остављена да се загреје до собне температуре. Потом је у реакциону смешу додат водени

раствор HCl (1 : 10, v/v, на леденом купатилу), а смеша је екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви испрани су zasiћеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованим MgSO₄ и растварач је упарен на ротационом вакуум-упаривачу. Добијени производи идентификовани су GC-MS анализом непречишћене реакционе смеше, као и GC-MS анализом силилованих деривата (реакција дериватизације је описана у поглављу 4.4.11) као и одговарајућих ацетата (реакција естерификације је описана у поглављу 4.4.1), а након тога и потврђена ¹H NMR анализом.

Триметилсиллил-дериват 1-хидрокси-1-фенил-3-тетрадеканона (37a) RI=2390; *m/z* (70 eV): 376 [M]⁺ (3), 361 [M – 15]⁺ (13), 179 [PhCHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 221 (44), 255 (14), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (30), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (39).

3-Оксо-1-фенилтетрадецил-ацетат (14a) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,88 (t, *J*≈7 Hz, виртуелно купловање, 3H, C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 1,24 – 1,45 (m, 18H, C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 2,06 (s, 3H, Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 2,41 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 2,81 (dd, *J*=16,2, 5,1 Hz, 1H, Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 3,11 (dd, *J*=16,2, 8,7 Hz, 1H, Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 6,19 (dd, *J*=8,7, 5,1 Hz, 1H, Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 7,31 (m, 2H, Ph), 7,36 (m, 3H, Ph); ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ: 14,1 (C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 22,7 – 31,9 (C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 21,2 (Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 43,7 (C(O)CH₂(CH₂)₉CH₃), 49,4 (Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 71,5 (Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 126,5, 128,3, 127,5 (*Ph*), 170,4 (Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)), 206,5 (Ph(CH₃COO)CHCH₂C(O)).

3-Хидрокси-1-фенил-1-ундеканон RI=1937; *m/z* (70 eV): 244 [M – 18]⁺ (2), 159 (2), 145 (1), 120 (2), 105 [PhCO]⁺ (100), 77 [Ph]⁺ (23).

Триметилсиллил-дериват 3-хидрокси-1-фенил-1-ундеканона RI=2148; *m/z* (70 eV): 334 [M]⁺ (1), 319 [M – 15]⁺ (58), 221 [PhC(O)CH₂CHOSi(CH₃)₃]⁺ (47), 205 (24), 177 (46), 105 [PhCO]⁺ (100), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (25), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (20).

1-Оксо-1-фенил-3-ундецил-ацетат ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,88 (t, *J*≈7 Hz, виртуелно купловање, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1,27 (m, 12H, PhC(O)CH₂CH(COOCH₃)CH₂(CH₂)₆CH₃), 1,63 (m, 2H, PhC(O)CH₂CH(COOCH₃)CH₂), 2,01 (s, 3H, CH₃COOCH), 3,09 (dd, *J*=16,1 6,2 Hz, 1H, PhC(O)CH₂CH), 3,36 (dd, *J*=16,1 6,2 Hz,

1H, PhC(O)CH₂CH), 5,39 (pseudo quint, $J=6,2$ Hz, 1H, PhC(O)CH₂CH(COOCH₃)CH₂), 7,47 (m, 2H, Ph), 7,56 (m, 1H, Ph), 7,95 (m, 2H, Ph).

1-Фенил-2-ундецен-1-он RI=2046; m/z (70 eV): 244 [M]⁺ (7), 159 (24), 145 (21), 133 (25), 120 (39), 105 [PhCO]⁺ (100), 77 [Ph]⁺ (42), 55 (16), 41(16).

Производ алдолне кондензације, (*E*)-1-фенил-1-тетрадецен-3-он, синтетисан је у алдолној реакцији кинетичког литијум-енолата, 2-тридеканона и бензалдехида, а пречишћен је *dry-flash* хроматографијом на силика-гелу (*n*-хексан–Et₂O, 92:8, *v/v*).

(*E*)-1-Фенил-1-тетрадецен-3-он RI=2403; m/z (70 eV): 286 [M]⁺ (3), 146 [PhCHCHCOCH₃]⁺ (93), 131 [PhCHCHCO]⁺ (100), 103 [PhCHCH]⁺ (35), 77 [Ph]⁺ (15). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,88 (t, $J\approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H, C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,18 – 1,37 (m, 16H, C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,67 (pseudo quint, $J=7,3$ Hz, 2H, C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 2,66 (pseudo triplet, $J=7,4$ Hz, 2H, C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 6,75 (d, $J=16,2$ Hz, 1H, PhCH=CHC(O)), 7,55 (d, $J=16,2$ Hz, 1H, PhCH=CHC(O)), 7,55 (m, 2H, Ph), 7,39 (m, 3H, Ph); ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ : 14,1 (C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 22,7 – 31,7 (m, C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 24,4 (C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 41,0 (C(O)CH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 126,3 (PhCH=CHC(O)), 142,3 (PhCH=CHC(O)), 134,6, 130,4, 129,0, 128,3 (*Ph*), 200,8 (PhCH=CHC(O)).

4.4.13. Хидроксилација *n*-алкана

n-Додекан и *n*-пентадекан су подвргнути неселективној хидроксилацији коришћењем *in situ* припремљеног реагенса, CF₃COOH из H₂O₂-CF₃COOH, а добијена је смеша алкохола: 2-додеканол, 3-додеканол, 4-додеканол, 5-додеканол, и 6-додеканол и 2-пентадеканол, 3-пентадеканол, 4-пентадеканол, 5-пентадеканол, 6-пентадеканол, 7-пентадеканол и 8-пентадеканол (Deno et al., 1977). Смеша ових *sec*-алкохола је подвргута реакцији силиловања, а затим директно (без пречишћавања) анализирана GC-MS-ом. Масена фрагментација силилованих деривата *sec*-алкохола приказана је доле:

2-Додеканол, TMS-дериват (47a, RI=1499): 258 [M]⁺ (1), 243 [M – 15]⁺ (11), 117 [CH₃CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (3), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (30), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (32).

3-Додеканол, TMS-дериват (60a, RI=1487): 258 [M]⁺ (1), 243 [M – 15]⁺ (7), 229 [CH₃(CH₂)₈CHOSi(CH₃)₃]⁺ (41), 131 [CH₃CH₂CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (6), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (37), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (58).

4-Додеканол, TMS-дериват (69a, RI=1466): 258 [M]⁺ (1), 243 [M – 15]⁺ (7), 215 [CH₃(CH₂)₇CHOSi(CH₃)₃]⁺ (48), 145 [CH₃(CH₂)₂CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (6), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (34), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (55).

5-Додеканол, TMS-дериват (75a, RI=1455): 258 [M]⁺ (2), 243 [M – 15]⁺ (7), 201 [CH₃(CH₂)₆CHOSi(CH₃)₃]⁺ (65), 159 [CH₃(CH₂)₃CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (4), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (40), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (63).

6-Додеканол, TMS-дериват (82a, RI=1451): 258 [M]⁺ (2), 243 [M – 15]⁺ (8), 187 [CH₃(CH₂)₅CHOSi(CH₃)₃]⁺ (87), 173 [CH₃(CH₂)₄CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (5), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (42), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (68).

2-Пентадеканол, TMS-дериват (48a, RI=1795): 300 [M]⁺ (2), 285 [M – 15]⁺ (10), 117 [CH₃CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (3), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (32), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (50).

3-Пентадеканол, TMS-дериват (61a, RI=1782): 300 [M]⁺ (3), 285 [M – 15]⁺ (6), 271 [CH₃(CH₂)₁₁CHOSi(CH₃)₃]⁺ (56), 131 [CH₃CH₂CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (4), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (32), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (50).

4-Пентадеканол, TMS-дериват (70a, RI=1758): 300 [M]⁺ (2), 285 [M – 15]⁺ (6), 257 [CH₃(CH₂)₁₀CHOSi(CH₃)₃]⁺ (56), 145 [CH₃(CH₂)₂CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (4), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (32), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (50).

5-Пентадеканол, TMS-дериват (76a, RI=1743): 300 [M]⁺ (2), 285 [M – 15]⁺ (6), 243 [CH₃(CH₂)₉CHOSi(CH₃)₃]⁺ (56), 159 [CH₃(CH₂)₃CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (2), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (32), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (50).

6-Пентадеканол, TMS-дериват (83a, RI=1737): 300 [M]⁺ (1), 285 [M – 15]⁺ (6), 229 [CH₃(CH₂)₈CHOSi(CH₃)₃]⁺ (68), 173 [CH₃(CH₂)₄CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (3), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (31), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (46).

7-Пентадеканол, TMS-дериват (88a, RI=1733): 300 [M]⁺ (3), 285 [M – 15]⁺ (10), 215 [CH₃(CH₂)₇CHOSi(CH₃)₃]⁺ (83), 187 [CH₃(CH₂)₅CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (2), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (47), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (74).

8-Пентадеканол, TMS-дериват (94a, RI=1731): 300 [M]⁺ (2), 285 [M – 15]⁺ (10), 201 [CH₃(CH₂)₆CHOSi(CH₃)₃]⁺ (100), 103 (3), (11), 75 [(CH₃)₂SiOH]⁺ (45), 73 [(CH₃)₃Si]⁺ (30).

4.4.14. α -Метиловање метил-естара дуголанчаних масних киселина

Смеси хексадеканске (50 mg), октадеканске (50 mg) и докозанске киселине (50 mg) додат је велики вишак метанола и каталитичка количина *p*-толуенсулфонске киселине. Смеша је рефлугована током 24 h, затим је упарен вишак метанола, а реакциона смеша је растворена у хлороформу, потом и испрана раствором NaOH (5%, w/w). Хлороформски слој је осушен анхидрованим MgSO₄, а растварач је упарен. Чисти метил-естри су изоловани након изократске *dry-flash* хроматографије на силика-гелу (135 mg, елуент: *n*-хексан-Et₂O (95 : 5, v/v); принос: 135 mg, 86%). Смеша естара је растворена у 20 ml сувог тетрахидрофурана, охлађена на ледном купатилу (0 °C), а под инертном атмосфером (N₂), додат је раствор LDA (1,2 eq, 1,5 M раствора у циклохексану, 0,35 ml). Након једног сата мешања, додат је вишак MeI (4 eq, 250 mg), растворен у сувом тетрахидрофурану. Мешање је настављено на леденом купатилу 1 h, а затим и на собној температури (1 h). Након тога, реакциона смеша је поново охлађена на леденом купатилу и додат је водени раствор HCl (1 : 10, v/v), а затим екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви су испрани засићеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованим MgSO₄, а растварач је упарен на ротационом вакуум-упаривачу. Добијени метил-2-метилалканоати (120 mg, принос: 85%) су анализирани GC-MS-ом, а њихова структура је потврђена ¹H NMR спектроскопијом, без претходног пречишћавања.

Метил-2-метилхексадеканоат (104 α): бела кристална супстанца; RI=1960; *m/z* (70 ev) 284 [M]⁺ (6), 227 (8), 241 (5), 157 (9), 143 (8), 101 [CH₂CH(CH₃)COOCH₃]⁺ (43), 88 [CH₃OC(OH)CHCH₃]⁺ (100), 55 (17), 43 (18), 41 (18).

Метил-2-метилоктадеканоат (106 α): бела кристална супстанца; RI=2160; *m/z* (70 ev) 312 [M]⁺ (9), 255 (8), 157 (10), 143 (9), 101 [CH₂CH(CH₃)COOCH₃]⁺ (44), 88 [CH₃OC(OH)CHCH₃]⁺ (100), 55 (16), 43 (19), 41 (19).

Метил-2-метилдокозаноат (110 α): бела кристална супстанца; RI=2560; *m/z* (70 ev) 368 [M]⁺ (15), 311 (10), 157 (11), 143 (9), 101 [CH₂CH(CH₃)COOCH₃]⁺ (45), 88 [CH₃OC(OH)CHCH₃]⁺ (100), 55 (16), 43 (21).

NMR спектрални подаци метил-2-метилалканоата:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,88 (t, *J*≈7 Hz, виртуелно купловање, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1,14 (d, *J*=7 Hz, 3H, CH₂CH(CH₃)COOCH₃), 1,64 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)COOCH₃), 2,43 (m,

^1H , $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$), 3,71 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$); ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 17,1 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$), 33,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$), ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$), 39,5 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$), 52,2 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$).

4.4.15. Синтеза метил-3-метилтетрадеcanoата

Синтеза метил-3-метилтетрадеcanoата одвијала се у неколико корака:

I) Добијање етил-3-хидрокси-3-метилтетрадеcanoата:

Етил-ацетат (200 mg, 2,3 mmol, HPLC чистоће) је растворен у сувом тетраhydroфурану (20 ml) под инертном атмосфером (N_2), а раствор је охлађен на $-95\text{ }^\circ\text{C}$ (смеша течног и чврстог ацетона; ацетон је охлађен течним азотом); затим је у капима додаван раствор LDA (1,5 eq, 1,5 M у циклохексану, 2,3 ml). Након 60 минута мешања, балон са реакционом смешом је постављен изнад купатила, а мешање је настављено још 30 минута; затим је балон враћен у купатило и додат је кетон (2-тридеканон, 1 eq, 2,3 mmol, 455 mg) растворен у сувом тетраhydroфурану, а мешање је настављено на температури од $-95\text{ }^\circ\text{C}$. Реакциона смеша је мешана током 16 h; ацетон се отопио, а купатило и реакциона смеша су загрејани до собне температуре. Након тога, додат је водени раствор HCl (1 : 10, v/v) на леденом купатилу и реакциона смеша је екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви су испрани засићеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованим MgSO_4 , а растварач је уклоњен на ротационом вакуум-упаривачу. Успешност синтезе је потврђена GC-MS и ^1H NMR анализама (без претходног пречишћавања).

Етил-3-хидрокси-3-метилтетрадеcanoат (506 mg, принос: 78%): RI=1947; m/z (70 ev) 271 [$\text{M} - 15$] $^+$ (6), 131 [$\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$] $^+$ (100), 85 (30), 71 (14), 58 (21), 43 (53).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, $J \approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1,18 (t, $J=7,2$ Hz, 3H, $\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1,23 (m, 3H, $\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1,26 (m, 18H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1,32 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$)

2,43 (d, $J=15,5$ Hz, 1H, C(OH)(CH₃)CH₂COOCH₂CH₃), 2,50 (d, $J=15,5$ Hz, 1H, C(OH)(CH₃)CH₂COOCH₂CH₃), 4,18 (q, $J=7,2$ Hz, 2H, C(OH)(CH₃)CH₂COOCH₂CH₃).

II) Дехидратација етил-3-хидрокси-3-метилтетрадеканоата и хидрогенизација добијених незасићених етил-естара:

Раствор естра (1 eq, 150 mg, 0,52 mmol) у 0,5 ml сувог пиридина је охлађен на леденом купатилу, а затим је у капима додат фосфорил-хлорид (1,8 eq, 144 mg, 0,94 mmol) током два минута. Реакциона смеша је мешана на леденом купатилу током 30 минута, а затим и на собној температури током 2 h. Након тога, реакциона смеша је изливена у водени раствор HCl (1 : 10, v/v, на леденом купатилу) и екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви су испрани воденим раствором HCl (1 : 10, v/v), а затим и засићеним раствором натријум-хлорида, осушени анхидрованоим MgSO₄, а растварач је уклоњен на ротационом вакуум-упаривачу. Смеша одговарајућих незасићених естара (115 mg, принос: 82%) анализирана је GC-MS-ом, а затим и хидрогенизована без претходног пречишћавања. Раствору незасићених естара у етил-ацетату (15 ml, HPLC чистоће) је додат паладијум на угљу (Pd/C, 915 mg, 10%) у количини да се награди непрозрачна суспензија, довољне густине за неометано мешање, под 1 atm H₂. Реакциона смеша је мешана током 48 h, а затим профилирана кроз слој целита (Celite® 545, величина честице 0,01 – 0,04 mm), а растварач је упарен на ротационом вакуум-упаривачу. Реакциона смеша је, без претходног пречишћавања, анализирана GC-MS-ом (107 mg, принос: 92%).

Етил-3-метилтетрадеканоат: RI=1878; m/z (70 ev) 270 [M]⁺ (7), 225 [M – OCH₂CH₃]⁺ (18), 115 [CH₃CHCH₂COOCH₂CH₃]⁺ (78), 88 [CH₂C(OH)OCH₂CH₃]⁺ (100), 43 (21), 55 (19).

III) Трансестерификација етил-3-метилтетрадеканоата

Етил-3-метилтетрадеканоат је трансестерификован метоксидом у метанолу (MeO/MeOH) по процедури описаној у поглављу 4.4.3. Чист метил-3-метилтетрадеканоат (**103β**) је изолован након *dry-flash* хроматографије на силика-гелу (71 mg, принос: 70%).

Метил-3-метилтетрадеканоат (103β): RI=1759; m/z (70 ev) 256 [M]⁺ (4), 225 (7), 213 (8), 101 [CH₃CHCH₂COOCH₃]⁺ (95), 74 [CH₃OC(OH)CH₂]⁺ (100), 55 (20), 43 (27).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, $J \approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 0,92 (d, $J=6,7$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1,17 и 1,29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1,26 (m, 18H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2,10 (dd, $J=14,7, 5,8$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2,13 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2,31 (dd, $J=14,7, 6,0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 3,67 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$).

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 19,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 22,7 – 31,9 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 29,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 36,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 41,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 51,3 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 173,9 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3$).

4.4.16. Општа процедура дериватизације диметил-дисулфидом

Узорак моноена (5 mg) растворен је у диметил-дисулфиду (1 ml), а затим је додат раствор (0,25 ml) јода у диетил-етру (60 mg ml⁻¹). Реакциона смеша је мешана 24 сата, а затим је додато 25 ml хексана. Смеша је испрана разблаженим раствором натријум-тиосулфата, осушена анхидрованим магнезијум-сулфатом, и упарена до сува на ротационом вакуум-упаривачу. Реакциони производ је растворен у *n*-хексану и директно ињектиран (без претходног пречишћавања) на GC-колону.

4.4.17. Општа процедура *Simmons-Smith*-ове реакције циклопропанаације

Узорак моноена (1,95 mmol, 1 eq) раствори је у сувом тетраhydroфурану (10 ml), а затим је раствор охлађен на -50 °C (контрола температуре у ацетонском купатилу; хлађење помоћу додатог течног азота). Потом је у капима додат раствор диетилцинка (1 M раствор у *n*-хексану, 10 mmol, 5,1 eq), а одмах затим и дијодметан (19,7 mmol, 10 eq) растворен у сувом тетраhydroфурану. Реакциона смеша је загрејана до собне температуре и остављена да се меша током 18 h. Затим је опет охлађена на -40 °C, у капима је додат засићени раствор амонијум-хлорида (20 ml), а затим остављена да се уз мешање загреје до собне температуре. Након тога, смеша је декантована, а водена фаза је екстрахована диетил-етром (3 x 20 ml). Спојени органски слојеви су испрани засићеним раствором

натријум-хлорида, осушени анхидрованим $MgSO_4$, а растварач је упарен на ротационом вакуум-упаривачу.

4.5. Припрема раствора за одређивање термалних особина воскова

Припремљена су два концентрована раствора (10 mg ml^{-1}) растварањем по 60 mg бензил-бехената и алкана (хексанска фракција након хроматографије испирка *P. veris*) у 6 ml хлороформа. За конструисање фазног дијаграма припремљени су раствори, из концентрованих раствора, следећих пропорција: 1 : 9 (тј. $100 \text{ }\mu\text{l}$ раствора бензил-бехената + $900 \text{ }\mu\text{l}$ раствора алкана), 2 : 8 (тј. $200 \text{ }\mu\text{l}$ раствора бензил-бехената + $800 \text{ }\mu\text{l}$ раствора алкана), односно аналогно за 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2 и 9 : 1. Хлороформ је упарен под струјом азота, уз благо загревање ($\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$); у периоду од 24 h је мерена маса узорка да би се осигурало да је хлороформ у потпуности упарен. Сваки узорак добро хомогенизоване бинарне смеше (2 mg) је пренешен у стаклену капилару и одређена је тачка топљења. Измерене су и тачке топљења чистог бензил-бехената и смеше алкана. Узорци су загревани том брзином да је температура расла за $1 \text{ }^\circ\text{C}$ у минути. Иста процедура припреме раствора и одређивање тачке топљења је примењена на алкане и модел-смешу бензил-естара масних киселина синтетисаних из пчелињег воска.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

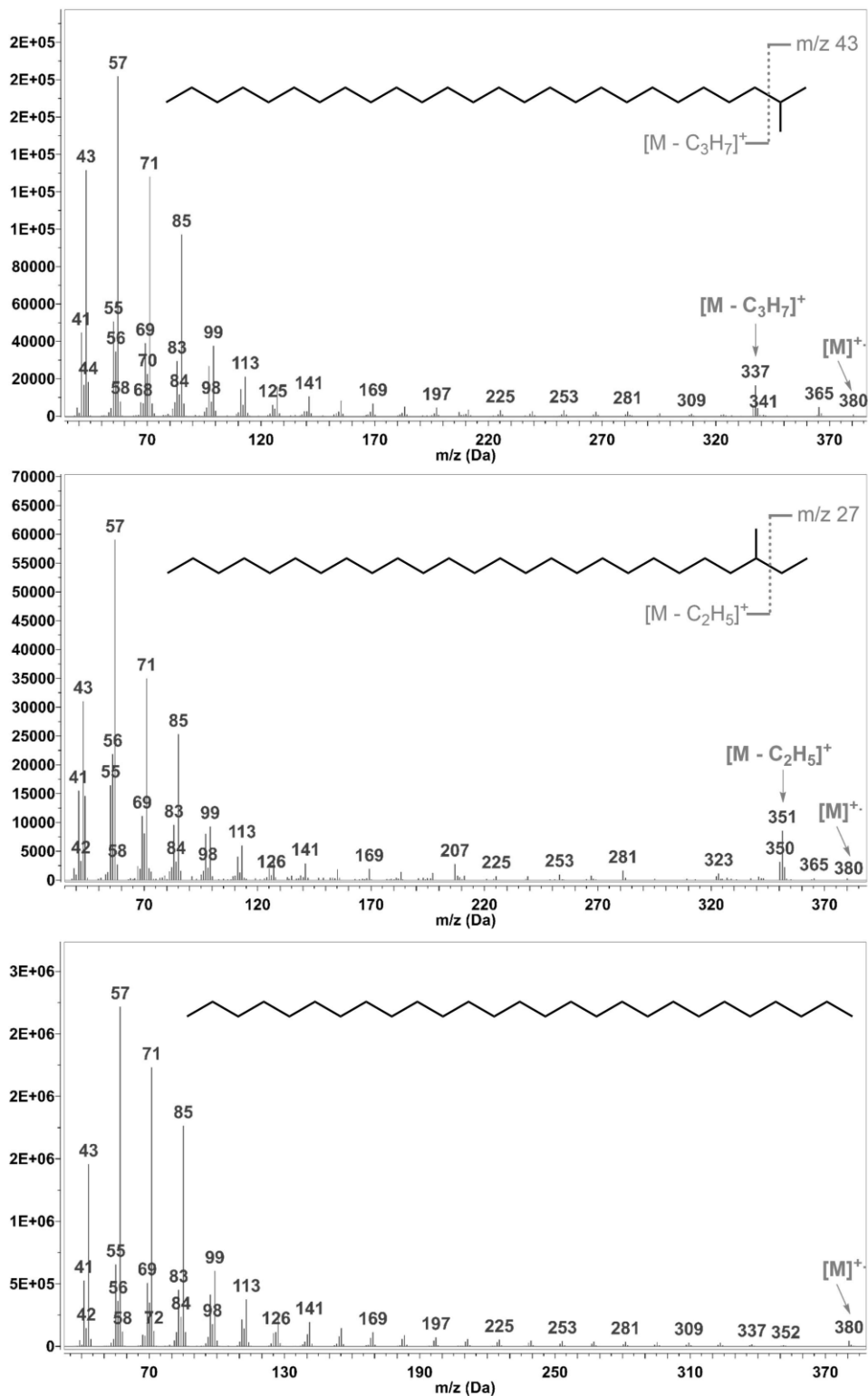
Воскови са површине надземних делова (листова и цветова) *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2), и цветова *L. tulipifera* (P-8), испрани су потапањем у хлороформ, помоћу ултразвука. Након прелиминарне GC-MS анализе, састојци испирака раздвојени су градијентном *dry-flash* хроматографијом на силика-гелу (поступак је описан у поглављу 4.3.3).

5.1. Епикутикуларни алкански профил врста *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2)

Анализом хексанске фракције испирака надземног дела *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2), идентификовани су дуголанчани *n*-, *iso*- и *anteiso*-алкани (C₂₁–C₃₅, шеме 4.3.1 и 4.3.2, слика 5.1.1., табела 5.1.2.).

R =		<i>n</i> -низ	<i>iso</i> -низ	<i>anteiso</i> -низ	
					
Алкани	2-Алканони	<i>n</i>			
		Алкани	17-31	15-29	15-28
		2-Алканони	19-31	17-24, 26, 27	17-21, 23
Бензил-естри		Бензил-естри	17, 19-29	19-27	19-25

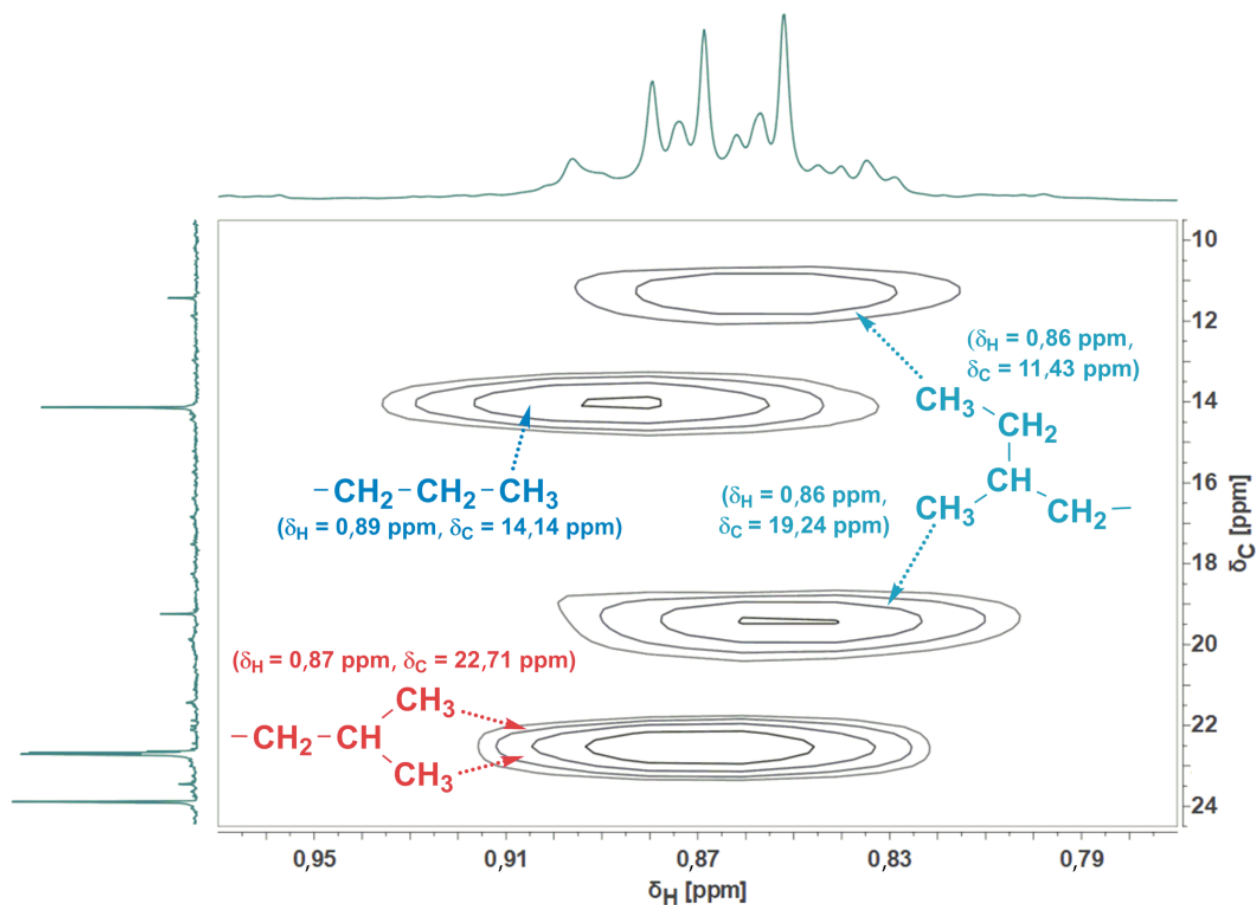
Слика 5.1.1. Идентификовани алкани, 2-алканони и бензил-естри дуголанчаних масних киселина са површине листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*



Слика 5.1.2. Масени спектри *n*-, *iso*-, *anteiso*-алкана (C₂₇), са приказаним карактеристичним масеним фрагментацијама. Ови алкани су идентификовани у хексанској фракцији испирака *P. veris* и *P. acaulis*.

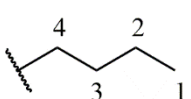
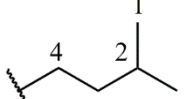
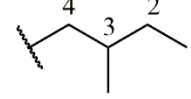
Идентификација *n*-алкана је недвосмислено потврђена коинјекцијом комерцијално доступне смеше серије *n*-алкана од C₇ до C₄₀. Рачvasti алкани (*iso*- и *anteiso*-), међусобно су, а и у односу на *n*-алкане, разликовани на основу њихове масене фрагментације, као и на основу њихових ретенционих особина. Приликом EI-MS фрагментација, код обе серије изомерних рачvasti алкана, раскида се C₂-C₃ веза, при чему се бележе јони, [M - C₃H₇]⁺ за *iso*-изомере и [M - C₂H₅]⁺ за *anteiso*-изомере (слика 5.1.2.). Поређење гасно-хроматографских података са литературним подацима (Radulović et al., 2012), као и чињеница да алкани *iso*-серије елуирају са GC-колоне нешто брже од *anteiso*-алкана (Zaikin & Vorisov, 2002), искоришћени су за иницијалну идентификацију ове две класе изомерних алкана.

Ипак, додатни доказ позиције метил-групе код рачvasti алкана, добијен је анализом 1D и 2D NMR спектра (у CDCl₃) хексанске фракције испирака. Анализом DEPT-135 спектра асигниране су четири различите метил-групе чији су сигнали угљеника на померањима 11,4, 14,1, 19,2 и 22,7 ppm, а на основу gHSQC спектра утврђено је да су ови угљеници повезани са протонима чији су сигнали преклопљени у опсегу од 0,82 – 0,90 ppm у ¹H NMR спектрима (табела 5.1.1 и слика 5.1.3). Сигнал угљеника на 14,1 ppm корелише кроз једну везу са триплетом на 0,88 ppm (*J*=7,0 Hz), а и један и други сигнал корелишу у градијентном ¹H-¹H COSY и gHMBC спектру са CH₂ групом на *ca.* 1,28 ppm, тако да се њихове вредности могу недвосмислено приписати угљеницима и водоницима неразгранатог краја низа, тј. *n*-алкана. Иако је преклопљен у ¹H NMR спектру, дублет на δ 0,86 (*J*=6,6 Hz) који се куплује са протонима на δ 1,53, може се са сигурношћу приписати спинском систему *iso*-групе, што је и потврђено одговарајућим корелацијама у другим 2D спектрима. Протони *anteiso*-метил-групе су били преклопљени у ¹H NMR спектру, па су њихова хемијска померања потврђена на основу литературних података (Pic-Tomic et al., 2015), а касније и додатно поређењем NMR података синтетисаног модел-једињења са метил-групом у *anteiso*-положају бочног ланца (слика 5.3.15).



Слика 5.1.3. Део gHSQC спектра хексанске фракције испирка *P. veris* са карактеристичним сигнаlima за *n*-, *iso*- и *anteiso*-метил-групе

Табела 5.1.1. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) који се односе на нефункционализовани крај (ω) дуголанчаних једињења (алкани, бензил-естри масних киселина, 2-алканони, 1-фенил-1,3-алкадирил-диацетати, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетати, 1-фенил-1,3-алкадиони, 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони, *sec*-алкохоли и масне киселине) идентификованих у *P. veris* и *P. acaulis* испирцима

		<i>n</i> -низ		<i>iso</i> -низ		<i>anteiso</i> -низ	
							
Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	14,1	0,88 (t, $J=7,0$ Hz, 3H)	22,7	0,86 (d, $J=6,6$ Hz, 6H)	11,4	0,85 (3H) ^a	
2	22,8	1,28 (2H) ^a	28,0	1,53 (1H) ^b	30,1	1,53 (2H) ^b	
3	32,1	1,22-1,28 (2H) ^a	39,0	1,17 (2H) ^a	35,1	1,38 (1H) ^a	
4	29,4-29,7	1,22-1,28 (2H) ^a	26,4	1,22-1,28 (2H) ^a	36,6	1,25 (2H) ^a	
1'	/	/	/	/	19,2	0,84 (3H) ^a	

^a преклопљен сигнал;

^b сигнал преклопљен са сигналом H-2 који потиче од 3-алканаола;

/ – подаци нису доступни или нису применљиви.

Квантификација алкана је извршена интегралњем површина испод пикова у GC-хроматограму. Као стандард за конструисање калибрационе праве, коришћен је *n*-додекан. У табели 5.1.2. приказана је количина сваког појединачног алкана, као и класе алкана присутних у 100 g свежег биљног материјала (цветова и листова, без раздвајања, 0,017 – 5,30 mg за P-1 и 0,046 – 2,20 mg за P-2). Уколико претпоставимо да је површина цветова занемарљива у односу на површину листова, процењена вредност укупне количине алкана по cm² листова износи 10,6 µg за P-1 и 7,1 µg за P-2. *Primula veris* и *P. acaulis* се разликују по квалитативном и квантитативном саставу алкана. *Primula veris* продукује алкане дужег низа (C₂₃–C₃₅) у поређењу са дужином ланца алкана *P. acaulis* (C₉–C₃₃). Међутим, сви алкани средњег или дугачког низа идентификовани у испирку *P. acaulis* детектовани су у траговима (табела је дата у прилогу).

Табела 5.1.2. Алкани идентификовани у испирцима листова и цветова *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2)

RI ^a	Једињење	Класа	Количина ^b		Метода идентификације ^b
			<i>P. veris</i>	<i>P. acaulis</i>	
2063	2-Метилеикозан	<i>I</i>	н.д. ^Г	тр. ^Д	RI, MS, NMR
2100	Хенеикозан	<i>N</i>	тр.	0,046 ± 0,004	RI, MS, CoI, NMR
2164	2-Метилхенеикозан	<i>I</i>	0,017 ± 0,001	0,098 ± 0,006	RI, MS, NMR
2173	3-Метилхенеикозан	<i>A</i>	н.д.	тр.	RI, MS, NMR
2200	Докозан	<i>N</i>	тр.	0,047 ± 0,004	RI, MS, CoI, NMR
2264	2-Метилдокозан	<i>I</i>	тр.	0,059 ± 0,005	RI, MS, NMR
2273	3-Метилдокозан	<i>A</i>	н.д.	тр.	RI, MS, NMR
2300	Трикозан	<i>N</i>	0,34 ± 0,02	1,30 ± 0,08	RI, MS, CoI, NMR
2364	2-Метилтрикозан	<i>I</i>	0,18 ± 0,01	1,20 ± 0,07	RI, MS, NMR
2372	3-Метилтрикозан	<i>A</i>	тр.	0,27 ± 0,02	RI, MS, NMR
2400	Тетракозан	<i>N</i>	0,073 ± 0,004	0,20 ± 0,01	RI, MS, CoI, NMR
2463	2-Метилтетракозан	<i>I</i>	0,039 ± 0,002	0,35 ± 0,02	RI, MS, NMR
2472	3-Метилтетракозан	<i>A</i>	тр.	0,055 ± 0,003	RI, MS, NMR
2500	Пентакозан	<i>N</i>	0,47 ± 0,03	1,20 ± 0,01	RI, MS, CoI, NMR

2563	2-Метилпентакозан	<i>I</i>	$0,33 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,05$	RI, MS, NMR
2573	3-Метилпентакозан	<i>A</i>	$0,080 \pm 0,005$	$0,50 \pm 0,03$	RI, MS, NMR
2600	Хексакозан	<i>N</i>	$0,130 \pm 0,008$	$0,075 \pm 0,004$	RI, MS, CoI, NMR
2664	2-Метилхексакозан	<i>I</i>	$0,100 \pm 0,005$	$0,130 \pm 0,008$	RI, MS, NMR
2674	3-Метилхексакозан	<i>A</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
2700	Хептакозан	<i>N</i>	$1,300 \pm 0,008$	$1,200 \pm 0,007$	RI, MS, CoI, NMR
2764	2-Метилхептакозан	<i>I</i>	$0,65 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,05$	RI, MS, NMR
2775	3-Метилхептакозан	<i>A</i>	$0,18 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$	RI, MS, NMR
2800	Октакозан	<i>N</i>	$0,37 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	RI, MS, CoI, NMR
2864	2-Метилоктакозан	<i>I</i>	$0,23 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	RI, MS, NMR
2875	3-Метилоктакозан	<i>A</i>	$0,033 \pm 0,002$	тр.	RI, MS, NMR
2900	Нонакозан	<i>N</i>	$5,3 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,2$	RI, MS, CoI, NMR
2963	2-Метилнонакозан	<i>I</i>	$1,40 \pm 0,08$	$0,63 \pm 0,05$	RI, MS, NMR
2974	3-Метилнонакозан	<i>A</i>	$0,46 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01$	RI, MS, NMR
3000	Триакоктан	<i>N</i>	$0,38 \pm 0,02$	$0,096 \pm 0,006$	RI, MS, CoI, NMR
3063	2-Метилтриакоктан	<i>I</i>	$0,170 \pm 0,001$	$0,059 \pm 0,004$	RI, MS, NMR
3075	3-Метилтриакоктан	<i>A</i>	$0,039 \pm 0,002$	тр.	RI, MS, NMR

3100	Хентриаконтан	<i>N</i>	$2,50 \pm 0,15$	$0,53 \pm 0,03$	RI, MS, CoI, NMR
3164	2-Метилхентриаконтан	<i>I</i>	$0,18 \pm 0,01$	$0,051 \pm 0,003$	RI, MS, NMR
3176	3-Метилхентриаконтан	<i>A</i>	$0,055 \pm 0,003$	тр.	RI, MS, NMR
3200	Дотриаконтан	<i>N</i>	$0,076 \pm 0,005$	тр.	RI, MS, CoI, NMR
3263	2-Метилдотриаконтан	<i>I</i>	$0,029 \pm 0,002$	н.д.	RI, MS, NMR
3275	3-Метилдотриаконтан	<i>A</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3300	Тритриаконтан	<i>N</i>	$0,29 \pm 0,02$	$0,057 \pm 0,003$	RI, MS, CoI, NMR
3364	2-Метилтритриаконтан	<i>I</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3376	3-Метилтритриаконтан	<i>A</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3400	Тетратриаконтан	<i>N</i>	тр.	тр.	RI, MS, CoI, NMR
3463	2-Метилтетратриаконтан	<i>I</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3475	3-Метилтетратриаконтан	<i>A</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3500	Пентатриаконтан	<i>N</i>	$0,021 \pm 0,001$	тр.	RI, MS, CoI, NMR
	Укупно идентификовано алкана		15,422 (41)	13,143 (38)	
	Нормалног низа (<i>N</i>)		11,250 (15) ^b	7,111 (15)	
	Парни		1,029 (7)	0,578 (7)	
	Непарни		10,221 (8)	6,533 (8)	

<i>Iso</i> -низа (I)	3,325 (14)	4,517 (12)
Парни	2,757 (7)	3,719 (6)
Непарни	0,568 (7)	0,798 (6)
<i>Anteiso</i> -низа (A)	0,847 (12)	1,515 (11)
Парни	0,775 (6)	1,460 (6)
Непарни	0,072 (6)	0,055 (5)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₂₀–C₄₀);

^b садржај алкана изражен у милиграмима (mg) на 100 g биљног материјала;

^b метода идентификације: RI – поклапање ретенционих индекса; MS – поређење масених спектра; CoI – додатна потврда коинјекцијом одговарајућег стандардног узорка; NMR – NMR анализа;

^г н.д. – није детектовано;

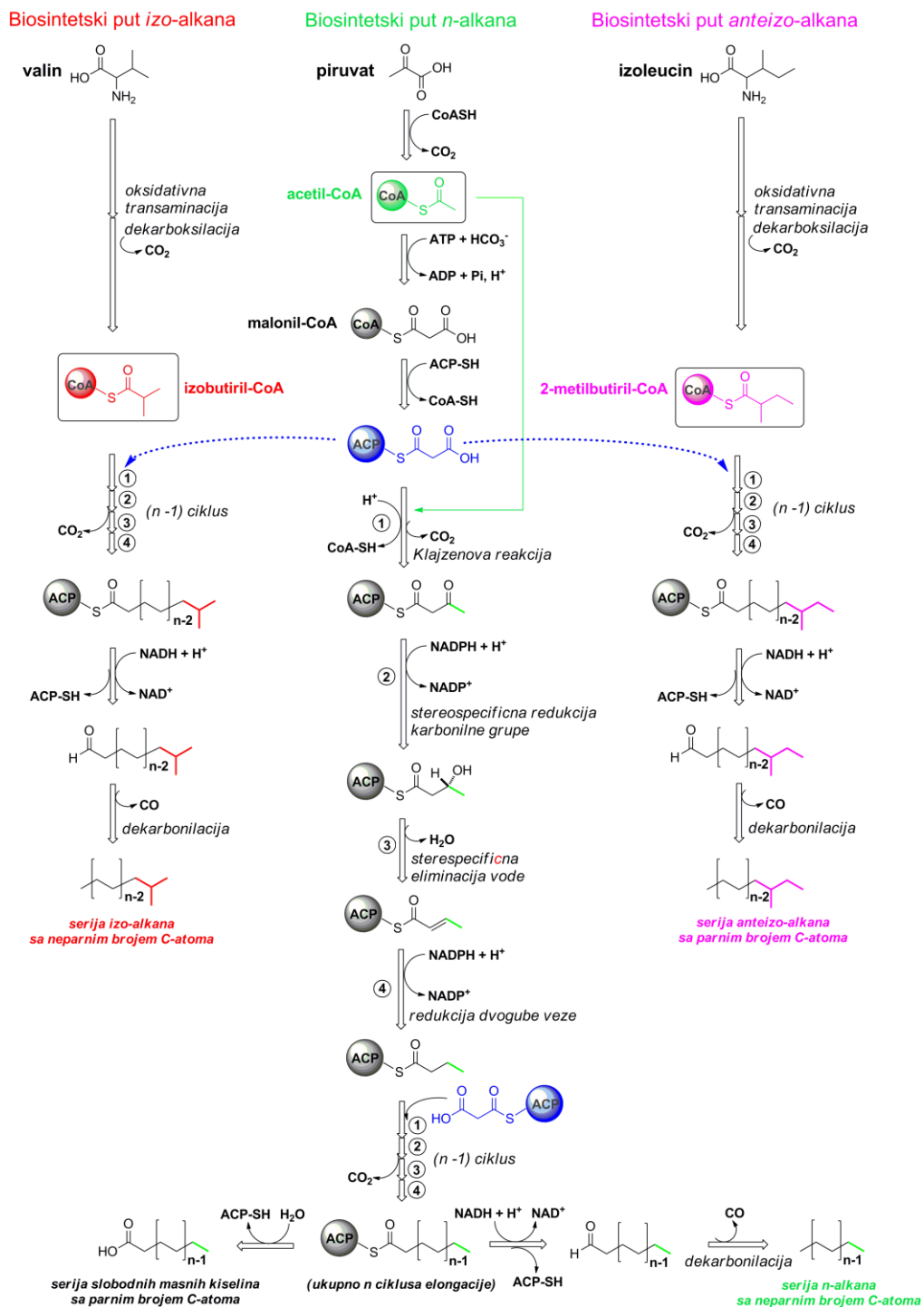
^д тр. – траг (<0,015 mg/100 g биљног материјала);

^ђ број у загради представља број детектованих алкана који припадају тој класи.

Биосинтеза главних састојака воскова обухвата вишеструке, узастопне елонгације одговарајућег стартног једињења, градивном C_2 односно ацетатном, јединицом. Ова градивна јединица настаје из малонил-коензима А (малонил- CoA) (Shepherd & Griffiths, 2006). Сваки циклус елонгације, односно додаток ацетатне јединице, одвија се у четири корака (слика 5.1.4):

- 1 – Клајзенова кондензација праћена сукцесивном декарбоксилацијом;
- 2 – стереоспецифична редукција карбонилне групе;
- 3 – стереоспецифична дехидратација, односно елиминација молекула воде;
- 4 – редукција двогубе везе у кораку Мајклове адиције.

Истим овим путем се одвија и биосинтеза масних киселина. Примарни елонгациони систем је смештен у хлоропластима, где се изнова синтетишу ацил-низови (ацил- CoA) до C_{16} и/или C_{18} . Секундарним елонгационим системом, у ендоплазматичном ретикулуму, низови се потом продужавају до C_{30} низа, или чак и дужих низова. На самом крају, хемијским трансформацијама у ацил- CoA низу настају алкани, алдехиди, кетони, примарни и секундарни алкохоли, естри као и многа друга полиоксигенована једињења. Алкани највероватније настају у двофазном процесу који се састоји од редукције ацил- CoA и декарбонилације насталог алдехида (Shepherd & Griffiths, 2006). Структура стартера одређује дистрибуцију изомерних алкана, па тако на пример, стратери у биосинтези *n*- и *iso*-алкана садрже паран број угљеникових атома, C_2 , ацетил- CoA (који настаје из пирувата), и C_4 , изобутирил- CoA (који настаје из валина), па су зато код *n*- и *iso*-алкана доминантни хомолози са непарним бројем угљеникових атома; међутим, биосинтеза *anteiso*-алкана укључује стартер који садржи непаран број угљеникових атома, C_5 , 2-метилбутирил- CoA (који настаје из изолеуцина), са непарним бројем угљеникових атома, па су зато код *anteiso*-алкана доминантни хомолози са парним бројем угљеникових атома (Youping et al., 2010).



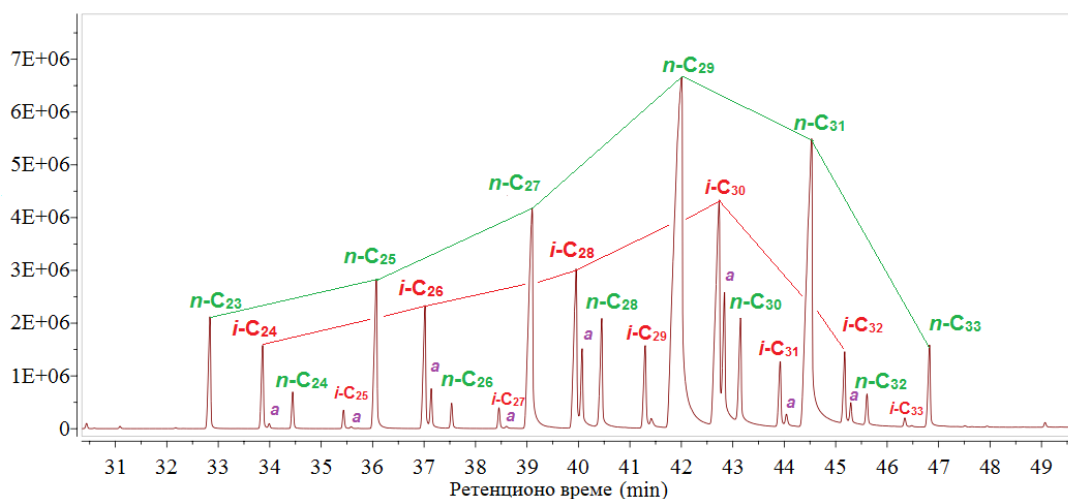
Слика 5.1.4. Биосинтеза слободних масних киселина и *n*-, *iso*- и *anteiso*-алкана код виших биљака (слика је преузета из докторске дисертације, Генчић, 2015)

Алкански профил, тачније однос количина алкана са непарним и парним бројем угљеникових атома испирака листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*, уобичајен је за више биљке. Најзаступљенији алкан у испирцима и једне и друге врсте био је *n*-нонакозан (C₂₉). Просечна дужина угљоводоничног ланца (*Average Chain Length* - ACL) износила је 28,93 за *P. veris* и 26,77 за *P. acaulis*, праћена високим вредностима угљеничног преференцијалног индекса (*Carbon Preference Index* - CPI) од 9,93 за *P. veris* и 11,30 за *P. acaulis*. Вредности CPI и ACL су израчунате по модификованој формули која је раније објављена (Radulović et al., 2012). Тенденција *P. acaulis* да биосинтетише веће количине алкана са мањим бројем угљеникових атома у односу на *P. veris*, јасно се огледа у њиховим ACL вредностима.

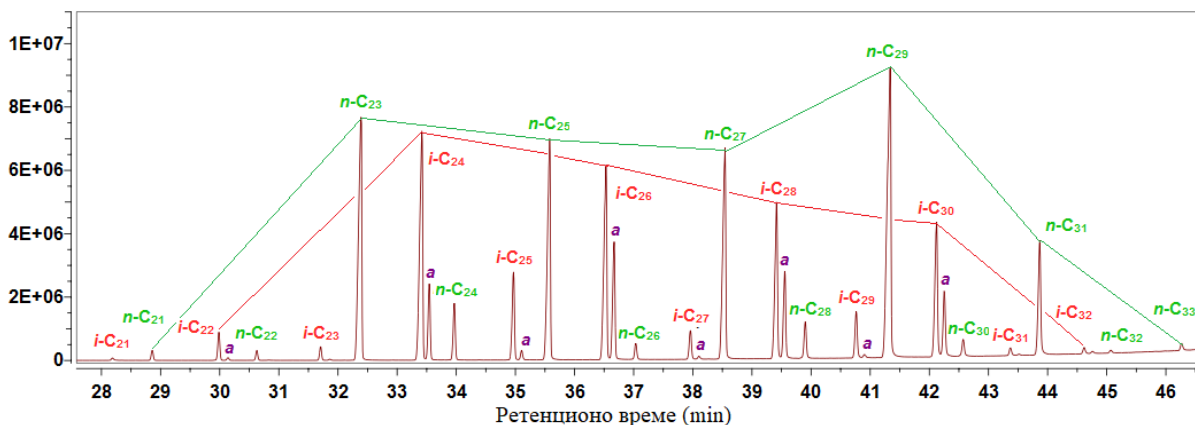
Потребно је посебно истакнути да су дуголанчани рачvasti алкани били присутни у знатној количини у односу на *n*-алкане; средња вредност заступљености *n*- : *iso*- : *anteiso*- алкана за *P. veris* износила је 73 : 21 : 6, а за *P. acaulis* 54 : 34 : 12. Дуван (*Nicotiana tabacum*) је један од ретких биљних таксона који садржи значајну количину *iso*- и *anteiso*- алкана (25–50% од укупне количине алкана, Mold et al., 1963). Код *anteiso*-алкана проучаваних *Primula* врста, заступљенији су били хомолози са парним бројем угљеникових атома. Способност *P. acaulis* да биосинтетише хомологе ниже масе је очигледнија код *anteiso*-алкана, код којих је најзаступљенији хексакозан (C₂₆, ACL=26,91), док је најзаступљенији *anteiso*-алкан *P. veris* триаконтан (C₃₀, ACL=29,33). Такође се може закључити да *P. acaulis* има израженију тежњу да продукује *anteiso*-алкане парног броја угљеникових атома (CPI=26,54) у односу на *P. veris* (CPI=10,76). Заступљеност *iso*-алкана парног броја угљеникових атома је неочекивано већа у односу на хомологе са непарним бројем угљеникових атома и код једне и код друге биљне врсте, што се и види и по блиским CPI вредностима (4,76 за *P. veris* и 4,54 за *P. acaulis*). Међутим, најзаступљенији *iso*-хомолог *P. veris* је триаконтан (C₃₀), као и код *anteiso*-алкана, док је код *P. acaulis* најзаступљенији *iso*-хомолог са мањом масом, тетракозан (C₂₄). Иначе, садржај *iso*-алкана са непарним бројем угљеникових атома у биљним восковима је знатно већи у односу на садржај хомолога са парним бројем угљеникових атома (Busta & Jetter, 2017).

5.1.1. Гаусова расподела релативних количина површинских алкана *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2)

На сликама 5.1.5 и 5.1.6 приказане су алканске фракције испирка надземних делова *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2; табела 5.1.2). И голим оком је било могуће уочити на неким хроматограмима да постоји правилност у расподели количина алкана који припадају појединим класама (*n*-, *iso*- и *anteiso*-), подељени по парности броја C-атома.

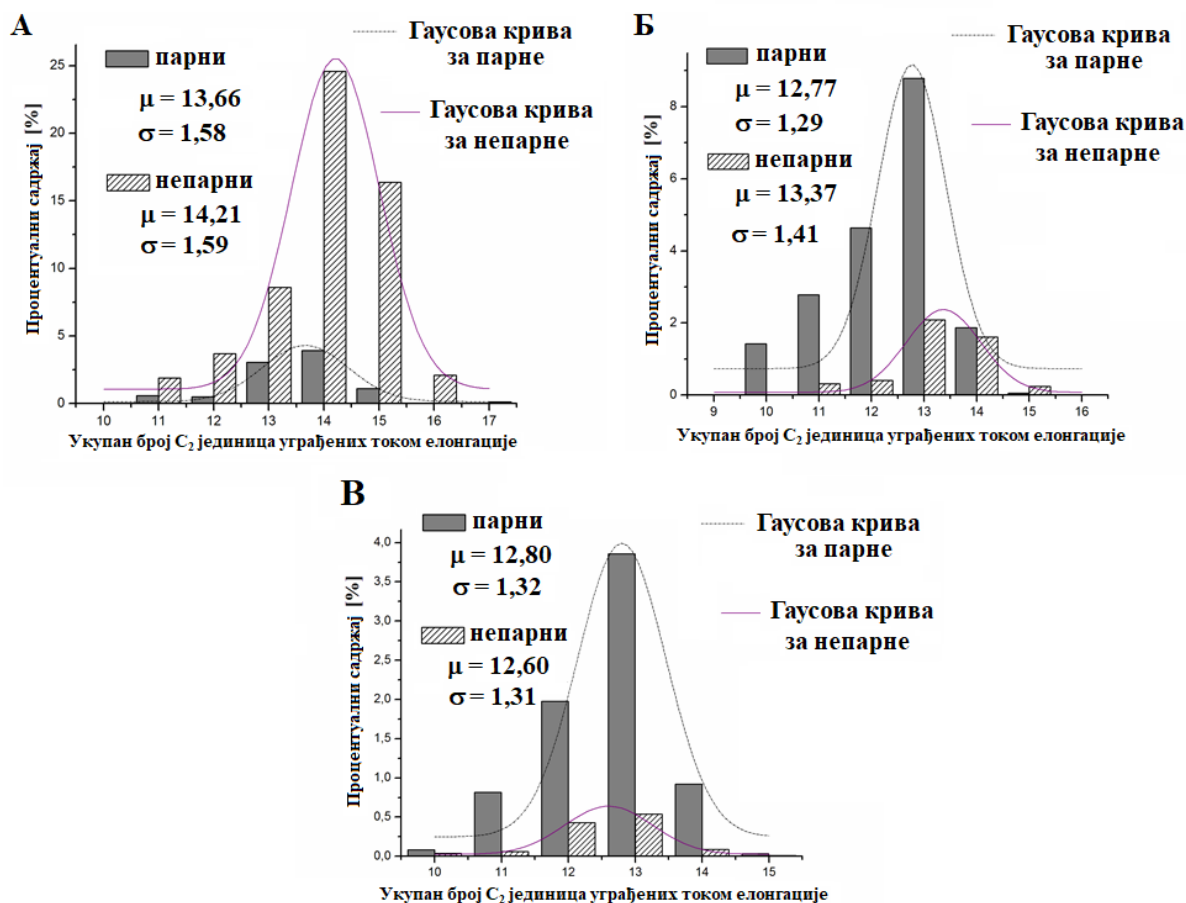


Слика 5.1.5. Хексанска фракција хлороформског испирка надземних делова (листова и цветова) *P. veris* (P-1; *n* – *n*-изомери, *i* – *iso*-изомери и *a* – *anteiso*-изомери који имају исти број угљеникових атома као и најближи *iso*-изомер)

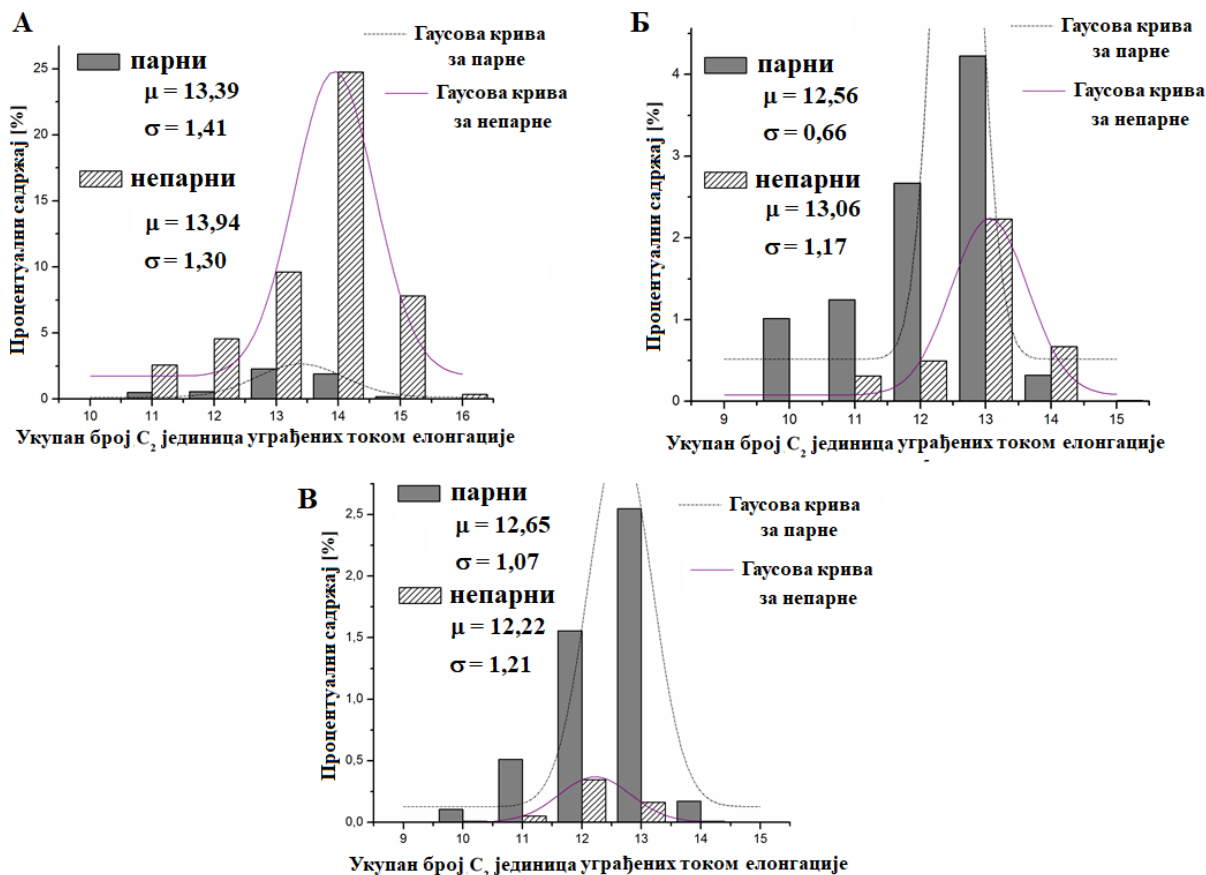


Слика 5.1.6. Хексанска фракција хлороформског испирка надземних делова (листова и цветова) *P. acaulis* (P-2; *n* – *n*-изомери, *i* – *iso*-изомери и *a* – *anteiso*-изомери који имају исти број угљеникових атома као и најближи *iso*-изомер)

Након тога уследила је графичка анализа релативне заступљености алкана где је потврђено да њихова заступљеност прати Гаусову расподелу (слике 5.1.7 и 5.1.8). Гаусова расподела је природна расподела, где средња вредност представља идеалну вредност којој природа тежи, а све расподеле око те средње вредности су грешка тј. одступање од идеалне вредности, па се зато Гаусова расподела може назвати и „закон природне грешке“ (Howell, 2008).



Слика 5.1.7. Гаусова расподела парних и непарних *n*- (А), *iso*- (Б) и *anteiso*-алкана (В) хексанске фракције испирка *P. veris* изражена као процентни садржај у односу на сваку уграђену C_2 јединицу током елонгације



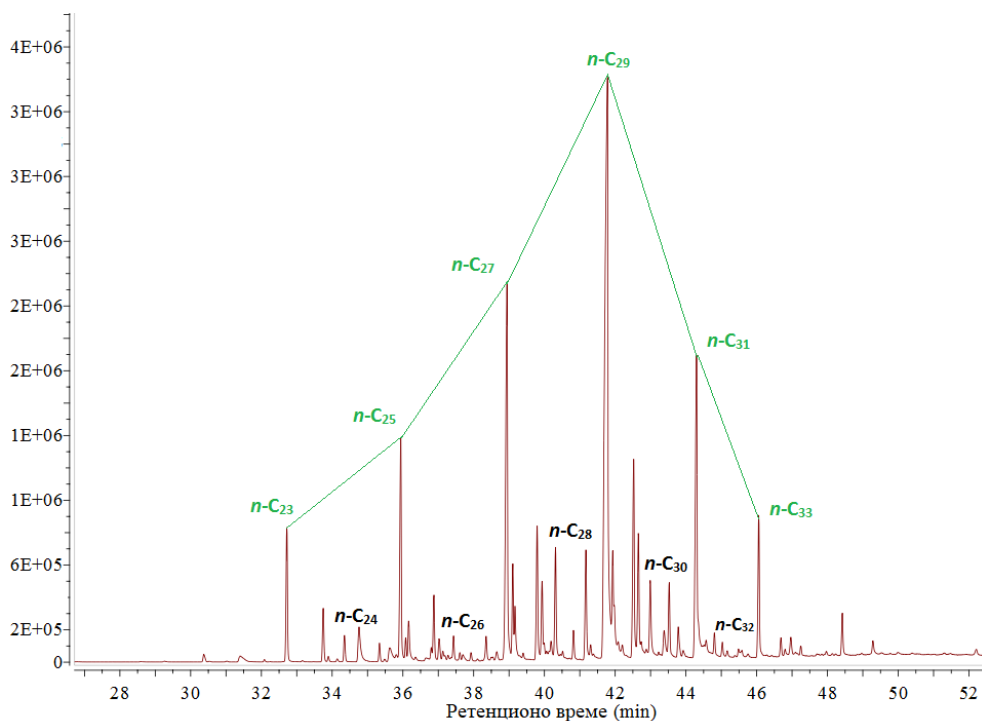
Слика 5.1.8. Гаусова расподела парних и непарних *n*- (А), *iso*- (Б) и *anteiso*-алкана (В) хексанске фракције испирка *P. acaulis* изражена као процентни садржај у односу на сваку уграђену C_2 јединицу током елонгације

У биосинтези алкана уочавају се две главне фазе: 1 – елонгација стеаринске или палмитинске киселине ацетатним јединицама и 2 – биотрансформација добијених дуголанчаних масних киселина (декарбоксилација) при чему настају *n*-алкани са непарним бројем угљеникових атома (слика 5.1.4). Претпоставља се да крајњу дужину ацил-низа одређује ензим који катализује почетну реакцију у циклусу елонгације масне киселине, односно ензим који катализује реакцију Клајзенове кондензације (слика 5.1.4). Одлучујући фактор у овом процесу је дубина хидрофобног цепа у који се смешта дуголанчана масна киселина током циклуса елонгације, тако да када дужина ацил-низа достигне дубину хидрофобног цепа, елонгација се прекида (Denic & Weissman, 2007).

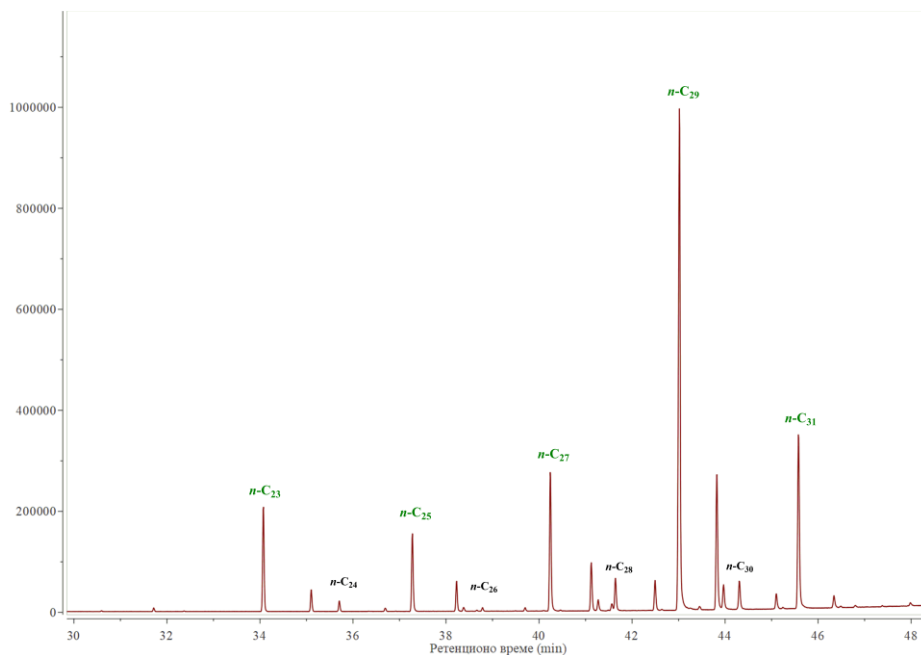
На основу наведеног, као и на основу Гаусових расподела алкана у врстама рода *Primula*, може се закључити да током биосинтетског пута добијања алкана (слика 5.1.4), елонгаза најбоље катализује реакцију у којој учествује масна киселина која се најбоље уклапа у хидрофобни џеп овог ензима. Сви други добијени производи елонгације би онда настајали као последица статистичке грешке ензима. На основу тога, параметри који одређују Гаусову расподелу алкана се карактеришу на следећи начин: μ представља дужину идеалне масне киселине, која је генетски кодирана, а σ представља грешку ензимског система који врши елонгацију. На сликама 5.1.7 и 5.1.8 приказане су Гаусове расподеле парних и непарних *n*-, *iso*- и *anteiso*-алкана хексанских фракција испирака *P. veris* и *P. acaulis* у функцији укупног броја C_2 јединица уграђених током елонгације. Одређено је да параметар μ варира око 2 ацетатне јединице, од $\mu=12,60$ код непарних *anteiso*-алкана до 14,21 код непарних *n*-алкана за *P. veris*, и од $\mu=12,22$ код непарних *anteiso*-алкана до 13,94 код непарних *n*-алкана за *P. acaulis*.

Параметри за описивање расподеле алкана у узорцима природног порекла ACL и CPI се могу прецизније израчунати, коришћењем параметара њима одговарајуће Гаусове расподеле. Средња вредност (μ) одговара просечној дужини угљоводоничног низа ($ACL=2 \times \mu + 1$), а однос површина испод Гаусових крива алкана са непарним и парним бројем угљеникових атома (за сваку серију засебно) аналоган је угљеничном преференцијалном индексу, а што је у случају *P. veris* и *P. acaulis*, $CPI=P_{\text{непарни}}/P_{\text{парни}}$, за *n*-серију, и $CPI=P_{\text{парни}}/P_{\text{непарни}}$ за *iso*- и *anteiso*-серију. Гаусови параметри за све три серије парних и непарних алкана приказани су на графицима (слике 5.1.7 и 5.1.8), а вредности ACL и CPI израчунате на основу њих се добро слажу са претходно добијеним вредностима применом класичне формуле (поглавље 5.1; Radulović et al., 2012).

Припремљени су хлороформски испирци надземних делова *P. veris* (P-7) и *P. acaulis* (P-4), засебно листова и цветова. Одређен је квалитативни и квантитативни састав испирака (табела 5.2.4) одакле се може закључити да су алкани заступљенији у испирцима цветова, док су испирци листова били богатији флавоноидима типичним за род *Primula*. На сликама 5.1.9 и 5.1.10 приказани су хроматограми (са увећањима) површинских испирка цветова *P. acaulis* (P-4) и *P. veris* (P-7), на којима се уочава да релативна заступљеност *n*-алкана непарног броја угљеникових атома подсећа на Гаусову расподелу. Слична расподела се може уочити и код *n*-алкана са парним бројем угљеникових атома.



Слика 5.1.9. Гасни хроматограм испирка цветова *P. acaulis* (P-4)



Слика 5.1.10. Гасни хроматограм испирка цветова *P. veris* (P-7)

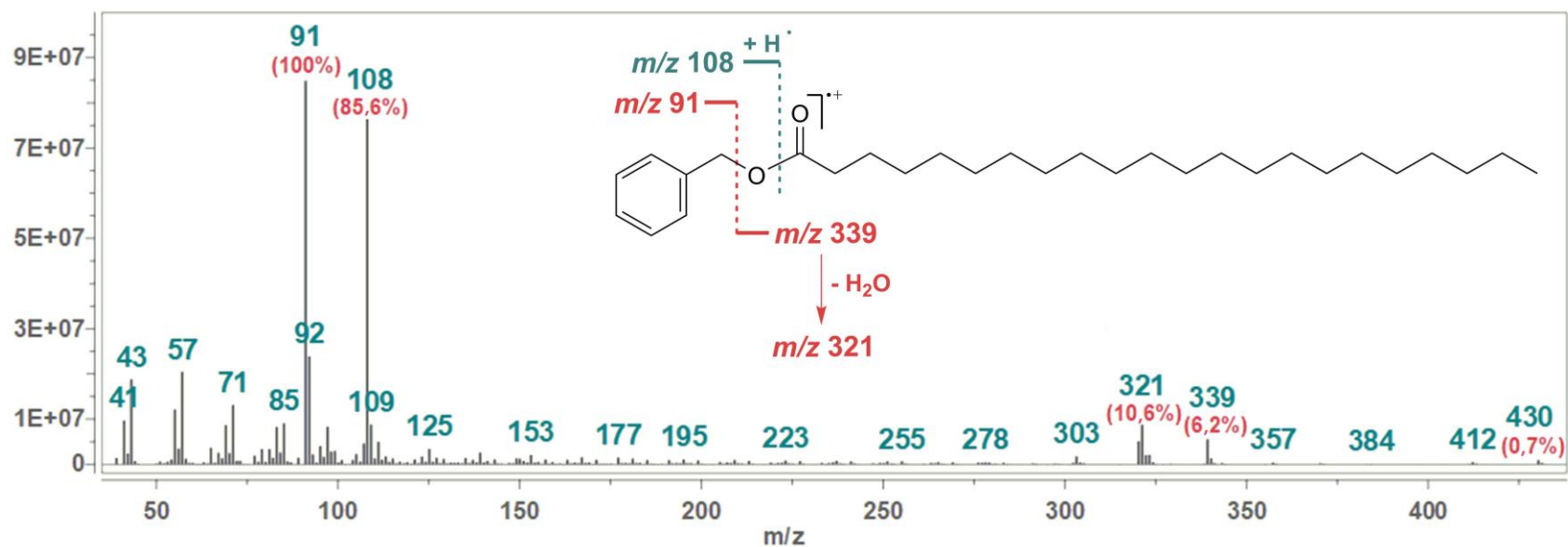
Воскови који прекривају надземне делове биљака, могу бити различитог хемијског састава, а тај састав може бити другачији и између органа једне исте биљне врсте. Примећено је и да састав воска зависи и од морфолошких особина биљног органа, као и то да восак може бити аморфне или кристалне структуре (Gülz & Hangst, 1983). Такође, услови животне средине у којима се биљка налази утичу на хемијски састав, а самим тим и на кристалну структуру воска. Раније је уочено да се са снижавањем температуре удео кристалне фазе воска повећава, како би сачувао биљку од смрзавања (Gülz & Hangst, 1983), и да ниске температуре поспешују биљку да биосинтезише већу количину алкана (НАО et al., 2017). Кристална структура воска потиче од засићених дуголанчаних једињења, естара, масних киселина и алкохола, док је аморфна структура воска последица присутних незасићених естара, масних киселина итд., а такође и рачвастих алкана. Такође, количина алкана присутних у воску повезана је са заштитом од губитка воде (Zhang et al., 2007). Као што се види на сликама 5.1.9 и 5.1.10 и у табелама 5.1.2 и 5.2.4, воскови цветова *P. veris* и *P. acaulis* богати су како алканима нормалног низа, тако и рачвастим алканима, што уствари доприноси да се ове биљне врсте, које цветају у рано пролеће, заштите од губитка воде и ниских температура, прилагођавајући структуру својих површинских воскова условима средине у којима се налазе.

Кристаличност фазе алкана, тј. однос количина аморфних и кристалних делова се доводи у везу са расподелом количина алкана у смеси, а нарочито са присуством рачвастих алкана поред оних са *n*-низом. Ширина Гаусове криве, код нас σ , има директну везу са механичким особинама воскова. Учено је да, како расте стандардна девијација (σ), долази до повећања количине аморфне фазе у односу на број кристалних делова. Такође, показно је да удео аморфне фазе расте и са повећањем количине *iso*-алкана, али само у случају ако је $>12\%$ (Petitjean et al., 2010; Petitjean et al., 2008). Иако су алкани са ниском вредношћу σ (око 1,5), површински воскови *Primula* врста богати су рачвастим алканима (46% за Р-4 и 28% за Р-7), па ови воскови вероватно формирају чврсту фазу, са великим уделом аморфних делова.

5.2. Анализа састојака хроматографских фракција 2 и 3 *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2)

5.2.1. Дуголанчани бензил-естри испирака воскова *P. veris* и *P. acaulis* (фракција 2)

Хроматографске фракције испирака *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2), садржавале су дуголанчане 2-алканоне, алдехиде и бензил-естре масних киселина (шеме 4.3.1 и 4.3.2). Бензил-алканоати су лако препознати по својој карактеристичној масеној фрагментацији: m/z 91 (тропилијум-катјон; основни јон) и m/z 108 (протоновани бензилокси-катјон; слика 5.2.1, а MS-подаци су дати у прилогу; Hintze et al., 1973). Иако код неких бензил-естара молекулски јон није био уочљив, молекулска маса естара је одређена на основу масене фрагментације $[M - 91]^+$ (Gülz & Marner, 1986; Hintze et al., 1973). У GC-хроматограму уочене су групе од по три пика који елуирају са блиским ретенционим временима и скоро идентичним масеним спектрима (имају исте $[M]^+$ и/или $[M - 91]^+$ јоне). Ови изомери могли су се даље груписати на основу ретенционих особина, тј. константне разлике ретенционих индекса од *ca.* 103 јединице (табела 5.2.1.). У оквиру група од по три изомера, претпостављено је да је хомолог који најспорије елуира са GC-колоне изомер *n*-низа; ово је, у случају за групу изомера чија је вредност молекулског јона m/z 430, касније и потврђено коинјекцијом синтетисаног бензил-бехената (поглавље 4.4.2), а који је комплетно спектрално окарактерисан (^1H - и ^{13}C -NMR, MS, IR и UV) и чије је присуство потврђено у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*. Мала заступљеност или одсуство молекулског јона или неких других јона који би омогућили одређивање тачне молекулске масе могу да отежају идентификацију дуголанчаних бензил-естара (Bianchi et al., 1994; Hintze et al., 1973). Слични су разлози зашто је тешко разликовати бензил-естре нормалног и рачвастог низа (*iso*- или *anteiso*-) само на основу масених спектра. Недостатак литературних вредности ретенционих индекса за ову класу рачвастих естара, такође, отежава њихову идентификацију; у литератури су доступни само ретенциони индекси бензил- C_{21} - C_{24} -*n*-алканоата (Radulović & Zlatković, 2014; Isidorov & Szczepaniak, 2009). Ниједан од до сада идентификованих бензил-естара дуголанчаних масних киселина није комплетно спектрално окарактерисан (на пример, недостају ^1H - и ^{13}C -NMR, IR, или UV-Vis подаци).



Слика 5.2.1. Масени спектар синтетисаног бензил-бехената, са приказаном фрагментацијом

Табела 5.2.1. Дуголанчани бензил-естри у испирцима воскова листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*

RI ^a	Једињење	<i>P. veris</i> ^b	<i>P. acaulis</i> ^b	Метода идентификације ^b
2984	Бензил-еикозаноат	тр. ^г	н.д. ^д	RI, MS, CoI, NMR, D
3190	Бензил-докозаноат	тр.	тр.	RI, MS, CoI, NMR, D
3294	Бензил-трикозаноат	тр.	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3360	Бензил-22-метилтрикозаноат	тр.	тр.	RI, MS, NMR, D
3397	Бензил-тетракозаноат	7,0 ± 0,4	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3462	Бензил-23-метилтетракозаноат	1,00 ± 0,05	тр.	RI, MS, NMR, D
3473	Бензил-22-метилтетракозаноат	0,98 ± 0,05	н.д.	RI, MS, NMR, D
3507	Бензил-пентакозаноат	3,2 ± 0,2	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3563	Бензил-24-метилпентакозаноат	1,00 ± 0,05	тр.	RI, MS, NMR, D
3575	Бензил-23-метилпентакозаноат	0,98 ± 0,07	н.д.	RI, MS, NMR, D
3603	Бензил-хексакозаноат	7,2 ± 0,5	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3660	Бензил-25-метилхексакозаноат	1,10 ± 0,06	н.д.	RI, MS, NMR, D
3674	Бензил-24-метилхексакозаноат	1,10 ± 0,06	н.д.	RI, MS, NMR, D
3706	Бензил-хептакозаноат	1,00 ± 0,05	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3762	Бензил-26-метилхептакозаноат	0,95 ± 0,04	тр.	RI, MS, NMR, D
3776	Бензил-25-метилхептакозаноат	тр.	н.д.	RI, MS, NMR, D

3810	Бензил-октакозаноат	$3,7 \pm 0,3$	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
3861	Бензил-27-метилоктакозаноат	$0,96 \pm 0,08$	н.д.	RI, MS, NMR, D
3875	Бензил-26-метилоктакозаноат	$0,95 \pm 0,04$	н.д.	RI, MS, NMR, D
3913	Бензил-нонакозаноат	$1,00 \pm 0,05$	тр.	RI, MS, CoI, NMR, D
3962	Бензил-28-метилнонакозаноат	$0,96 \pm 0,05$	н.д.	RI, MS, NMR, D
3976	Бензил-27-метилнонакозаноат	тр.	н.д.	RI, MS, NMR, D
4016	Бензил-триаконтаноат	$1,40 \pm 0,08$	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
4063	Бензил-29-метилтриаконтаноат	$0,94 \pm 0,04$	н.д.	RI, MS, NMR, D
4074	Бензил-28-метилтриаконтаноат	тр.	н.д.	RI, MS, NMR, D
4119	Бензил-хентриаконтаноат	тр.	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
4162	Бензил-30-метилхентриаконтаноат	тр.	н.д.	RI, MS, NMR, D
4222	Бензил-дотриаконтаноат	$0,97 \pm 0,06$	н.д.	RI, MS, CoI, NMR, D
	Укупно идентификовано бензил-естара	36,39 (28)	тр. (6)	
	Нормалног низа (<i>N</i>)	25,47 (12) ^b		
	Парни	20,27 (7)		
	Непарни	5,20 (5)		
	<i>Iso</i> -низа (<i>I</i>)	6,91 (9)		
	Парни	2,91 (5)		

Непарни	4,00 (4)
<i>Anteiso</i> -низа (A)	4,01 (7)
Парни	0,98 (3)
Непарни	3,03 (4)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₂₀–C₄₀);

^b садржај бензил-естара масних киселина изражен у микрограмима (µg) на 100 g биљног материјала;

^b метода идентификације: RI – поклапање ретенционих индекса; MS – поређење масених спектра; CoI – додатна потврда коинјекцијом одговарајућег стандардног узорка; NMR – NMR анализа; D – реакција дериватизације да би се добио одговарајући метил-естар;

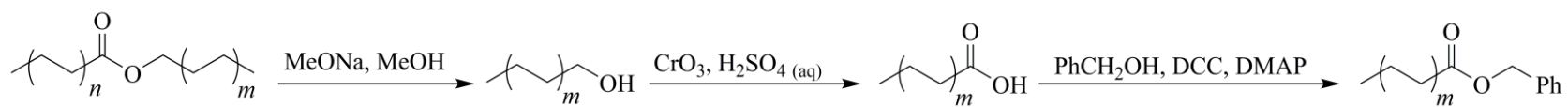
^г тр. – траг (<0,007 µg /100 g биљног материјала);

^д н.д. – није детектовано;

^h број у загради представља број детектованих бензил-естара масних киселина који припадају тој класи.

Састав испирака углавном је анализиран програмом 1: $(70(0')/5 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}/315$ (изотермално $30'$), проток $\text{He } 1,0 \text{ ml min}^{-1}$) у коме се линеарно програмирање завршава 49-ог минута. Међутим, већи број детектованих бензил-естара дуголанчаних масних киселина елуира са GC-колоне током изотермалног дела програма 1, где престаје линеарна веза између ретенционих времена (тј. индекса) и броја CH_2 група у молекулу (на пример хексакозаноати и естри већих маса), па се стандардни приступ за израчунавање ретенционих индекса у овом случају не може применити (Van Den Dool & Kratz, 1963). Дакле, није било могуће уочити ни корелацију ретенционих времена естара чак ни код *n*-изомера (Boswell et al., 2012; Sliepcevich & Gelosa, 2008). Зато, да бисмо са сигурношћу одредили ретенционе индексе свих бензил-естара масних киселина, узорци су снимљени под другачијим условима (програм 2: $200(0') 1 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}/315$ (изотермално $30'$), проток $\text{He } 1,5 \text{ ml min}^{-1}$), како би омогућили да сва једињења елуирају са колоне у линеарном делу програма.

Да бисмо потврдили идентификацију бензил-естара, одлучено је да се синтетишу стандарди тих естара. Доступност дуголанчаних *n*-киселина (дужих од бехенске киселине), ограничена је, како из природних извора, тако и из комерцијалних, а доступне комерцијалне киселине, углавном у паковањима од пар милиграма (нпр. лигноцеринска и хексакозанска киселина), веома су скупа. Из тог разлога, одлучено је да се искористи други извор дуголанчаних масних киселина. Познато је да су главни састојци (са. 40%) пчелињег воска естри палмитинске, олеинске и тетракозанске киселине и 1-алканола са 12 до 36 бројем угљеникових атома у ланцу (Jackson & Eller, 2006). Након метанолизе пчелињег воска натријум-метоксидом у метанолу, изолована је смеша *n*-алкохола ($\text{C}_6\text{--C}_{32}$), који су затим оксидовани до одговарајућих масних киселина (поглавље 4.4.3). Да би се одредио квалитативни састав добијене смеше масних киселина, део узорка (са. 10 mg) је дериватизован CH_2N_2 , а добијени метил-естри анализирани су GC-MS-ом и NMR спектроскопијом. У узорку није било присутних рачвастих масних киселина, чак ни у траговима (Pic-Tomic et al., 2015; Radulović et al., 2012). На крају, естерификација добијених масних киселина бензил-алкохолем (по Штеглиху, поглавље 4.4.1) дала је модел-смешу бензил-*n*-алканоата ($\text{C}_6\text{--C}_{32}$; слика 5.2.2.).



$n = \text{од } 6 \text{ до } 10$

$m = \text{од } 2 \text{ до } 15$

Слика 5.2.2. Синтеза модел-смеше бензил-*n*-алканоата (C₆–C₃₂)

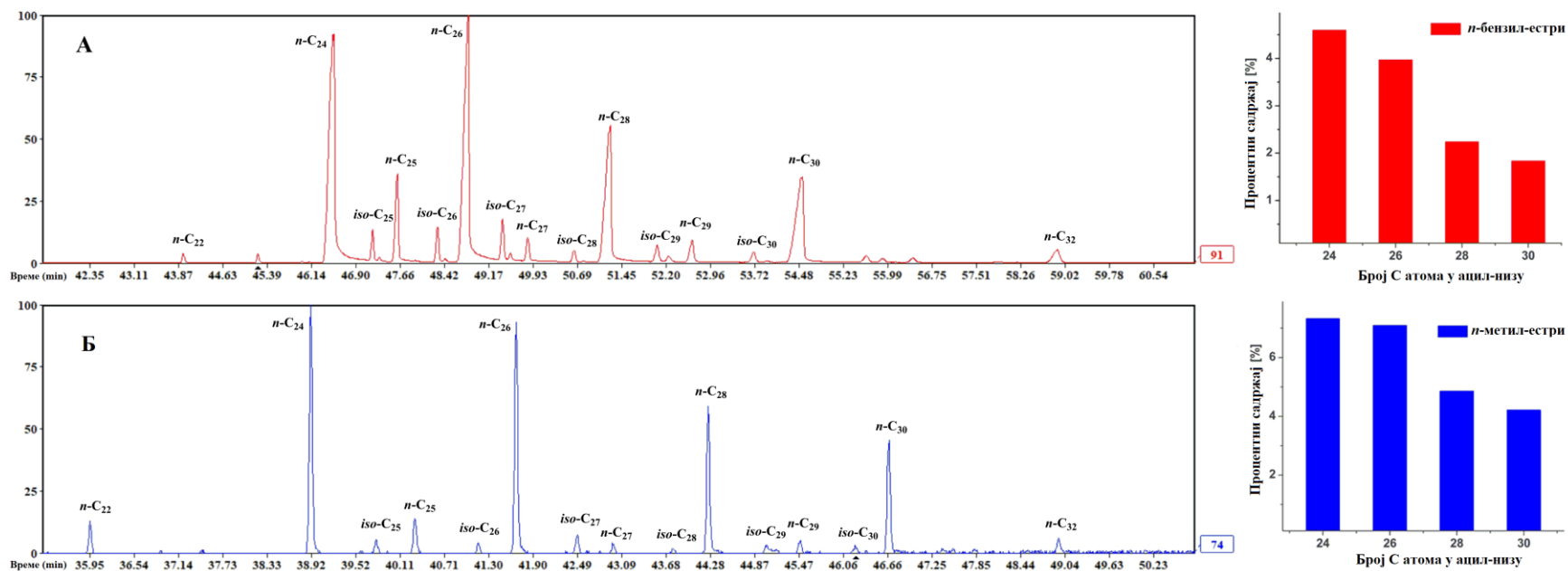
Састав модел-смеше бензил-естара масних киселина одређен је GC-MS-ом и дат у прилогу, а NMR анализом је потврђено да у смеси нема неиспарљивих састојака. Гасна хроматографија добијене модел-смеше и фракција испирака *P. veris* и *P. acaulis*, као и самих испирака, недвосмислено је потврдила присуство C₂₀–C₃₂ (осим C₂₁) *n*-хомологе серије бензил-естара дуголанчаних масних киселина. Свих 12 *n*-бензил-естара су по први пут су идентификовани у роду *Primula*, док бензил-естри хептакозанске, наокозанске и хентриакоктанске киселине представљају нове природне производе.

У GC-хроматограму ове фракције могле су се уочити још две групе засићених бензил-естара масних киселина са истом молекулском масом као и одговарајућих *n*-изомера, које елуирају брже са колоне, указујући на то да је реч о рачвастим изомерима (табела 5.2.1). Прва група рачвастих бензил-естара имала је ретенциони индекс за 36-60 јединица (ΔRI) нижих вредности у односу на изомере *n*-низа, док је код других изомера вредност ΔRI износила 23-47. Ове вредности су сличне са вредностима одређеним за *iso*-серију ($\Delta RI=37$, C₂₄–C₃₅, табела 5.1.2) и *anteiso*-серију алкана ($\Delta RI=27$, C₂₄–C₃₅, табела 5.1.2). Раније је показано да се ΔRI вредности рачвастих изомера метил-естара дуголанчаних киселина крећу у сличном опсегу (вредност ΔRI за *iso*-изомере (C₉–C₂₀) износила је 36, а за *anteiso*-изомере 28, (C₁₁–C₁₉); Пис-Томич et al., 2015). Као што је већ претходно речено (поглавље 5.1), алкани и масне киселине у биљкама настају истим биосинтетским путем, по коме се парне киселине скраћују за један угљеник до одговарајућег непарног алкана и обрнуто (Radulović et al., 2012). Због свега наведеног, чини се логичним да *P. veris* и *P. acaulis* производе дуголанчане *iso*- и *anteiso*-бензил-естре заједно са *iso*- и *anteiso*-алканима.

Рачвасти метил-естри масних киселина (са метил-групом у ($\omega-1$)- или ($\omega-2$)-положају) међусобно се разликују на основу карактеристичне масене фрагментације, јер се кидање везе приликом фрагментације обично дешава у суседству терцијарног угљениковог атома, при чему настају карактеристични интензивни фрагменти у зависности од серије изомера: $[M - 43]^+$ за *iso*-, и $[M - 29]^+$ и $[M - 57]^+$ за *anteiso*-метил-естре масних киселина (Ran-Ressler et al., 2021; Пис-Томич et al., 2015). Због тога је одлучено да се бензил-естри масних киселина преведу у одговарајуће метил-естре. Део фракције богате бензил-естрима је трансестерификован раствором MeONa у MeOH. Детаљна GC-MS анализа (PIC хроматограм, тј. они који одређују структурне *m/z*

вредности за карактеристичне фрагментне јоне, слика 5.2.3) омогућила је да се израчунају вредности ΔRI , 37 и 27, за две серије раччастих дуголанчаних метил-естара масних киселина, добијених из одговарајућих бензил-естара. Подударање ових вредности са литературним вредностима ΔRI за дуголанчане *iso*- и *anteiso*-метил естре масних киселина, у комбинацији са присутним карактеристичним фрагментним јонима у масеним спектрима, омогућило је да се утврди положај метил-рачвце, тј. њихове ($\omega-1$)- и ($\omega-2$)-положаје. Тиме је извршена идентификација дуголанчаних *iso*- и *anteiso*-бензил-естара масних киселина у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*.

Потребно је нагласити да не постоји значајна разлика у ΔRI вредностима за *iso*- и *anteiso*-изомере метил-естара масних киселина у поређењу са ΔRI вредностима за *iso*- и *anteiso*-алкане. Међутим, то није случај код *iso*- и *anteiso*-бензил-естара масних киселина, чије вредности ΔRI значајно одступају од ових вредности. Из овога се може се закључити да ће различите функционалне групе другачије утицати на ΔRI раччастих изомера. Такође, не треба занемарити ни утицај π - π интеракције фенил-групе ових естара са стационарном фазом GC-колоне (5% фенилметилполисилоксан). Напошетку, детаљна NMR анализа фракције богате бензил-естрима масних киселина потврдила је присуство раччастих изомера. У gHSQC спектру су се јасно могле препознати четири различите метил-групе, које се налазе на крајевима низа. Хемијска померања водоника и угљеника ових метил-група су била скоро па идентична као и подаци добијени анализом алканске фракције еквивалентних метил-група *n*-, *iso*- и *anteiso*-серије као и са претходно објављеним (слика 5.1.3, табела 5.1.1, Пис-Томич et al., 2015). Сви идентификовани рачvasti дуголанчани бензил-естри масних киселина представљају нове природне производе.



Слика 5.2.3. Поређење парцијалних јонских хроматограма фракције бензил-естара масних киселина, (А, m/z 91) и смеше метил-естара масних киселина добијених трансестерификацијом фракције бензил-естара (В, m/z 74); приликом снимања је коришћен програм 1: 70(0')/5 °C min⁻¹/315 (изотермално 30'), проток He 1,0 ml min⁻¹

Квантификација бензил-естара је извршена интегралњем површина испод пикова у GC-хроматограму. Као стандард за конструисање калибрационе праве, коришћен је синтетисани бензил-бехенат. Садржај бензил-естара одређен је на 100 g свежих листова и цветова и кретао се у опсегу 0,94 – 7,20 μg (табела 5.2.1), а укупна количина бензил-естара по cm^2 површине листова била је 25,1 ng. Иако су *n*-бензил-естри (укупна количина 25,47 μg на 100 g) заступљенији у односу на рачвасте, не сме се занемарити количина рачвастих изомера које биосинтетише *P. veris* (6,91 μg на 100 g *iso*-бензил-естара и 4,01 μg на 100 g *anteiso*-бензил-естара). Као што се у табели 5.2.1 може видети, ова врста квантификације није била могућа за бензил-естре *P. acaulis*, јер је њихов садржај био испод границе квантификације. На основу биосинтетског пута по коме настају *n*-, *iso*- и *anteiso*-масне киселине, било би очекивано да код *n*- и *iso*-бензил-естара доминирају хомолози са парним бројем угљеникових атома, а код *anteiso*-бензил-естара хомолози са непарним бројем угљеникових атома. Као и код *iso*-алкана, *iso*-бензил-естри одступају од овог биосинтетског правила јер доминирају непарни хомолози (CPI=1,37).

По први пут су идентификовани дуголанчани бензил-естри масних киселина у роду *Primula*, а може се рећи да су ретки у узорцима природног порекла. Епикутикуларни воскови *Eucalyptus* врста (*E. globulus* и *E. nitens*) садрже хомологу серију девет бензил-алканоата са дужином ланца од C₂₀ до C₃₀, изузев C₂₇ и C₂₉ (Gosney et al., 2016; Steinbauer et al., 2009; Rapley et al., 2004; Steinbauer et al., 2004; Jones et al., 2002). Интересантно је поменути да се код одређених генотипа *E. globulus* повећава количина парних бензил-алканоата (C₂₀–C₂₆) у восковима приликом напада мољаца (*Mnesampela privata* Guenée) на биљку (Rapley et al., 2004; Jones et al., 2002). Дуголанчани бензил-естри масних киселина парног броја угљеникових атома су идентификовани у восковима малог броја биљних врста: *Jojoba* (листови, C₂₄–C₃₀; Gülz & Marner, 1986), пшеница (C₂₈–C₃₂; Racovita et al., 2016), *Heracleum sphondylium* (C₂₄; Radulović & Zlatković, 2014), као и у плодовима маслине (C₂₄–C₂₈; Vlahov et al., 2008). Међутим сви ови бензил-естри идентификовани су у смеси са другим састојцима. Једино су из воска листа јојобе изоловани чисти бензил-естри, а идентитет неких од њих је потврђен коинјекцијом са стандардима (C₂₆ и C₂₈; Gülz & Marner, 1986). Идентификација бензил-естара у другим радовима вршена је поређењем масених спектра са доступним базама, нпр. NIST, или поређењем ретенционих индекса (времена), при чему врло често ретенциони и спектрални подаци нису уопште наведени у

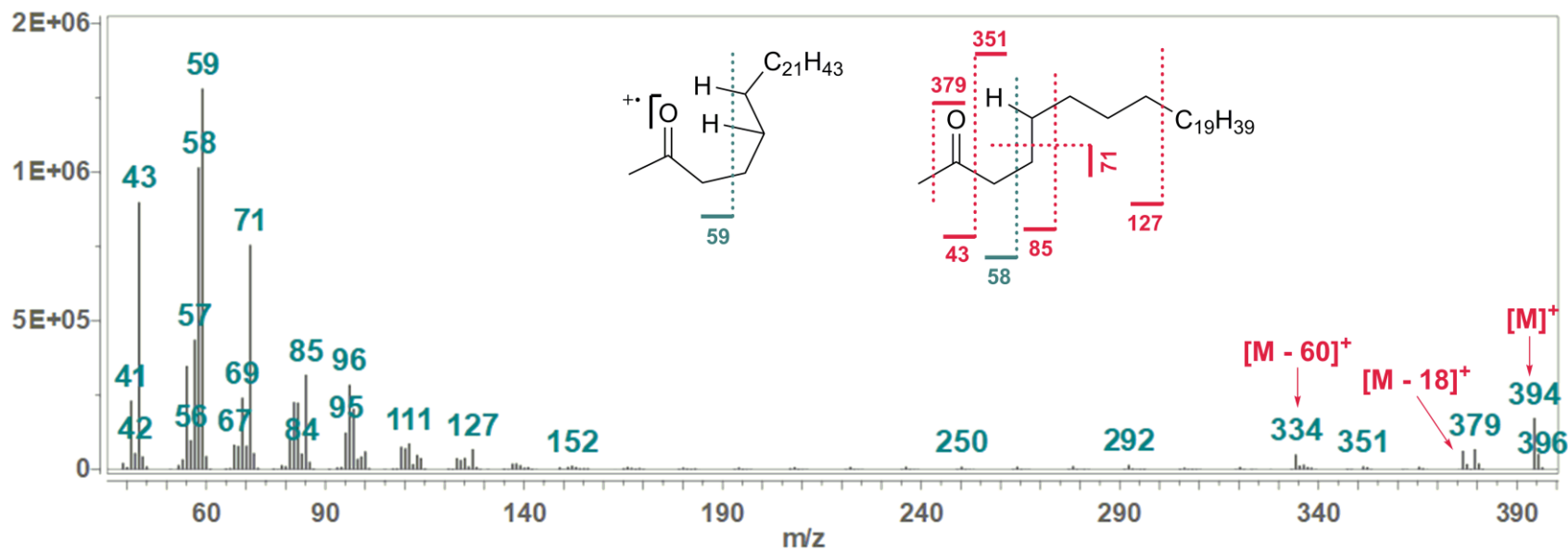
тим радовима. У узорцима испитиваних *Primula* врста идентификовано је 19 нових дуголанчаних бензил-естара масних киселина, са дужином ацил-ланца од C₂₄ до C₃₂, подељених у три серије, *n*-, *iso*- и *anteiso*-низ (табела 5.2.1). Подаци из масених спектра свих идентификованох бензил-естара, као и сами масени спектри најзаступљенијих бензил-естара, дати су у прилогу.

5.2.2. Дуголанчани 2-алканони испирака воскова *P. veris* и *P. acaulis* (фракција 3)

Хроматографске фракције (број 3, шеме 4.3.1 и 4.3.2) испирака *P. veris* и *P. acaulis* садржавале су дуголанчане 2-алканоне (C₂₄–C₃₀; слика 5.2.4 и табела 5.2.2), чији су масени спектри у слози са литературним масеним спектрима засићених метил-кетона. У овим масеним спектрима могао се јасно уочити молекулски јон, као и јони који имају за 15, 18 и 60 *amu* мању масу од молекулског, а поред тога и интензивни јони на *m/z* 58 (Меклафертијево (*McLafferty*) премештање) и *m/z* 43 ([R₁C≡O]⁺) и основни јон на *m/z* 59 (протоновани ацетон; слика 5.2.4; Szafranek & Synak, 2006). Као и код алкана и бензил-естара, са колоне су елуирале групе са истим масеним спектрима. На пример, изомери 2-хептакозанона (са истим [M]⁺ на *m/z* 394) имали су следеће вредности ретенционих индекса на DB-5MS колони: 2883, 2894 и 2923. Како увођење рачве у молекул смањује његову тачку кључања, а самим тим и вредност RI, логично је претпоставити да је изомер са највећим RI, изомер *n*-низа, тј. 2-хептакозанон. Нажалост, недостатак литературних података за ретенционе индексе отежавао је идентификацију 2-алканона. У литератури постоји RI податак за 2-хептакозанон (RI=2840 на SPB-5 колони, која је еквивалентна овде коришћеној GC-колони, Mahmood et al., 2009), али ова вредност је значајно другачија него вредности ретенционих индекса било ког од три детектована изомера 2-хептакозанона. Међутим, ретенциони индекс за 2-нонакозанон, RI(DB-5MS)=3122, једног од детектованих 2-алканона, био је у слози са литературним вредностима RI (3131 (DB-5), Yildizhan et al., 2009; 3116 (DB-5MS), Radulović et al., 2014б; и 3121 (DB-5MS), Radulović & Zlatković, 2014). Такође, ΔRI вредности (38 и 28) два изомерна метил-кетона, који, у

групи од три, елуирају брже са колоне, сличних су вредности као и ΔRI *iso*- и *anteiso*-алкана идентификованих у хексанској фракцији.

У литератури се могу наћи 2-алканони *n*-низа у восковима неколико биљних врста: *Heracleum sphondylium* (C₂₇ и C₂₉; Radulović & Zlatković, 2014), *Festuca arundinacea* (C₂₉; Wang et al., 2008), *Solanum tuberosum* (C₂₅–C₃₃; Szafranek & Synak, 2006), *Eucalyptus globulus* (C₂₇; Rapley et al., 2004) и *Avicennia marina* (C₂₆–C₃₅; Mohan et al., 1998). Дуголанчани 2-алканони су пронађени у земљишту, тресету и седиментима (Szafranek & Synak, 2006), а идентификовани су и као састојци површинских липида или секрета жлезда змија (C₂₇, C₂₉–C₃₃, C₃₅; Mason et al., 1990), гуштера (C₂₇, C₂₉, C₃₁, C₃₃–C₃₅; Louw et al., 2007), паукова (C₂₉ и C₃₁; Prouvost et al., 1999), лептира (C₂₉; Yildizhan et al., 2009) и бумбара (C₂₅, C₂₇, и C₂₉; Rottler et al., 2013; Hefetz et al., 1996). Ипак, до сада у литератури нема података о идентификованим рачвастим дуголанчаним 2-алканонима.



Слика 5.2.4. Масени спектар 2-хептакозанона, са приказаном фрагментацијом

Табела 5.2.2. Дуголанчани 2-алканони испирака воскова листова и цветова *P. veris* и *P. acaulis*

RI ^a	Једињење	Класа	<i>P. veris</i> ^b	<i>P. acaulis</i> ^b	Метода идентификације ^B
2476	21-Метил-2-докозанон	<i>I</i>	н.д. ^Г	тр. ^Д	RI, MS, NMR
2514	2-Трикозанон	<i>N</i>	0,130 ± 0,009	0,50 ± 0,03	RI, MS, NMR
2578	22-Метил-2-трикозанон	<i>I</i>	0,23 ± 0,02	0,70 ± 0,04	RI, MS, NMR
2588	21-Метил-2-трикозанон	<i>A</i>	0,087 ± 0,005	0,32 ± 0,02	RI, MS, NMR
2615	2-Тетракозанон	<i>N</i>	0,089 ± 0,006	0,30 ± 0,02	RI, MS, NMR
2680	23-Метил-2-тетракозанон	<i>I</i>	0,17 ± 0,01	0,60 ± 0,04	RI, MS, NMR
2690	22-Метил-2-тетракозанон	<i>A</i>	тр.	0,21 ± 0,01	RI, MS, NMR
2717	2-Пентакозанон	<i>N</i>	0,56 ± 0,04	1,9 ± 0,1	RI, MS, NMR
2781	24-Метил-2-пентакозанон	<i>I</i>	0,80 ± 0,06	1,9 ± 0,1	RI, MS, NMR
2792	23-Метил-2-пентакозанон	<i>A</i>	0,43 ± 0,03	1,40 ± 0,08	RI, MS, NMR
2820	2-Хексакозанон	<i>N</i>	0,130 ± 0,006	0,22 ± 0,01	RI, MS, NMR
2883	25-Метил-2-хексакозанон	<i>I</i>	0,130 ± 0,006	0,29 ± 0,02	RI, MS, NMR
2894	24-Метил-2-хексакозанон	<i>A</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
2923	2-Хептакозанон	<i>N</i>	0,55 ± 0,03	0,90 ± 0,05	RI, MS, NMR
2985	26-Метил-2-хептакозанон	<i>I</i>	0,28 ± 0,02	0,41 ± 0,03	RI, MS, NMR
2996	25-Метил-2-хептакозанон	<i>A</i>	0,20 ± 0,01	0,34 ± 0,02	RI, MS, NMR

3023	2-Октакозанон	<i>N</i>	0,046 ± 0,003	тр.	RI, MS, NMR
3086	27-Метил-2-октакозанон	<i>I</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
3125	2-Нонакозанон	<i>N</i>	0,057 ± 0,003	0,23 ± 0,02	RI, MS, NMR
3189	28-Метил-2-нонакозанон	<i>I</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
3199	27-Метил-2-нонакозанон	<i>A</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
3227	2-Триакоктанон	<i>N</i>	0,048 ± 0,003	тр.	RI, MS, NMR
3329	2-Хентриакоктанон	<i>N</i>	0,088 ± 0,006	0,44 ± 0,03	RI, MS, NMR
3391	30-Метил-2-хентриакоктанон	<i>I</i>	тр.	тр.	RI, MS, NMR
3429	2-Дотриакоктанон	<i>N</i>	0,052 ± 0,003	тр.	RI, MS, NMR
3493	31-Метил-2-дотриакоктанон	<i>I</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3531	2-Тритриакоктанон	<i>N</i>	0,130 ± 0,008	0,45 ± 0,03	RI, MS, NMR
3632	2-Тетратриакоктанон	<i>N</i>	тр.	н.д.	RI, MS, NMR
3733	2-Пентатриакоктанон	<i>N</i>	н.д.	тр.	RI, MS, NMR
Укупно идентификовано 2-алканона			4,207 (27)	11,110 (27)	
Нормалног низа (<i>N</i>)			1,880 (12) ^h	4,940 (12)	
Парни			0,365 (6)	0,520 (5)	
Непарни			1,515 (6)	4,420 (7)	
<i>Iso</i> -низа (<i>I</i>)			1,610 (9)	3,90 (9)	

Парни	1,310 (5)	3,01 (5)
Непарни	0,30 (4)	0,89 (4)
<i>Anteiso</i> -низа (А)	0,717 (6)	2,27 (6)
Парни	0,717 (4)	2,06 (4)
Непарни	tr (2)	0,21 (2)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₂₀–C₄₀);

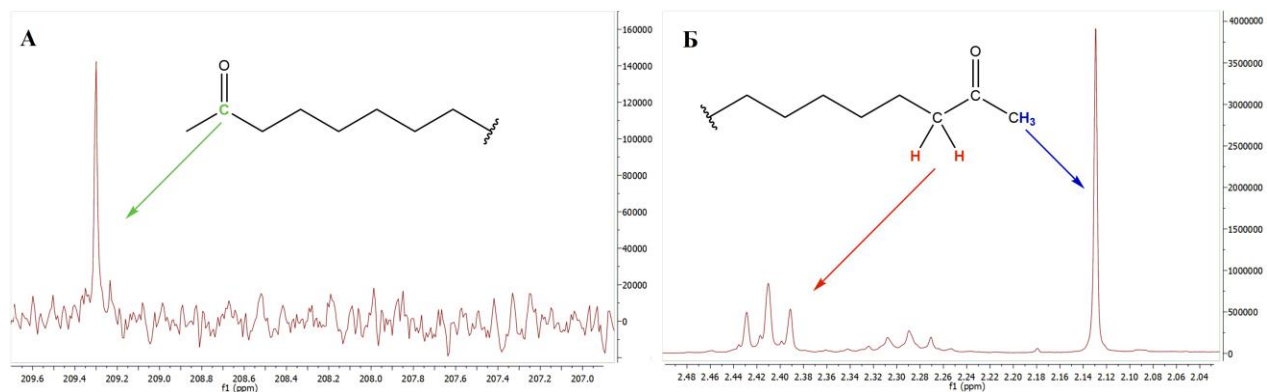
^b садржај 2-алканона изражен у микрограмима (μg) на 100 g биљног материјала;

^b метода идентификације: RI – поклапање ретенционих индекса; MS – поређење масених спектра; CoI – додатна потврда коинјекцијом одговарајућег стандардног узорка; NMR – NMR анализа;

^г н.д. – није детектовано;

^д тр. – траг (<0,007 μg /100 g биљног материјала);

^h број у загради представља број детектованих 2-алканона који припадају тој класи.



Слика 5.2.5. Увећања ^{13}C NMR (А) и ^1H NMR (Б) спектра (са означеним сигналама) 2-алканона фракције *P. veris*

NMR анализа фракција потврдила је идентификацију 2-алканона као и тип и позицију рачве у молекулима: сигнал карбонилне групе кетона био је на δ_{C} 209,3; синглет на δ_{H} 2,13 и триплет на δ_{H} 2,41 ($J=7,5$ Hz, у CDCl_3) означени су као метил- и метиленски протони у α -положају у односу на кетон (слика 5.2.5). Детаљна NMR анализа фракција богатих 2-алканонима, потврдила је и присуство рачвастих изомера. У gHSQC спектру су се јасно могле препознати четири различите метил-групе. Хемијска померања водоника и угљеника ових метил-група су била скоро идентична као и подаци добијени анализом алканске фракције еквивалентних метил-група *n*-, *iso*- и *anteiso*-серије, као и са претходно објављеним (слика 5.1.3, табела 5.1.1; Пис-Томич et al., 2015). Асигнација сигнала 2-алканона потврђена је поређењем ^1H и ^{13}C NMR спектра са литературним подацима (табела 5.2.3). Хемијска померања у ^{13}C NMR спектру за ω - и $(\omega - 2)$ -метил-групе (11,4 и 19,3 ppm) била су готово идентична са хемијским померањима ових метил-група 11-метил-2-тридеканона (Dickschat et al., 2005), чиме је доказано присуство *anteiso*-2-алканона у фракцијама.

Табела 5.2.3. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100.6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) смеше дуголанчаних 2-алканона и поређење њихових података са литературним подацима

$\delta\text{с}$	$\delta\text{н}$	Ознака	Литературни подаци	
			$\delta\text{с}$	$\delta\text{н}$
29,87	2,134 (s)	$\alpha\text{-CH}_3$	29,9 ^a	2,12 (s) ^a
209,26	/	C=O	209,5 ^a	/
43,85	2,415 (t, $J=7,5$ Hz)	$\alpha\text{-CH}_2$	43,8 ^a	2,40 (t, $J=7,4$ Hz) ^a
23,88	1,55 – 1,63 (m)	$\beta\text{-CH}_2$	23,9 ^a	1,54 – 1,59 (m) ^a
14,14	0,880 (t, $J=7,0$ Hz)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$	14,0 ^a	0,86 (q, $J=6,5$ Hz) ^a
22,71	1,22 – 1,29 ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$	22,7 ^a	~ 1,24 ^a
31,94	1,22 – 1,29 ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$	31,9 ^a	~ 1,24 ^a
22,68	0,862 (d, $^3J(\text{H,H})=6,6$ Hz)	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-}$	22,6 ^b	0,86 (d, $^3J(\text{H,H})=6,6$ Hz) ^b
27,98	1,535 (non, $^3J(\text{H,H})=6,6$ Hz)	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-}$	27,8 ^b	1.51 (non, $^3J(\text{H,H})=6,6$ Hz) ^b
11,43	0,852 ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH-}$	11,4 ^г	0,85 (t, $^3J(\text{H,H})=7,2$ Hz) ^г
19,27	0,847 ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH-}$	19,2 ^г	0,83 (d, $^3J(\text{H,H})=6,4$ Hz) ^г

^a NMR подаци за 2-хексадеканон (Wang et al., 2009);

^b преклопљени сигнали;

^b NMR подаци за 11-метил-2-додеканон (Dickschat et al., 2005);

^г NMR подаци за 11-метил-2-тридеканон (Dickschat et al., 2005).

Као стандард за квантификацију метил-кетона у восковима коришћен је синтетисани 2-пентакозанон (поглавља 4.3.4 и 4.4.4). *Primula acaulis* биосинтетише дуголанчане метил-кетоне (11,1 mg на 100 g свежег биљног материјала, табела 5.2.2, односно 6,1 μg на cm^2 површине листова и цветова) у знатно већој количини него *P. veris* (4,2 mg на 100 g свежег биљног материјала, табела 5.2.2, односно 2,9 μg на cm^2 површине листова и цветова). Треба поменути да обе биљне врсте биосинтетишу рачвасте 2-алканоне у већој количини у односу на изомере нормалног низа, тј. више од 50% 2-алканона су *iso*- и *anteiso*-изомери (1,6 μg на cm^2 површине листова и цветова, за *P. veris* и 3,3 μg на cm^2 површине листова и цветова, за *P. acaulis*). Расподела релативних количина 2-алканона међу изомерима била је следећа: *n*- : *iso*- : *anteiso*-2-алканони 45 : 38 : 17, за *P. veris* и 44 : 34 : 20 за *P. acaulis*. Најзаступљенији дуголанчани 2-алканони и једне и друге врсте били су 24-метил-2-пентакозанон (0,80 mg на 100 g *P. veris* и 1,9 mg на 100 g *P. acaulis*) и 2-пентакозанон (0,56

mg на 100 g *P. veris* и 1,9 mg на 100 g *P. acaulis*). Дистрибуција према броју угљеникових атома *n*- и *anteiso*-2-алканона је карактеристична за више биљке: *n*-низ ACL=26,82 и CPI=4,15 за *P. veris* и ACL=26,60 и CPI=8,50 за *P. acaulis*; *anteiso*-низ ACL=26,32 и CPI=23,90 за *P. veris* и ACL=25,93 и CPI=9,80 за *P. acaulis*. Као што је већ поменуто, биосинтетски пут води ка непарним *iso*-хомолозима, међутим, код *iso*-2-алканона доминирају изомери са парним бројем угљеникових атома (ACL=26,03 и CPI=4,37, за *P. veris* и ACL=25,77 и CPI=3,38 за *P. acaulis*).

Дуголанчани *iso*- (C₂₃–C₃₀, C₃₂, C₃₃) и *anteiso*-2-алканони (C₂₄–C₂₈, C₃₀) су сада по први пут идентификовани у узорцима природног порекла. Метил-кетони са мањим бројем угљеникових атома *iso*-(C₁₃–C₁₆) и *anteiso*-низа (C₁₄–C₁₆), заједно са изомерима *n*-низа (C₁₂–C₁₆), ослобађају различити сојеви групе *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (Dickschat et al., 2005). Такође, *iso*-2-алканон краћег низа идентификован је у етарском уљу *Ruta graveolens* L. (C₁₁; Yaacob et al., 1989). Метил-кетони нормалног низа (C₉–C₁₃) су једни од главних састојака етарског уља *Ruta chalepensis* L., а неки од њих (C₉ и C₁₁) су и добри репеленти (Demirci et al., 2013).

5.2.3. Веза између структуре молекула и ретенционог индекса

Присуство хомологих серија *n*-, *iso*- и *anteiso*-бензил-естара масних киселина и метил-кетона у испирцима *P. veris* и *P. acaulis* омогућило је да се проучи веза између структуре молекула и ретенционог индекса за ове две класе једињења. Због недостатка ретенционих података за бензил-естре и метил-кетоне у литератури, подаци добијени из масених спектра нису довољни за њихову потпуну идентификацију. Под овим се подразумева да је могуће закључити на основу масених спектра да су у питању 2-алканони или бензил-естри, али није могуће знати дужину низа или потенцијално присуство рачви. Из тог разлога, успостављањем корелације између структуре молекула и ретенционог индекса, омогућава се идентификација (Peng, 2010; 2000). Корелација између експериментално одређених ретенционих индекса за *n*-, *iso*- и *anteiso*-бензил-естре и метил-кетоне и броја угљеникових атома у алифатичном делу молекула (без атома који припадају функционалној групи), може се изразити као линеарна регресиона једначина општег типа:

$$RI = M \times n(C) + (FG + \sum Me_i)$$

где је M линеарни регресиони коефицијент који је дефинисан као метиленска вредност јер представља инкремент вредности ретенционог индекса за сваку додату $-CH_2-$ групу хомологе серије, n представља број угљеникових атома у алкил-низ у масне киселине бензил-естра, умањен за атом карбоксилне групе, или број угљеникових атома 2-алканона, умањен за број угљеникових атома ацил-групе, FG је инкремент тј. константа карактеристична за функционалну групу, а Me је инкремент метил-групе, чија вредност зависи од положаја метил-групе у ланцу (Schulz, 2001).

Линеарном регресионом анализом вредности RI у функцији $n(C)$ за n -серију идентификованих бензил-естара у испирцима (слика 5.2.6), одређена је вредност M за n -серију и FG за све региоизомерне бензил-естре масних киселина; због непостојања рачви у молекулима n -серије, вредност Me износи нула. Вредност FG је јединствена за сваку серију једињења и зависи од хемијске структуре једињења, интрамолекулских и стерних интеракција, као и од поларности колоне (Peng, 2010, 2000). За n -серију, метиленска вредност била је око 103 јединице ($R^2=0,99999$):

$$RI_n = 103,23 \times n(C) + 1023.$$

Важно је поменути да је вредност одсечка на x -оси, која представља допринос функционалне групе вредности RI , упоредива са вредношћу ретенционог индекса бензил-формијата, $RI=1071$ (Adams, 2017). Аналогне једначине за *iso*- и *anteiso*-серију биле су:

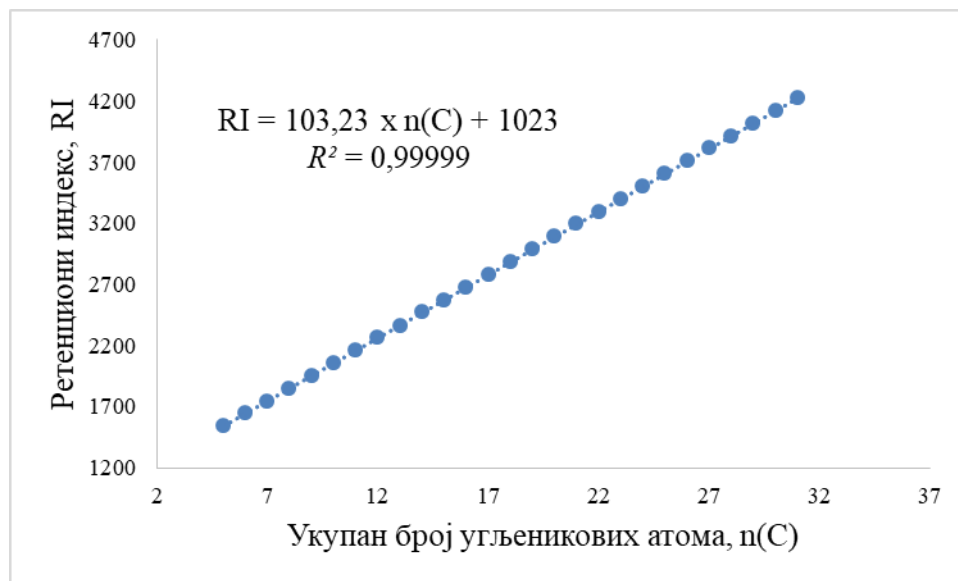
$$RI_{iso} = 100,17 \times n(C) + 1057,2 \quad (R^2=0,99999, \text{ слика 5.2.7})$$

$$RI_{anteiso} = 100,29 \times n(C) + 1067,1 \quad (R^2=0,99998, \text{ слика 5.2.8}).$$

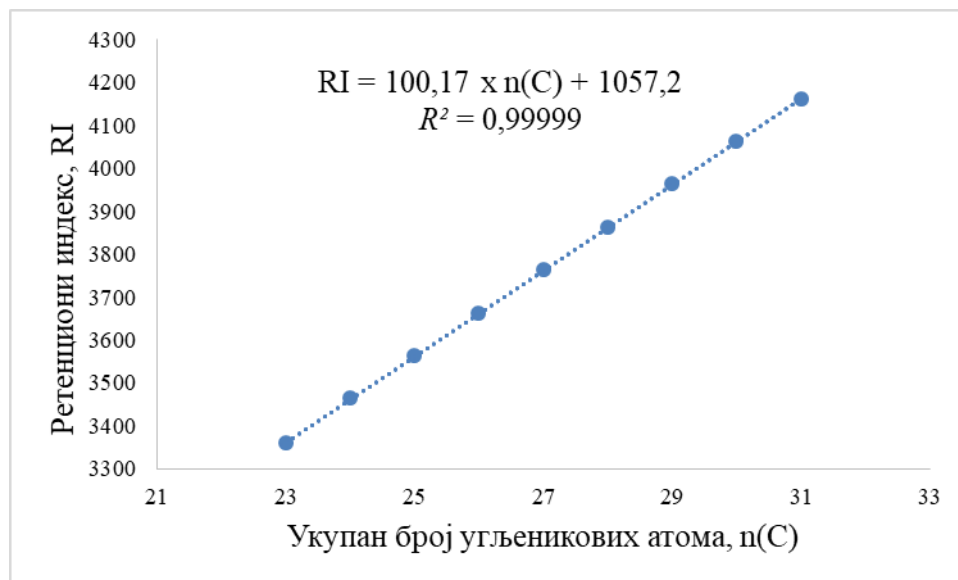
Вредност M је износила око 100 јединица за *iso*- и *anteiso*-серију. На основу ових једначина може се закључити да стерни ефекти (рачвање у низу) имају значајан утицај и на метиленску вредност као, и на инкремент функционалне групе.

Познато је да како дужина ланца алкохолног дела естра расте, од метил- до n -хексил-, метиленска вредност ове хомологе серије C_1 - C_6 естара опада од 99,25 до 85,97 (одређено на SE-30 колони; Peng et al., 1988). Слично томе, вредност M одређена раније за серију метил-естара (C_6 - C_{32} ; поглавље 5.2.1) на DB-5MS колони износила је $100,5 \pm 0,5$. Ипак, присуство бензил-групе у овде идентификованим естрима доводи до повећања вредности M . Сличан ефекат је примећен и раније код серије алкил-бензена чије су вредности M износиле 102,48 на DB-1 и 103,78 на DB-35 колони (Peng, 2000). Познато је

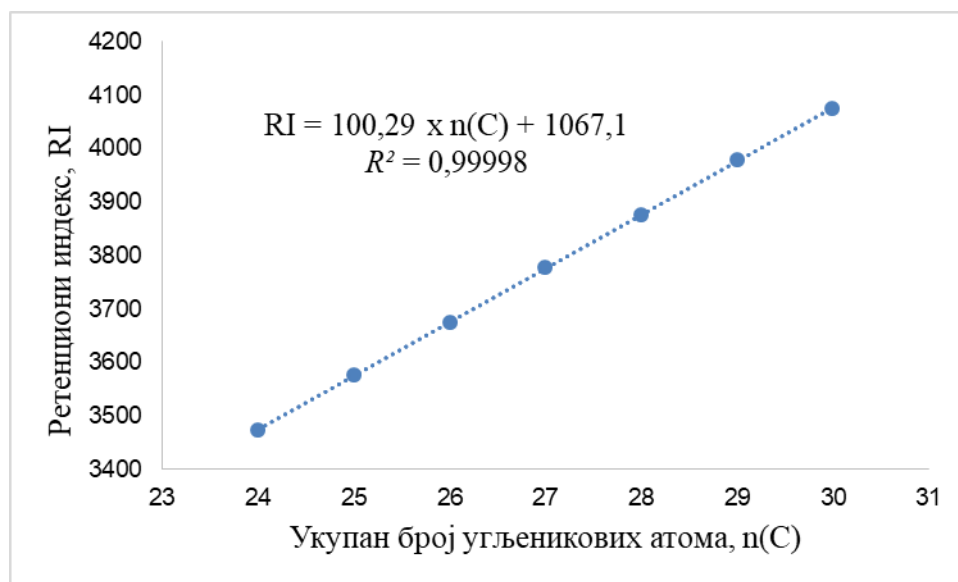
да се ароматична једињења дуже задржавају на GC-колонама у односу на алифатична једињења, а то задржавање је израженије уколико се повећа удео фенил-група у стационарној фази колоне (Slipsevich & Gelosa, 2008). Зато не треба занемарити утицај стационарне фазе на вредност M бензил-естара (и алкил-бензена) јер долази до π - π интеракција између фенил-групе стационарне фазе (на пример у случају DB-5MS и DB-35) и ароматичних језгра ових једињења.



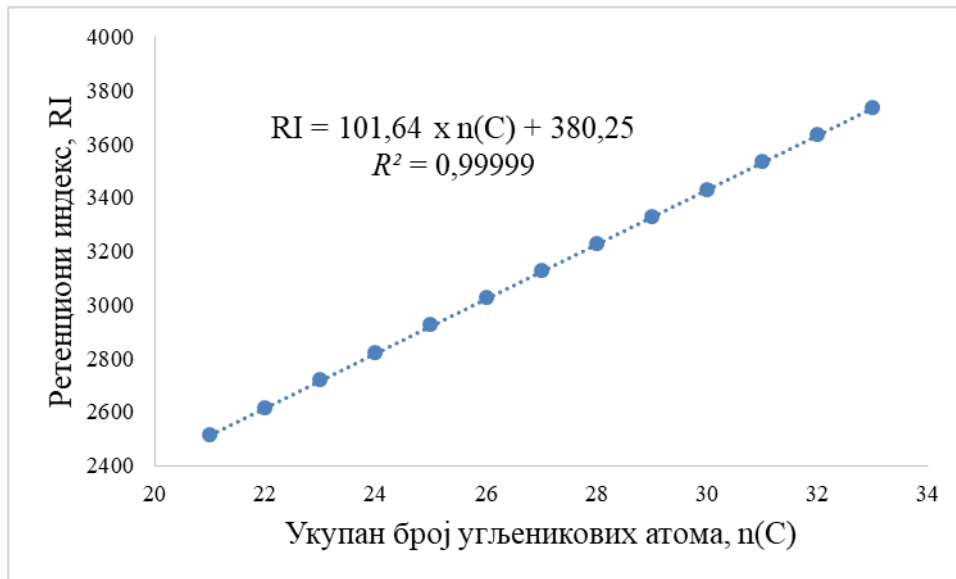
Слика 5.2.6. Корелација RI и $n(C)$ n -бензил-естара масаних киселина на DB-5MS колони



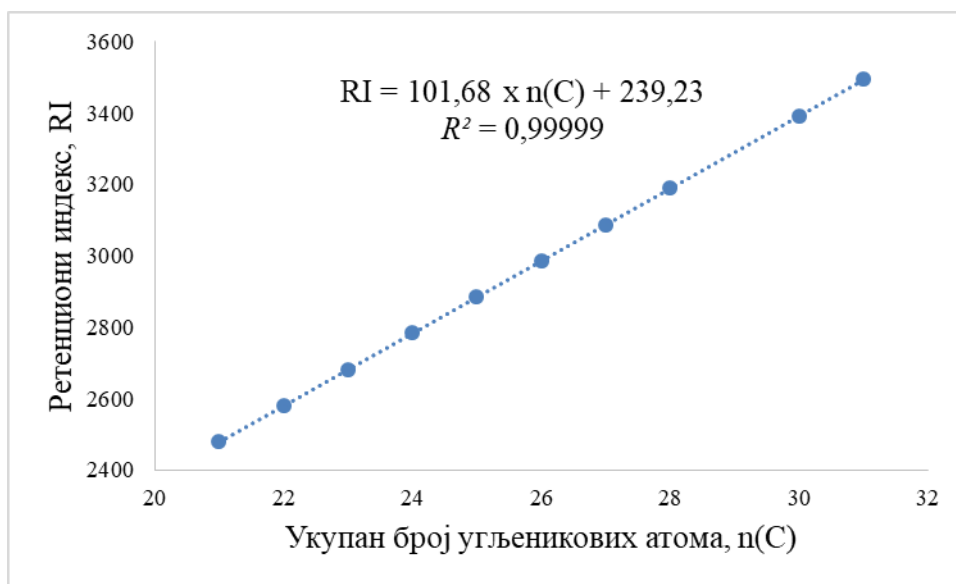
Слика 5.2.7. Корелација RI и n(C) *iso*-бензил-естара масних киселина на DB-5MS колони



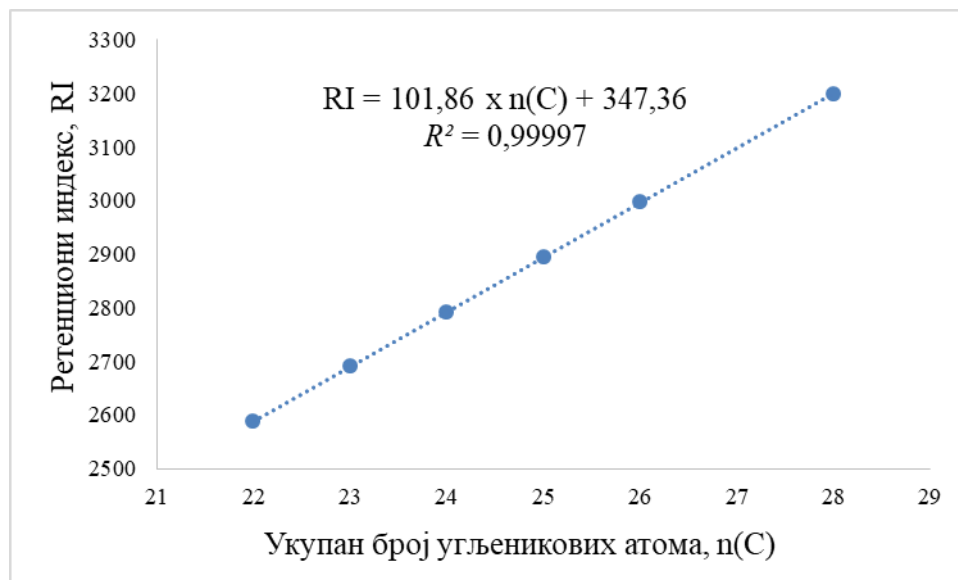
Слика 5.2.8. Корелација RI и n(C) *anteiso*-бензил-естара масних киселина на DB-5MS колони



Слика 5.2.9. Корелација RI и n(C) *n*-2-алканона на DB-5MS колони



Слика 5.2.10. Корелација RI и n(C) *iso*-2-алканона на DB-5MS колони



Слика 5.2.11. Корелација RI и n(C) *anteiso*-2-алканона на DB-5MS колони

На аналоган начин, линеарна регресиона анализа ретенционих индекса *n*-, *iso*- и *anteiso*-2-алканона дала је следеће једначине (слике 5.2.9, 5.2.10 и 5.2.11):

$$RI_n = 101,64 \times n(C) + 380,25 \quad (R^2 = 0,99999)$$

$$RI_{iso} = 101,68 \times n(C) + 239,23 \quad (R^2 = 0,99999)$$

$$RI_{anteiso} = 101,86 \times n(C) + 347,36 \quad (R^2 = 0,99997)$$

где n(C) представља број угљеникових атома умањен за два угљеникова атома ацетил-групе. Све три хомологе серије имале су сличну вредност M, око 102 јединице.

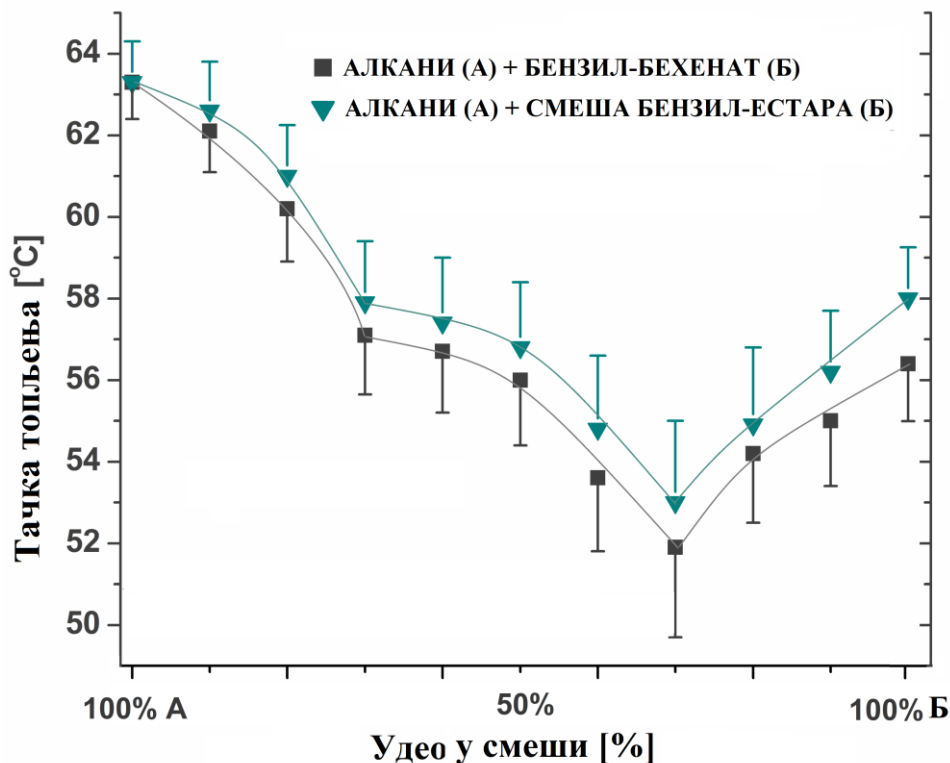
5.2.4. Термалне особине састојака воскова: алкани и бензил-естри масних киселина

Хидрофобни слој (кутикула), који прекрива биљне органе, има функцију да заштити биљку од неконтролисаног губитка воде, а такође његова је функција и смањење утицаја спољашњих фактора (Hamilton, 2004). Ипак, транспорт воде и хранљивих материја кроз кутикулу до ћелија у биљци, условљен је хемијским саставом воска, као и физичким особинама липида који се налазе у кутикули, на пример тачком топљења. Сви ови фактори утичу на пермеабилност кутикуле (Hamilton, 2004; Merk et al., 1998; Schönherr et al., 1979).

Како расте температура средине у којој се биљка налази, липиди се топе и повећава се њихова пермеабилност, а самим тим и губитак воде. Температура при којој биљка почиње да губи воду назива се критична температура (T_c) и у блиској је вези са температуром топљења кутикуларних липида (T_m). Вредности T_m су углавном мало више од вредности T_c (Gibbs & Rajpurohit, 2010; Rourke & Gibbs, 1999).

Воскови кутикуле су комплексног састава и често садрже и преко 100 различитих једињења. Карактеристике воскова су одређене интеракцијом његових састојака (Gibbs, 2002; Merk et al., 1998). Као што се у литератури може наћи, алкани су присутни у кутикуларним восковима свих виших биљака, док је присуство дуголанчаних бензил-естара масних киселина ограничено на неколико врста. Због тога су испитиване термалне особине следећих смеша (у различитим односима): 1 – смеша бензил-бехената и алкана који су добијени хроматографијом испирка *P. veris*, и 2 – смеша бензил-естара синтетисаних из пчелињег воска и алкана добијених хроматографијом испирка *P. veris* (поглавље 4.4.3). Коришћењем добијених података конструисани су фазни дијаграми тачки топљена смеша у функцији састава смеша (поглавље 4.5 и слика 5.2.12). Најнижа тачка топљења (еутектичка тачка, T_e) смеше 1 и 2 измерена је када су оне садржавале 30%, w/w , алкана; n (алкана) : n (бензил-бехената или бензил-естара масних киселина) = 1 : 2,3. Смеша 1 је имала вишу еутектичку тачку, као и ΔT ($T_e=51,9$ °C; $\Delta T=T_m(\text{алкани}) - T_e=11,4$ °C; ΔT – смањење температуре топљења), у односу на смешу 2 ($T_e=53,0$ °C; $\Delta T=10,3$ °C). Обе смеше су имале перитектичку тачку када је у смеси било 30%, w/w , бензил-бехената или смеше бензил-естара масних киселина (n (алкана) : n (бензил-бехената или бензил-естара масних киселина) = 2,4 : 1).

Претходно су испитиване термалне особине смеша алифатичних естара воскова кутикуле инсекта (смеша је садржавала октадецил-еикозаноат, тетрадецил-стеарат и додецил-миристант) и n -алкана, дужине ланаца од 26 до 48 угљеникових атома. Састојци су одабрани тако да и естри и алкани имају сличне T_m вредности, да би и њихова смеша имала сличну вредност T_m . Ипак, ове смеше су се топиле на 3–5 °C нижој температури, што сугерише да и састав воска утиче на T_m (Gibbs, 2002; Patel et al., 2001).



Слика 5.2.12. Температура топљења смеси која садржи алкане хексанске фракције *P. veris* и бензил-бехенат или модел-смешу бензил-естара (удео је изражен као w/w)

Насупрот томе, недавно истраживање термалних особина смеша парафинског воска (који садржи *n*-алкане C_{20} – C_{40}) и воска пиринчаних мекиња (који садржи алифатичне естре C_{44} – C_{64}) показало је да *n*-алкани парафинског воска не интерагују са естрима пиринчаних мекиња. Такође, ова смеша парцијално кристалише и формира монотектички фазни дијаграм (Jana & Martini, 2016). Са друге стране, смеша *n*-, *iso*- и *anteiso*-алкана и *n*-бензил-естара масних киселина, испитивана у овом раду, имала је еутектички састав, где је $T_e=53$ °C са количином бензил-естара, 70%, w/w , што указује да бензил-естри боље интерагују са алканима од алифатичних естара.

Претходна истраживања су показала да смеси *n*-алкана и 2-алканона такође могу имати еутектички састав. На пример, еутектичка смеша 2-хептадеканона ($T_m=48,5$ – 49 °C) и *n*-хенеикозана ($T_m=41,5$ -42 °C) има еутектичку тачку $T_e=35,5$ -36 °C ($\Delta T=6$ °C).

Смеша која садржи 10%, w/w, 2-хенеикозанона ($T_m=62 - 62,5$ °C) а остатак је *n*-хексакозан ($T_m=55,9$ °C) има смањење тачке топљења у односу на алкан за 8,3 °C (Nunez et al., 1992). Нажалост, током хроматографије испирака *P. veris* и *P. acaulis* није изолована довољна количина 2-алканона за испитивање еутектичких особина у смеси са одговарајућом смешом алкана. Такође, синтетисани стандард за 2-алканоне, 2-пентакозанон има ниску тачку топљења ($T_m=30,3$ °C) што је било неодговарајуће за испитивање термалних особина.

У литератури се може наћи да је температура кристализације воде у ћелијама листова *Primula malacoides*, чији су површински воскови богати флавоном (**1**), нижа за 6 °C у односу на листове код којих је флавон (**1**) вештачки уклоњен. Такође, флавоноиди који прекривају листове *P. malacoides* смањују цурење електролита из ћелија које су изложене ниским температурама. Познато је да рачвање у угљоводоничном ланцу води ка смањењу тачке топљења. На пример, 2-метилпентакозан се топи на приближно 12 °C нижој температури него *n*-хексакозан (Gibbs & Pomonis, 1995). Дакле, може се закључити да на термалне особине воска биљних врста рода *Primula* утиче присуство рачвастих једињења у воску. Иако већина биљних врста биосинтетише липиде који су у чврстом агрегатном стању, део воска ипак може да се топи јер биљке биосинтетишу и липиде са нижим тачкама топљења (Gibbs, 2002). Такође, међусобне интеракције присутних различитих класа липида у восковима (на пример, алкани и естри или примарни алкохоли или метил-кетони) доприносе снижењу тачке топљења воска (Rathgeber et al., 2013; Patel et al., 2001; Nunez et al., 1992). Иако снижење тачке топљења воска може довести до повећаног губитка воде, постоје и позитивне стране ове појаве. Топљењем липида и других састојака воска повећава се њихова дисперзија преко кутикуле и тиме се побољшава одбрана биљке од микроба. Такође, восак може попунити оштећења у матриксу кутина листа и плодова, која су настала као последица ширења површине биљке током раста. Добра пермеабилност воска побољшава отпуштање кутикуларних феромона који привлаче или одбијају инсекте или друге биљке (Khanal et al., 2013; Hamilton, 2004; Patel et al., 2001).

5.2.5. Потенцијална UV-заштитна улога бензил-естара масних киселина врста *Primula*

Количина светлости која падне на биљку и продре у ћелије листова јако је важна за њен развој јер и биљке, као и сви остали живи организми реагују на све типове UV-радијације (UV-A, UV-B и UV-C; Hamilton, 2004; Stapleton, 1992). Познато је да све врсте UV-радијације утичу на различите процесе у биљкама, па тако радијација може да изазове оштећење ДНК и доведе до мутација, а може и да изазове промене које су део физиолошких процеса (Stapleton, 1992). Како је последњих деценија оштећење озонског омотача велики еколошки проблем, улога флавоноида у заштити од сунчевог UV-B (280 – 315 nm) зрачења постала је јако важна (Agati & Tattini, 2010). На пример, флавон (1, 2-фенил-4H-1-бензопиран-4-он) у метанолу има два апсорпциона максимума на 307 nm (трака I, чија апсорпција потиче од цинамоил-система B-прстена) и 250 nm (трака II, чија апсорпција потиче од бензоил-система A-прстена; Mabry et al., 1970), па се може очекивати да флавон и остали флавоноиди имају значајну улогу у заштити биљних врста рода *Primula* од UV-B-зрачења.

UV-зрачење краћих таласних дужина (UV-C, 100 – 280 nm), са већом радијационом енергијом, најопасније је UV-зрачење које емитује Сунце. Ипак, позитивна чињеница за живи свет на Земљи је то да озонски омотач упија највећи део овог зрачења, тако да је количина UV-C-зрачења које стигне до земље мала, осим на врховима високих планина (Häder, 2007). Ипак, треба узети у обзир и чињеницу да је због атмосферског загађења озонски омотач оштећен и да је непредвидиво у којој мери је повећано UV-C-зрачење које допире до површине Земље. Бензил-бехенат има високу моларну апсорптивност и апсорбује скоро у читавом UV-C-опсегу са максимумом на 210 nm. Дакле, бензил-естри масних киселина могу смањити штетан утицај UV-C-зрачења на биљке, што је јако важно за биљне врсте које расту на великим надморским висинама, као што су на пример *Primula* spp. које расту на планини Велики Кавказ.

5.2.6. Дуголанчани алкани, бензил-естри масних киселина и 2-алканони у испирцима *P. acaulis* (P-3 – P-6) и *P. veris* (P-7)

Након детаљне анализе алкана, бензил-естара и 2-алканона у фракцијама испирака *P. veris* (P-1) и *P. acaulis* (P-2), извршена је додата анализа испирака (без претходног раздвајања, табеле 4.3.1 и 4.3.2) четири узорка *P. acaulis* и једног узорка *P. veris* (табеле 5.2.4, 5.2.5 и 5.2.6). Четири узорка биљног материјала сакупљена су у фази цветања са територије источне, југоисточне и јужне Србије, док је узорак са Великог Кавказа сакупљен у јулу, па је он садржавао само листове (табеле 4.3.1 и 4.3.2). Приликом припреме испирака два узорка биљног материјала *P. acaulis* (P-4 и P-6) и једног узорка *P. veris* (P-7), раздвојени су цветови и листови и припремљени су засебни испирци ових биљних органа. GC-MS анализом (табеле 5.2.4, 5.2.5 и 5.2.6) хлороформских испирака било је могуће одредити заступљеност дуголанчаних нефлавоидних састојака са површине листова и цветова засебно. Код ових узорака (P-4, P-6 и P-7) могло се уочити да ове врсте продукују велике количине рачвастих алкана, око 23-56% од укупне количине, којих има 2-3 пута више на листовима него на цветовима (табела 5.2.4). Узорак P-3, сакупљен на Великом Кавказу садржи мање количине алкана, како нормалног тако и разгранатог низа, у односу на количине алкана идентификованих у осталим врстама пореклом из Србије. Аналогна је заступљеност и дуголанчаних 2-алканона (табела 5.2.6). По први пут су детектована, у анализираним *Primula* врстама, два *iso*-изомера нижих маса, 14-метил-2-пентадеканон и 15-метил-2-хексадеканон, идентификовани једино у узорцима P-4 и P-6. Штавише, анализом испирака цветова и листова засебно, може се уочити да су дуголанчани бензил-естри заступљени претежно на цветовима у односу на листове. У испирцима листова бензил-естри су детектовани у траговима или их уште није ни било. Ипак, у испирку листова врсте, сакупљене на Великом Кавказу, идентификована је значајна количина дуголанчаних бензил-естара (табела 5.2.5).

Испитиване врсте *Primula* сакупљене су у различитим фазама развоја биљке. Врсте сакупљене на територији Србије биле су у фази цветања, док је биљна врста са Великог Кавказа сакупљена након цветања. Ово може бити разлог постојања разлика у биосинтези и акумулацији алкана, бензил-естара и 2-алканона на површини различитих органа. Други

фактор који може утицати на квалитативне и квантитативне разлике испирака биљних врста *Primula* је адаптација на животне услове, јер је *P. acaulis* (P-3) сакупљена на Великом Кавказу, на надморској висини већој од 3300 м, док су друге биљне врсте *Primula*, сакупљене на територији Србије, расле на надморској висини мањој од 950 м. Раније је објављено да су неке врсте *Primula* развиле механизам различите брзине раста листова у зависности од климатских промена, тј. промене надморске висине, па тако листови имају већу површину и нижи садржај азота на нижим надморским висинама (Seriani et al., 2009). Дакле, мања заступљеност рачвастих дуголанчаних алкана, као и укупних алкана, и већа заступљеност количине дуголанчаних бензил-естара на површини листова *P. acaulis* са Великог Кавказа би могла бити фактор адаптације ове врсте, јер промена састава воска узрокује промену температуре топљења и флуидност воска. Такође, акумулација дуголанчаних бензил-естара на површини узорка P-3 би могла бити проузрокована повећаним UV-зрачењем на надморским висинама већим од 3300 м (поглавље 5.2.5).

На основу анализе дуголанчаних алкана, бензил-естара масних киселина и 2-алканона испирака испитиваних врста *Primula* са различитих локација, потврђена је неуобичајена расподела непарних *iso*-алкана и *iso*-2-алканона као доминантних, па се може рећи да је то одлика ових биљних врста. Садржај дуголанчаних бензил-естара у испирцима проучаваних врста *Primula* био је низак, па није било могуће квантификовати бензил-естре директно из испирака, без одвајања.

Табела 5.2.4. Садржај алкана у врстама *P. acaulis* и *P. veris*

Једињење	Класа	Садржај ^а									
		P-3 ^б		P-4		P-5		P-6		P-7	
		листови	цветови	листови	цветови и листови	цветови	листови	цветови	листови		
2-Метилеикозан	<i>I</i>	н.д. ^в	тр. ^г	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
Хенеикозан	<i>N</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Метилхенеикозан	<i>I</i>	н.д.	0,62 ± 0,04	н.д.	тр.	0,18 ± 0,01	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
3-Метилхенеикозан	<i>A</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
Докозан	<i>N</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	
2-Метилдокозан	<i>I</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	
Трикозан	<i>N</i>	тр.	3,8 ± 0,2	тр.	1,10 ± 0,06	3,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	5,22 ± 0,20	тр.	н.д.	
2-Метилтрикозан	<i>I</i>	н.д.	1,30 ± 0,08	3,7 ± 0,2	1,50 ± 0,09	0,61 ± 0,04	3,4 ± 0,2	1,43 ± 0,06	6,62 ± 0,22	н.д.	
3-Метилтрикозан	<i>A</i>	н.д.	тр.	тр.	тр.	0,120 ± 0,007	1,20 ± 0,07	тр.	тр.	н.д.	
Тетракозан	<i>N</i>	тр.	0,70 ± 0,04	тр.	тр.	0,43 ± 0,03	тр.	0,97 ± 0,04	н.д.	н.д.	
2-Метилтетракозан	<i>I</i>	н.д.	0,42 ± 0,03	тр.	тр.	0,25 ± 0,02	1,30 ± 0,08	тр.	н.д.	н.д.	
3-Метилтетракозан	<i>A</i>	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	
Пентакозан	<i>N</i>	0,22 ± 0,02	3,8 ± 0,3	3,0 ± 0,2	1,70 ± 0,05	2,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	4,14 ± 0,32	н.д.	н.д.	
2-Метилпентакозан	<i>I</i>	тр.	1,00 ± 0,05	5,0 ± 0,4	2,4 ± 0,2	0,56 ± 0,03	3,5 ± 0,3	1,83 ± 0,05	12,83 ± 0,42	н.д.	
3-Метилпентакозан	<i>A</i>	н.д.	0,38 ± 0,02	2,00 ± 0,16	0,96 ± 0,06	0,25 ± 0,02	2,0 ± 0,1	тр.	3,90 ± 0,15	н.д.	
Хексакозан	<i>N</i>	тр.	0,41 ± 0,02	тр.	тр.	0,150 ± 0,009	тр.	тр.	н.д.	н.д.	
2-Метилхексакозан	<i>I</i>	н.д.	0,46 ± 0,02	н.д.	н.д.	0,23 ± 0,01	н.д.	тр.	тр.	н.д.	
3-Метилхексакозан	<i>A</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
Хептакозан	<i>N</i>	0,62 ± 0,04	6,9 ± 0,5	4,0 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2	7,14 ± 0,41	12,44 ± 0,38	н.д.	
2-Метилхептакозан	<i>I</i>	0,220 ± 0,015	1,6 ± 0,1	4,80 ± 0,29	2,70 ± 0,16	0,76 ± 0,05	4,6 ± 0,3	2,83 ± 0,08	27,58 ± 0,71	н.д.	
3-Метилхептакозан	<i>A</i>	тр.	0,92 ± 0,06	1,90 ± 0,13	1,10 ± 0,07	0,53 ± 0,04	2,2 ± 0,15	1,08 ± 0,04	4,42 ± 0,28	н.д.	
Октакозан	<i>N</i>	0,30 ± 0,02	1,30 ± 0,09	тр.	тр.	0,40 ± 0,03	тр.	2,15 ± 0,12	н.д.	н.д.	
2-Метилоктакозан	<i>I</i>	тр.	1,30 ± 0,09	тр.	тр.	0,50 ± 0,04	тр.	1,98 ± 0,07	н.д.	н.д.	
3-Метилоктакозан	<i>A</i>	н.д.	0,32 ± 0,02	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	
Нонакозан	<i>N</i>	2,00 ± 0,16	18,8 ± 1,1	4,9 ± 0,3	7,60 ± 0,46	7,3 ± 0,4	5,4 ± 0,4	27,68 ± 1,22	33,50 ± 1,88	н.д.	
2-Метилнонакозан	<i>I</i>	0,30 ± 0,02	2,5 ± 0,2	3,20 ± 0,25	2,8 ± 0,2	0,89 ± 0,06	2,60 ± 0,18	7,45 ± 0,22	24,19 ± 1,01	н.д.	
3-Метилнонакозан	<i>A</i>	0,22 ± 0,02	1,4 ± 0,1	тр.	1,4 ± 0,1	0,55 ± 0,04	1,6 ± 0,2	1,92 ± 0,08	н.д.	н.д.	
Триакоктан	<i>N</i>	0,28 ± 0,03	0,90 ± 0,05	тр.	тр.	0,23 ± 0,02	н.д.	2,04 ± 0,11	н.д.	н.д.	
2-Метилтриакоктан	<i>I</i>	н.д.	0,52 ± 0,03	н.д.	тр.	0,15 ± 0,01	н.д.	1,28 ± 0,03	н.д.	н.д.	
3-Метилтриакоктан	<i>A</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	
Хентриакоктан	<i>N</i>	1,10 ± 0,08	4,6 ± 0,4	2,40 ± 0,17	2,60 ± 0,18	1,30 ± 0,02	1,60 ± 0,11	9,83 ± 0,33	21,34 ± 0,82	н.д.	
2-Метилхентриакоктан	<i>I</i>	тр.	тр.	н.д.	тр.	тр.	тр.	1,16 ± 0,04	3,81 ± 0,18	н.д.	

3-Метилхентриаконтан	A	н.д.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.
Дотриаконтан	N	тр.	тр.	н.д.	тр.	тр.	н.д.	тр.	тр.
Тритриаконтан	N	тр.	0,35 ± 0,03	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	тр.	тр.
Тетратриаконтан	N	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Укупно		5,26 (19)	54,3 (34)	34,9 (19)	29,06 (24)	24,09 (34)	37,8 (19)	80,16 (30)	150,64 (15)
Укупно – 1^а		2,5	95,0	27,8	16,6	19,5	31,4	63,2	98,3
<i>n</i> -низ (N)		4,52 (12) ^б	41,56 (13)	14,3 (9)	16,2 (10)	18,51 (13)	15,4 (8)	59,18 (12)	67,28 (6)
Парни		0,58 (6)	3,31 (6)	тр. (4)	тр. (5)	1,21 (6)	тр. (3)	5,16 (6)	тр. (1)
Непарни		3,94 (6)	38,25 (7)	14,3 (5)	16,2 (5)	17,3 (7)	15,4 (5)	54,02 (6)	67,28 (5)
<i>Iso</i> (I)		0,52 (5)	9,1 (12)	16,7 (6)	9,4 (9)	4,13 (12)	15,4 (7)	17,97 (10)	75,04 (6)
Парни		0,52 (4)	7,02 (6)	16,7 (4)	9,4 (6)	3,0 (6)	14,1 (5)	14,71 (5)	75,04 (5)
Непарни		тр. (1)	2,7 (6)	тр. (2)	тр. (3)	1,13 (6)	1,3 (2)	3,26 (5)	тр. (1)
<i>Anteiso</i> (A)		0,22 (2)	3,02 (9)	3,9 (4)	3,46 (5)	1,45 (9)	7,0 (4)	3,01 (8)	8,32 (3)
Парни		тр. (2)	2,7 (6)	3,9 (4)	3,46 (5)	1,45 (5)	7,0 (4)	3,01 (5)	8,32 (3)
Непарни		н.д.	0,32 (3)	н.д.	н.д.	тр. (4)	н.д.	тр. (3)	н.д.

^а милиграма на 100 g биљног материјала;

^б подаци о анализираним биљним врстама дати су у табелама 4.3.1 и 4.3.2;

^в н.д. – није детектовано;

^г тр. – траг (<0,015 mg/100 g биљног материјала);

^д микрограма по cm² површине цветова и/или листова;

^б број у загради представља број алкана који припадају тој класи.

Табела 5.2.5. Садржај бензил-естара масних киселина у врстама *P. acaulis* и *P. veris*

Једињење	Садржај ^а								
	Р-3 ^б		Р-4		Р-5		Р-6		Р-7
	листови	цветови	листови	цветови и листови	цветови	листови	цветови	листови	
Бензил-докозаноат	н.д. ^в	н.д.	н.д.	н.д.	0,35 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-трикозаноат	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр. ^г	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-тетракозаноат	тр.	1,20 ± 0,01	н.д.	2,6 ± 0,2	0,40 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-пентакозаноат	тр.	тр.	н.д.	тр.	0,40 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-хексакозаноат	0,68 ± 0,03	тр.	н.д.	1,50 ± 0,03	0,53 ± 0,03	тр.	тр.	н.д.	
Бензил-хептакозаноат	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-октакозаноат	0,75 ± 0,04	1,30 ± 0,08	н.д.	тр.	0,40 ± 0,02	тр.	тр.	н.д.	
Бензил-нонакозаноат	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	0,35 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
Бензил-триаконтаноат	тр.	тр.	н.д.	тр.	тр.	тр.	н.д.	н.д.	
Бензил-хентриаконтаноат	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
Укупно	1,43	2,5	н.д.	4,1	2,43	тр.	н.д.	н.д.	
Укупно – 1^д	0,7	4,4	н.д.	2,3	2,0	тр.	н.д.	н.д.	

^а милиграма на 100 g биљног материјала;

^б подаци о анализираним биљним врстама дати су у табелама 4.3.1 и 4.3.2;

^в н.д. – није детектовано;

^г тр. – траг (<0,015 mg/100 g биљног материјала);

^д нанограма по cm² површине цветова и/или листова.

Табела 5.2.6. Садржај 2-алканона у врстама *P. acaulis* и *P. veris*

Једињење	Класа	Садржај ^а								
		P-3 ^б		P-4		P-5		P-6		P-7
		ЛИСТОВИ	ЦВЕТОВИ	ЛИСТОВИ	ЦВЕТОВИ И ЛИСТОВИ	ЦВЕТОВИ	ЛИСТОВИ	ЦВЕТОВИ	ЛИСТОВИ	
14-Метил-2-пентадеканон	<i>I</i>	н.д. ^б	тр. ^г	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
15-Метил-2-хексадеканон	<i>I</i>	н.д.	0,60 ± 0,04	н.д.	н.д.	0,24 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
22-Метил-2-трикозанон	<i>I</i>	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,20 ± 0,02	н.д.	н.д.	н.д.	
21-Метил-2-трикозанон	<i>A</i>	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Тетракозанон	<i>N</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	0,22 ± 0,03	тр.	н.д.	н.д.	
23-Метил-2-тетракозанон	<i>I</i>	н.д.	н.д.	тр.	тр.	тр.	тр.	н.д.	н.д.	
22-Метил-2-тетракозанон	<i>A</i>	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Пентакозанон	<i>N</i>	тр.	1,60 ± 0,11	тр.	2,00 ± 0,14	0,96 ± 0,07	3,9 ± 0,3	тр.	тр.	
24-Метил-2-пентакозанон	<i>I</i>	н.д.	тр.	3,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,22 ± 0,01	4,1 ± 0,3	н.д.	тр.	
23-Метил-2-пентакозанон	<i>A</i>	н.д.	тр.	тр.	тр.	тр.	3,80 ± 0,27	н.д.	тр.	
2-Хексакозанон	<i>N</i>	тр.	тр.	тр.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
25-Метил-2-хексакозанон	<i>I</i>	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	
2-Хептакозанон	<i>N</i>	0,30 ± 0,02	1,70 ± 0,12	тр.	тр.	0,74 ± 0,05	тр.	н.д.	тр.	
26-Метил-2-хептакозанон	<i>I</i>	тр.	тр.	тр.	тр.	тр.	тр.	н.д.	н.д.	
2-Октакозанон	<i>N</i>	тр.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Нонакозанон	<i>N</i>	тр.	0,62 ± 0,04	н.д.	тр.	тр.	тр.	н.д.	н.д.	
2-Триакоктанон	<i>N</i>	тр.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Хентриакоктанон	<i>N</i>	0,45 ± 0,03	0,67 ± 0,05	тр.	тр.	0,20 ± 0,01	тр.	н.д.	н.д.	
30-Метил-2-хентриакоктанон	<i>I</i>	тр.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
2-Дотриакоктанон	<i>N</i>	тр.	тр.	н.д.	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
3-Тритриакоктанон	<i>N</i>	0,48 ± 0,03	0,64 ± 0,05	тр.	тр.	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	
Укупно		1,23 (11)	5,83 (17)	3,9 (9)	3,4 (9)	2,78 (21)	11,8 (9)	тр.	тр. (5)	
Укупно – 1^а		0,6	10,2	3,1	1,9	2,2	9,8	тр.	тр.	
<i>n</i> -низ (<i>N</i>)		1,23 (9) ^б	5,23 (10)	тр. (5)	2,0 (5)	2,12 (10)	3,9 (5)	тр. (1)	тр. (2)	
Парни		тр. (4)	тр. (5)	тр. (1)	н.д.	0,22 (5)	тр. (1)	н.д.	н.д.	
Непарни		1,23 (5)	5,23 (5)	тр. (4)	2,0 (5)	1,9 (5)	3,9 (4)	тр. (1)	тр. (2)	
<i>Iso</i> -низ (<i>I</i>)		тр. (2)	0,6 (6)	3,9 (3)	1,4 (3)	0,66 (8)	4,1 (3)	н.д.	тр. (2)	
Парни		тр. (2)	тр. (4)	3,9 (2)	1,4 (2)	0,42 (5)	4,1 (2)	н.д.	тр. (1)	
Непарни		н.д.	0,6 (2)	тр. (1)	тр. (1)	0,24 (3)	тр. (1)	н.д.	тр. (1)	
<i>Anteiso</i> (<i>A</i>)		н.д.	тр. (1)	тр. (1)	тр. (1)	тр. (3)	3,8 (1)	н.д.	тр. (1)	

Парни	н.д.	тр. (1)	тр. (1)	тр. (1)	тр. (2)	3,8 (1)	н.д.	тр. (1)
Непарни	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	тр. (1)	н.д.	н.д.	н.д.

^a милиграма на 100 g биљног материјала;

^b подаци о анализираним биљним врстама дати су у табелама 4.3.1 и 4.3.2;

^в н.д. – није детектовано;

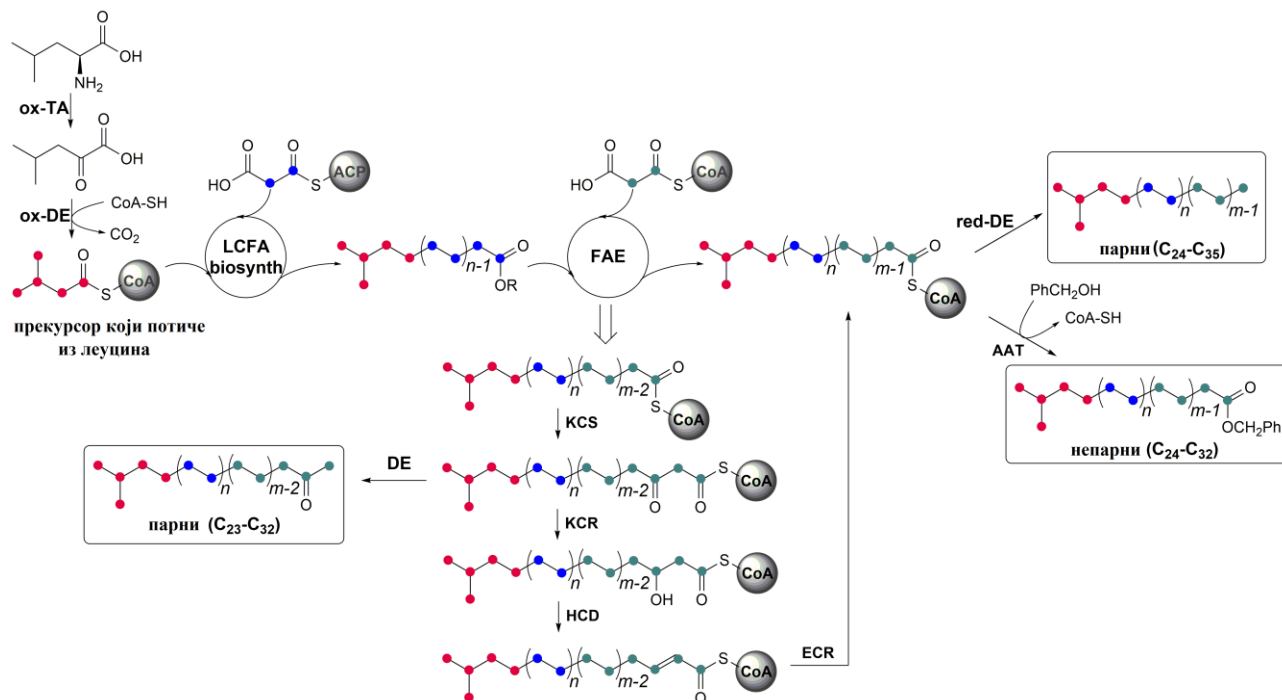
^г тр. – траг (<0,03 mg/100 g биљног материјала);

^д микрограма по cm² површине цветова и/или листова;

^б број у загради представља број 2-алканона који припадају тој класи.

5.2.7. Различита заступљеност парних, односно непарних *iso*-хомолога испитиваних врста рода *Primula*

Код виших биљака, састојци воскова, са неразгранатим угљоводоничним ланцем, биосинтетишу се из дуголанчаних масних киселина нормалног низа. Ове масне киселине се биосинтетишу вишеструким, узастопним елонгацијама стартера, ацетил-СоА, ацетатном јединицом. Примарним елонгационим системом синтетишу се ацил-низови до С₁₆ и С₁₈. Затим се, секундарним елонгационим системом, низови продужавају до С₃₀, или чак и дужих низова. На крају, хемијским трансформацијама ацил-низова добијају се алкани, алдехиди, примарни алкохоли, алкил-естри, секундарни алкохоли, кетони, као и многа друга полиоксигенована једињења (Shepherd & Griffiths, 2006). Са друге стране, рачвасте дуголанчане масне киселине се биосинтетишу вишеструким, узастопним елонгацијама СоА-тиоестара кратколанчаних рачвастих киселина, насталих из рачвастих аминокиселина као што су валин, леуцин и изолеуцин. Према томе, изобутирил-СоА (који настаје из валина), изовалерил-СоА (који настаје из леуцина) и α -метилбутирил-СоА (који настаје из изолеуцина) могући су прекурсори за добијање *iso*-масних киселина са парним бројем угљеникових атома, *iso*-масних киселина са непарним бројем угљеникових атома и *anteiso*-масних киселина са парним бројем угљеникових атома (Busta & Jetter, 2017; Grice et al., 2008). Претходна истраживања су показала да биљне врсте које продукују велике количине *iso*-алкана (и других састојака воска са *iso*-рачвом) садрже једино стартере који настају из валина, као, на пример, код врсте *Nicotiana benthamiana*, па овакви воскови садрже само парне *iso*-алкане. У неким врстама доминантни су стартери који настају из валина, у односу на друге стартере, као код врсте *Arabidopsis thaliana*, где су парни хомолози доминантнији у односу на непарне (који настају из леуцина; Busta & Jetter, 2017).



Слика 5.2.13. Предложена биосинтеза парних *iso*-алкана и 2-алканона, и непарних *iso*-бензил-естара масних киселина (ACP - *acyl carrier protein* – протеин који је носач ацил-групе; CoA – коензим-А; ox-TA – *oxidative transamination* – оксидативна трансаминација; ox-DE или red-DE– оксидативна или редуктивна декарбоксилација; LCFA biosynth – *long-chain fatty acid biosynthesis* – биосинтеза дуголанчаних масних киселина; FAE – *fatty acid elongase* – елонгаза масних киселина; KCS – *ketoacyl-CoA synthase* – кетоацил-CoA синтаза; KCR, *ketoacyl-CoA reductase* – кетоацил-CoA редуктаза; HCD – *hydroxyacyl-CoA dehydratase* – хидроксиацил-CoA дехидратаза; ECR – *enoyl-CoA reductase* – еноил-CoA редуктаза; AAT – *alcohol acyl-transferase* – алкохолна ацил-трансфераза).

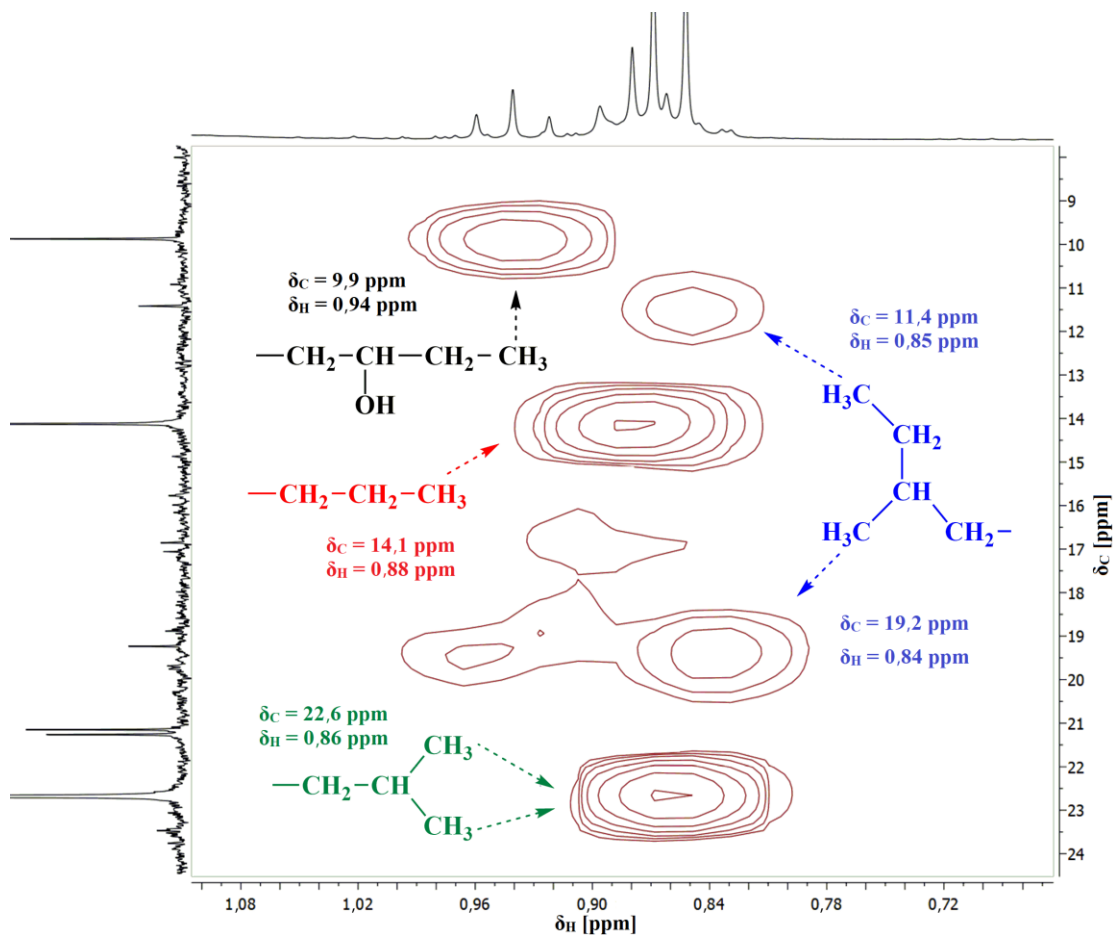
Врсте рода *Primula*, проучаване у овом раду, биосинтетишу у већој количини парне *iso*-алкане и 2-алканоне, као и *iso*-непарне бензил-естре масних киселина. Може се закључити да је у биосинтези ових састојака *iso*-низа доминантнији стартер који настаје из леуцина у односу на стартер који настаје из валина, што се може сматрати јединственим за биљно царство. Узимајући у обзир необичну заступљеност парних *iso*-алкана и 2-алканона и непарних *iso*-бензил-естара, на слици 5.2.13 предложена је највероватнија биосинтеза којом би ови нови (или ретки) секундарни метаболити могли да се настану код врста рода *Primula* испитиваних у овом раду. Идентификовани *iso*-алкани, *iso*-бензил-естри и *iso*-2-

алканони су сличних дужина угљоводоничног ланца, што сугерише да је један део биосинтетског пута заједнички. Па тако, парни *iso*-2-алканони највероватније настају хидролизом непарних интермедијера 3-кето-ацил-СоА у процесу елонгације, која је праћена декарбоксилацијом (Racovita et al., 2015). *iso*-Алкани и *iso*-бензил-естри највероватније настају из одговарајућих непарних дуголанчаних ацил-СоА, који је у ствари супстрат паралених путева синтезе ових једињења, па би *iso*-алкани са непарним бројем угљеникових атома могли да настану декарбоксилацијом, док би последњи корак биосинтезе *iso*-бензил-естара могао бити катализован алкохолном ацил-трансферазом, која би повезала алкохол са ацил-низом (слика 5.2.13; Busta & Jetter, 2017). Овакав сличан механизам који укључује алкохолне трансферазе у синтези испарљивих естара је познат код диње, јагоде и банане (Beekwilder et al., 2004).

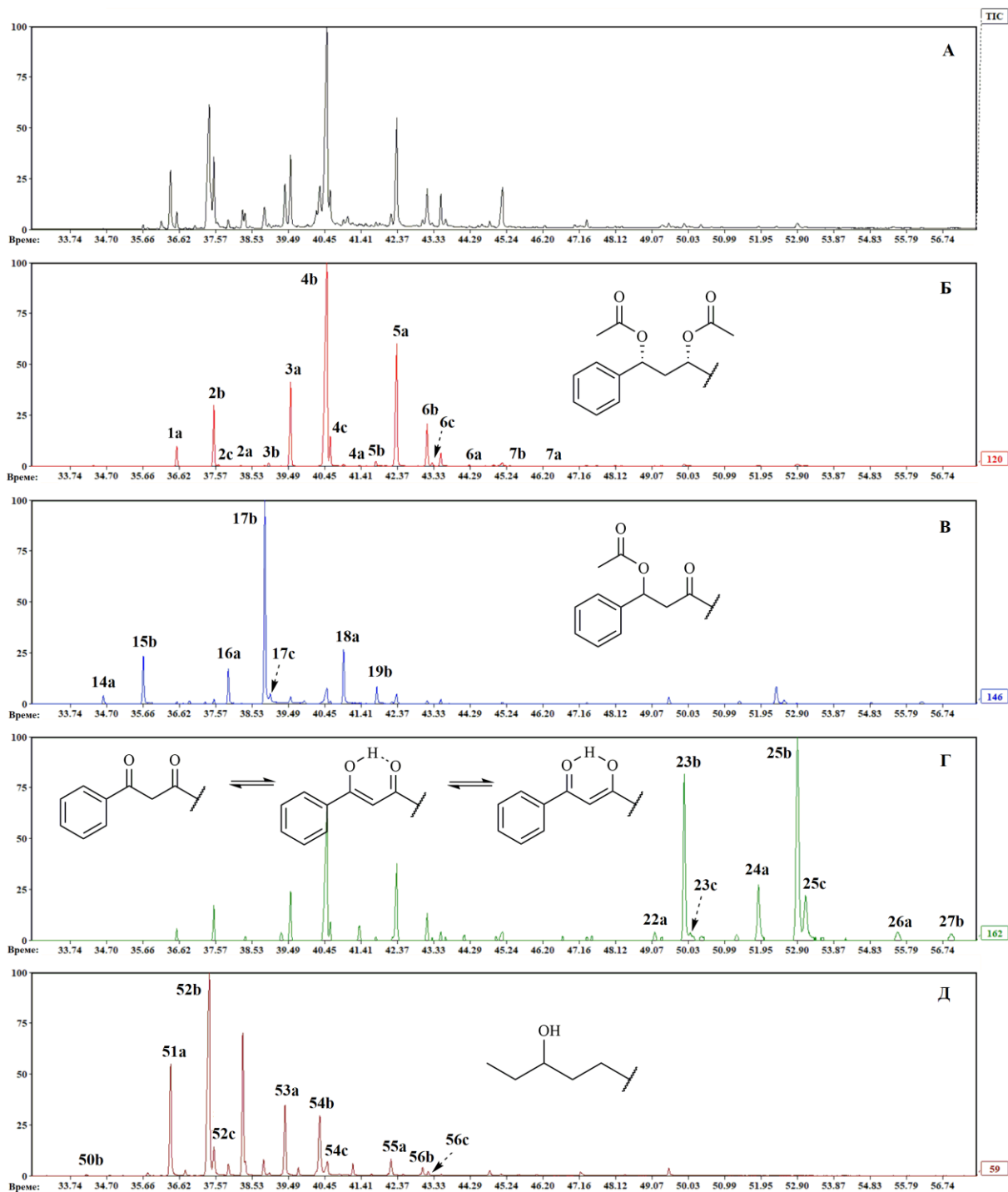
Код свих *anteiso*-хомолога, доминантни су они са парним бројем угљеникових атома, што је и очекивано на основу биосинтетског пута ових једињења. Ипак је примећено да су неки непарни *anteiso*-алкани (нпр., C₂₅, C₂₉ и C₃₁) и 2-алканони (C₂₅ и C₂₇), као и паран *anteiso*-бензил-естар (C₂₆) заступљени у значајној количини у восковима овде проучаваних врста рода *Primula* (табеле 5.1.2, 5.2.1, 5.2.2, 5.2.4 и 5.2.6). До сада није разјашњено којим биосинтетским путем настају ови *anteiso*-хомолози. Биљке их обично синтетишу у траговима или их уопште не синтетишу (Busta & Jetter, 2017; Dickschat et al., 2005). Ови *anteiso*-хомолози би могли да се биосинтетишу у биљкама из стартера 2-амино-4-метилхексанске киселине (која настаје из хомоизолеуцина; слика 5.2.13). Међутим, ова аминокиселина је врло ретка и до сада је само једном идентификована као биљни метаболит. Тачније, хомоизолеуцин се налази у семену врсте *Aesculus californica*, где је улога ове аминокиселине да складишти азот који се ослобађа током клијања семена, чиме би азот касније био биодоступан за биосинтетске путеве (Jegorov et al., 1997).

5.3. Анализа састојака фракције 4 испирка *P. veris* (P-1)

Фракција 4, добијена након *dry-flash* хроматографије испирка надземних делова *P. veris*, шема 4.3.1, масе 12,2 mg, анализирана је GC-MS-ом и NMR спектроскопијом. Поред других сигнала, анализом ^1H NMR спектра фракције, у комбинацији са другим NMR (DEPT-135, ^1H - ^1H COSY, gHSQC и gHMBC) спектрима, потврђено је присуство *n*-, *iso*- и *anteiso*-крајева низа у молекулима, на аналоган начин као и код алкана (поглавље 5.1, слика 5.3.1 и табела 5.1.1). Након детаљне анализе утврђено је да фракција 4 садржи једињења нормалног и рачвастог низа: 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетате, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетате, 1-фенил-1,3-алкадионе, 1-фенил-1-хидрокси-3-алканоне, *sec*-алканоле (слика 5.3.2.) и масне киселине (слика 5.3.33).



Слика 5.3.1. Део gHSQC спектра хроматографске фракције 4 испирка надземних делова *P. veris*: карактеристични сигнали за *n*-, *iso*- и *anteiso*-метил групе, као и сигнал метил-групе 3-алканола



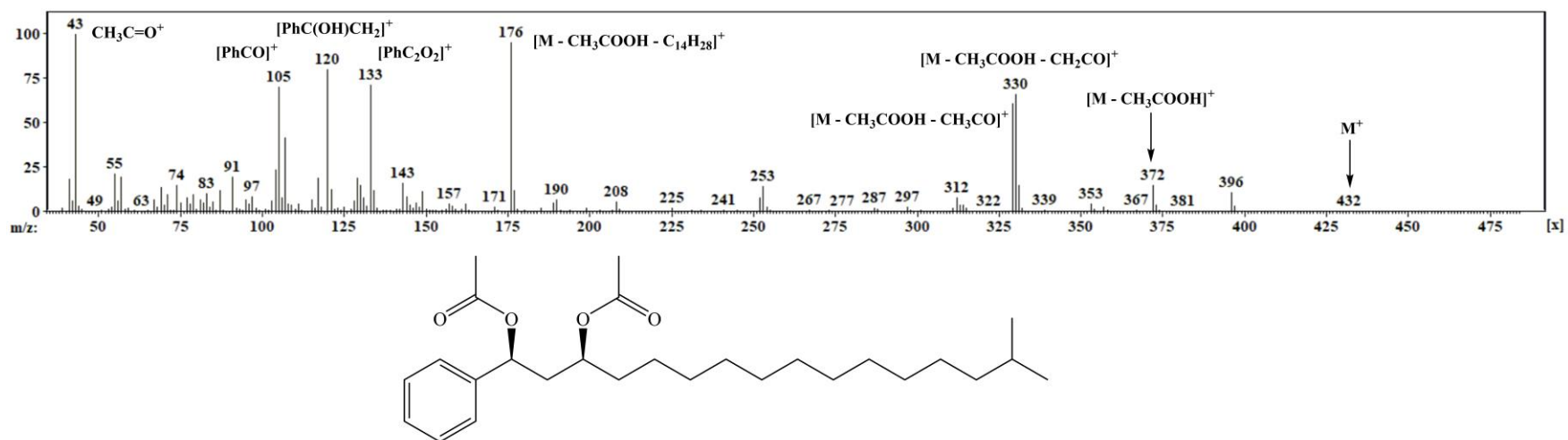
Слика 5.3.2. Укупан (А) и парцијални (Б-Д) јонски хроматограм који приказује идентификоване класе једињења хроматографске фракције испирка *P. veris*: m/z 120 за *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетате – Б, m/z 146 за 3-оксо-1-фенилалкил-ацетате (идентификовани као 1-фенил-1-алкен-3-они) – В, m/z 162 за 1-фенил-1,3-алкадионе – Г, и m/z 59 за 3-алканоле – Д.

5.3.1. 1-Фенил-1,3-алкадирил-диацетати у испирцима *P. veris*

Присутни јони у масеном спектру, m/z 43 $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$, основни јон, и m/z 105 $[\text{PhCO}]^+$, најинтензивнијег пика у хроматограму фракције 4, указивали су на присуство једне или више ацетил-група у молекулу, као и на постојање моносупституисане фенил-групе са оксигенацијом у бензилном положају (слика 5.3.3). Укупно шеснаест једињења, сличних масених спектра, подељени су у три групе, чији су се ретенциони индекси међусобно разликовали за *ca.* 101 (табела 5.3.1).

Уз потврду добијену NMR анализом (слика 5.3.1), ове три групе једињења класификоване су као серије *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера. Анализом протонског NMR спектра фракције, уочени су препознатљиви синглети који потичу од водоника метил-група ацетата, на 2,06 и 1,98 ppm (слика 5.3.4), везани за атоме угљеника на 21,2 и 21,3 ppm (слика 5.3.5). У gHMBC спектру се јасно види да ови протони корелишу преко две везе са угљеницима карбонилне групе естара на 170,5 и 170,1 ppm. У gHMBC спектру може се уочити да карбонилни угљеник на 170,5 ppm корелише са псеудо триплетом на 5,79 ppm (dd, $J=7,15, 6,70$ Hz, H_a)⁴, а карбонилни угљеник на 170,1 ppm корелише са мултиплетом на 4,78 ppm (dddd, $J=8,36, 6,30, 6,20, 4,50$ Hz, H_d ; табела 5.3.2). Такође, интеракције уочене у ¹H-¹H COSY, NOESY, и gHMBC спектрима (слика 5.3.4, Б и В), указују да су угљеници, који се налазе до естарских група, раздвојени једном CH₂ групом (2,03 ppm, ddd, $J=-14,52, 6,70, 4,50$ Hz, H_b и 2,23 ppm, ddd, $J=-14,52, 8,36, 7,15$ Hz, H_c). У gHMBC и NOESY спектрима уочавају се јасне корелације H_a протона и фенил-групе, која је геминална са једном од ацетатних група, као и то да се H_d протон налази у близини алкил-низа.

⁴ Константе купловања протона одређене су ¹H NMR симулацијом.



Слика 5.3.3. Масени спектар и структура најзаступљенијег 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (*syn*-15-метил-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетата, **4b**) идентификован у испирку *P. veris*

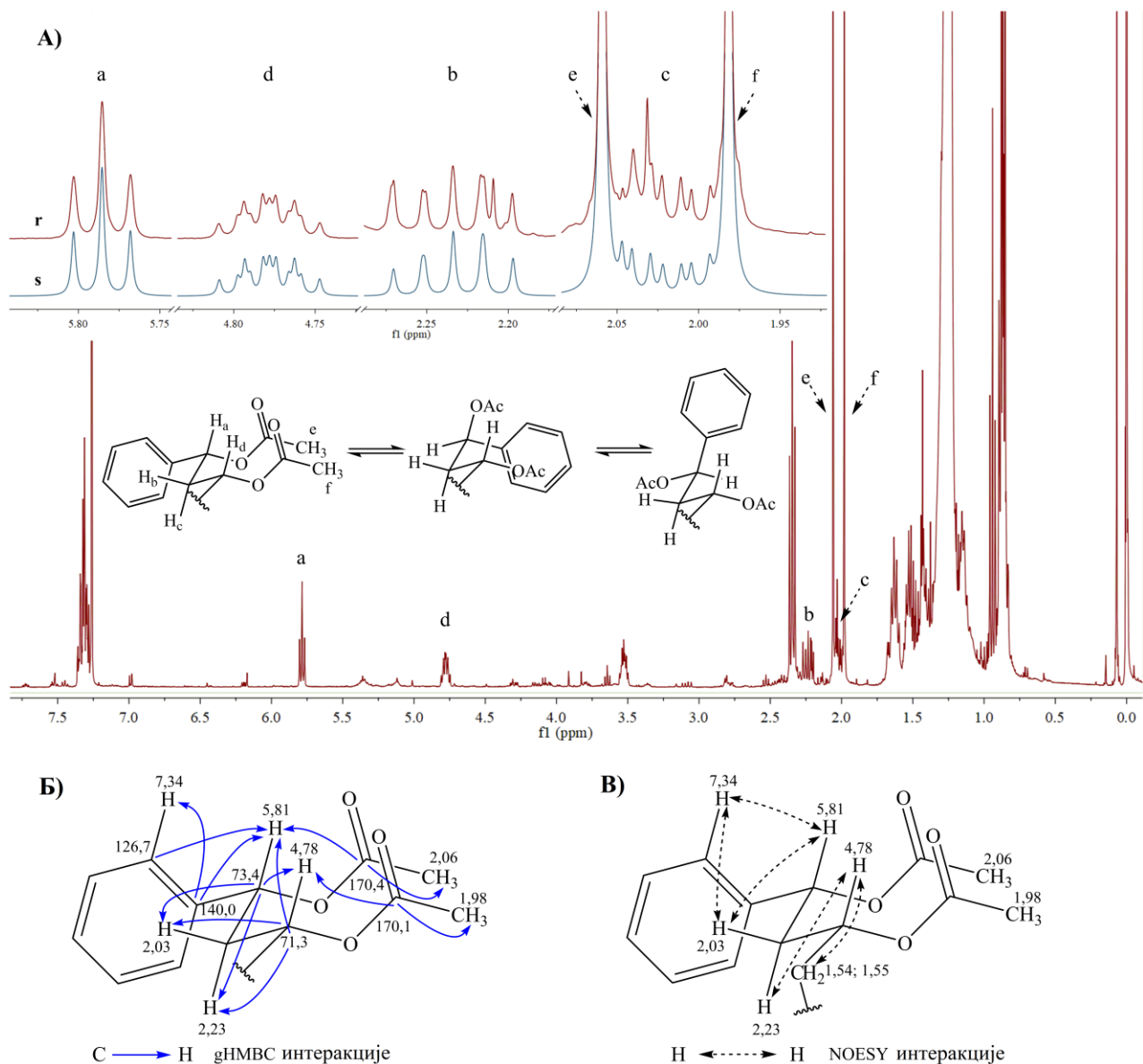
Табела 5.3.1. Релативна заступљеност *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата у хроматографској фракцији испирка *P. veris*

RI ^a	Једињење	Садржај (%)
2543	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (1a)	0,9
2608	<i>syn</i> -13-Метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (2b)	4,1
2618	<i>syn</i> -12-Метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (2c)	тр.
2646	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-пентадекадиил-диацетат (2a)	тр.
2707	<i>syn</i> -14-Метил-1-фенил-1,3-пентадекадиил-диацетат (3b)	0,2
2750	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-хексадекадиил-диацетат (3a)	4,6
2817	<i>syn</i> -15-Метил-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетат (4b)	18,6
2825	<i>syn</i> -14-Метил-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетат (4c)	2,9
2849	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-хептадекадиил-диацетат (4a)	0,1
2912	<i>syn</i> -16-Метил-1-фенил-1,3-хептадекадиил-диацетат (5b)	тр.
2951	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-октадекадиил-диацетат (5a)	8,4
3015	<i>syn</i> -17-Метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетат (6b)	2,8
3025	<i>syn</i> -16-Метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетат (6c)	0,6
3046	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-нонадекадиил-диацетат (6a)	0,8
3104	<i>syn</i> -18-Метил-1-фенил-1,3-нонадекадиил-диацетат (7b)	тр.
3152	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-еикозадиил-диацетат (7a)	тр.
Укупно идентификовано		44,0 (16)
<i>syn</i>-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата		
	<i>n</i> -низа	14,8 (7) ^б
	<i>iso</i> -низа	25,7 (6)
	<i>anteiso</i> -низа	3,5 (3)

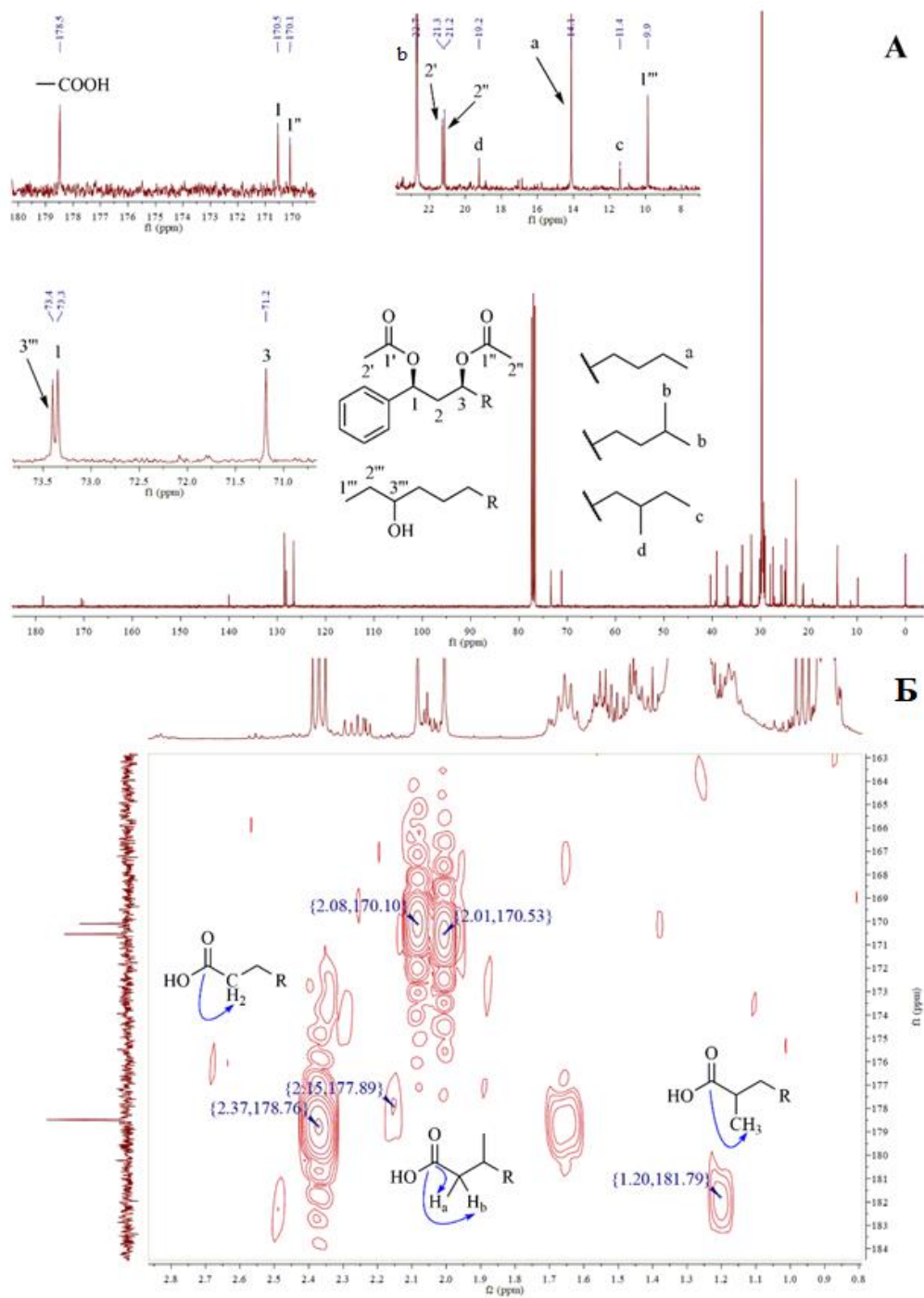
тр. – траг (<0,05%);

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (програм 1: 70(0')/5 °C min⁻¹/315(30'));

^б број у загради представља број идентификованих *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата који припадају тој класи.

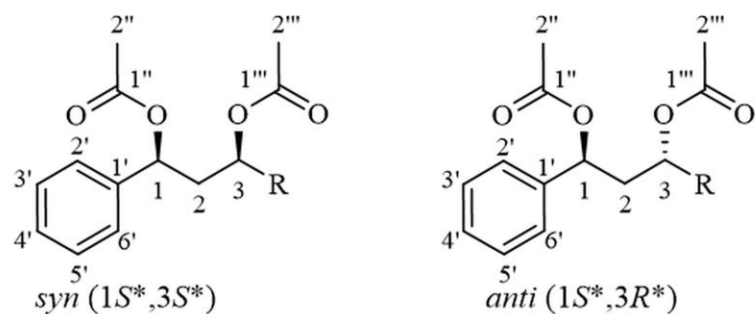


Слика 5.3.4. ^1H NMR спектар хроматографске фракције 4 испирка *P. veris*, са увећаним сигнаlima (линија црвене боје), *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (*syn*-1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c, и 7a-b, сигнали a-f). “s” линија (плаве боје) представља симулиране сигнале диацетата, а “r” линија представља одговарајућа спектрална увећања; **Б)** и **В)** одабране корелације угљеника и водоника *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата уочене у gHMBC и NOESY спектрима (*syn*-1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c, и 7a-b)

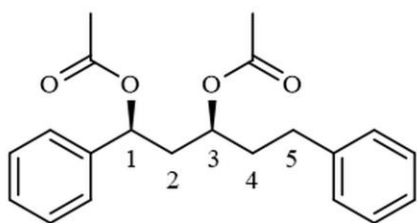


Слика 5.3.5. А) ^{13}C NMR спектар хроматографске фракције 4 испирка *P. veris* са увећањима сигнала за 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетате, 3-алканоле и крајеве алкил-низова; Б) Увећање gNMR спектра са интеракцијама кроз две и три везе које су омогућиле асигнацију угљеника из карбонилне групе 2- и 3-метил-масних киселина у ^{13}C NMR спектру.

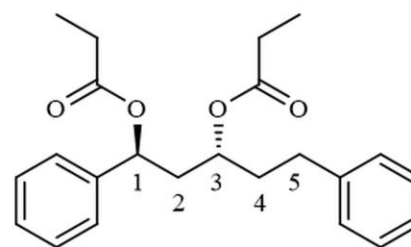
Како у молекулима 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата постоје бар два хирална центра (два за *n*- и *iso*-изомере и три за *anteiso*-изомере), могућа су два (односно четири) дијастереомера који се могу означити као *syn* ($1S^*,3S^*$) и *anti* ($1S^*,3R^*$) (слика 5.3.6., Moss, 1996). Да би се одредила мултиплетност сигнала, као и вредности константи купловања за протоне H_a , H_b , H_c и H_d , извршена је симулација ових спинских система (Radulović et al., 2019) коришћењем *MestReNova* софтверског пакета (поглавље 4.2.2.1, слика 5.3.4). Симулација је омогућила да се одреди вредност константи купловања, а на основу ових вредности и релативна конфигурација идентификованих диацетата. Такође, разлучени су сигнали диацетата од други сигнала из фракције са којима су били прекопљени. Хемијска померања протона H_a , H_b , H_c и H_d , као и добијене вредности константи купловања, упоређени су са подацима који су били доступни у литератури за сличне спинске системе. Такође, доступни су спектрални подаци за *syn*- и *anti*-1,3-диоле (Pelter et al., 1993; Hoffmann & Weidmann, 1985), што је омогућило да се уочи јасна разлика између *syn*- и *anti*-дијастереомера, јер поређење спектралних података је најрелевантније само у случају када су NMR подаци доступни за оба дијастереомера. Једини подаци, доступни за поређење са идентификованим диестрима, су они за *syn*- и *anti*-1-арил-1,3-алкадиил-диестре ($(1S,3S)$ -1,5-дифенил-1,3-пентадиил-диацетат (*syn*-изомер) и $(1S,3R)$ -1,5-дифенил-1,3-пентадиил-дипропаноат (*anti*-изомер); једињења **10** и **11**, слика 5.3.6 и табела 5.3.2; Merad et al., 2017; Niwa et al., 1987). Поређењем 1H NMR хемијских померања и константи купловања добијених анализом и симулацијом, са литературним подацима, закључује се да су диацетати, идентификовани у фракцији испирка *P. veris*, *syn*-конфигурације.



	a (n-)	b (iso-)	c (anteiso-)
R			
	n		
1	10 (0,9) ^x	/	/
2	11 (тр.)	9 (4,1)	8 (тр.)
3	12 (4,6)	10 (0,2)	/
4	13 (0,1)	11 (18,6)	10 (2,9)
5	14 (8,4)	12 (тр.)	/
6	15 (0,8)	13 (2,8)	12 (0,6)
7	16 (тр.)	14 (тр.)	/
8	0	/	/
9	5	3	2



10
syn-изомер



11
anti-изомер

Слика 5.3.6. Структуре 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата идентификованих у фракцији испирка *P. veris* (*syn*-1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c, и 7a-b), као и диацетати добијени синтезом (*syn*- и *anti*-8a и 9a-c), и једињења (10 и 11) из литературе (Merad et al., 2017; Niwa et al., 1987) коришћена за поређење; ^x – број у загради представља релативни садржај једињења идентификованих у фракцији испирка *P. veris* (тр., траг, <0,05%).

Табела 5.3.2. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (**syn-1a**, **2a-c**, **3a-b**, **4a-c**, **5a-b**, **6a-c**, и **7a-b**) из фракције испирка *P. veris* и поређење њихових NMR спектралних података са подацима из литературе (**10** и **11**; Merad et al., 2017; Niwa et al., 1987)

Положај	syn-1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c, и 7a-b		10^a	11^b
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H} (<i>syn</i>)	δ_{H} (<i>anti</i>)
1	73,3	5,7854 (dd, $J=7,15, 6,70$ Hz, 1H) ^B	5,79 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	5,79 (dd, $J=10,1, 4,1$ Hz, 1H)
2	40,4	2,0274 (ddd, $J=-14,52, 6,70, 4,50$ Hz, 1H) ^B	/	1,98-2,08 (m, 1H)
		2,2322 (ddd, $J=-14,52, 8,36, 7,15$ Hz, 1H) ^B		2,12-2,21 (m, 1H)
3	71,2	4,7779 (dddd, $J=8,36, 6,30, 6,20, 4,50$ Hz, 1H) ^B	4,85 (m, 1H)	5,14 (dddd, $J=8,7, 7,2, 5,2, 3,4$ Hz, 1H)
4	34,4	1,5200 (ddd, $J=-14,50, 7,00, 6,30$ Hz, 1H) ^B	/	/
		1,5290 (ddd, $J=-14,50, 7,00, 6,20$ Hz, 1H) ^B		
5	25,7	1,25 (m, 2H)	/	/
6-(ω -4)	29,7	1.28 (m, преклопљени сигнали)	/	/
1'	140,0	/	/	/
2', 6'	127,8	7,34 (m, 2H) ^Г	7,0-7,4 (10H)	7,12-7,37 (10H)
3', 5'	128,2	7,35 (m, 2H) ^Г		
4'	126,7	7,35 (m, 1H) ^Г		
1''	170,5	/	/	/
2''	21,2	2,0592 (s, 3H) ^б	2,01 (s, 3H)	/
1'''	170,1	/	/	/
2'''	21,3	1,9815 (s, 3H) ^б	1,95 (s, 3H)	/

^a (1*S*,3*S*)-1,5-дифенил-1,3-пентадиил-диацетат (**10**, *syn*-изомер, слика 5.3.6, Niwa et al., 1987);

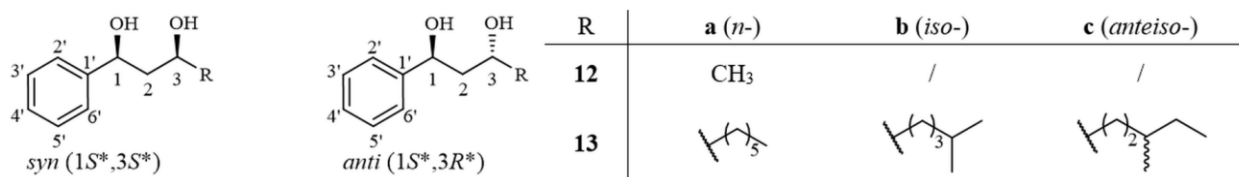
^b (1*S*,3*R*)-1,5-дифенил-1,3-пентадиил-дипропаноат (**11**, *anti*-изомер, слика 5.3.6, Merad et al., 2017);

^B хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су на основу симулације (слика 5.3.4.) коришћењем *MestReNova* софтверског пакета;

^Г хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

Релативна конфигурација (*syn*-) за 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетате потврђена је на два начина. Најпре је извршена синтеза модел-једињења, *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (**8a**, поглавље 4.4.7); комерцијално доступан 1-фенил-1,3-бутадион је редукован натријум-борхидридом, а добијени диоли (слика 5.3.7; NMR спектрални подаци добијених диола приказани су у табели у прилогу) естерификовани су сирћетном киселином.



Слика 5.3.7. Структура синтетисаних 1-фенил-1,3-алкадиола (*syn*- и *anti*-**12a**, **13a-13c**)

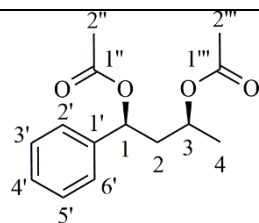
Да би се одредила релативна конфигурација интермедијерних *syn*- и *anti*-диола (**12a**, слика 5.3.7.), део узорка диола растворен у деутерисаном хлороформу, помешан са бензалдехидом, а затим је уследило снимање серије NMR спектра у одређеним временским интервалима (поглавље 4.4.8.). Добијени бензилиден-деривати (циклични ацетали), у потпуности су асигнирани на основу 1D и 2D NMR спектра (табела 5.3.3). Даље су, на основу NOESY спектра и константи купловања, дијастереомерни ацетали доведени у везу са диолима од којих су настали. *syn*-Диол је дао један циклични ацетал, бензилиден-дериват I, док је *anti*-диол формирао са бензалдехидом два циклична ацетала, бензилиден-дериват II и бензилиден-дериват III (табела 5.3.3). Релативна заступљеност бензилиден-деривата била је у слози са њиховом стабилношћу (израчуната методом молекулске механике MM+), тј. израчунатим енергијама. Може се уочити да су експериментално добијене вредности заступљености зависиле од кинетичких фактора настајања ацетала, јер се очекивала већа заступљеност *syn*-бензилиден-деривата I (табела 5.3.3). Подаци добијени овим експериментом као и поређење хемијских померања и константи купловања диацетата из фракције са синтетисаним диацетатима (NMR спектрални подаци *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (**8a**) су дати у табели 5.3.4.), недвосмислено су потврдили *syn* конфигурацију 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата у фракцији.

Табела 5.3.3. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) бензилиден-деривата *syn*- и *anti*-12a

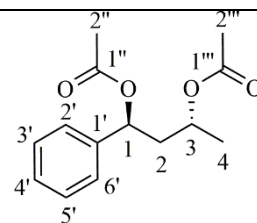
Бензилиден-дериват I (<i>syn</i>)			Бензилиден-дериват II (<i>anti</i>)			Бензилиден-дериват III (<i>anti</i>)		
Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	78,7	4,89 (dd, $J=11,3, 2,7$ Hz, 1H)	73,1	5,4104 (br d, $J=6,13, 2,30$ Hz, 1H) ^{a, 6}	73,9	5,12 (dd, $J=12,0, 2,6$ Hz, 1H)		
		1,7264 (ax, ddd, $J=-13,50, 11,30, 10,70$ Hz, 1H) ^a		2,2647 (ax, ddd, $J=-14,00, 11,40, 6,13$ Hz, 1H) ^a		1,7262 (ax, ddd, $J=-14,10, 12,00, 8,50$ Hz, 1H) ^a		
2	40,7	1,8800 (eq, ddd, $J=-13,50, 2,70, 2,40$ Hz, 1H) ^a	34,0	2,3308 (eq, ddd, $J=-14,00, 2,70, 2,30$ Hz, 1H) ^a	37,2	2,3374 (eq, ddd, $J=-14,10, 2,60, 0,90$ Hz, 1H) ^a		
3	73,3	4,13 (dq, $J=10,7, 6,2, 2,4$ Hz, 1H)	69,1	4,08 (dq, $J=11,40, 6,20, 2,70$ Hz, 1H) ^a	68,9	4,62 (dq, $J=8,50, 6,90, 0,90$ Hz, 1H) ^a		
4	21,9	1,36 (d, $J=6,2$, 3H)	21,6	1,34 (d, $J=6,2$, 3H)	17,1	1,62 (d, $J=6,9$ Hz, 1H)		
1'	101,2	5,73 (s, 3H)	95,4	5,66 (s, 3H)	94,2	6,04 (s, 3H)		
E ^b		81,8533		82,5863		91,3074		
				E₂ - E₁ = 0,733		E₃ - E₂ = 8,7211		
K ^г		45,7		33,8		1,0		
I ^д		2,24		1,32		1,0		

ax – аксијални протон; eq – екваторијални протон; ^a хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом коришћењем *MestReNova* софтверског пакета; ⁶ ширење сигнала је последица купловања *ortho*-водоника фенил-групе везане за C-1 атом; ^b E – енергија молекула (kJ/mol) израчуната коришћењем MM+ модела у оквиру *Chem 3D (Chem Office 2016)* софтверског пакета; ^г K – израчуната релативна заступљеност бензилиден-деривата, на основу вредности енергије молекула (E), на собној температури, када би се хипотетички гледано, сва три изомера налазила у међусобној равнотежи; ^д I – релативна заступљеност бензилиден-деривата у реакционој смеши, добијена интеграљењем ацеталних-водоника (H-1'); * NMR спектрални подаци за фенил-групе, ^1H NMR: 7,25-7,46 ppm, и ^{13}C NMR: 125,9, 126,3, 127,7, 128,2, 128,4, 128,5, 138,8, 141,9 ppm

Табела 5.3.4. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (**8a**).



***syn*-8a**



***anti*-8a**

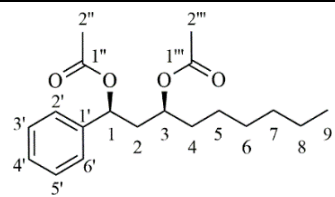
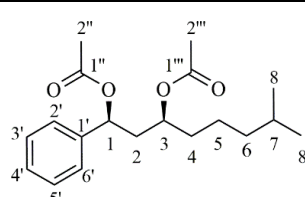
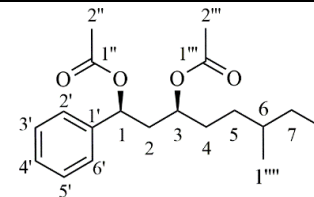
Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	73,1	5,8077 (dd, $J=7,60, 6,75$ Hz, 1H) ^a	72,2	5,8249 (dd, $J=10,35, 4,20$ Hz, 1H) ^a
2	42,2	2,2982 (ddd, $J=-14,70, 8,20, 7,60$ Hz, 1H) ^a 1,9410 (ddd, $J=-14,50, 6,75, 5,10$ Hz, 1H) ^a	42,6	2,0877 (ddd, $J=-14,70, 10,35, 3,00$ Hz, 1H) ^a 2,0263 (ddd, $J=-14,70, 10,00, 3,60$ Hz, 1H) ^a
3	67,9	4,7980 (dq, $J=8,20, 6,30, 5,10$ Hz, 1H) ^a	67,1	5,0433 (dq, $J=10,50, 6,50, 3,00$ Hz, 1H) ^a
4	20,1	1,2350 (d, $J=6,30, 3\text{H}$) ^a	20,4	1,2500 (d, $J=6,50, 3\text{H}$) ^a
1'	140,0	/	139,9	/
2', 6'	128,2	7,31 (m, 2H) ^b	128,1	7,31 (m, 2H) ^b
3', 5'	128,6	7,33 (m, 2H) ^b	128,6	7,33 (m, 2H) ^b
4'	126,5	7,32 (m, 1H) ^b	126,3	7,32 (m, 1H) ^b
1''	170,6	/	170,2	/
2''	21,2	2,0643 (s, 3H) ^a	21,1	2,0551 (s, 3H) ^a
1'''	170,4	/	170,1	/
2'''	21,25	2,0061 (s, 3H) ^a	21,24	1,9913 (s, 3H) ^a

^a хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом коришћењем *MestReNova* софтверског пакета;

^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

Синтеза *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (**8a**) омогућила је да се упореде ретенционе особине стереоизомера. Разлика ретенционих индекса ових дијастереомера износила је 14, што је блиско вредности разлике RI *iso*- и *anteiso*-региоизомера (око 8 јединица). Из овог разлога, било је потребно искључити могућност погрешне идентификације *syn*-/*anti*-стереоизомера и *iso*-/*anteiso*-региоизомера и/или других комбинација, поготову што у овом случају подаци добијени из масених спектра нису довољни да направе разлику између изомера. Главна потврда да је у фракцији било само *syn*-изомера диацетата је добијена NMR анализом, јер у спектрима није било сигнала који потичу од *anti*-дијастереомера. Ипак, да би се овај закључак још једном потврдио и уклонила сумња да је можда дошло до преклапања сигнала, синтетисана су још три *syn*-*anti*-пара *n*-, *iso*- и *anteiso*-региоизомера (поглавља 4.4.9 и 4.4.10). Најпре је продужен низ комерцијално доступног 1-фенил-1,3-бутадиона на следећи начин: извршено је двоструко депротоновање праћено алкиловањем одговарајућим изомерним алкил-халогенидом (слика 5.3.8). Добијени дикетони (**29a**, **29b** и **29c**) су, аналогно добијању краћег модел-једињења, **8a**, редуковани до диола **13a**, **13b** и **13c** (слика 5.3.7), који су потом естерификовани до диацетата **9a**, **9b** и **9c** (слика 5.3.6). Ова једињења су спектрално окарактерисана (табеле 5.3.5 и 5.3.6 и прилог). Очекивано је да се приликом NMR анализе **9c** и **13c**, због постојања трећег хиралног центра, уоче два пара *syn*-*anti*-стереоизомера. Међутим, они нису били видљиви у хроматограмима нити је у NMR спектрима било сигнала који би указивали на довољне разлике у њиховим хемијским померањима (табеле 5.3.5 и 5.3.6 и прилог). NMR подаци синтетисаних једињења (**9a**, **9b**, **9c**, **29a**, **29b** и **29c**) су у слози са спектралним подацима добијеним NMR анализом фракције. Такође, са доступним ¹³C NMR подацима за *syn*- и *anti*-изомере диола, бензилиден-деривата и диацетата, тачна хемијска померања сваког изомера се са сигурношћу могу одредити, као и корелације које међу њима постоје (Pelter et al., 1993; Hoffmann & Weidmann, 1985). Познато је да је збир ¹³C NMR хемијских померања за атоме C-1 и C-3 (хиралне центре) *syn*-изомера увек већи него збир ових померања код *anti*-изомера. Ова тврдња важи и за идентификоване диацетате, што је додатни доказ предложене релативне конфигурације (табела 5.3.7).

Табела 5.3.5. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (**9a-c**)

syn-9a

syn-9b

syn-9c^a

Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	73,3	5,7860 (dd, $J=7,15, 6,70$ Hz, 1H) ^б	73,3	5,7859 (dd, $J=7,10, 6,80$ Hz, 1H) ^б	73,4	5,7878 (dd, $J=7,25, 6,95$ Hz, 1H) ^б
		2,0110 (ddd, $J=-14,52, 6,70, 4,50$ Hz, 1H) ^б				
2	40,3	2,2350 (ddd, $J=-14,52, 8,36, 7,15$ Hz, 1H) ^б	40,3	2,2370 (ddd, $J=-14,55, 8,10, 7,10$ Hz, 1H) ^б	40,4	2,2400 (ddd, $J=-14,40, 8,1, 6,95$ Hz, 1H) ^б
		4,7790 (dddd, $J=8,36, 6,30, 6,20, 4,50$ Hz, 1H) ^б		4,7815 (dddd, $J=8,10, 6,30, 6,20, 4,50$ Hz, 1H) ^б		4,7667 (dddd, $J=8,10, 6,80, 6,15, 4,85$ Hz, 1H) ^б
3	71,2	1,5360 (ddd, $J=-14,15, 7,00, 6,30$ Hz, 1H) ^б	71,1	1,4800 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 6,30$ Hz, 1H) ^б	71,3	1,2800 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 6,80$ Hz, 1H) ^б
		1,5660 (ddd, $J=-14,15, 7,00, 6,20$ Hz, 1H) ^б		1,5300 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 6,20$ Hz, 1H) ^б		1,5400 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 6,15$ Hz, 1H) ^б
5	24,9	1,28 (m, 2H) ^б	28,0	1,29 (m, 2H) ^б	31,6	1,28 (m, 2H) ^б
6	31,7	1,26 (m, 2H) ^б	38,9	1,13 (m, 2H) ^б	34,2	1,30 (m, 1H) ^б
7	29,0	1,25 (m, 2H) ^б	27,8	1,54 (m, 1H) ^б	31,5	1,53 (m, 2H) ^б
8	22,5	1,25 (m, 2H) ^б	22,5	0,8380 (d, $J=6,70$ Hz, 6H) ^б	11,3	0,84 (t, $J=7,3$ Hz, 3H)
9	14,1	0,87 (t, $J\approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H)	/	/	/	/

1 ^{'''}	/	/	/	/	19,1	0,82 (d, J=6,8 Hz, 3H)
1'	140,0	/	140,0	/	140,0	/
2', 6'	128,1	7,30 (m, 2H) ^b	128,1	7,30 (m, 2H) ^b	128,1	7,30 (m, 2H) ^b
3', 5'	128,6	7,33 (m, 2H) ^b	128,6	7,33 (m, 2H) ^b	128,6	7,33 (m, 2H) ^b
4'	126,6	7,33 (m, 1H) ^b	126,6	7,33 (m, 1H) ^b	126,6	7,33 (m, 1H) ^b
1''	170,1	/	170,1	/	170,1	/
2''	21,3	2,0600 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>anti</i> -изомера) ^b	21,3	2,0617 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>anti</i> -изомера) ^b	21,3	2,0615 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>anti</i> -изомера) ^b
1'''	170,5	/	170,5	/	170,5	/
2'''	21,2	1,9800 (s, 3H) ^b	21,2	1,9857 (s, 3H) ^b	21,1	1,9900 (s, 3H) ^b

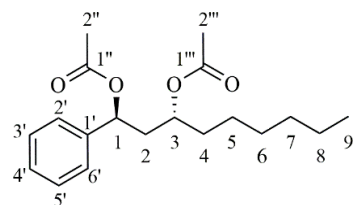
^a хемијска померања два могућа стереоизомера, услед постојања стереоцентра на С-6, нису уочена;

^b хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом *MestReNova* софтверског пакета;

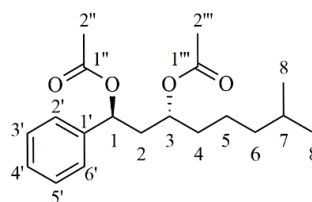
^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

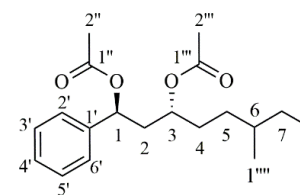
Табела 5.3.6. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *anti*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (**9a-c**)



anti-9a



anti-9b



anti-9c^a

Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	72,1	5,7841 (dd, $J=10,35, 3,90$ Hz, 1H) ^δ	72,1	5,7849 (dd, $J=10,10, 3,95$ Hz, 1H) ^δ	72,1	5,7875 (dd, $J=10,40, 4,40$ Hz, 1H) ^δ
		1,9620 (ddd, $J=-14,70, 10,10, 3,90$ Hz, 1H) ^δ		1,9620 (ddd, $J=-14,80, 10,00, 3,95$ Hz, 1H) ^δ		1,9702 (ddd, $J=-14,40, 10,30, 4,40$ Hz, 1H) ^δ
2	40,8	2,1180 (ddd, $J=-14,70, 10,35, 3,10$ Hz, 1H) ^δ	40,8	2,1195 (ddd, $J=-14,80, 10,10, 3,10$ Hz, 1H) ^δ	40,9	2,1200 (ddd, $J=-14,40, 10,40, 3,10$ Hz, 1H) ^δ
3	70,3	5,0560 (dddd, $J=10,10, 7,25, 5,10, 3,10$ Hz, 1H) ^δ	70,3	5,0600 (dddd, $J=10,00, 7,40, 5,15, 3,10$ Hz, 2H) ^δ	70,5	5,0449 (dddd, $J=10,30, 7,10, 5,8, 3,1$ Hz, 1H) ^δ
		1,5360 (ddd, $J=-14,50, 7,25, 7,00$ Hz, 1H) ^δ		1,4700 (ddd, $J=-14,30, 7,40, 7,00$ Hz, 1H) ^δ		1,1500 (ddd, $J=-14,30, 7,10, 7,00$ Hz, 1H) ^δ
4	34,7	1,5600 (ddd, $J=-14,50, 7,00, 5,10$ Hz, 1H) ^δ	34,9	1,5400 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 5,15$ Hz, 1H) ^δ	34,4	1,5500 (ddd, $J=-14,30, 7,00, 5,80$ Hz, 1H) ^δ
5	25,0	1,28 (m, 2H) ^B	27,7	1,29 (m, 2H) ^B	31,6	1,28 (m, 1H) ^B
6	29,1	1,26 (m, 2H) ^B	38,7	1,12 (m, 2H) ^B	34,2	1,30 (m, 2H) ^B
7	31,7	1,25 (m, 2H) ^B	27,8	1,54 (m, 1H) ^B	31,5	1,53 (m, 2H) ^B
8	22,5	1,25 (m, 2H) ^B	22,5	0,8538 (d, $J=7,10$ Hz, 6H) ^δ	11,3	0,84 (t, $J=7,3$ Hz, 3H)

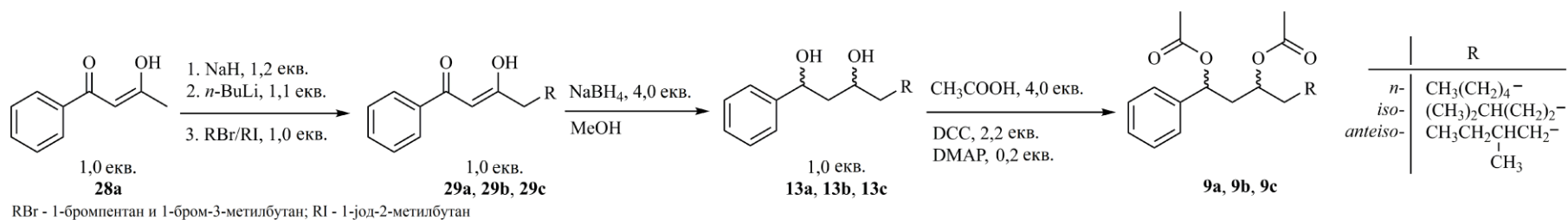
9	14,1	0,87 (t, $J \approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H)	/	/	/	/
1 ^{'''}	/	/	/	/	19,1	0,82 (d, $J=6,8$ Hz, 3H)
1'	140,5	/	140,5	/	140,5	/
2', 6'	128,0	7,30 (m, 2H) ^B	128,0	7,30 (m, 2H) ^B	128,0	7,30 (m, 2H) ^B
3', 5'	128,5	7,33 (m, 2H) ^B	128,5	7,33 (m, 2H) ^B	128,5	7,33 (m, 2H) ^B
4'	126,3	7,33 (m, 1H) ^B	126,3	7,33 (m, 1H) ^B	126,3	7,33 (m, 1H) ^B
1''	170,2	/	170,2	/	170,2	/
2''	21,14	2,0600 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>syn</i> -изомера) ^б	21,2	2,0617 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>syn</i> -изомера) ^б	21,14	2,0615 (s, 3H, преклопљен са сигналом Н-2'' <i>syn</i> -изомера) ^б
1'''	170,7	/	170,7	/	170,7	/
2'''	21,10	2,0101 (s, 3H) ^б	21,1	2,0090 (s, 3H) ^б	21,1	2,0100 (s, 3H) ^б

^a хемијска померања два могућа стереоизомера, услед постојања стереоцентра на С-6, нису уочена;

^б хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом *MestReNova* софтверског пакета;

^B хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.



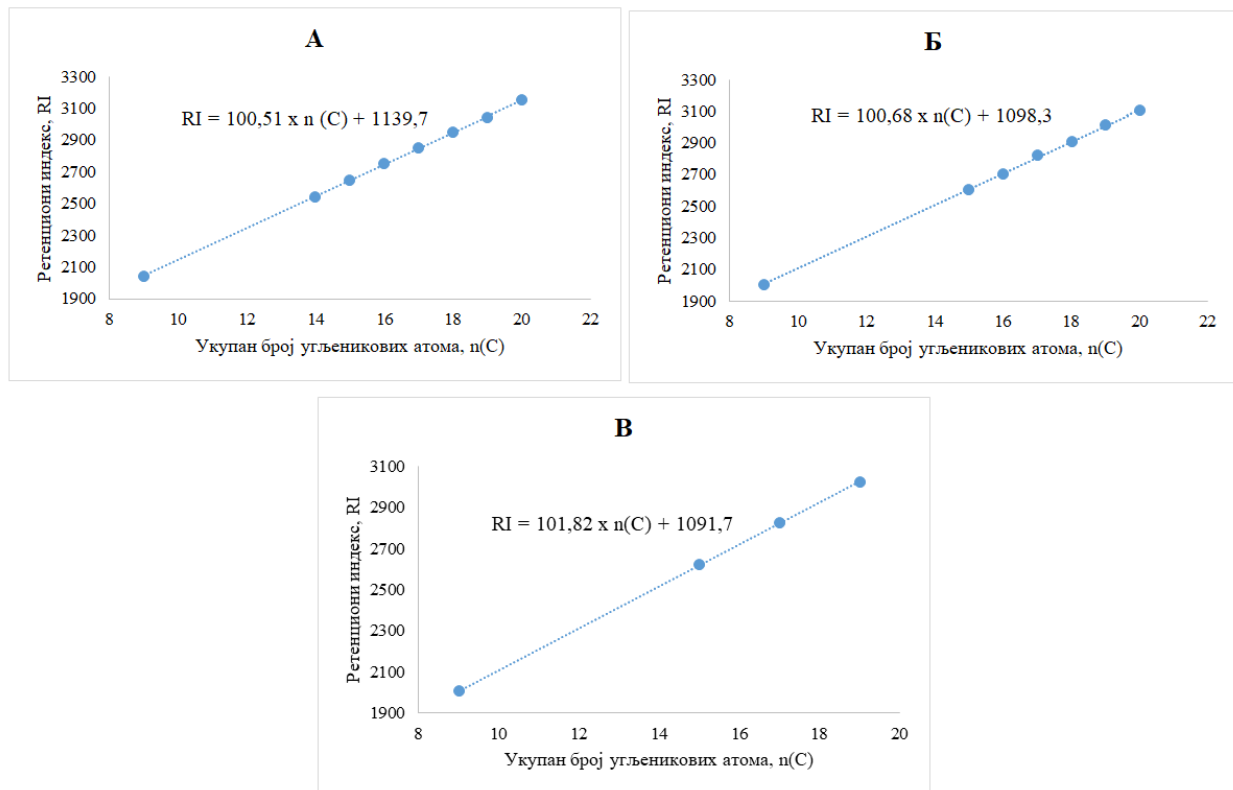
Слика 5.3.8. Синтетска шема 1-фенил-1,3-нонадиил-диацетата, 7-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата (*syn*- и *anti*-**9a-c**)

Табела 5.3.7. Поређење збира ^{13}C NMR хемијских померања угљеника C-1 и C-3 (хирални центри) *syn*- и *anti*-изомера 1-фенил-1,3-алкадиола, њихових бензилиден-деривата, и 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата

1-Фенил-1,3-алкадиоли	Σ (C-1 + C-3)		1-Фенил-1,3-алкадиил-диацетати	Σ (C-1 + C-3)	
	<i>syn</i>	<i>anti</i>		<i>syn</i>	<i>anti</i>
12a	144,2	137,2	8a	141,0	139,9
13a	148,3	141,0	9a	144,5	142,4
13b	148,2	141,0	9b	144,4	142,4
13c	148,7	141,3	9c	144,7	142,6
Бензилиден-деривати	152,0 (I)	142,2 (II) 142,8 (III)	1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c и 7a-b	144,6	

Последњи корак у расветљавању структуре и релативне конфигурације диацетата је спајање нефункционализованог краја низа са функционализованим. Једино се код најзаступљенијег диацетата (**4b**) у фракцији могао јасно видети молекулски јон, што је омогућило да се одреди број угљеникових атома у молекулу (слика 5.3.3). Код осталих диацетата, дужина угљоводоничног ланца у молекулу одређена је на основу фрагментног јона који одговара маси молекулског јона умањеној за масу молекула сирћетне киселине ($[\text{M} - 60]^+$), који је био јасно уочљив и код свих осталих диацетата.

Од раније је познато да постоји линеарна корелација између броја угљеникових атома у ланцу и ретенционих индекса (Peng, 2010; 2000). Извршена је корелација ретенционих индекса диацетата природног порекла, заједно са онима добијених синтезом, и њихових дужина угљоводоничног ланца, засебно за сваку серију регио- или стереоизомера. Добијене корелационе једначине у потпуности потврђују да су у фракцији 4 испирка *P. veris* присутни само *syn*-стереоизомери диацетата (слика 5.3.9). За све једначине R^2 је износио $>0,999$. Такође, на овај начин, може се решити проблем одређивања дужине угљоводоничног ланца у молекулу када у масеном спектру није уочљив M^+ јон.



Слика 5.3.9. Корелација броја угљеникових атома у алкил-низу и ретенционих индекса диацетата природног порекла (*syn-1a*, *2a-c*, *3a-b*, *4a-c*, *5a-b*, *6a-c*, *7a-b*) и добијених синтезом (*syn-9a-c*): *n*-низ (**А**), (ω -1)-метил-низ (**Б**) и (ω -2)-метил-низ (**В**); сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$

На овај начин, идентификовано је укупно 16 *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (*syn-1a*, *2a-c*, *3a-b*, *4a-c*, *5a-b*, *6a-c* и *7a-b*) са дужином угљоводоничног ланца од 14 до 20 угљеникових атома подељених у три серије *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера (табела 5.3.1), који представљају нова једињења. До сада су у узорцима природног порекла идентификована само једињења сличних структура. Липиди полена сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) садрже *n*-1-фенил-1,3-дикетоне, као и њима сродне хидроксикетоне и диоле (Schulz et al., 2000). Поред тога што су 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетати нова једињења, треба истакнути да су *iso*-изомери заступљенији у односу на *n*-изомере: 1,8 : 1 на основу односа површина пикова у хроматограму, што ове молекуле чини јединственим.

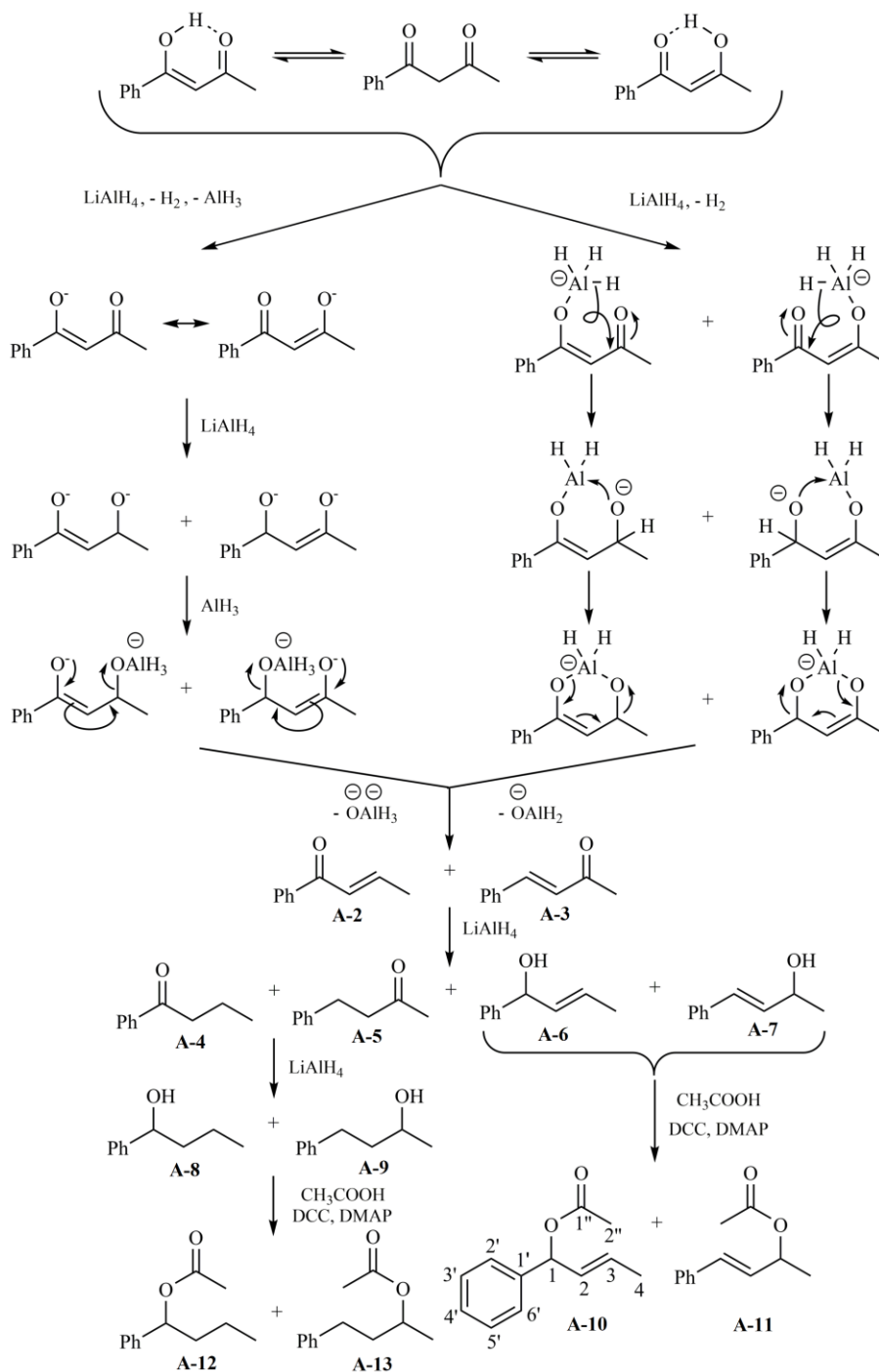
5.3.1.1. Редукција 1-фенил-1,3-бутадиона литијум-алуминијум-хидридом и ацетиловање добијених производа: NMR и GC-MS анализа

Као што је у претходном поглављу описано, у циљу потврде структуре идентификованих *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата, синтетисани су одговарајући стандарди, а по иницијалном плану, један од корака синтезе била је редукција 1-фенил-1,3-алкадиона до одговарајућих диола, коришћењем литијум-алуминијум-хидрида. Најпре је извршена редукција краћег диона, 1-фенил-1,3-бутадиона. Нажалост, реакциона смеша након редукције није садржавала 1,3-диоле, већ смешу фенилбут(ен)она и фенилбут(ен)ола (слика 5.3.10).

Познато је да, редукцијом 1,3-дикетона коришћењем литијум-алуминијум-хидрида, дикето и кетенолни таутомери дају другачије производе редукције, у различитом приносу. Очекивано је да се дикетони редукују директно до диола, док би кетеноли требало да дају производе елиминације, засићене и незасићене кетоне и алкоhole (Frankenfeld & Tyler, 1971), због брже кисело-базне реакције са литијум-алуминијум-хидридом. Добијени су очекивани производи редукције 1-фенил-1,3-бутадиона литијум-алуминијум-хидридом (**A-2** – **A-9**; слика 5.3.10). На основу интегралнења протонског NMR спектра, кетенолног облика има 90%, а дикето-облика 1-фенил-1,3-бутадиона око 10%. Разматрана су два различита механизма редукције 1-фенил-1,3-бутадиона литијум-алуминијум-хидридом (слика 5.3.10). У првом случају, литијум-алуминијум-хидрид, као база, депротонује кетенолни облик 1-фенил-1,3-бутадиона, тачније, кинетички и термодинамички киселија ОН група се брже депротонује од СН групе, из дикето-облика. Затим се хидридни јон из другог молекула литијум-алуминијум-хидрида адире на карбонилни угљеник кетона. Двоструко негативно наелектрисана врста се даље координира за алан и тако се гради боља одлазећа група (двоструко негативно наелектрисани алуминат).

Други могући пут редукције је интрамолекулско премештање хидрида са алумината, који је настао депротоновањем енола и координацијом алана (слика 5.3.10). Ово премештање хидрида се одвија преко шесточланог прелазног стања. Након премештања, могуће је да се Луисовим (*Lewis*) кисело-базним реакцијама поново формира циклични интермедијер који би подлегао елиминацији једном негативно наелектрисане одлазеће

групе, алумината. Без додатних испитивања механизма реакције није могуће тачно одредити који би пут редукције био вероватнији. Други пут редукције укључује стабилније интермедијере и боље одлазеће групе, па је он вероватнији. Такође, могуће је предложити и друге механизме редукције.



Слика 5.3.10. Предлог механизма редукције 1-фенил-1,3-бутадиона литијум-алуминијум-хидридом

Добијени коњуговани енони (**A-2** и **A-3**) даље се, директном и/или коњугованом адицијом, преводе у производе **A-4** – **A-9**. Да би се лакше одредила структура добијених производа, сирова реакциона смеша је ацетилована (по Штеглиху, поглавље 4.4.5; **A-10** – **A-13**), а затим су састојци ацетиловане реакционе смеше раздвајани *dry-flash* хроматографијом. Квантификација једињења **A-2** – **A-5** и **A-10** – **A-13** извршена је интегралнењем површина испод пикова у хроматограмима укупне јонске струје. Под претпоставком да је ацетиловање било квантитативно, а и на основу релативних количина идентификованих анализата, најзаступљеније је било једињење **A-10**, што сугерише да је редукција ишла у правцу настајања једињења **A-6**, односно **A-2** (слика 5.3.10). Уколико се укупна процентуална заступљеност **A-2**, као и осталих једињења добијених из **A-2**, упореди са укупном заступљеношћу **A-3** и једињења добијених из **A-3**, закључује се да приликом редукције стартног дикетона литијум-алуминијум-хидридом, брже реагује мање стерно заклоњена/некоњугована карбонилна група, тј. она која је удаљенија од фенил-групе (слика 5.3.10).

Анализом сирове реакционе смеше добијене након редукције, и смеше добијене након ацетиловања, као и самих фракција, није утврђено присуство диола или њихових ацетата, чак ни у траговима. Може се претпоставити да велика заступљеност кетенолног облика у таутомерној смеси, као и бржа протолитичка реакција у односу на реакцију адиције, диктирају крајњи исход редукције 1-фенил-1,3-бутадиона литијум-алуминијум-хидридом. Редукцијом 1-фенил-1,3-бутадиона коришћењем мање базног NaNH_4 добијају се само диоли (поглавље 4.4.7; Radulović & Živković Stošić, 2021). Треба нагласити и чињеницу да диоли лако подлежу дехидратацији, па под условима обраде реакционе смеше може доћи до елиминације молекула воде при чему могу настати производи **A-6** и **A-7**. Како је приликом редукције натријум-бор-хидридом реакциона смеша обрађена под базним условима, не очекује се да дође до дехидратације добијених диола.

Пикови фенилбут(ен)ола у хроматограму сирове реакционе смеше били су широки и преклопљени другим пиковима, па није било могуће одредити тачне вредности ретенционих индекса за фенилбут(ен)оле. Из тог разлога, сирова реакциона смеша добијена након редукције је ацетилована, а добијени производи су раздвајани *dry-flash* хроматографијом. Након раздвајања, одређени су ретенциони индекси за фенилбут(ен)оне и фенилбут(ен)ил-ацетате.

Табела 5.3.8. Ретенциони индекси кетона (**A-2** – **A-5**) и ацетата (**A-10** – **A-13**) на колони DB-5MS

Кетони	RI	Ацетати	RI
A-2	1308	A-10	1370
A-3	1356	A-11	1462
A-4	1254	A-12	1348
A-5	1239	A-13	1391

Различит тип коњугације код изомера **A-2** и **A-3** изазива велику разлику вредности њихових ретенционих индекса. Због линеарне коњугације, једињење **A-3** је поларније од једињења **A-2**, где је присутна укрштена коњугација, што резултује већом тачком кључања и за 48 јединица вишом вредношћу RI за једињење **A-3** у односу на једињење **A-2**. Утицај коњугације на вредности RI се може видети и у случају једињења **A-4** и **A-5**. Вредност ретенционог индекса једињења **A-5** је 15 јединица нижа јер не постоји коњугација између бензена и карбонилне групе, већ су између њих две σ -везе (табела 5.3.8). Међу изомерима, највећу разлику вредности ретенционих индекса имају ацетати **A-10** и **A-11**, где изомер **A-11** има за 97 јединица већу вредност. Као први разлог можемо навести то да су у молекулу **A-11** бензеново језгро и двогуба веза у коњугацији, док је код једињења **A-10** ова коњугација прекинута. Други разлог је тај што је ацетатна група у различитим положајима, у унутрашњости молекула **A-10** и на крају низа молекула **A-11**. Као што је већ поменуто (поглавље 4.4.13), одређене су вредности ретенционих индекса триметилсиллил-деривата региоизомерних *sec*-алкохола са положајем хидроксилне групе од 2 до 10. Уочено је да деривати чија је функционална група померена ка унутрашњости ланца имају ниже вредности ретенционих индекса. Када је функционална група померена ка унутрашњости молекула, смањује се укупна површина молекула, а самим тим се и смањује интеракција са другим молекулима и стационарном фазом GC-колоне. Ови стерни ефекти такође могу бити последица разлике у вредности ретенционих индекса између једињења **A-12** и **A-13** ($RI_{A-13} - RI_{A-12} = 43$). Ацетил-група која се у молекулу **A-13** налази близу краја ланца, вероватно може да оствари више интеракција са колоном него ли молекул **A-12** чија је ацетил-група унутрашња (табела 5.3.8).

Уколико се упореде вредности ретенционих индекса засићених и незасићених парова фенилбут(ен)она и фенбут(ен)ил-ацетата, долази се до закључка да увођење двогубе везе у молекулу повећава вредност RI . Уколико увођење π -везе резултује коњугацијом, вредност RI расте у зависности од типа коњугације, на пример, уколико настаје линеарна коњугација, онда је $R_{A-3} - R_{A-5}=102$, а уколико настаје укрштена коњугација, онда је $R_{A-2} - R_{A-4}=54$. Такође, уколико је уведена коњугација дужа, већи је раст ретенционог индекса $R_{A-3} - R_{A-5}=102$ и $R_{A-11} - R_{A-13}=71$. Чак и само увођење двогубе везе у молекулу, без грађења коњугованог система, повећава вредност ретенционог индекса, $R_{A-10} - R_{A-12}=22$.

Снимљени су 1D и 2D NMR спектри (у $CDCl_3$) производа редукције 1-фенил-1,3-бутадiona литијум-алуминијум-хидридом, као и хроматографских фракција ацетиловане реакционе смеше. Анализом NMR спектара одређене су структуре фенилбут(ен)ола, фенилбут(ен)она и фенилбут(ен)ил-ацетата. Сигнали неких протона били су сложени и није било могуће директно из 1H NMR спектра одредити хемијска померања и константе купловања. Хемијска померања и константе купловања одређена су симулацијом сигнала протона коришћењем Mestrelab Research S.L. (MestReNova) софтверског пакета (поглавље 4.2.2.1, Radulović et al., 2019; табеле 5.3.9, 5.3.10 и 5.3.11 и слике 5.3.11 и 5.3.12). Ради поређења, нумерација атома је била иста за сва једињења и приказана је на слици 5.3.10.

Како су у свим молекулима сигнали протона фенил-групе били сложени и/или преклопљени, они нису симулирани. Протони у бензилном положају, H-1, фенилбут(ен)она (A-3, табела 5.3.9), фенилбут(ен)ола (A-6, A-7 и A-8, табела 5.3.10), и фенилбут(ен)ил-ацетата (A-10, A-11 и A-12, табела 5.3.11), били су широки, због купловања са *o*-, *m*- и *p*-водоницима бензеновог језгра. Из овог разлога протони са бензеновог језгра су укључени у симулацију, а њихова константа купловања са другим протонима из молекула је била мања од 1 Hz. На основу велике вредности константе купловања протона на двогубим везама ($J > 15$ Hz), могло се закључити да су двогубе везе свих незасићених једињења *trans*-конфигурације. Вредност константе купловања протона двогубе везе је варијала у зависности од положаја двогубе везе у молекулу. Протони двогубе везе која је у коњугацији са бензеновим језгром (A-7 и A-11) имали су већу вредност константи купловања (~ 1 Hz) у односу на она једињења у којима двогубе веза није била у коњугацији са бензеновим језгром (A-6 и A-10). Такође, у зависности од типа коњугације у молекулу, варира и вредност J . На пример, протони двогубе везе која је део

укрштене коњугације (А-2) имали су мању вредност J (1 Hz) у односу на протоне двогубе везе која је део линеране коњугације.

Табела 5.3.9. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних кетона

Положај	А-2		А-3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	/	190,8	7,52 (br d, $J=16,3$ Hz, 1H)	143,5
2	6,91 (dq, $J=15,3$, -1,6 Hz, 1H)	128,0	6,72 (d, $J=16,3$ Hz, 1H)	127,2
3	7,08 (dq, $J=15,3$, 6,8 Hz, 1H)	145,3	/	198,5
4	2,00 (dd, $J=6,8$, -1,6 Hz, 3H)	18,6	2,39 (s, 3H)	27,5
1'	/	137,9	/	134,4
2', 6'	7,92 (m, 2H) ^a	128,3	7,55 (m, 2H) ^a	128,3
3', 5'	7,50 (m, 2H) ^a	129,0	7,39 (m, 2H) ^a	129,0
4'	7,55 (m, 1H) ^a	132,7	7,40 (m, 1H) ^a	130,5

	А-4		А-5	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	/	200,4	2,8931 (ddd, $J=-16,00$, 8,00, 6,00 Hz, 1H) ^б	29,7
2	2,9385 (ddd, $J=-13,60$, 8,00, 7,10 Hz, 1H) ^б	40,6	2,7598 (ddd, $J=-15,10$, 8,10, 6,00 Hz, 1H) ^б	45,2
	2,9455 (ddd, $J=-13,60$, 8,10, 7,45 Hz, 1H) ^б		2,7598 (ddd, $J=-15,10$, 8,00, 5,90 Hz, 1H) ^б	
3	1,7375 (ddqd, $J=-13,40$, 8,00, 7,50, 7,45 Hz, 1H) ^б	17,8	/	207,9
	1,7775 (ddqd, $J=-13,40$, 8,10, 7,30, 7,10 Hz, 1H) ^б			
4	1,003 (dd, $J=7,50$, 7,30 Hz, 3H) ^б	13,9	2,1359 (s, 3H) ^б	30,1
1'	/	135,2	/	141,0
2', 6'	7,96 (m, 2H) ^a	128,2	7,18 (m, 2H) ^a	128,3
3', 5'	7,52 (m, 2H) ^a	127,9	7,27 (m, 2H) ^a	128,5
4'	7,78 (m, 1H) ^a	133,0	7,19 (m, 1H) ^a	126,1

^a хемијска померања су прочитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

^б хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом коришћењем *MestReNova* софтверског пакета;

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

Табела 5.3.10. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних алкохола

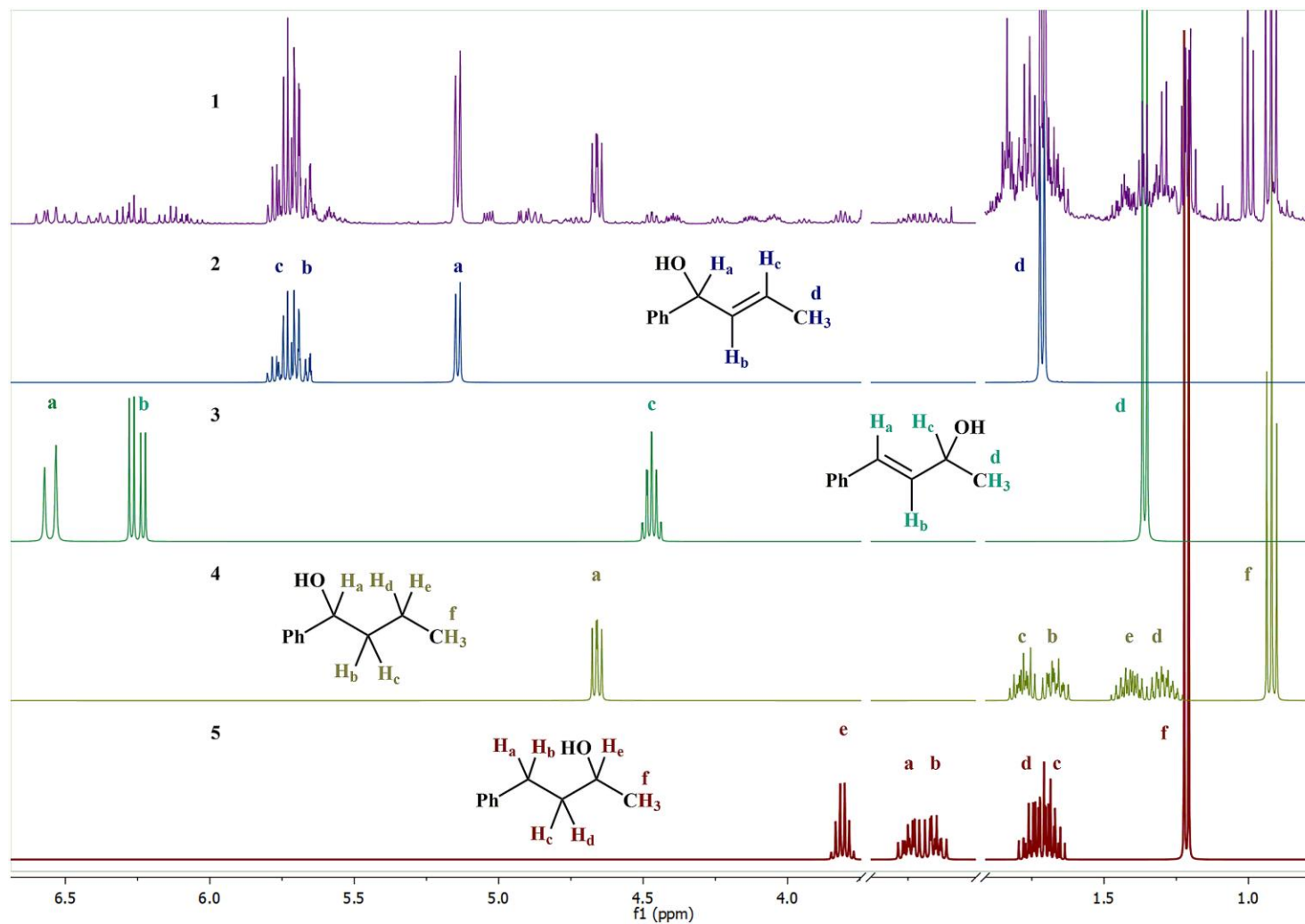
Положај	А-6		А-7	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	5,1417 (br dd, $J=6,90$, $-1,08$ Hz, 1H) ^a	75,2	6,5511 (br dd, $J=15,90$, $-1,10$ Hz, 1H) ^a	131,2
2	5,6855 (ddd, $J=15,05$, $6,90$, $-1,60$ Hz, 1H) ^a	133,1	6,2518 (dd, $J=15,90$, $6,55$ Hz, 1H) ^a	133,7
3	5,7520 (dqd, $J=15,05$, $6,80$, $-1,08$ Hz, 1H) ^a	126,6	4,4705 (dqd, $J=6,55$, $6,45$, $-1,10$ Hz, 1H) ^a	69,1
4	1,7138 (br dd, $J=6,80$, $-1,60$ Hz, 3H) ^a	17,8	1,3592 (d, $J=6,45$ Hz, 3H) ^a	23,5
1'	/	143,0	/	131,0
2', 6'	7,26 (m, 2H) ^b	127,2	7,25 (m, 2H) ^b	128,3
3', 5'	7,33 (m, 2H) ^b	128,4	7,28 (m, 2H) ^b	128,5
4'	7,27 (m, 1H) ^b	127,4	7,30 (m, 1H) ^b	127,2

	А-8		А-9	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	4,6600 (br dd, $J=7,35$, $5,80$ Hz, 1H) ^a	74,5	2,7439 (ddd, $J=-13,5$, $9,70$, $6,10$ Hz, 1H) ^a	32,2
	1,6700 (dddd, $J=-13,20$, $9,20$, $7,35$, $5,80$ Hz, 1H) ^a		2,6571 (ddd, $J=-13,5$, $9,40$, $6,80$ Hz, 1H) ^a	
2	1,7800 (dddd, $J=-13,20$, $9,80$, $5,80$, $5,60$ Hz, 1H) ^a	41,2	1,6845 (dddd, $J=-13,6$, $9,40$, $6,30$, $6,10$ Hz, 1H) ^a	40,5
	1,2922 (ddqd, $J=-13,30$, $9,20$, $7,00$, $5,60$ Hz, 1H) ^a		1,7458 (dddd, $J=-13,6$, $9,70$, $6,80$, $6,15$ Hz, 1H) ^a	
3	1,4300 (ddqd, $J=-13,30$, $9,80$, $6,80$, $5,80$ Hz, 1H) ^a	19,1	3,8101 (dqd, $J=6,30$, $6,25$, $6,15$ Hz, 1H) ^a	67,7
4	0,92 (dd, $J=7,00$, $6,80$ Hz, 3H) ^a	14,1	1,2145 (d, $J=6,25$, 3H) ^a	22,2
1'	/	145,1	/	142,1
2', 6'	7,33 (m, 2H) ^b	128,4	7,20 (m, 2H) ^b	126,3
3', 5'	7,32 (m, 2H) ^b	128,5	7,25 (m, 2H) ^b	127,2
4'	7,26 (m, 2H) ^b	127,6	7,19 (m, 2H) ^b	126,0

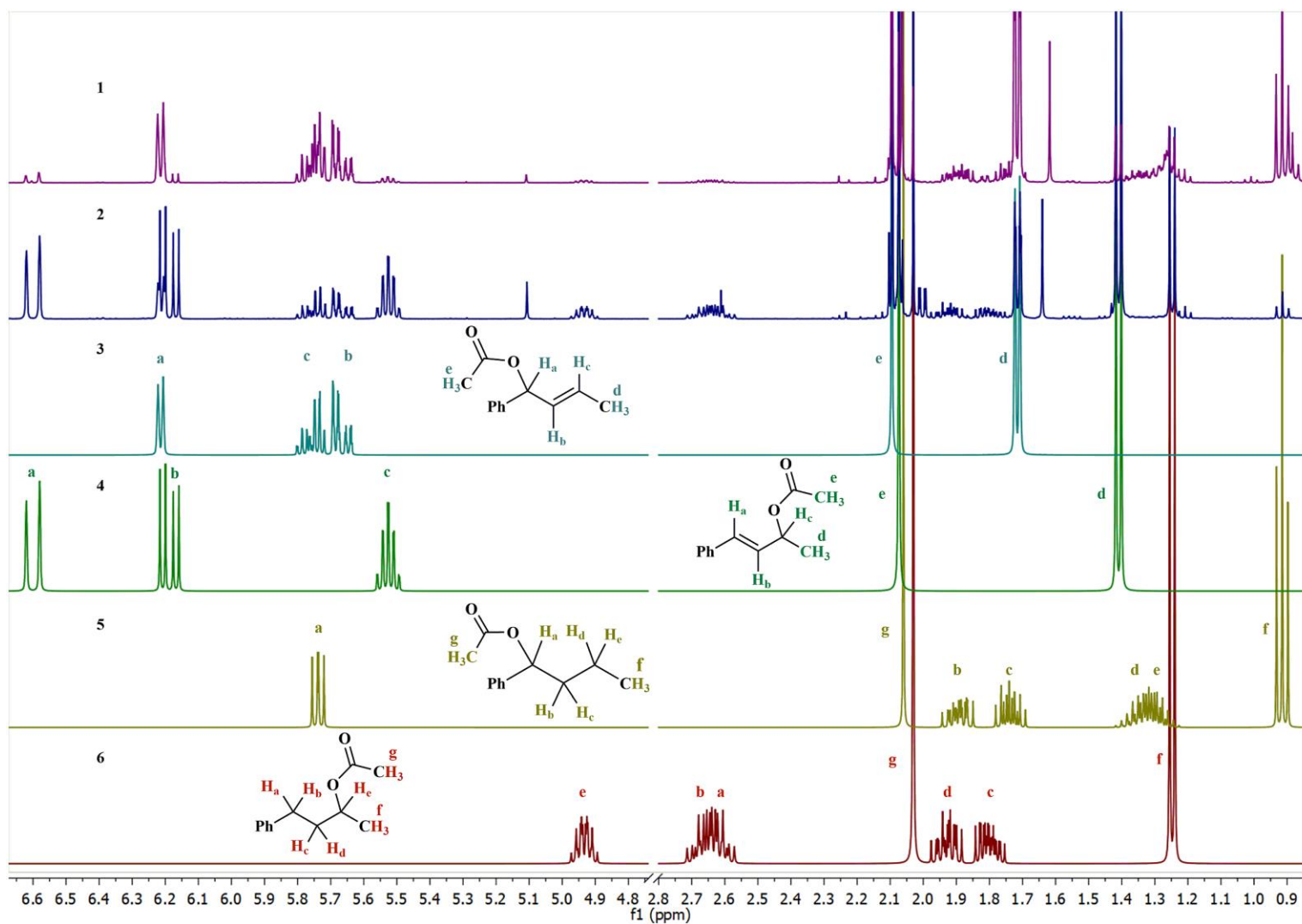
^a хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом коришћењем *MestReNova* софтверског пакета;

^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.



Слика 5.3.11. 1) Увећања ^1H NMR спектра реакционе смеше након редукције 1-фенил-1,3-бутадiona литијум-алуминијум-хидридом; симулирани сигнали: 2) (*E*)-1-фенил-2-бутен-1-ол, **A-6**, 3) (*E*)-4-фенил-3-бутен-2-ол, **A-7**, 4) 1-фенил-1-бутанол, **A-8**, 5) 4-фенил-2-бутанол, **A-9**



Слика 5.3.12. 1) и 2) Увећања ¹H NMR спектра хроматографских фракција; симулирани сигнали: 3) (E)-1-фенил-2-бутен-1-ил-ацетат, A-10, 4) (E)-4-фенил-3-бутен-2-ил-ацетат, A-11, 5) 1-фенилбутил-ацетат, A-12, 6) 4-фенил-2-бутил-ацетат, A-13

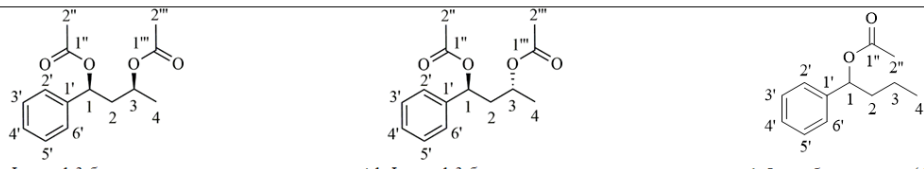
Табела 5.3.11. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних ацетата

Положај	А-10		А-11	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	6,2142 (br ddd, $J=6,50, -1,20, 0,80$ Hz, 1H) ^a	76,3	6,5990 (br dd, $J=16,10, -1,10$ Hz, 1H) ^a	131,6
2	5,6702 (ddq, $J=15,10, 6,50, -1,35$ Hz, 1H) ^a	129,5	6,1886 (dd, $J=16,10, 6,80$ Hz, 1H) ^a	128,8
3	5,7558 (dq, $J=15,10, 6,20, -1,20$ Hz, 1H) ^a	129,6	5,5260 (ddd, $J=6,80, 6,50, -1,10$ Hz, 1H) ^a	71,0
4	1,7155 (ddd, $J=6,20, -1,35, 0,80$ Hz, 3H) ^a	17,8	1,4095 (d, $J=6,50$ Hz, 3H) ^a	20,4
1'	/	139,7	/	136,4
2', 6'	7,27 (m, 2H) ^b	127,6	7,30 (m, 2H) ^b	128,4
3', 5'	7,33 (m, 2H) ^b	128,6	7,32 (m, 2H) ^b	128,7
4'	7,30 (m, 1H) ^b	128,1	7,35 (m, 1H) ^b	127,5
1''	/	170,1	/	170,3
2''	2,0952 (s, 3H) ^a	21,4	2,0738 (s, 3H) ^a	21,5
Положај	А-12		А-13	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	5,7381 (br dd, $J=7,80, 6,35$ Hz, 1H) ^a	75,9	2,6125 (ddd, $J=-13,80, 9,65, 6,20$ Hz, 1H) ^a 2,6714 (ddd, $J=-13,80, 10,20, 5,80$ Hz, 1H) ^a	37,6
2	1,8940 (dddd, $J=-13,30, 9,75, 7,80, 6,30$ Hz, 1H) ^a 1,7372 (dddd, $J=-13,30, 9,90, 6,40, 6,35$ Hz, 1H) ^a 1,3502 (ddqd, $J=-13,40, 9,75, 7,00, 6,40$ Hz, 1H) ^a	38,5	1,8005 (dddd, $J=-13,70, 10,20, 6,20, 5,00$ Hz, 1H) ^a 1,9281 (dddd, $J=-13,70, 9,65, 7,90, 5,80$ Hz, 1H) ^a	31,8
3	1,2938 (ddqd, $J=-13,40, 9,90, 6,80, 6,30$ Hz, 1H) ^a	20,3	4,9334 (dq, $J=7,90, 6,20, 5,00$ Hz, 1H) ^a	70,5
4	0,9152 (dd, $J=7,00, 6,80$ Hz, 3H) ^a	13,9	1,2475 (d, $J=6,20$ Hz, 3H) ^a	20,1
1'	/	140,8	/	141,7
2', 6'	7,31 (m, 2H) ^b	128,3	7,30 (m, 2H) ^b	128,2
3', 5'	7,25 (m, 2H) ^b	128,5	7,30 (m, 2H) ^b	128,4
4'	7,25 (m, 1H) ^b	125,9	7,21 (m, 1H) ^b	127,0
1''	/	170,4	/	170,8
2''	2,0632 (s, 3H) ^a	21,3	2,0302 (s, 3H) ^a	21,35

^a хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом коришћењем *MestReNova* софтверског пакета;

^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала);

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.



Положај	<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-бутадиил-диацетат		<i>anti</i> -1-Фенил-1,3-бутадиил-диацетат		1-Фенилбутил-ацетат (A-12)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	5,8077 (dd, $J=7,60, 6,75$ Hz, 1H)	73,1	5,8249 (dd, $J=10,35, 4,20$ Hz, 1H)	72,2	5,7381 (br dd, $J=7,80, 6,35$ Hz, 1H)	75,9
2	2,2982 (ddd, $J=-14,70, 8,20, 7,60$ Hz, 1H)	42,2	2,0877 (ddd, $J=-14,70, 10,35, 3,00$ Hz, 1H)	42,6	1,8940 (dddd, $J=-13,30, 9,75, 7,80, 6,30$ Hz, 1H)	38,5
	1,9410 (ddd, $J=-14,50, 6,75, 5,10$ Hz, 1H)		2,0263 (ddd, $J=-14,70, 10,00, 3,60$ Hz, 1H)		1,7372 (dddd, $J=-13,30, 9,90, 6,40, 6,35$ Hz, 1H)	
1''	/	170,6	/	170,2	/	170,4
2''	2,0643 (s, 3H)	21,2	2,0551 (s, 3H)	21,1	2,0632 (s, 3H)	21,3
1'''	/	170,4	/	170,1	/	/
2'''	2,0061 (s, 3H)	21,25	1,9913 (s, 3H)	21,24	/	/

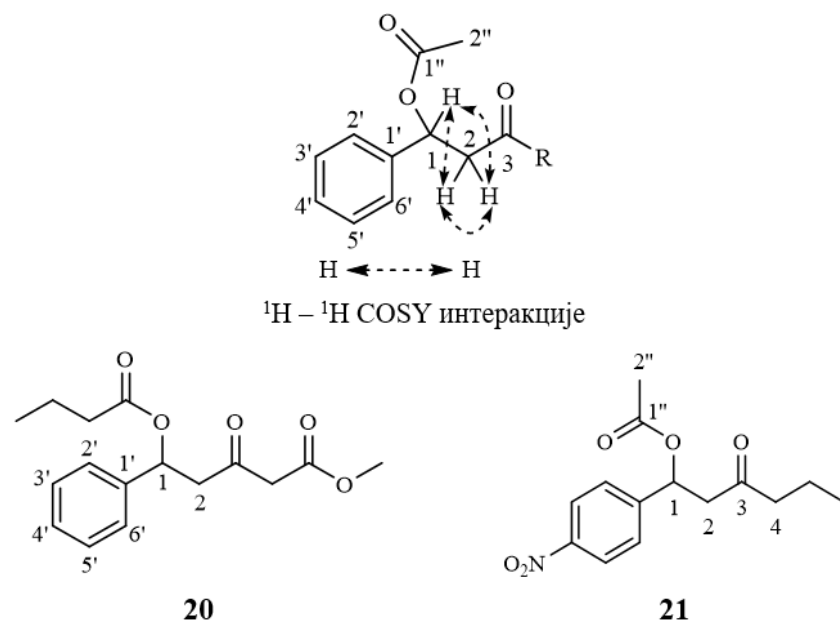
Слика 5.3.13. Део 1H и ^{13}C NMR спектралних података *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата и 1-фенилбутил-ацетата

На слици 5.3.13 су приказане вредности 1H и ^{13}C NMR хемијских померања и константи купловања одабраних сигнала *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата (поглавље 5.3.1) и 1-фенилбутил-ацетата (A-12). На основу константи купловања може се закључити да једињење A-12 има сличну конформацију као *syn*-изомери.

Сложеност сигнала протона одређених једињења последица је даљинског купловања, нарочито код незасићених једињења: алилене константе купловања ($^4J_{H,H}=-1,08 - -1,60$ Hz) за једињења A-2 (H-2, H-4), A-6 (H-1, H-2, H-3, H-4), A-7 (H-1, H-3), A-10 (H-1, H-2, H-3, H-4) и A-11 (H-1, H-3), и хомоалилене константе купловања за једињење A-10 ($^5J_{H,H}=0,8$ Hz). Сигнали протона у 1H NMR спектру засићених једињења били су сложени због купловања вишег реда, као и преклопљених сигнала и даљинског купловања у алифатичним низовима. Из тог разлога, за симулацију сигнала протона једињења A-8, A-9, A-12 и A-13 (табеле 5.3.10 и 5.3.11 и слике 5.3.11 и 5.3.12), преузете су одговарајуће константе купловања протона *n*-пентана, *n*-хексана и *n*-хептана из литературе (Tynkkynen et al., 2012).

5.3.2. 3-Оксо-1-фенилалкил-ацетати

Фракција 4 (шема 4.3.1) је садржавала серију пикова са масеним спектрима који садрже m/z 103 $[\text{PhCHCH}]^+$, 131 $[\text{PhCHCHCO}]^+$ и 146 $[\text{PhCHCHCOCH}_3]^+$. На основу претраге базе масених спектра претпостављено је да су у фракцији присутни 1-фенил-1-алкенил-3-они. Међутим, анализом ^1H NMR спектра фракције нису уочени сигнали протона везаних за угљенике двогубе везе. Наведену масену фрагментацију могу имати и 3-оксо-1-фенилалкил-ацетати, након губитка молекула сирћетне киселине ($[\text{M} - 60]^+$). Анализирани су 2D NMR спектри фракције, а добијени подаци су упоређени са литературним (једињења **20** и **21**, слика 5.3.14 и табела 5.3.12; Xu et al., 2016; Xu & Yuan, 2005). Детаљном анализом ^1H - ^1H COSY спектра (слика 5.3.14), као и симулацијом ^1H NMR сигнала (слика 5.3.15), потврђене су структуре 7 идентификованих 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, који су на основу нефункционализованог краја ланца подељени у три серије *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера (**14a**, **15b**, **16a**, **17b-c**, **18a**, и **19b**, слика 5.3.14 и табела 5.3.13). Треба поменути да ова једињења имају исти број угљеникових атома у бочном ланцу као и идентификовани 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетати (поглавље 5.3.1). Ради дефинитивне потврде структуре 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, синтетисани су 3-оксо-1-фенилтетрадецил-ацетат и 1-оксо-1-фенил-3-ундецил-ацетат. Алдолним реакцијама између кинетичког литијум-енолата 2-тридеканона и бензалдехида, као и између литијум-енолата ацетофенона и нонанала синтетисани су 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканон и 1-фенил-3-хидрокси-1-ундеканон. Штеглиховом естерификацијом сирћетном киселином хидроксикетона добијени су одговарајући естри (поглавље 4.4.12). NMR спектрални подаци за 3-оксо-1-фенилтетрадецил-ацетат били су у слози са подацима добијеним NMR анализом фракције. У NMR спектрима фракције није било сигнала који потичу од 1-оксо-1-фенил-3-алкил-ацетата.



	a (n-)	b (iso-)	c (anteiso-)
R			
	n		
14	10 (тр.) ^a	/	/
15	/	9 (0,2) ^a	/
16	12 (0,7) ^a	/	/
17	/	11 (1,6) ^a	10 (0,1) ^a
18	14 (0,7) ^a	/	/
19	/	13 (0,2) ^a	/

Слика 5.3.14. Структуре 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата (**14a**, **15b**, **16a**, **17b-c**, **18a** и **19b**), метил-5-(бутирилокси)-3-оксо-5-фенилпентаноата (**20**) и 1-(4-нитрофенил)-3-оксохексил-ацетата (**21**) (Xu et al., 2016; Xu & Yuan, 2005), и синтетисаног кето-ацетата (**14a**) фракције испирка *P. veris*; ^a – број у загради представља процентни садржај једињења фракције испирка *P. veris* (тр., траг, <0,05%)

Табела 5.3.12. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата (**14a**, **15b**, **16a**, **17b-c**, **18a** и **19b**) фракције испирка и поређење NMR сигнала са сигнаlima из литературе за слична једињења (**20** и **21**; Xu et al., 2016; Xu & Yuan, 2005)

14a, 15b, 16a, 17b-c, 18a и 19b			20 ^a	21 ^b	
Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	71,7	6,1905 (dd, $J=8,62, 5,10$ Hz, 1H) ^B	6,20 (dd, $J=8,7, 4,8$ Hz, 1H)	70,7	6,25 (dd, $J=8,1, 5,5$ Hz, 1H)
2	49,2	2,7927 (dd, $J=-16,40, 5,10$ Hz, 1H) ^B	2,97 (dd, $J=16,8, 4,8$ Hz, 1H)	48,5	2,78-3,15 (m, 2H)
		3,0849 (dd, $J=-16,40, 8,62$ Hz, 1H) ^B	3,22 (dd, $J=16,8, 8,7$ Hz, 1H)		
3	206,7 ^Г	/	/	206,2	/
4	43,9	2,42 (t, $J=7,2$ Hz, 2H)	/	45,3	2,32-2,46 (m, 2H)
2', 6'	126,6 ^Д	7,34 (m, 2H) ^Д		/	/
3', 5'	128,2 ^Д	7,35 (m, 2H) ^Д	7,26-7,36 (m, 5H)	/	/
4'	127,7 ^Д	7,35 (m, 1H) ^Д		/	/
1''	170,5 ^Д	/	/	169,7	/
2''	21,2 ^Д	2,06 (s, 3H) ^Д	/	21,0	2,07 (s, 3H)

^a метил-5-(бутирилокси)-3-оксо-5-фенилпентаноат (**20**, слика 5.3.14; Xu & Yuan, 2005);

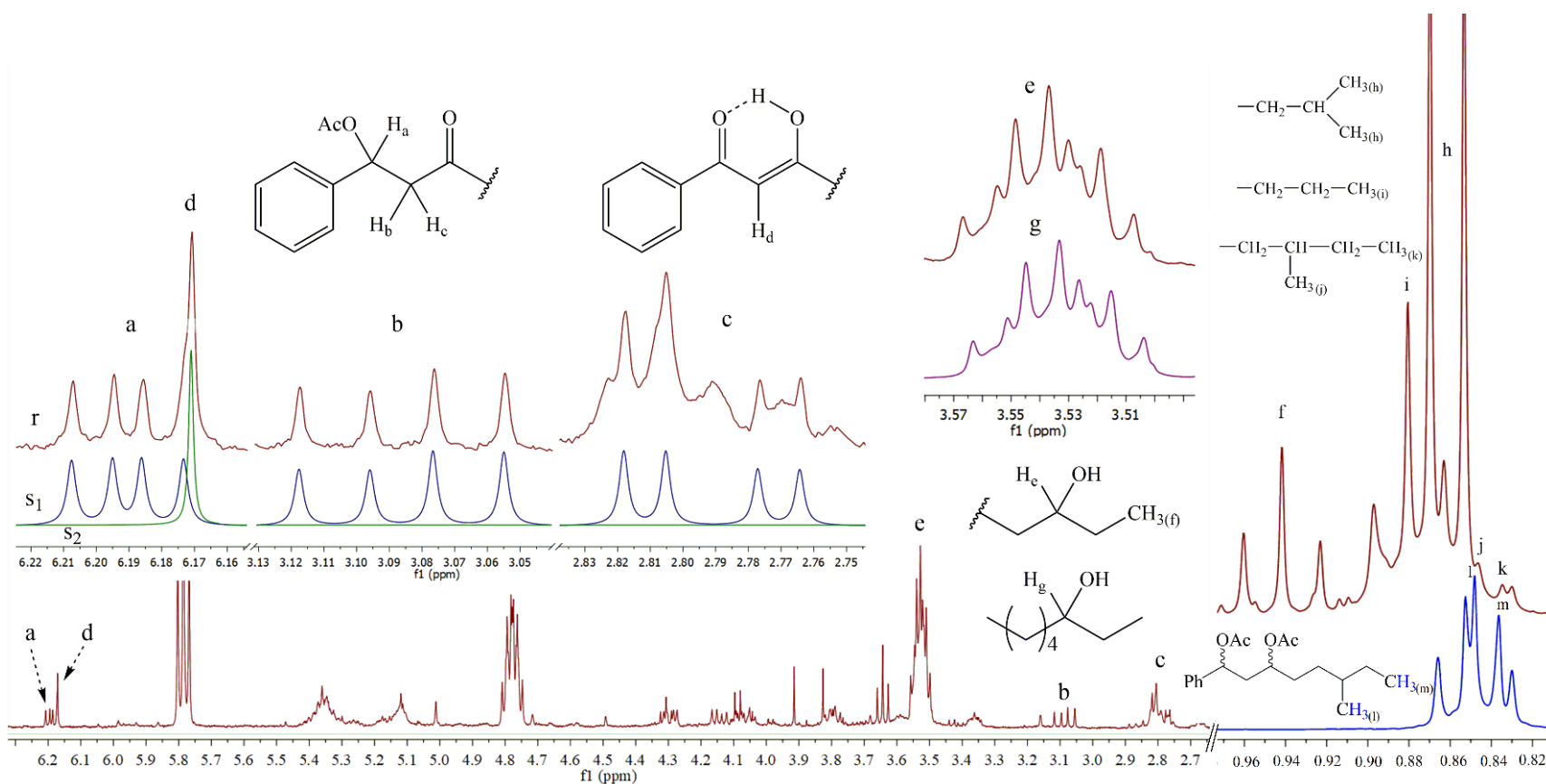
^b 1-(4-нитрофенил)-3-оксохексил-ацетат (**21**, слика 5.3.14; Xu et al., 2016);

^B хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом *MestReNova* софтверског пакета;

^Г асигнација на основу литературних података датих у овој табели;

^Д сигнали су преклопљени са сигнаlima **1a**, **2a-c**, **3a-b**, **4a-c**, **5a-b**, **6a-c** и **7a-b**;

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.



Слика 5.3.15. Увећања ^1H NMR спектра хроматографске фракције 4 испирка *P. veris* (црвена линија): 3-оксо-1-фенилалкилацетати (**14a**, **15b**, **16a**, **17b-c**, **18a** и **19b**, сигнали a-c), 1-фенил-1,3-алкадиони (**22a**, **23b-c**, **24a**, **25b-c**, **26a** и **27b**, сигнал d), 3-алканоли (**49a**, **50a-b**, **51a-c**, **52a-c**, **53a-c**, **54a-c**, **55a**, **56a-c**, **57a**, **58a-b** и **59a**, сигнали e и f), 3-октанол (сигнал g), нефункционализовани крај ланца (сигнали h-k) и 6-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетат (**9c**, сигнали l и m). “s₁” и “s₂” су линије симулираних сигнала ових састојака фракције, а “r” представља линију сигнала експерименталног спектра (са увећањима).

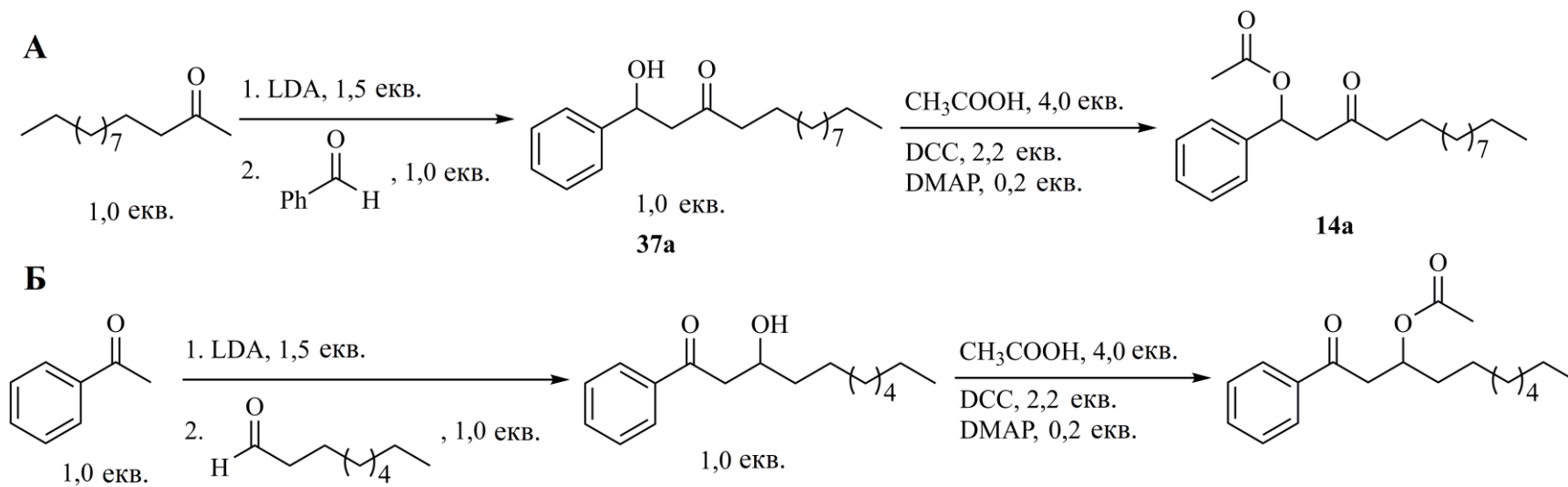
Табела 5.3.13. 3-Оксо-1-фенилалкил-ацетати идентификовани у фракцији испирка *P. veris*, као и њихови одговарајући алкени настали под условима гасне хроматографије (процентни садржај одговара детектованим алкенима)

Једињење	Садржај (%)	Једињење	RI ^a
3-Оксо-1-фенилтерадецил-ацетат (14a)	тр.	(<i>E</i>)-1-Фенил-1-тетрадецен-3-он	2403
13-Метил-3-оксо-1-фенилтерадецил-ацетат (15b)	0,2	(<i>E</i>)-13-Метил-1-фенил-1-тетрадецен-3-он	2470
3-Оксо-1-фенилхексадецил-ацетат (16a)	0,7	(<i>E</i>)-1-Фенил-1-хексадецен-3-он	2618
15-Метил-3-оксо-1-фенилхексадецил-ацетат (17b)	1,6	(<i>E</i>)-15-Метил-1-фенил-1-хексадецен-3-он	2681
14-Метил-3-оксо-1-фенилхексадецил-ацетат (17c)	0,1	(<i>E</i>)-14-Метил-1-фенил-1-хексадецен-3-он	2693
3-Оксо-1-фенилоктадецил-ацетат (18a)	0,7	(<i>E</i>)-1-Фенил-1-октадецен-3-он	2831
17-Метил-3-оксо-1-фенилоктадецил-ацетат (19b)	0,2	(<i>E</i>)-17-Метил-1-фенил-1-октадецен-3-он	2894
Укупно идентификовано			
3-оксо-1-фенилалкил-ацетата	3,5 (7)		
<i>n</i> -низ	1,4 (3) ^b		
<i>iso</i> -низ	2,0 (3)		
<i>anteiso</i> -низ	0,1 (1)		

тр. – траг (<0,05%);

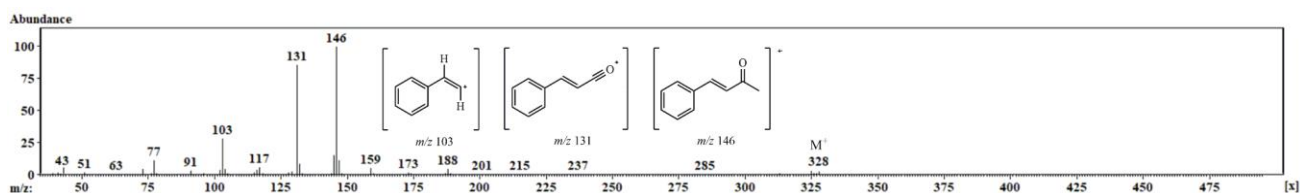
^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (програм 1: 70(0’)/5 °C min⁻¹/315(30’));

^b број у загради представља број детектованих 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата који припадају тој класи.



Слика 5.3.16. Синтетска шема **А** – 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканона (**37a**) и 3-оксо-1-фенилтетрадецил-ацетата (**14a**) и **Б** – 1-фенил-3-хидрокси-1-удеканона и 1-оксо-1-фенил-3-ундецил-ацетата

Производ алдолне кондензације, (*E*)-1-фенил-1-тетрадецен-3-он, изолован из реакционе смеше реакције литијум-енолата 2-тридеканона и бензалдехида, једнако је био важан за GC-MS анализу фракције, као и производ алдолне адиције, 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканон (**37a**). Пикови у гасном хроматограму фракције, за које се иницијално сматрало да припадају 3-оксо-1-фенилалкил-ацетатима, у ствари су одговарали (*E*)-1-фенил-1-алкенил-3-онима (слика 5.3.17, табела 5.3.13, а MS подаци су дати у прилогу).



Слика 5.3.17. Масени спектар (*E*)-15-метил-1-фенил-1-хексадецен-3-он, са предложеном фрагментацијом

На основу свега наведеног, закључено је да приликом ињектовања узорка фракције, у ињектору, на температури од 250 °C, долази до елиминације сирћетне киселине из 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата. Слично понашање уочено је и код 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона, код којих долази до губитка молекула воде у ињектору, што отежава њихову детекцију GC-MS-ом, без претходног силиловања узорака. Региоизомерни 1-оксо-1-фенил-3-алкил-ацетати такође елиминишу AcOH под условима гасне хроматографије, што се закључује из податка да у хроматограмима није било могуће идентификовати 1-оксо-1-фенил-3-ундецил-ацетат, већ његов производ елиминације сирћетне киселине. Ипак, 1-фенил-3-хидрокси-1-ундеканон не подлеже елиминацији молекула воде под условима снимања.

Једино липиди полена сунцокрета садрже молекуле сличних структура, 1-фенил-1-хидрокси-3-хексадеканон и 1-фенил-1-хидрокси-3-октадеканон (Schulz et al., 2000). Ови β-хидроксикетони имају исти број C-атома у бочном ланцу као и 3-оксо-1-фенилалкил-ацетати, идентификовани у фракцији. Ово је прва идентификација 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата као природних производа, а треба истакнути и да је релативни однос *iso*- и *n*-изомера 1 : 0,7, добијен интеграљењем површина испод пикова у хроматограму, такође јединствен.

5.3.3. 1-Фенил-1,3-алкадиони

Након идентификације претходне две класе једињења, могло се очекивати да се у фракцији нађу молекули истог скелета, али потпуно оксидовани у положајима 1 и 3, тј. 1-фенил-1,3-алкадиони. Једињења овакве структуре идентификована су у полену *H. annuus* (Schulz et al., 2000), и у том раду су приложени масени спектри за C₁₆ и C₁₈ хомологе. Поређењем масених спектра са масеним спектрима датим у овом раду, а и на основу карактеристичног фрагментног јона, m/z 162 (слика 5.3.2), уочени су β-дикетони у хроматограму фракције, али са знатно већим бројем угљеникових атома у бочном ланцу у односу на β-дикетоне идентификоване у липидима полена *H. annuus* и претходно идентификоване 1-фенил-1,3-алкадил-диацетате и 3-оксо-1-фенилалкил-ацетате (слика 5.3.2). Зато се са сигурношћу може потврдити да β-дикетони у фракцији нису артефакти настали од диацетата (*суп-1а*, *2а-с*, *3а-б*, *4а-с*, *5а-б*, *6а-с* и *7а-б*) или кетоацетата (*14а*, *15б*, *16а*, *17б-с*, *18а* и *19б*) хидролизом или аутооксидацијом, већ да они представљају реалне састојке фракције.

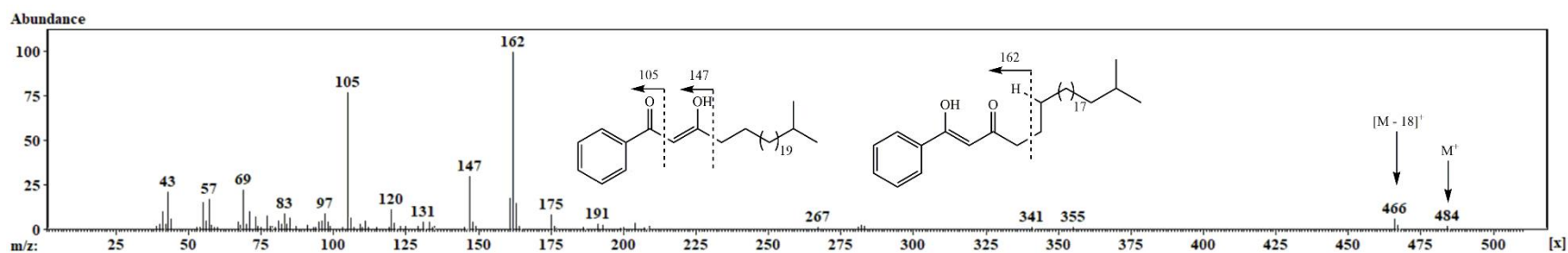
Идентификовани 1-фенил-1,3-алкадиони у масеним спектрима показују следећу карактеристичну фрагментацију: m/z 105 [PhCO]⁺, m/z 120 [Ph(CO)CH₃]⁺, m/z 147 [Ph(CO)CH₂(CO)]⁺ и m/z 162 [Ph(CO)CH₂(CO)CH₃]⁺ (слика 5.3.18). Молекулски јон, као и јон [M – 18]⁺ лако се уочавају у масеним спектрима, што је омогућило да се са лакоћом одреди укупан број угљеникових атома у ланцу (C₂₄-C₂₉; подаци из масених спектра, као и сами масени спектри свих идентификованих 1-фенил-1,3-алкадиона дати су у прилогу). Међутим, било је потребно одредити вредност ретенционих индекса за 1-фенил-1,3-алкадионе. По програму 1 GC-MS анализе, који је коришћен за анализу састојака испирака и фракција (70(0')/5 °C min⁻¹/315 (изотермално 30'), проток He 1,0 ml min⁻¹), линеарно програмирање се завршава на 49. минути, међутим већи број дикетона елуира са колоне након овог времена, па се уобичајени прорачуни за одређивање ретенционих индекса нису могли користити (Van den Dool & Kratz, 1963). Одређивање вредности ретенционих индекса је круцијално важно за међусобно разликовање региоизомера, *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа. Из овог разлога, фракција је поново анализирана програмом 2 – (200(0') 1 °C min⁻¹/315 (изотермално 30'), проток He 1,5 ml min⁻¹), где се линеарно програмирање завршава на 100. минути, чиме је омогућено да сви састојци фракције елуирају са колоне у

линеарном делу програма. Као што је већ поменуто, синтетисана су три изомерна (*n*-, *iso*- и *anteiso*-) C₉ β-дикетона (**29a**, **29b** и **29c**; поглавље 4.4.9; слике 5.3.8 и 5.3.19). Анализа NMR спектра синтетисаних β-дикетона и комерцијално доступног 1-фенил-1,3-бутадiona показала је да ова једињења представљају смеше таутомера, где су кетоенолни таутомери доминантнији (>89%; слика 5.3.19), док удео дикето-облика опада са порастом броја угљеникових атома у молекулу (Masur et al., 1987). У хроматограмима комерцијалног и синтетисаних узорака нису се могли уочити засебни пикови који потичу од таутомера, већ само пикови ових једињења који елуирају са колоне у опсегу од 5 ретенционих јединица. Ово ширење сигнала је праћено и променом интензитета фрагментних јона у оквиру једног пика, што је карактеристично за једињења који подлежу кето-енолној таутомерији (Masur et al., 1987). Могуће је и да таутомерни облици анализираних β-дикетона имају слично ретенционо понашање (Masur et al., 1987). Масени спектри пикова који потичу од β-дикетона у хроматографској фракцији више су одговарали кетоенолном облику молекула и није било назнаке да може доћи до раздвајања пикова, од којих би један одговарао дикето-облику. Ово може бити последица ниске заступљености дикето-облика у таутомерној смеси, као и тога да је укупна заступљеност β-дикетона у фракцији мала. Нажалост, у NMR спектрима фракције нису уочени сигнали C-2 метиленске групе дикето-облика (око 4 ppm) јер су вероватно преклопљени са сигнаlima других састојака фракције. Синглет који одговара водонику на C-2 атому кетоенолног облика, био је лако уочљив на 6,18 ppm (s, 1H) и везан за угљеник на 95,8 ppm, што је у слози са подацима за синтетисане β-дикетоне (слике 5.3.14 и 5.3.19 и табела 5.3.14). Како је на овај начин искључена могућност постојања пикова који потичу од дикето-облика, добијене вредности ретенционих индекса 8 детектованих 1-фенил-1,3-алкадиона могу се са сигурношћу приписати *n*-, *iso*- и *anteiso*-серијама β-дикетона (слике 5.3.1, 5.3.2 и 5.3.20 и табела 5.1.1). На овај начин идентификовано је 8 нових 1-фенил-1,3-алкадиона, тачније у њиховом кетоенолном облику, са бројем угљеникових атома у ланцу од 24 до 29 (слика 5.3.19 и табела 5.3.15). Још једном је потребно нагласити да ово представља идентификацију рачвастих изомера β-дикетона по први пут.

Табела 5.3.14. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) комерцијалног дикетона и синтетисаних дикетона (**29a-c**).

	29a		29b		29c			
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}		
-OH ^a	/	16,18 (s, 1H)	/	16,21 (s, 1H)	/	16,21 (s, 1H)	/	16,21 (s, 1H)
1e ^a	183,3	/	183,5	/	183,5	/	183,3	/
2e ^a	96,7	6,17 (s, 1H)	96,1	6,17 (s, 1H)	96,1	6,17 (s, 1H)	96,0	6,18 (s, 1H)
3e ^a	193,8	/	197,0	/	197,0	/	197,5	/
4e ^a	25,8	2,19 (s, 3H)	39,3	2,45 (t, $J=7,6$ Hz, 2H)	39,5	2,41 (t, $J=7,6$ Hz, 2H)	37,1	2,43 (t, $J=7,6$ Hz, 2H)
1k ^b	202,4	/	194,2	/	194,0	/	194,1	/
2k ^b	54,7	4,09 (s, 2H)	54,0	4,09 (s, 2H)	54,1	4,08 (s, 2H)	54,0	4,10 (s, 2H)
3k ^b	193,9	/	204,7	/	204,6	/	204,8	/
4k ^b	30,6	2,30 (s, 3H)	43,5	2,58 (t, $J=7,4$ Hz, 2H)	43,7	2,56 (t, $J=7,4$ Hz, 2H)	41,3	2,59 (t, $J=7,4$ Hz, 2H)
5	/	/	25,8	1,69 (pseudo quint, $J\approx 7,7$ Hz)	23,7	1,69 (pseudo quint, $J\approx 7,7$ Hz)	32,4	1,50 (m, 1H)
6	/	/	29,0	1,39 (m, 2H)	38,5	1,25 (m, 2H)	34,1	1,41 (m, 1H)
7	/	/	31,6	1,34 (m, 2H)	28,0	1,58 (pseudo non, $J\approx 6,7$ Hz, 1H)	29,2	1,20 (m, 1H)
8	/	/	22,5	1,34 (m, 2H)	22,5	0,90 (d, $J=6,7$ Hz, 6H)	11,3	0,89 (t, $J=7,25$ Hz, 3H)
9	/	/	14,06	0,92 (t, $J\approx 7$ Hz, виртуелно купловање, 3H)	/	/	/	/
1''	/	/	/	/	/	/	18,9	0,91 (d, $J=6,2$ Hz, 3H)
1'	134,9	/	135,1	/	135,1	/	135,1	/
2', 6'	127,0	7,87 (m, 2H) ^b	127,0	7,88 (m, 2H) ^b	127,0	7,88 (m, 2H) ^b	127,0	7,88 (m, 2H) ^b
3', 5'	128,6	7,44 (m, 2H) ^b	128,6	7,45 (m, 2H) ^b	128,6	7,45 (m, 2H) ^b	128,6	7,45 (m, 2H) ^b
4'	132,3	7,50 (m, 1H) ^b	132,2	7,52 (m, 1H) ^b	132,9	7,52 (m, 1H) ^b	132,2	7,52 (m, 1H) ^b

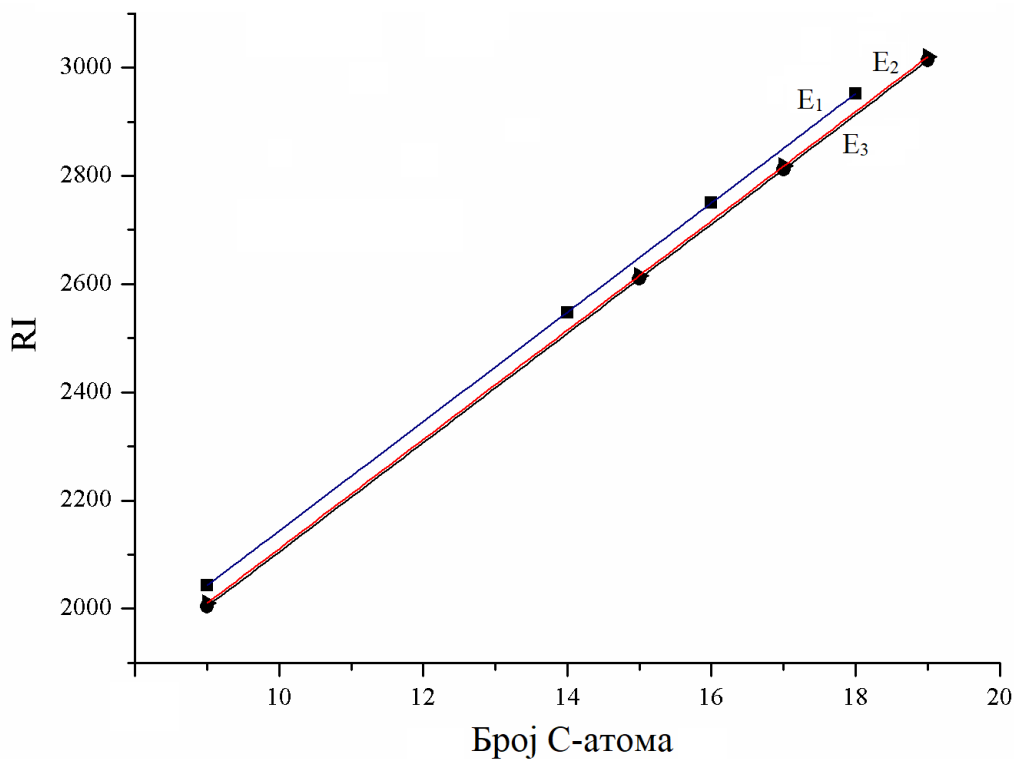
^a сигнали кетенолног облика; ^b сигнали дикето-облика; ^b хемијска померања су прочитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала); / – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.



Слика 5.3.18. Масени спектар са предложеном фрагментацијом најзаступљенијег 1-фенил-1,3-алкадиона (25-метил-1-фенил-1,3-хексакозацион, **25b**) фракције 4 испирка *P. veris*

		a (n-)	b (iso-)	c (anteiso-)
R				
		n		
22		20 (тр.) ^a	/	/
23		/	19 (0,4) ^a	18 (0,1) ^a
24		22 (0,1) ^a	/	/
25		/	21 (0,5) ^a	20 (0,2) ^a
26		24 (тр.) ^a	/	/
27		/	23 (тр.) ^a	/
28		0 (89) ^б	/	/
29		5 (96) ^б	3 (97) ^б	2 (92) ^б

Слика 5.3.19. Структуре 1-фенил-1,3-алкадиона (**22a**, **23b-c**, **24a**, **25b-c**, **26a** и **27b**), комерцијално доступног дикетона (**28a**), и синтетисаних дикетона (**29a-c**), фракције испирка *P. veris*; ^a – број у загради представља процентни садржај једињења фракције испирка *P. veris* (тр., траг, <0,05%), ^б – број у загради представља процентни садржај енола у кетоенолној равнотежи



Слика 5.3.20. Корелација ретенционих индекса (RI) и броја угљеникових атома бочног низа синтетисаних (**14e-16e**) и идентификованих у фракцији испирка (**14a-c, 15a-c, 16a-b**) изомера 1-фенил-1,3-алкадиона; за линеарну једначину $RI = a + n(C) \times b$, a – одсечак на x -оси, b – нагиб праве: E_1 – n -изомери ($a=962$, $b=105$), E_2 – iso -изомери ($a=923$, $b=105$) и E_3 – $anteiso$ -изомери ($a=935$, $b=105$), корелациони коефицијенти свих права били су $R^2 > 0,99$

Табела 5.3.15. Релативни садржај 1-фенил-1,3-алкадиона (**22а**, **23b-с**, **24а**, **25b-с**, **26а** и **27b**) у хроматографској фракцији испирка *P. veris*

RI ^а	Једињење	Садржај (%)
3487	1-Фенил-1,3-тетракозадион (22а)	тр.
3550	23-Метил-1-фенил-1,3-тетракозадион (23b)	0,4
3564	22-Метил-1-фенил-1,3-тетракозадион (23с)	0,1
3697	1-Фенил-1,3-хексакозадион (24а)	0,1
3760	25-Метил-1-фенил-1,3-хексакозадион (25b)	0,5
3774	24-Метил-1-фенил-1,3-хексакозадион (25с)	0,2
3907	1-Фенил-1,3-октакозадион (26а)	тр.
3970	27-Метил-1-фенил-1,3-октакозадион (27b)	тр.
Укупно идентификовано		1,3 (8)
1-фенил-1,3-алкадиона		
	<i>n</i> -низ	0,1 (3) ^б
	<i>iso</i> -низ	0,9 (3)
	<i>anteiso</i> -низ	0,3 (2)

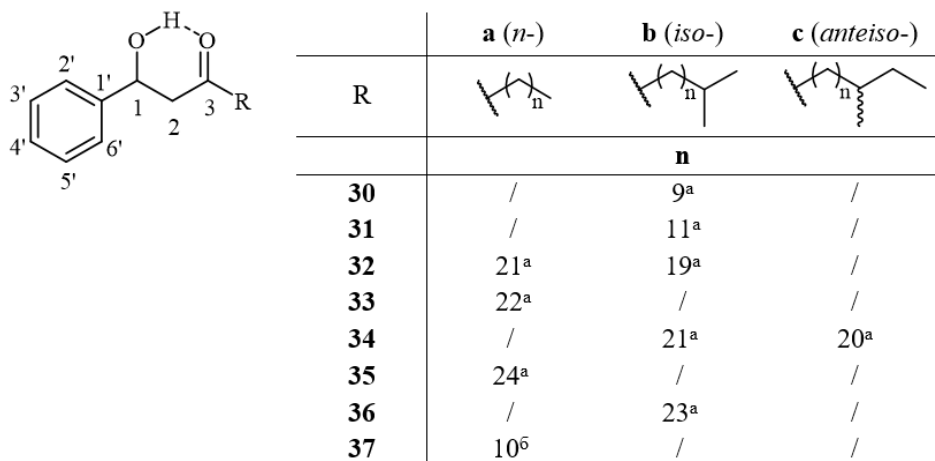
тр. – траг (<0,05%);


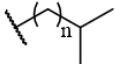
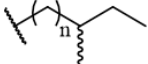
^а RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (200(0') 1 °C min⁻¹/315(30'));

^б број у загради представља број детектованих 1-фенил-1,3-алкадиона који припадају тој класи.

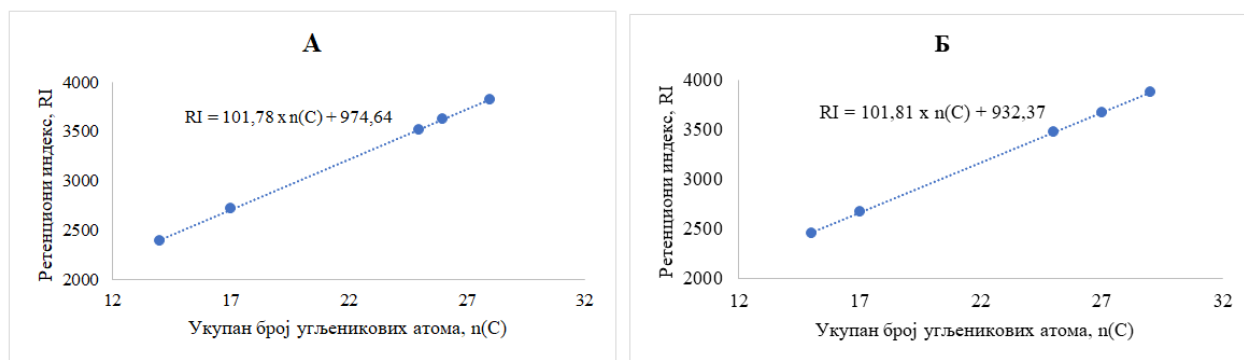
5.3.4. 1-Фенил-1-хидрокси-3-алканони

Силиловањем фракције 4 идентификовано је 10 дуголанчаних 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона (**30b**, **31a-b**, **32a-b**, **33a**, **34b-c**, **35a** и **36b**; поглавље 4.4.11, слика 5.3.21 и табела 5.3.16). Ови хидроксикетони под условима гасне хроматографије губе молекул воде, у ињектору, па их је зато било могуће идентификовати тек након дериватизације. Као што је већ речено, 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканон (**37a**) је синтетисан и силилован да би се потврдила структура ове класе једињења (поглавља 4.4.11 и 4.4.12). Подударане масених спектра и корелација ретенционих индекса силилованих деривата омогућило је идентификацију 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона са 15, 17 и 25-29 угљеникових атома у ланцу (слика 5.3.21 и табела 5.3.16). Молекули ове структуре, али различитог броја угљеникових атома, идентификовани су само у полену сунцокрета (Schulz et al., 2000), тако да сви идентификовани 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони представљају нове природне производе. На основу броја угљеникових атома у ланцу, може се претпоставити да 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони настају на два начина: једним путем који је повезан са биосинтезом 1-фенил-1,3-алкадиона (хомолози са 25-29 угљеникових атома у ланцу) и другим путем који је повезан са биосинтезом 3-оксо-1-фенилалкил-ацетатима (једињења са 15 и 17 угљеникових атома у ланцу).



	a (n-)	b (iso-)	c (anteiso-)
R			
	n		
30	/	9 ^a	/
31	/	11 ^a	/
32	21 ^a	19 ^a	/
33	22 ^a	/	/
34	/	21 ^a	20 ^a
35	24 ^a	/	/
36	/	23 ^a	/
37	10 ^b	/	/

Слика 5.3.21. Структуре 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона (**30b**, **31a-b**, **32a-b**, **33a**, **34b-c**, **35a** и **36b**) и синтетисаног хидрокси-кетона (**37a**), фракције испирка *P. veris*; ^a – једињења идентификована силиловањем фракције испирка *P. veris*, ^b – једињење добијено синтезом: 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканон (**37a**)



Слика 5.3.22. Корелација броја угљеникових атома у ланцу са вредностима ретенционог индекса триметилсилил-деривата 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона (фракције испирка **30b**, **31a-b**, **32a-b**, **33a**, **34b-c**, **35a** и **36b**, и синтетисани стандард, **37a**) по серијама изомера: *n*-низ (А), и *iso*-низ (Б); сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$.

Табела 5.3.16. 1-Фенил-1-хидрокси-3-алканони идентификовани у фракцији 4 испирка *P. veris* идентификовани као одговарајући триметилсиллил-деривати; квантификација је извршена интегралњем површина испод пикова парцијалне јонске струје, m/z 179.

RI ^a	Триметилсиллил-дериват	Садржај (%)
2454	13-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканон (30b)	0,9
2669	15-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-хексадеканон (31b)	2,0
2717	1-Фенил-1-хидрокси-3-хептадеканон (31a)	8,0
3479	23-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-тетракозанон (32b)	6,1
3518	1-Фенил-1-хидрокси-3-пентакозанон (32a)	3,1
3623	1-Фенил-1-хидрокси-3-хексакозанон (33a)	1,5
3681	25-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-хексакозанон (34b)	1,8
3698	24-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-хексакозанон (34c)	0,8
3821	1-Фенил-1-хидрокси-3-октакозанон (35a)	1,2
3883	27-Метил-1-фенил-1-хидрокси-3-октакозанон (36b)	0,8
Укупно идентификовано		26,2 (10)
1-фенил-1-хидрокси-3-алканона		
	<i>n</i> -низ	13,8 (4) ^b
	<i>iso</i> -низ	11,6 (5)
	<i>anteiso</i> -низ	0,8 (1)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (200(0') 1 °C min⁻¹/315(30'));

^b број у загради представља број детектованих 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона који припадају тој класи.

5.3.5. Секундарни алкохоли са положајем хидроксилне групе од 2 до 10

Серија пикова са следећим јонима у масеним спектрима, m/z 59 [CH₃CH₂CHOH]⁺, (основни јон; слика 5.3.2), [M – 18]⁺, губитак молекула воде, [M – 29]⁺, губитак етил-групе, указивала је на присуство дуголанчаних 3-алканола у фракцији 4 (масени спектри

идентификованих 3-алкохола дати су у прилогу). У ^1H NMR спектру фракције уочен је сложени мултиплет на 3,52 ppm (широки псеудо триплет триплета, $J \approx 7,3, 4,7$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$, слика 5.3.15 и табела 5.3.17), који сугерише да се алкохолна група налази негде у унутрашњости угљоводоничног ланца, у свим положајима осим у 1- и 2-, јер би сигнали водоника у тим положајима имали другачије хемијско померање и мултиплетност. Да би потврдили ову претпоставку, снимљени су NMR спектри комерцијално доступног 3-октанола (подаци су дати у прилогу). Водоник хиралног центра 3-октанола и водоници секундарних алкохола уочени у протонском спектру фракције били су идентични (слика 5.3.15). На овај начин је било могуће објаснити сложеност мултиплета, тј. ширење сигнала, као и додатна виртуелна купловања, која потичу од међусобно јако спрегнутих метиленских група у близини хиралног центра алкохола и већине преосталих CH_2 група у ланцу. Такође, могуће је и да се сигнали других секундарних алкохола налазе на сличном хемијском померању.

Табела 5.3.17. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) 3-алканола (**49a**, **50a-b**, **51a-c**, **52a-c**, **53a-c**, **54a-c**, **55a**, **56a-c**, **57a**, **58a-b** и **59a**) и 2-алканола (**38a**, **39a-c**, **40a-b**, **41a-c**, **42a-b**, **43a-c**, **44a**, **45a-c** и **46a**) идентификованих у фракцији 4 испирка *P. veris*

Положај	δ_{C}	δ_{H}
3-алканоли		
1	9,9	0,94 (t, $J=7,5$ Hz, 3H)
2	34,1	1,52 (m, 2H, преклопљени са протонима <i>anteiso</i> -краја низа)
3	73,4	3,52 (br pseudo tt, $J \approx 7,3, 4,7$ Hz, 1H)
4	37,0	1,45 (m, 2H)
2-алканоли		
1	23,6	1,19 (d, $J=6,2$ Hz, 3H)
2	68,3	3,79 (m, 1H)
3	39,2	1,40 (m, 2H)

На основу NMR и GC-MS анализа, потврђено је присуство десет 3-алканола (**50b**, **51a**, **52b-c**, **53a**, **54b-c**, **55a** и **56b-c**) у фракцији 4, са укупним бројем угљеникових атома од 22 до 28, распоређених у три серије *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа (табела 5.3.18), по први пут идентификованих у узорцима природног порекла. Најзаступљенији су били хомолози *iso*-серије, а најзаступљенији међу њима био је хомолог C₂₄. У литератури су били доступни једно подаци за 3-трикозанол (масени спектар и ретенциони индекс, на колони SE30) и били су у слози са нашим подацима (Ubik et al., 1974; Streibl & Stránský, 1972). Осталих девет 3-алканола је по први пут идентификовано.

Табела 5.3.18. Идентификовани 3-алканоли у хроматографској фракцији 4 испирка *P. veris*, пре дериватизације

RI ^a	Једињење
2376	20-Метил-3-хенеикозанол (50b)
2517	3-Трикозанол (51a)
2580	22-Метил-3-трикозанол (52b)
2592	21-Метил-3-трикозанол (52c)
2719	3-Пентакозанол (53a)
2785	24-Метил-3-пентакозанол (54b)
2796	23-Метил-3-пентакозанол (55c)
2922	3-Хептакозанол (55a)
2987	26-Метил-3-хептакозанол (56b)
2998	25-Метил-3-хептакозанол (56c)

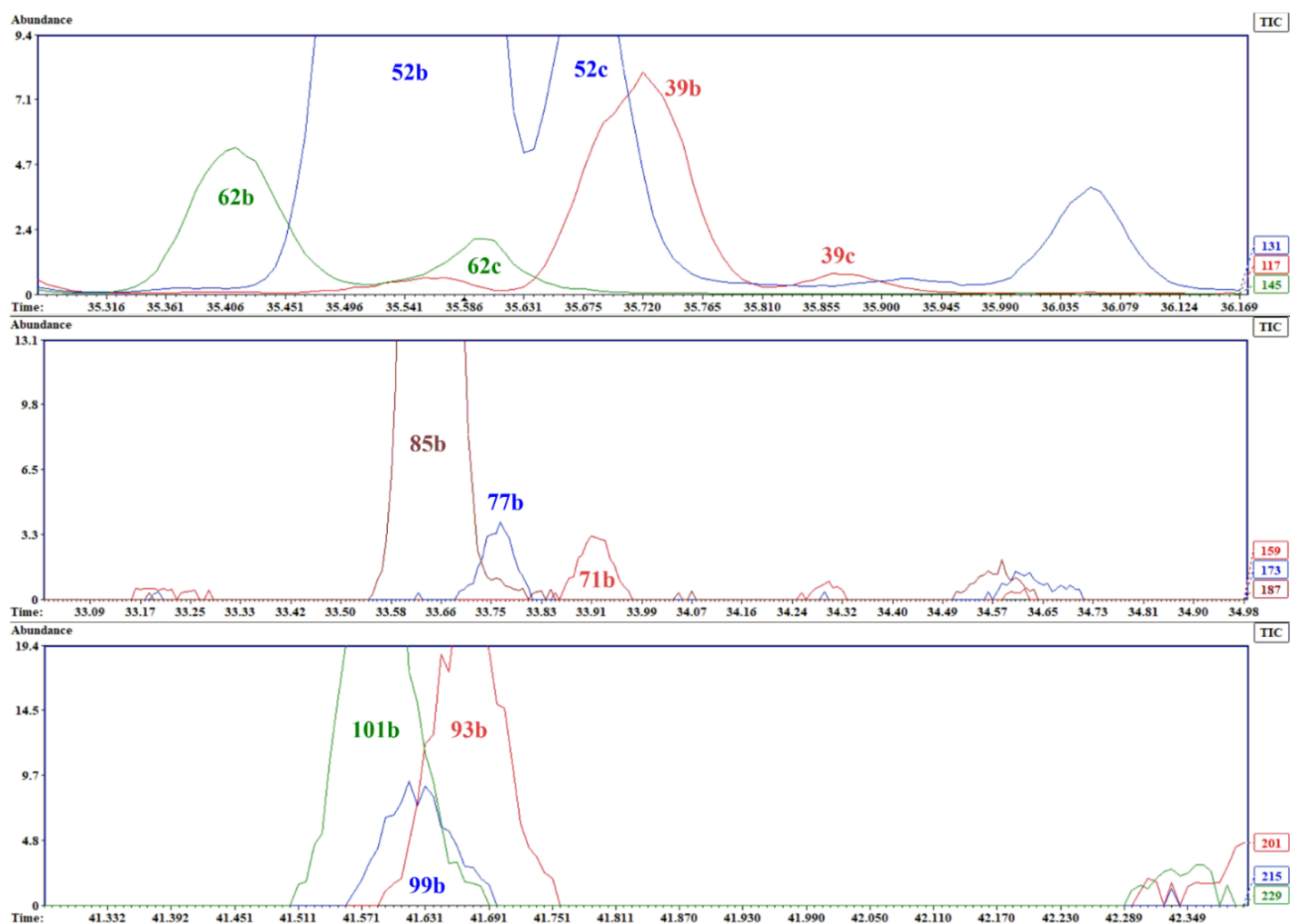
^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (70(0')/5 °C min⁻¹/315(30')).

	a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)
R				R				R				R			
	n				n				n				n		
38	12 (2,6) ^a	/	/	49	10 (тр.)	/	/	62	/	16 (23,5)	15 (10,0)	71	/	16 (0,7)	/
39	13 (1,5)	11 (13,8)	10 (1,4)	50	11 (0,6)	9 (0,4)	/	63	/	17 (2,3)	/	72	/	17 (5,6)	/
40	14 (11,3)	12 (4,0)	/	51	12 (16,5)	10 (0,9)	9 (тр.)	64	/	18 (3,9)	/	73	/	19 (4,2)	/
41	15 (0,8)	13 (17,0)	12 (6,5)	52	13 (1,8)	11 (35,8)	10 (10,2)	65	/	20 (0,5)	/	74	/	21 (3,4)	/
42	16 (7,2)	14 (2,0)	/	53	14 (1,1)	12 (9,7)	11 (8,1)	66	/	21 (1,4)	/	75	6	/	/
43	17 (1,3)	15 (4,5)	14 (2,8)	54	15 (0,4)	13 (9,3)	12 (3,7)	67	/	22 (1,5)	/	76	9	/	/
44	18 (3,9)	/	/	55	16 (3,3)	/	/	68	/	23 (0,6)	/				
45	19 (0,4)	17 (0,5)	16 (0,2)	56	17 (0,2)	15 (1,3)	14 (0,6)	69	6	/	/				
46	20 (0,3)	/	/	57	18 (0,7)	/	/	70	9	/	/				
47	1	/	/	58	19 (0,2)	17 (0,2)	/								
48	4	/	/	59	20 (0,3)	/	/								
				60	1	/	/								
				61	4	/	/								

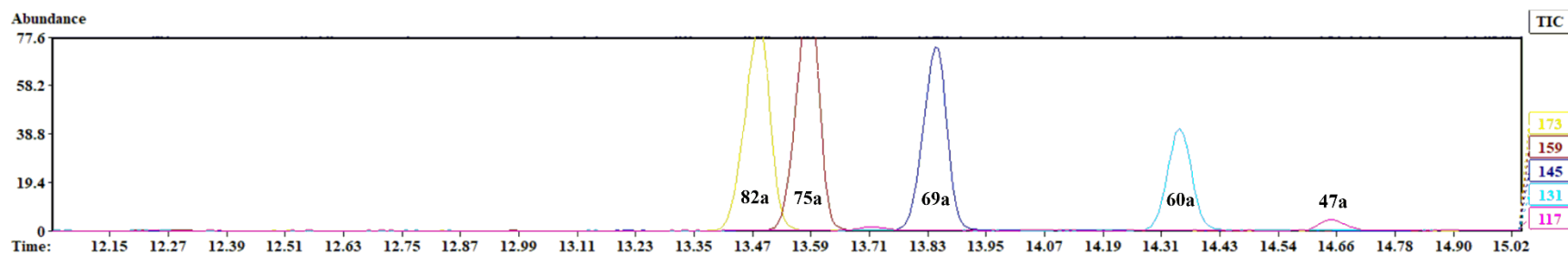
	a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)		a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)
R				R				R				R			
	n				n				n				n		
77	/	14 (1,6)	/	84	13 (1,7)	11 (0,8)	/	89	12 (1,8)	/	/	95	11 (0,5)	/	/
78	/	18 (7,9)	/	85	/	13 (76,5)	/	90	14 (1,8)	12 (32,8)	/	96	13 (1,7)	11 (18,1)	/
79	21 (0,8)	/	/	86	/	15 (4,9)	/	91	/	14 (13,3)	/	97	/	13 (42,3)	/
80	22 (3,1)	20 (0,1)	/	87	/	17 (9,3)	/	92	/	16 (13,6)	/	98	/	15 (7,9)	/
81	/	22 (2,2)	/	88	7	/	/	93	/	18 (9,7)	/	99	/	17 (9,0)	/
82	5	/	/					94	6	/	/				
83	8	/	/												

	a (<i>n</i> -)	b (<i>iso</i> -)	c (<i>anteiso</i> -)
R			
	n		
100	/	12 (5,9)	/
101	/	16 (53,9)	/

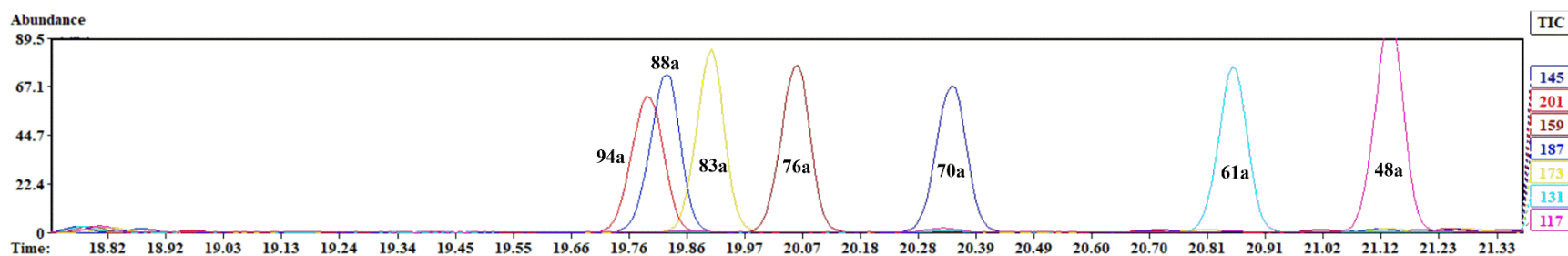
Слика 5.3.23. Структуре *sec*-алканолa идентификованих након силиловања фракције 4 испирка *P. veris* (2-алканолa: **38a**, **39a-c**, **40a-b**, **41a-c**, **42a-b**, **43a-c**, **44a**, **45a-c** и **46a**; 3-алканолa: **49a**, **50a-b**, **51a-c**, **52a-c**, **53a-c**, **54a-c**, **55a**, **56a-c**, **57a**, **58a-b** и **59a**; 4-алканолa: **62b-c** и **63-68b**; 5-алканолa: **71-74b**; 6-алканолa: **77-78b**, **79a**, **80a-b** и **81b**; 7-алканолa: **84a-b** и **85-87b**; 8-алканолa: **89a**, **90a-b** и **91-93b**; 9-алканолa: **95a**, **96a-b** и **97-99b**; 10-алканолa: **100-101b**), као и триметилсиллил-деривати синтетисаних *sec*-алканолa (2-алканолa: **47-48a**; 3-алканолa: **60-61a**; 4-алканолa: **69-70a**; 5-алканолa: **75-76a**; 6-алканолa: **82-83a**; 7-алканолa: **88a**; 8-алканолa: **94a**); ^a – број у загради представља релативну заступљеност једињења (%), тр., траг, <0,05%) која је добијена интеграљењем хроматограма парцијалних јонских струја најзаступљенијег фрагментног јона; релативни проценти класа алкохола нису међусобно упоредиви (на пример за 3-алканолa и 4-алканолa; поглавље 4.2.1).



Слика 5.3.24. Парцијални јонски хроматограми секундарних алканолна хроматографске фракције 4 испирка *P. veris*: 2-алканоли – m/z 117 $[\text{CH}_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 3-алканоли – m/z 131 $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 4-алканоли – m/z 145 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 5-алканоли – m/z 159 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 6-алканоли – m/z 173 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 7-алканоли – m/z 187 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 8-алканоли – m/z 201 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 9-алканоли – m/z 215 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 10-алканоли – m/z 229 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$

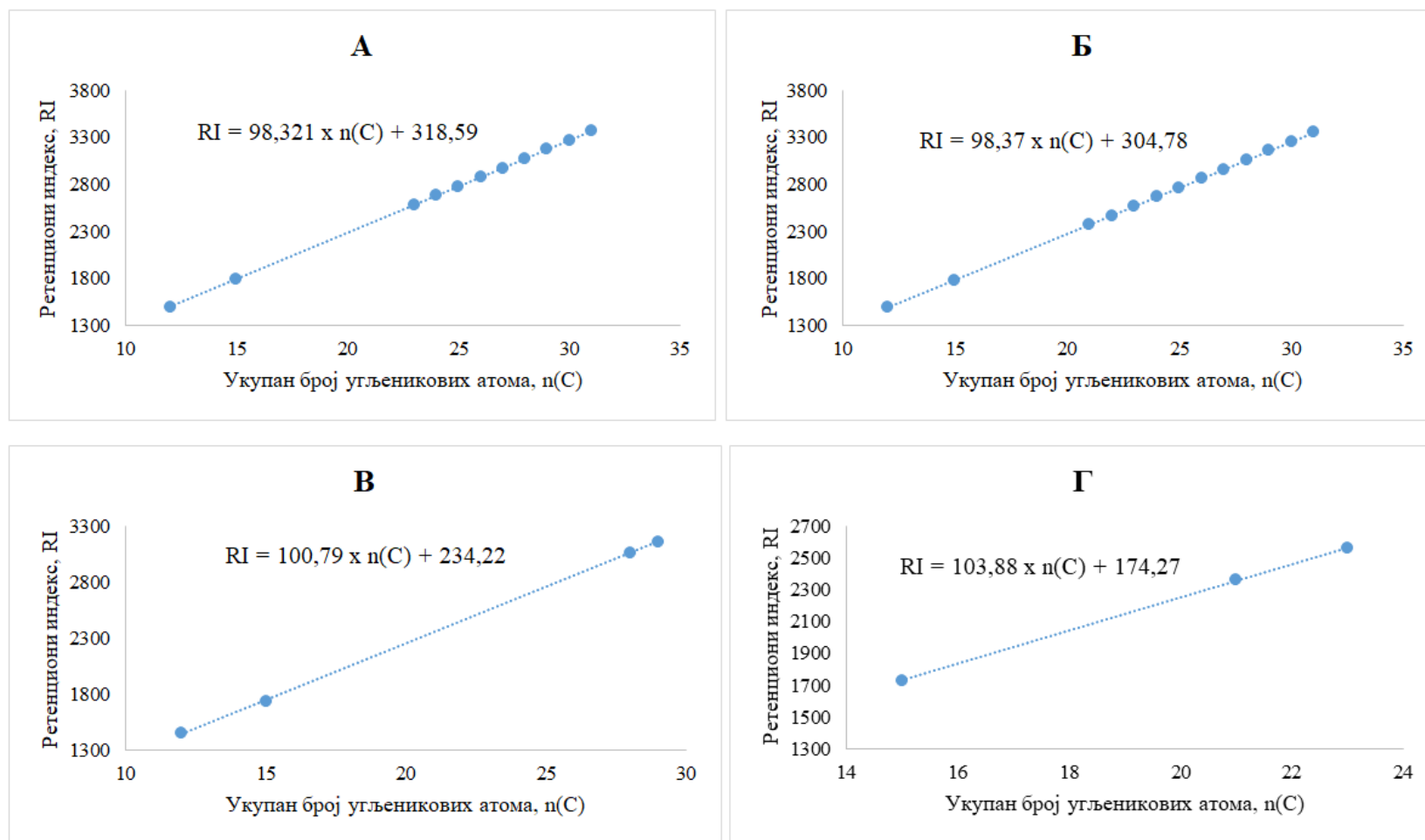


Слика 5.3.25. Парцијални јонски хроматограм триметилсилил-деривата синтетисаних *sec*-додеканаола: 2-додеканол (**47a**) – m/z 117 $[\text{CH}_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 3-додеканол (**60a**) – m/z 131 $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 4-додеканол (**69a**) – m/z 145 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 5-додеканол (**75a**) – m/z 159 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 6-додеканол (**82a**) – m/z 173 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$

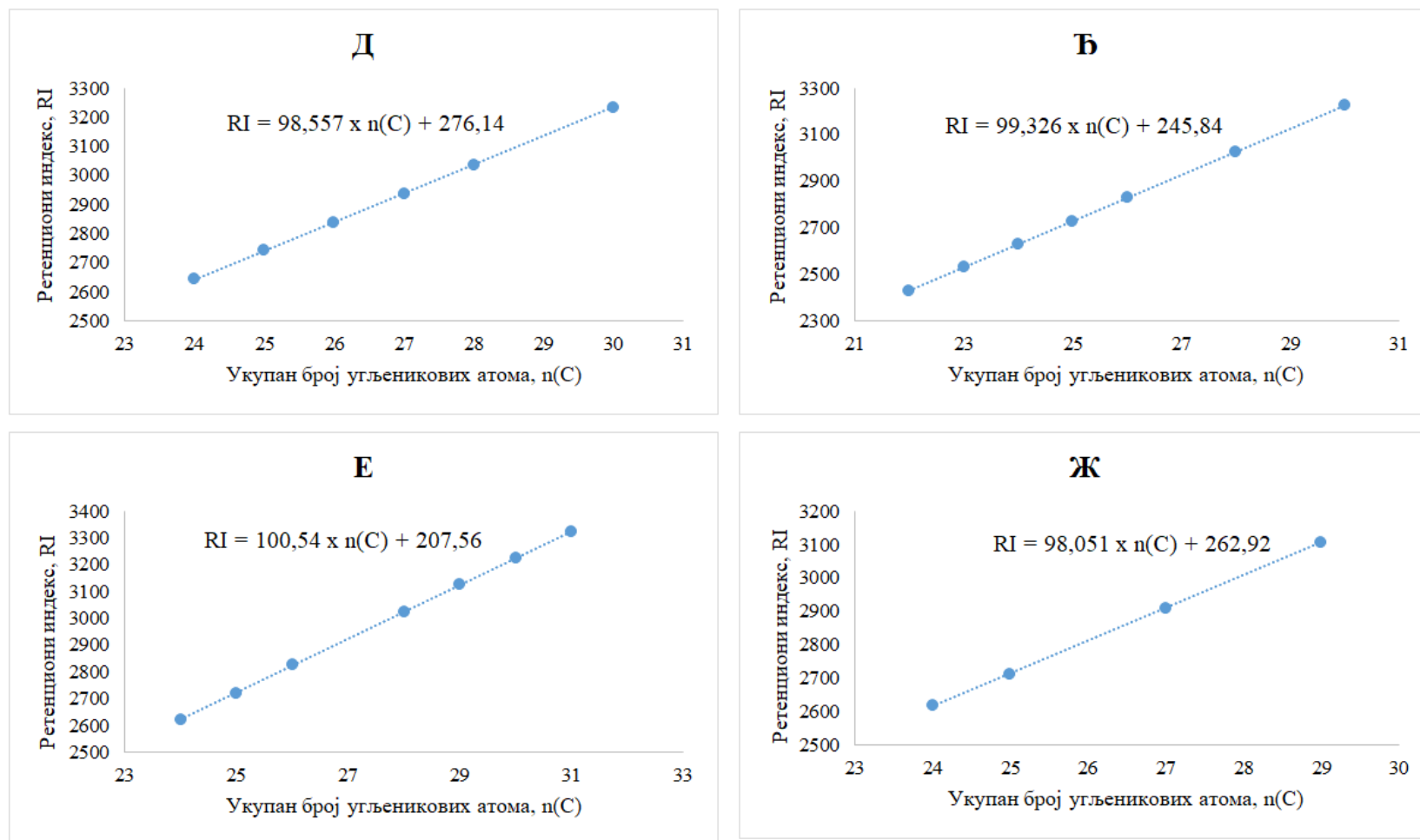


Слика 5.3.26. Парцијални јонски хроматограм триметилсилил-деривата синтетисаних *sec*-пентадеканаола: 2-пентадеканол (**48a**) – m/z 117 $[\text{CH}_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 3-пентадеканол (**61a**) – m/z 131 $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 4-пентадеканол (**70a**) – m/z 145 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 5-пентадеканол (**76a**) – m/z 159 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 6-пентадеканол (**83a**) – m/z 173 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 7-пентадеканол (**88a**) – m/z 187 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$, 8-пентадеканол (**94a**) – m/z 201 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$

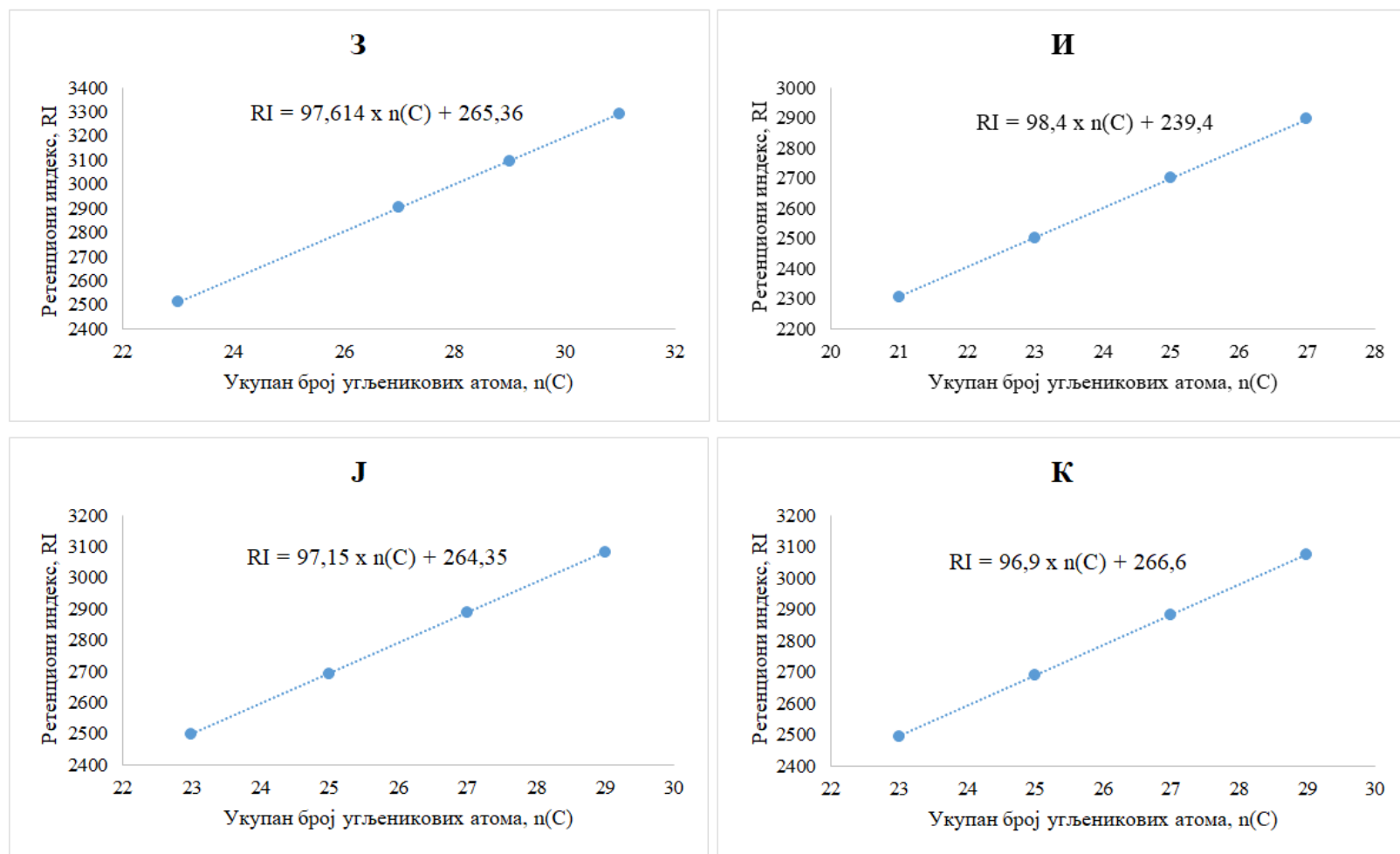
Да би се потврдило присуство секундарних алкохола, фракција 4 је силилована. Након дериватизације, на основу карактеристичних масених фрагмената триметилсилил-деривата (Harvey & Vouros, 2019) и правилности у вредностима RI ових деривата (слике 5.3.27, 5.3.28, 5.3.29, 5.3.30), поред идентификованих нових 3-алканола, идентификовано је укупно 79 *sec*-алкохола са положајем хидроксилне групе од 2 до 10, *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа (2-алканоли: **38a**, **39a-c**, **40a-b**, **41a-c**, **42a-b**, **43a-c**, **44a**, **45a-c** и **46a**; 3-алканоли: **49a**, **50a-b**, **51a-c**, **52a-c**, **53a-c**, **54a-c**, **55a**, **56a-c**, **57a**, **58a-b** и **59a**; 4-алканоли: **62b-c** и **63-68b**; 5-алканоли: **71-74b**; 6-алканоли: **77-78b**, **79a**, **80a-b** и **81b**; 7-алканоли: **84a-b** и **85-87b**; 8-алканоли: **89a**, **90a-b** и **91-93b**; 9-алканоли: **95a**, **96a-b** и **97-99b**; 10-алканоли: **100-101b**, слике 5.3.23 и 5.3.24). Након неселективне хидроксилације *n*-додекана и *n*-пентадекана, коришћењем *in situ* припремљеног CF₃COOH из H₂O₂-CF₃COOH (поглавље 4.4.13; Deno et al., 1977), добијена је смеша секундарних алкохола: 2-додеканол, 3-додеканол, 4-додеканол, 5-додеканол и 6-додеканол, и 2-пентадеканол, 3-пентадеканол, 4-пентадеканол, 5-пентадеканол, 6-пентадеканол, 7-пентадеканол и 8-пентадеканол. GC-MS анализа силиловане смеше ових секундарних алкохола потврдила је идентификацију секундарних алкохола у фракцији 4 (слике 5.3.25 и 5.3.26; масени спектри триметилсилил-деривата синтетисаних секундарних алкохола дати су у прилогу).



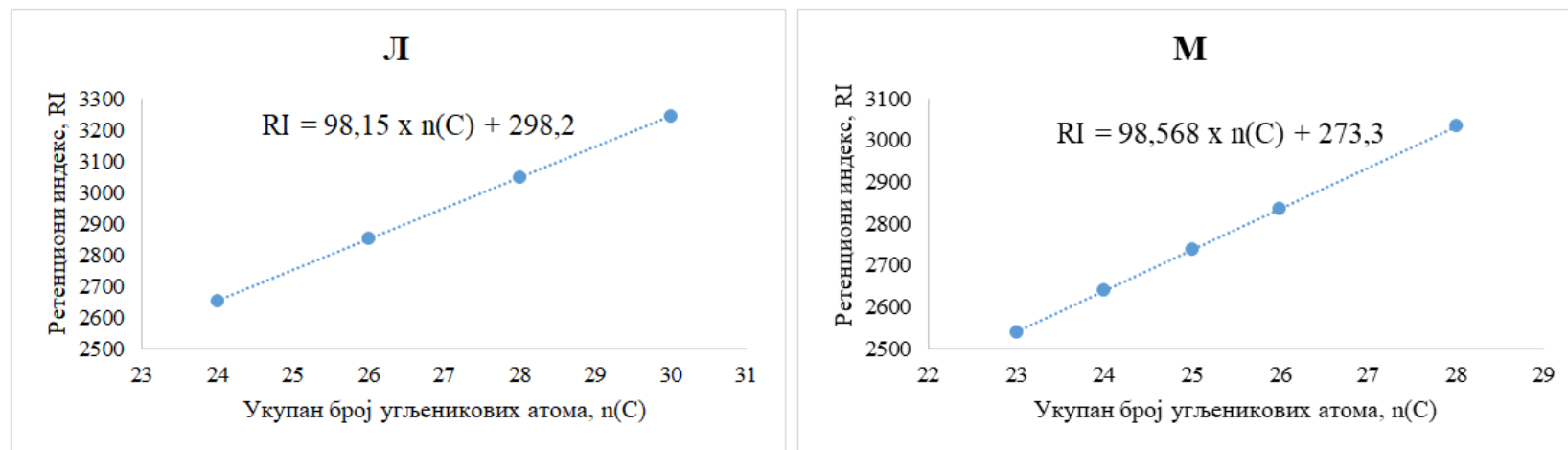
Слика 5.3.27. Корелација броја угљеникових атома у ланцу са вредностима ретенционог индекса триметилсиллил-деривата 2-алканола (А), 3-алканола (Б), 6-алканола (В) и 8-алканола (Г), фракције 4 и синтетских; сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$



Слика 5.3.28. Корелација броја угљеникових атома у ланцу са вредностима ретенционог индекса триметилсилил-деривата (ω -1)-метил-2-алканола (**Д**), (ω -1)-метил-3-алканола (**Б**), (ω -1)-метил-4-алканола (**Е**) и (ω -1)-метил-5-алканола (**Ж**) фракције 4; сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$

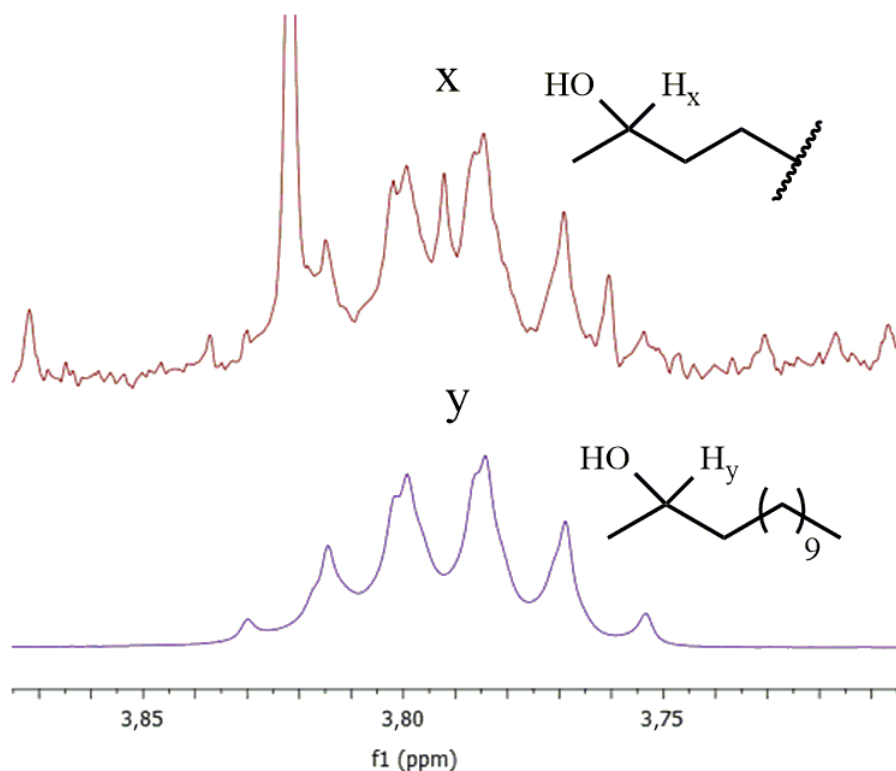


Слика 5.3.29. Корелација броја угљеникових атома у ланцу са вредностима ретенционог индекса триметилсилил-деривата (ω-1)-метил-6-алканола (**З**), (ω-1)-метил-7-алканола (**И**), (ω-1)-метил-8-алканола (**Ј**), (ω-1)-метил-9-алканола (**К**) фракције 4; сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$



Слика 5.3.30. Корелација броја угљеникових атома у ланцу са вредностима ретенционог индекса триметилсилил-деривата (ω -2)-метил-2-алканола (Л), (ω -2)-метил-3-алканола (М) фракције 4; сви корелациони коефицијенти били су $R^2 > 0,999$

У ^1H NMR спектру уочен је сигнал који припада 2-алканолима, а његова асигнација је потврђена у протонском NMR спектру синтетисаног 2-тридеканола (слика 5.3.31). Како је на основу хроматограма заступљеност преосталих секундарних алкохола била мала, њихови одговарајући $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ сигнали нису детектовани у протонском спектру, јер су вероватно преклопљени мултиплетом који потиче од водоника хиралног центра 3-алканола (3,49 – 3,56 ppm).



Слика 5.3.31. Увећање ^1H NMR спектра (400 MHz, у CDCl_3) сигнала 2-алканола (**38a**, **39a-c**, **40a-b**, **41a-c**, **42a-b**, **43a-c**, **44a**, **45a-c** и **46a**, сигнал x) хроматографске фракције 4 испирка *P. veris* и синтетисаног 2-тридеканола (сигнал y)

Укупно је идентификовано 79 *sec*-алкохола са дужином низа од 21 до 31 угљеников атом (слика 5.3.23 и табела 5.3.19) од којих 66 представљају нове природне производе. Међу њима, изомери *n*-нiza 7-, 8- и 9-алканола, као и *n*-нiza 3-алканола, са бројем угљеникових атома у ланцу: 21, 22, 24, 26, 28-31, као и сви рачvasti (*iso*- и *anteiso*-) 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- и 10-алканоли су по први пут идентификовани. У табели 5.3.19 је дат преглед секундарних алкохола који се помињу у литератури. Дужине ланца идентификованих *sec*-алкохола се поклапају са дужинама угљоводоничног низа

идентификованих алкана из хексанске фракције. Као и код свих осталих идентификованих класа једињења фракције 4, и код *sec*-алкохола, рачvasti изомери били су заступљенији него изомери *n*-низа (слика 5.3.23 и табела 5.3.19). Није било могуће упоредити заступљеност изомера са различитим положајем хидроксилне групе јер су пикови триметилсилил-деривата алкохола били преклопљени. Релативна процентуална заступљеност сваког појединачног *n*-, *iso*- и *anteiso*-хомолога одређена је интеграљењем површина испод пикова парцијалних јонских струја у хроматограму (слика 5.3.24 и табела 5.3.19). На основу података доступних у литератури, претпоставља се да је ензим МАН хидролаза (*Mandelamide hydrolase*) одговоран за хидроксилацију дуголанчаних алкана, поготову у положају 3, пре него у положајима 2 и 4, а да је хидроксилација свих осталих положаја мање вероватна. Ипак, деловање МАН ензима није до краја испитано јер је у питању само једно истраживање. На пример, познато је да МАН1 ензим хидроксилује положаје 13, 14 и 15, тј. CH_2 групе које се налазе у унутрашњости ланца алкана (C_{27} - C_{31}) биљне врсте *Arabidopsis thaliana* (Wen & Jetter, 2009).

Табела 5.3.19. Релативна заступљеност секундарних алкохола у хроматографској фракцији испирка *P. veris* идентификованих након силиловања фракције 4

RI ^a	Број С-атома	Триметилсилил-деривати <i>sec</i> -алканола	Садржај (%) ^b
2-Алконоли			
2579	23	2-Трикозанол (38a)	2,6
2642	24	22-Метил-2-трикозанол (39b)	1,3
2653	24	21-Метил-2-трикозанол (39c)	1,4
2678	24	2-Тетракозанол (39a)	1,5
2741	25	23-Метил-2-тетракозанол (40b)	4,0
2773	25	2-Пентакозанол (40a)	11,3
2838	26	24-Метил-2-пентакозанол (41b)	17,0
2852	26	23-Метил-2-пентакозанол (41c)	6,5
2874	26	2-Хексакозанол (41a)	0,8
2936	27	25-Метил-2-хексакозанол (42b)	2,0
2973	27	2-Хептакозанол (42a)	7,2
3035	28	26-Метил-2-хептакозанол (43b)	4,5
3045	28	25-Метил-2-хептакозанол (43c)	2,8
3070	28	2-Октакозанол (43a)	1,3
3172	29	2-Нонакозанол (44a)	3,9
3234	30	28-Метил-2-нонакозанол (45b)	0,5
3243	30	27-Метил-2-нонакозанол (45c)	0,2
3269	30	2-Триакоктанол (45a)	0,4
3369	31	2-Хентриакоктанол (46a)	0,3
Укупно идентификовано 2-алканола			81,8 (19) ^B
<i>n</i> -низ			29,3 (9)
<i>iso</i> -низ			41,7 (6)
<i>anteiso</i> -низ			10,8 (4)
3-Алконоли			
2367	21	3-Хенеикозанол (49a)	тр.

2430	22	20-Метил-3-хенеикозанол (50b)	0,4
2467	22	3-Докозанол (50a)	0,6
2531	23	21-Метил-3-докозанол (51b)	0,9
2539	23	20-Метил-3-докозанол (51c)	тр.
2564	23	3-Трикозанол (51a)	15,4
2631	24	22-Метил-3-трикозанол (52b)	34,3
2640	24	21-Метил-3-трикозанол (52c)	10,2
2666	24	3-Тетракозанол (52a)	1,8
2728	25	23-Метил-3-тетракозанол (53b)	9,7
2739	25	22-Methyl-3-тетракозанол (53c)	7,1
2764	25	3-Пентакозанол (53a)	1,1
2829	26	24-Метил-3-пентакозанол (54b)	8,3
2835	26	23-Метил-3-пентакозанол (54c)	3,2
2866	26	3-Хексакозанол (54a)	0,4
2959	27	3-Хептакозанол (55a)	3,2
3026	28	26-Метил-3-хептакозанол (56b)	1,2
3033	28	25-Метил-3-хептакозанол (56c)	0,5
3060	28	3-Октакозанол (56a)	0,2
3159	29	3-Нонакозанол (57a)	0,6
3226	30	28-Метил-3-нонакозанол (58b)	0,2
3256	30	3-Триакоктанол (58a)	0,2
3355	31	3-Хентриакоктанол (59a)	0,3
Укупно идентификовано			99,8 (23)
3-алканола			
<i>n</i> -низ			23,8 (11)
<i>iso</i> -низ			55,0 (7)
<i>anteiso</i> -низ			21,0 (5)
4-Алколи			
2620	24	22-Метил-4-трикозанол (62b)	23,5
2634	24	21-Метил-4-трикозанол (62c)	10,0
2719	25	23-Метил-4-тетракозанол (63b)	2,3

2826	26	24-Метил-4-пентакозанол (64b)	3,9
3021	28	26-Метил-4-хептакозанол (65b)	0,5
3124	29	27-Метил-4-октакозанол (66b)	1,4
3224	30	28-Метил-4-нонакозанол (67b)	1,5
3324	31	29-Метил-4-триаконтанол (68b)	0,6
Укупно идентификовано			43,7 (8)
4-алканола			
<i>n</i> -низ			н.д.
<i>iso</i> -низ			33,7 (7)
<i>anteiso</i> -низ			10,0 (1)
5-Алконоли			
2618	24	22-Метил-5-трикозанол (71b)	0,7
2712	25	23-Метил-5-тетракозанол (72b)	5,6
2910	27	25-Метил-5-хексакозанол (73b)	4,2
3107	29	27-Метил-5-октакозанол (74b)	3,4
Укупно идентификовано			13,9 (4)
5-алканола			
<i>n</i> -низ			н.д.
<i>iso</i> -низ			13,9 (4)
<i>anteiso</i> -низ			н.д.
6-Алконоли			
2510	23	21-Метил-6-докозанол (77b)	1,6
2902	27	25-Метил-6-хексакозанол (78b)	7,9
3058	28	6-Октакозанол (79a)	0,8
3096	29	27-Метил-6-октакозанол (80b)	0,1
3157	29	6-Нонакозанол (80a)	3,1
3291	31	29-Метил-6-триаконтанол (81b)	2,2
Укупно идентификовано			15,7 (6)
6-алканола			
<i>n</i> -низ			3,9 (2)
<i>iso</i> -низ			11,8 (4)

		<i>anteiso</i> -низ	н.д.
7-Алконоли			
2306	21	19-Метил-7-еикозанол (84b)	0,8
2363	21	7-Хенеикозанол (84a)	1,7
2502	23	21-Метил-7-докозанол (85b)	76,5
2700	25	23-Метил-7-тетракозанол (86b)	4,9
2896	27	25-Метил-7-хексакозанол (87b)	9,3
Укупно идентификовано			93,2 (5)
7-алканола			
<i>n</i> -низ			1,7 (1)
<i>iso</i> -низ			91,5 (4)
<i>anteiso</i> -низ			н.д.
8-Алконоли			
2362	21	8-Хенеикозанол (89a)	1,8
2498	23	21-Метил-8-докозанол (90b)	32,8
2559	23	8-Трикозанол (90a)	1,8
2693	25	23-Метил-8-тетракозанол (91b)	13,3
2890	27	25-Метил-8-хексакозанол (92b)	13,6
3080	29	27-Метил-8-октакозанол (93b)	9,7
Укупно идентификовано			72,9 (6)
8-алканола			
<i>n</i> -низ			3,6 (2)
<i>iso</i> -низ			69,3 (4)
<i>anteiso</i> -низ			н.д.
9-Алконоли			
2359	21	9-Хенеикозанол (95a)	0,5
2495	23	21-Метил-9-докозанол (96b)	18,1
2554	23	9-Трикозанол (96a)	1,7
2689	25	23-Метил-9-тетракозанол (97b)	42,3
2884	27	25-Метил-9-хексакозанол (98b)	7,9
3076	29	27-Метил-9-октакозанол (99b)	9,0

Укупно идентификовано			79,5 (6)
9-алканола			
<i>n</i> -низ			2,2 (2)
<i>iso</i> -низ			77,3 (4)
<i>anteiso</i> -низ			н.д.
10-Алконоли			
2687	25	23-Метил-10-тетракозанол (100b)	5,9
3074	29	27-Метил-10-октакозанол (101b)	53,9
Укупно идентификовано			59,9 (2)
10-алканола			
<i>n</i> -низ			н.д.
<i>iso</i> -низ			59,9 (2)
<i>anteiso</i> -низ			н.д.
Укупан број			79
идентификованих <i>sec</i>-алканола			

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (70(0')/5 °C min⁻¹/315(30')) за триметилсилил-деривате;

^b релативна заступљеност (%) одређена је интегралнењем површина испод пикова парцијалних јонских струја: 2-алканоли – *m/z* 117 [CH₃CHOSi(Me)₃]⁺, 3-алканоли – *m/z* 131 [CH₃CH₂CHOSi(Me)₃]⁺, 4-алканоли – *m/z* 145 [CH₃(CH₂)₂CHOSi(Me)₃]⁺, 5-алканоли – *m/z* 159 [CH₃(CH₂)₃CHOSi(Me)₃]⁺, 6-алканоли – *m/z* 173 [CH₃(CH₂)₄CHOSi(Me)₃]⁺, 7-алканоли – *m/z* 187 [CH₃(CH₂)₅CHOSi(Me)₃]⁺, 8-алканоли – *m/z* 201 [CH₃(CH₂)₆CHOSi(Me)₃]⁺, 9-алканоли – *m/z* 215 [CH₃(CH₂)₇CHOSi(Me)₃]⁺, 10-алканоли – *m/z* 229 [CH₃(CH₂)₈CHOSi(Me)₃]⁺; релативна заступљеност (%; тр., траг, <0,05%; н.д. – није детектовано) једињења *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа у оквиру групе *sec*-алкохола која је одређена положајем хидроксилне групе, па због тога проценти једињења између група нису упоредиви (на пример, за 3-алканоле и 4-алканоле, итд.);

^b број у загради представља број идентификованих једињења која припадају тој групи *sec*-алканола.

Табела 5.3.20. Дуголанчани *sec*-алканоли изоловани из узорака природног порекла (преглед литературе)

<i>sec</i> -Алкохоли	
2-Трикозанол	- <i>Mycobacterium xenopi</i> (Alugupalli & Larsson, 1992) - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Busta & Jetter, 2017)
2-Тетракозанол	- <i>M. xenopi</i> (Alugupalli & Larsson, 1992)
2-Пентакозанол	- Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>Solanum tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
2-Хексакозанол	- Етарско уље каранфилића и аниса (Della Porta et al., 1998) - Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>S. tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
2-Хептакозанол	- Кутикуларни воскови стабљике <i>Arabidopsis</i> (Goodwin et al., 2005) - Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>S. tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
6-Октакозанол	- Феромони изоловани са крила <i>Pieris rapae</i> и <i>Pieris brassicae</i> (Yildizhan et al., 2009)
2-Октакозанол	- Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>S. tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
6-Нонакозанол	- Епикутикуларни воскови <i>Picea abies</i> (L.) Karst. (Percy et al., 2009) - Феромони изоловани са крила <i>P. rapae</i> и <i>P. brassicae</i> (Yildizhan et al., 2009)
2-Нонакозанол	- Кутикуларни воскови листова <i>Aloe arborescens</i> (Racovita et al., 2015) - Кутикуларни воскови стабљике <i>Arabidopsis</i> (Goodwin et al., 2005) - Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>S. tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
2-Триакоктанол	- Кутикуларни воскови листова кромпира (<i>S. tuberosum</i> ; Szafranek & Synak, 2006)
2-Хентриакоктанол	- Кутикуларни воскови стабљике <i>Arabidopsis</i> (Goodwin et al., 2005)

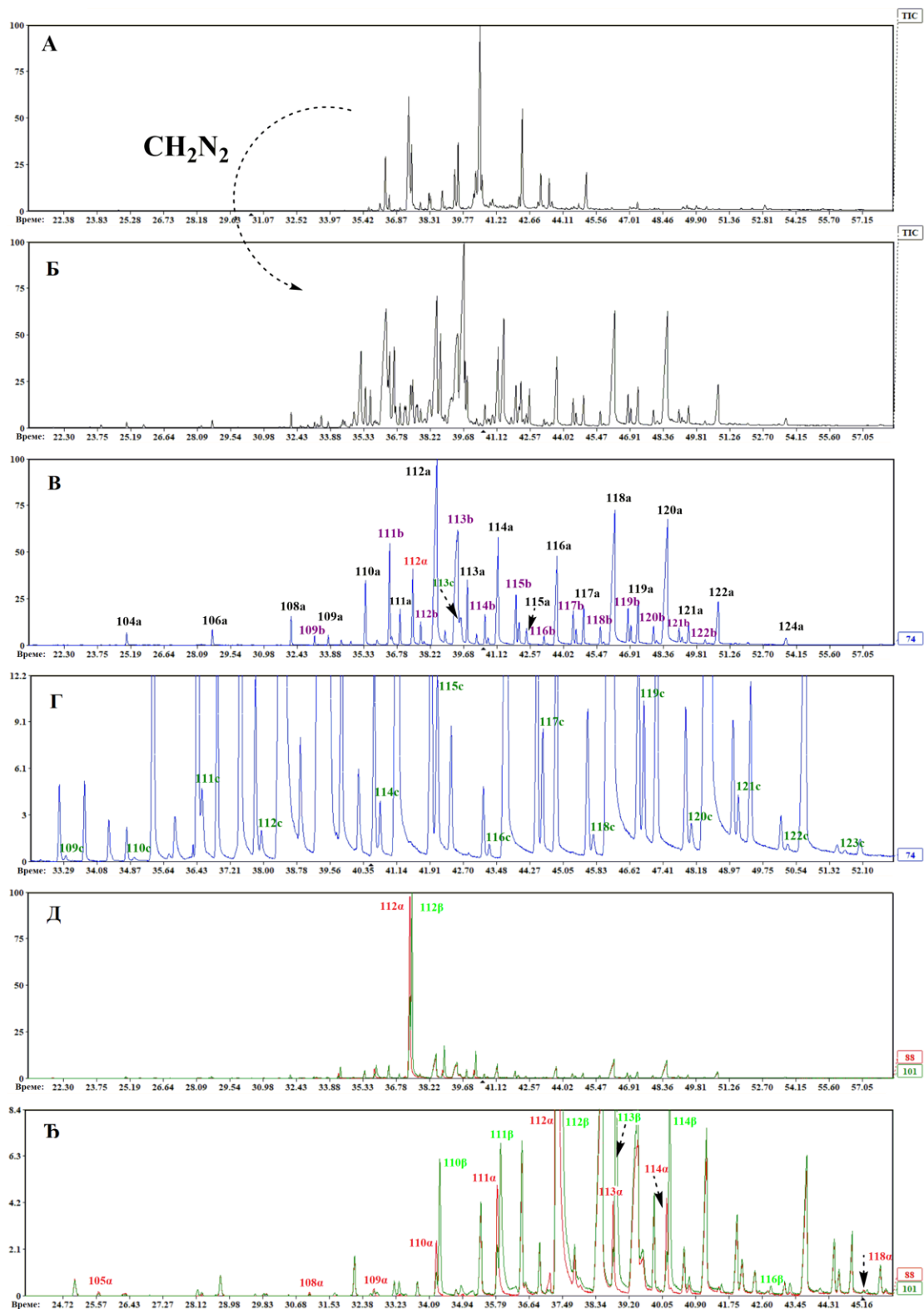
5.3.6. Слободне масне киселине

У масеним скеновима хроматограма недериватизоване фракције 4 уочавају се јони вредности m/z који одговарају серији $[\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n]^+$ јона, и јони m/z 60, $[\text{H}_2\text{OOCCH}_2]^+$, који највероватније потичу од слободних масних киселина присутних у фракцији. У ^{13}C NMR спектру уочен је сигнал на δ 178,5 који потиче од C-атома карбоксилне групе (Pretsch et al., 2009). Фракција 4 садржи секундарне алкоhole, диестре, дикетоне и масне киселине које коелуирају као широки пикови у хроматограму. Због тога је извршена танкослојна хроматографија комерцијално доступних дуголанчаних алкоholeа и киселина: 1-хексадеканол (мрља 1), 1-октадеканол (мрља 2), октадеканска киселина (мрља 3) и докозанска киселина (мрља 4), и фракција 4 (мрља Ф-4; слика 5.3.32). На силика-гелу, палмитил- и стеарил-алкоholeи су били поларнији (имали су ниже вредности R_f) у односу на стеаринску и бехенску киселину, док су ове киселине биле сличних вредности R_f као и састојци фракције 4.

Пре него што је силилована, фракција 4 је третирана етарским раствором CH_2N_2 (Pic-Tomic et al., 2015), чиме су све слободне масне киселине преведене у одговарајуће метил-естре (слика 5.3.33). Добијени хроматограм је сада садржавао мноштво пикова метил-естара, што је омогућило идентификацију слободних масних киселина (слика 5.3.33). На основу података добијених анализом масених спектра у комбинацији са ретенционим индексима метил-естара, а и на основу података добијених NMR анализом фракције, идентификоване су засићене дуголанчане масне киселине нормалног и рачвастог низа. Метиленски протони, у α - и β -положајима до карбонила масних киселина n -низа, асигнирани су као триплет на 2,36 ($J=7,5$ Hz) и квинтет 1,65 ppm ($J=7,5$ Hz; табела 5.3.18). Присуство 24 дуголанчана метил-естра масних киселина n -низа (C_{14} , C_{16} - C_{38} , табела 5.3.21), је потврђено GC-MS анализом (под истим условима снимања) метил-естара комерцијално доступних масних киселина n -низа, као и оних добијених синтетским путем (слика 5.3.34) и након метанолизе пчелињег воска (слика 5.2.2).



Слика 5.3.32. Пластика након танкослојне хроматографије (елуент: *n*-хексан:Et₂O=3:1, *v/v*) 1-хексадеканоло (палмитил-алкохола, мрља 1), 1-октадеканоло (стеарил-алкохола, мрља 2), октадеканске киселине (стеаринске киселине, мрља 3), докозанске киселине (бехенске киселине, мрља 4) и фракције 4 (мрља Ф-4); мрље су визуализоване помоћу UV-лампе (254 nm и оловком су заокружене мрље у тачкама 3 и 4), а затим и 50%-тним (*v/v*) воденим раствором сумпорне киселине, након чега су пластице кратко загреване до појаве мрља



Слика 5.3.33. Увећања укупних јонских хроматограма пре (А) и након (Б) дериватизације фракције 4 са CH₂N₂; увећања парцијалних јонских хроматограма са карактеристичним јонима метил-естара масних киселина – В: *n*-низа (104а, 106а, 108-122а и 124а) и *iso*-низа (109б и 111-122б); В и Г: *anteiso*-низа (109-112с и 114-123с) и В, Д и Б: 2-метил-(105а, 108-114а и 118а) и 3-метил-(110-114б и 116б) низа

Табела 5.3.21. Дуголанчане масне киселине идентификоване и квантификоване у фракцији 4 испирка *P. veris* као одговарајући метил-естри

RT ^a	Ознака	Једињење	μg mg ⁻¹ ^b
1724	14:0	Метил-тетрадеcanoат (102a)	тр.
1924	16:0	Метил-хексадеcanoат (104a)	2,2
1960	α-17:0	Метил-2-метилхексадеcanoат (105a)	тр.
1988	<i>i</i> -17:0	Метил-15-метилхексадеcanoат (105b)	тр.
2024	17:0	Метил-хептадеcanoат (105a)	тр.
2088	<i>i</i> -18:0	Метил-16-метилхептадеcanoат (106b)	1,1
2124	18:0	Метил-октадеcanoат (106a)	2,4
2188	<i>i</i> -19:0	Метил-17-метилоктадеcanoат (107b)	1,1
2196	<i>a</i> -19:0	Метил-16-метилоктадеcanoат (107c)	1,0
2224	19:0	Метил-нонадеcanoат (107a)	1,1
2260	α-20:0	Метил-2-метилнонадеcanoат (108a)	тр.
2288	<i>i</i> -20:0	Метил-18-метилнонадеcanoат (108b)	тр.
2296	<i>a</i> -20:0	Метил-17-метилнонадеcanoат (108c)	тр.
2324	20:0	Метил-еикозаноат (108a)	3,6
2360	α-21:0	Метил-2-метилеикозаноат (109a)	1,2
2388	<i>i</i> -21:0	Метил-19-метилеикозаноат (109b)	1,9
2396	<i>a</i> -21:0	Methyl-18-метилеикозаноат (109c)	тр.
2424	21:0	Метил-хенеикозаноат (109a)	2,1
2460	α-22:0	Метил-2-метилхенеикозаноат (110a)	1,2
2468	β-22:0	Метил-3-метилхенеикозаноат (110β)	1,4
2488	<i>i</i> -22:0	Метил-20-метилхенеикозаноат (110b)	1,7
2496	<i>a</i> -22:0	Метил-19-метилхенеикозаноат (110c)	тр.
2524	22:0	Метил-докозаноат (110a)	9,9
2560	α-23:0	Метил-2-метилдокозаноат (111a)	1,5
2568	β-23:0	Метил-3-метилдокозаноат (111β)	2,6
2588	<i>i</i> -23:0	Метил-21-метилдокозаноат (111b)	16,9
2596	<i>a</i> -23:0	Метил-20-метилдокозаноат (111c)	тр.
2624	23:0	Метил-трикозаноат (111a)	6,0

2660	α -24:0	Метил-2-метилтрикозаноат (112a)	11,4
2668	β -24:0	Метил-3-метилтрикозаноат (112b)	11,2
2688	<i>i</i> -24:0	Метил-22-метилтрикозаноат (112b)	5,4
2696	<i>a</i> -24:0	Метил-21-метилтрикозаноат (112c)	1,5
2724	24:0	Метил-тетракозаноат (112a)	56,5
2760	α -25:0	Метил-2-метилтетракозаноат (113a)	1,6
2768	β -25:0	Метил-3-метилтетракозаноат (113b)	4,6
2788	<i>i</i> -25:0	Метил-23-метилтетракозаноат (113b)	53,5
2796	<i>a</i> -25:0	Метил-22-метилтетракозаноат (113c)	27,4
2824	25:0	Метил-пентакозаноат (113a)	12,8
2860	α -26:0	Метил-2-метилпентакозаноат (114a)	1,5
2868	β -26:0	Метил-3-метилпентакозаноат (114b)	3,2
2888	<i>i</i> -26:0	Метил-24-метилпентакозаноат (114b)	6,1
2896	<i>a</i> -26:0	Метил-23-метилпентакозаноат (114c)	2,5
2924	26:0	Метил-хексакозаноат (114a)	22,9
2988	<i>i</i> -27:0	Метил-25-метилхексакозаноат (115b)	10,9
2996	<i>a</i> -27:0	Метил-24-метилхексакозаноат (115c)	5,3
3024	27:0	Метил-хептакозаноат (115a)	4,3
3068	β -28:0	Метил-3-метилхептакозаноат (116b)	1,2
3088	<i>i</i> -28:0	Метил-26-метилхептакозаноат (116b)	1,5
3096	<i>a</i> -28:0	Метил-25-метилхептакозаноат (116c)	1,5
3124	28:0	Метил-октакозаноат (116a)	21,0
3188	<i>i</i> -29:0	Метил-27-метилоктакозаноат (117b)	6,9
3196	<i>a</i> -29:0	Метил-26-метилоктакозаноат (117c)	4,2
3224	29:0	Метил-нонакозаноат (117a)	8,1
3260	α -30:0	Метил-2-метилнонакозаноат (118a)	тр.
3288	<i>i</i> -30:0	Метил-28-метилнонакозаноат (118b)	4,1
3296	<i>a</i> -30:0	Метил-27-метилнонакозаноат (118c)	1,9
3324	30:0	Метил-триаконтаноат (118a)	54,0
3388	<i>i</i> -31:0	Метил-29-метилтриаконтаноат (119b)	7,8
3396	<i>a</i> -31:0	Метил- 28-метилтриаконтаноат (119c)	5,2

3424	31:0	Метил-хентриаконтаноат (119a)	11,7
3488	<i>i</i> -32:0	Метил-30-метилхентриаконтаноат (120b)	5,1
3496	<i>a</i> -32:0	Метил-29-метилхентриаконтаноат (120c)	1,6
3524	32:0	Метил-дотриаконтаноат (120a)	56,9
3588	<i>i</i> -33:0	Метил-31-метилдотриаконтаноат (121b)	4,9
3596	<i>a</i> -33:0	Метил-30-метилдотриаконтаноат (121c)	2,7
3624	33:0	Метил-тритриаконтаноат (121a)	7,3
3688	<i>i</i> -34:0	Метил-32-метилтритриаконтаноат (122b)	2,7
3596	<i>a</i> -34:0	Метил-31-метилтритриаконтаноат (122c)	1,8
3724	34:0	Метил-тетратриаконтаноат (122a)	16,8
3788	<i>i</i> -35:0	Метил-33-метилтетратриаконтаноат (123b)	2,0
3796	<i>a</i> -35:0	Метил-32-метилтетратриаконтаноат (123c)	1,6
3824	35:0	Метил-пентатриаконтаноат (123a)	2,5
3888	<i>i</i> -36:0	Метил-34-метилпентатриаконтаноат (124b)	тр.
3896	<i>a</i> -36:0	Метил-33-метилпентатриаконтаноат (124c)	тр.
3924	36:0	Метил-хексатриаконтаноат (124a)	3,5
4024	37:0	Метил-хептатриаконтаноат (125a)	тр.
4124	38:0	Метил-октатриаконтаноат (126a)	1,6
Укупно идентификовано метил-естара			541,3 (77)
Нормалног низа (<i>N</i>)			307,0 (24) ^B
Парни			251,2 (13)
Непарни			55,8 (11)
<i>Iso</i> -низа			133,5 (20)
Парни			27,7 (10)
Непарни			105,8 (10)
<i>Anteiso</i> -низа			58,4 (18)
Парни			10,9 (9)
Непарни			47,5 (9)
2-Метил (α)			18,2 (9)
Парни			14,0 (5)
Непарни			4,2 (4)

3-Метил (β)	24,2 (6)
Парни	17,0 (4)
Непарни	7,2 (2)

тр. – траг ($<1,0 \mu\text{g mg}^{-1}$);

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана ($70(0')/5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}/315(30')$ или $200(0')/1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}/315(30')$);

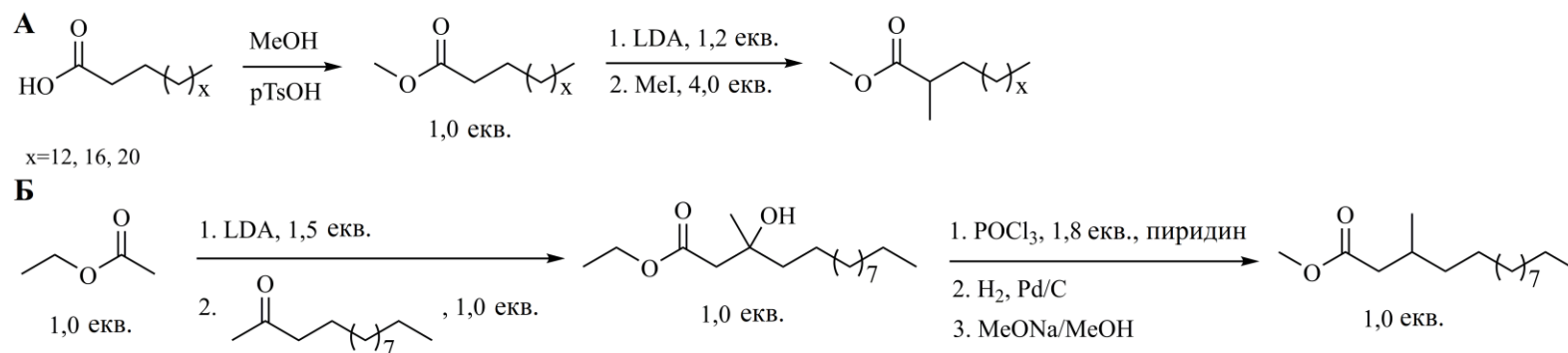
^b концентрација метил-естара је изражена као μg по mg фракције;

^b број у загради представља број идентификованих метил-естара који припадају тој класи.

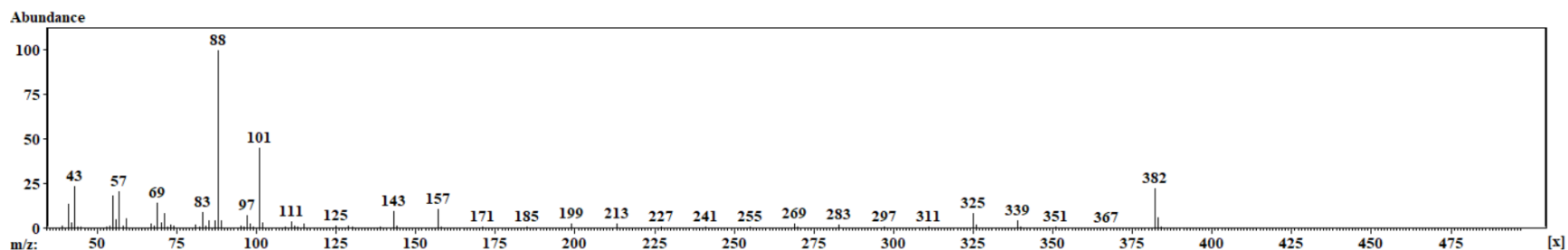
Укупно је идентификовано 77 метил-естара масних киселина, подељених у 5 група на основу правилности којом се мењају вредности њихових ретенционих индекса, од којих је једна серија дуголанчаних метил-естара *n*-масних киселина (слика 5.3.33). Остале четири серије представљају изомере *n*-серије, са нижим вредностима RI. Међу њима, ретенционе особине двеју серија су одговарале *iso*- и *anteiso*-хомолозима, док је код преосталих двеју серија, које елуирају брже од њих, претпостављено да се рачва налази ближе функционализованом крају ланца (Kubines et al., 2011). Ово је потврђено ^{13}C - ^1H интеракцијама кроз две и три везе у gHMBC спектру фракције (карбонилни угљеник чији је сигнал на 181,8 ppm корелише са водоницима Me-2', а карбонилни угљеник чији је сигнал на 177,9 ppm корелише са H-2, слика 5.3.5), што је у слози са хемијским померањима и корелацијама сигнала одабраних стандарда киселина, 2-метилхексанске и 3-метилхексанске киселине (Pretsch et al., 2009; Eychart, 1981; Couperus et al., 1978). У масеним спектрима α - и β -рачвастих масних киселина доминантни су били јони m/z 88 и 101, који потичу од Меклафертијевог (*McLafferty*) премештања и α -фрагментације у односу на рачву (слике 5.3.35 и 5.3.36; Aron & Nicolaidis, 1975). Како су у литератури за 2-метил и 3-метилкиселине доступни само ^{13}C NMR подаци, ради потврде њихове структуре у фракцији, снимљени су NMR спектри комерцијално доступних киселина, 2-метилхексанске и 3-метилхексанске киселине (табела 5.3.22; Eychart, 1981; Couperus et al., 1978). Добијени подаци су у потпуности били у слози са подацима добијеним NMR анализом фракције (табела 5.3.22). Могућност постојања двеју рачви, односно нпр. α , (ω -1)-диметил-масних киселина, одмах је одбачена на основу одличне корелације еквивалената дужине ланца (Kubines et al., 2011) и ретенционих индекса пет изомерних

серија метил-естара, са дужином угљоводоничног ланца киселине од C₂₁ и C₂₂ (слика 5.3.37). Присуство 2-метилкиселина у фракцији 4 још једном је потврђено GC-MS коињекцијом дериватизоване фракције са синтетском смешом метил-2-метилкиселина (метил-2-метилхексадеканат, метил-2-метилоктадеканат и метил-2-метилдокозанат), која је добијена метиловањем литијум-енолата одговарајућих метил-естара (поглавље 4.4.14). Ради потврде структуре 3-метилкиселина, синтетисан је метил-3-метилтетрадеканат у четири корака: алдолна адиција литијум-енолата етил-ацетата на одговарајући 2-алканон, након чега је уследила дехидратација, а затим хидрогенизација и метанолиза (поглавље 4.4.15).

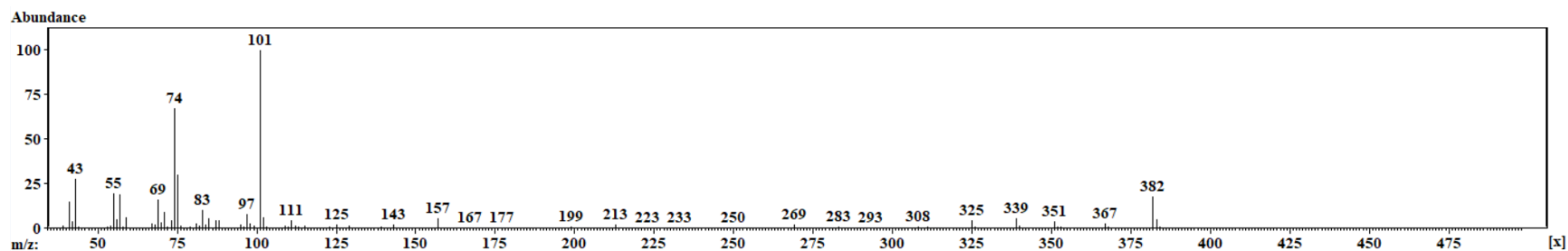
На овај начин је идентификовано и квантификовано (μg по mg фракције) 77 дуголанчаних метил-естара засићених масних киселина *n*-, *iso*-, *anteiso*-, 2-метил и 3-метил-низа (слика 5.3.38, табела 5.3.21). Међу њима, 32-метилтриакоктанска, 33-метилтетраакоктанска, 34-метилпентаакоктанска, 33-метилпентаакоктанска, 2-метилпентакозанска и све идентификоване 3-метил-масне киселине (3-метилхенеикозанска, 3-метилдокозанска, 3-метилтрикозанска, 3-метилтетракозанска, 3-метилпентакозанска и 3-метилхептакозанска киселина) представљају нове природне производе. 2-Метилхенеикозанска, 2-метилдокозанска и 2-метилтрикозанска киселина до сада су детектоване само везаном облику у оквиру фосфолипида али не и као слободне (Siljeström et al., 2017). Интересантно је поменути да је 3-метилхенеикозанска киселина активна против ларви комараца, тако што убија ларве у првој фази њиховог развоја (Hwang et al., 1978). Листа до сада идентификованих 2-метилкиселина дата је у табели 5.3.23.



Слика 5.3.34. Синтетска шема: **A** – метил-2-метилхексадеcanoата (**104 α**), метил-2-метилоктадеcanoата (**106 α**) и метил-2-метилдокозаноата (**110 α**) и **B** – метил-3-метилтетрадеcanoата (**103 β**)



Слика 5.3.35. Масени спектар метил-2-метилтрикозаноата (**112 α**) метиловане фракције 4 испирка *P. veris*



Слика 5.3.36. Масени спектар метил-3-трикозаноата (**112 β**) метиловане фракције 4 испирка *P. veris*

Табела 5.3.22. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) дуголанчаних масних киселина хроматографске фракције 4 испирка *P. veris*, као и комерцијално доступних киселина: 2-метилхексанска и 3-метилхексанска киселина

Положај	Киселине <i>n</i> -, <i>iso</i> - и <i>anteiso</i> -низа		2-Метил-киселине (α)		2-Метилхексанска киселина ^а		3-Метил-киселине (β)		3-Метилхексанска киселина ^б	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	178,5	/	181,8 ^в	/	183,5	/	177,9 ^в	/	179,6	/
2	33,8	2,36 (t, $J=7,5$ Hz, 2H)	39,4	2,4586 (ddq, $J=7,30, 7,00, 6,30$ Hz, 1H) ^г	39,4	2,46 (m, 1H)	41,2	2,15 (dd, $J=-14,9, 8,2$ Hz, 1H) 2,35 (1H, преклопљен сигнал)	41,6	2,15 (dd, $J=-14,9, 8,0$ Hz, 1H) 2,35 (dd, $J=-14,9, 6,0$ Hz, 1H)
3	24,7	1,65 (quint, $J=7,5$ Hz, 2H)	33,1	$\approx 1,40$ (1H, преклопљен сигнал) $\approx 1,60$ (1H, преклопљен сигнал)	33,2	1,42 (m, 1H) 1,69 (m, 1H)	$\approx 30,0$	1,90 (m, 1H)	29,9	1,98 (m, 1H)
2'	/	/	16,8	1,1871 (d, $J=6,30$ Hz, 3H) ^г	16,8	1,18 (d, $J=6,9$ Hz, 3H)	/	/	/	/
3'	/	/	/	/	/	/	19,5	0,99 (d, $J=6,6$ Hz, 3H)	19,6	0,97 (d, $J=6,6$ Hz, 3H)

^а хемијска померања одговарајућих језгара (водоника и угљеника) 2-метилхексанске киселине; за остале сигнале видети табелу у прилогу;

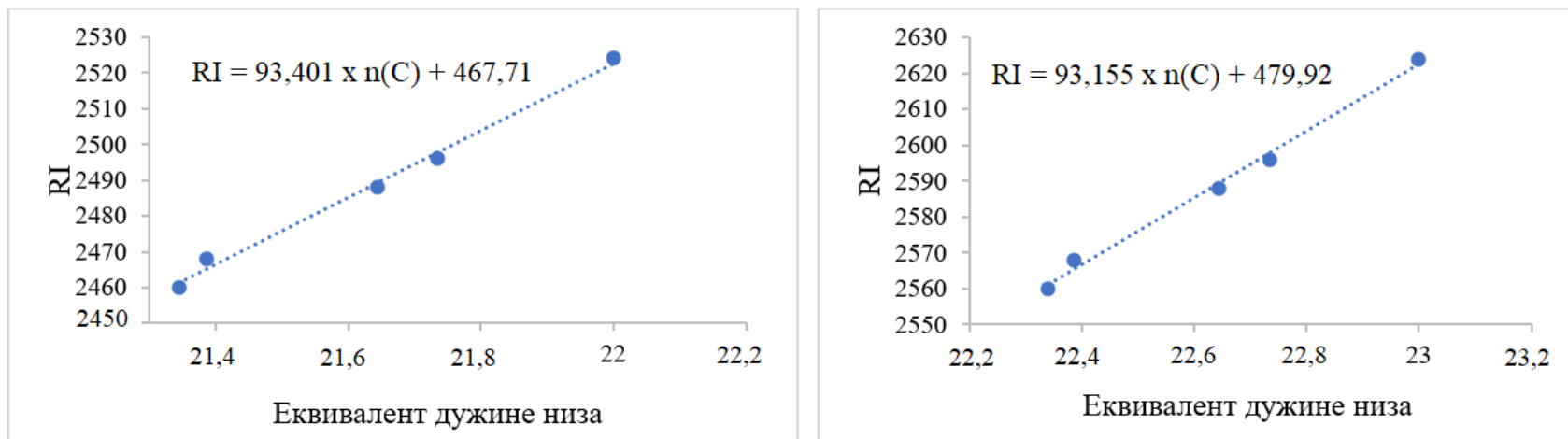
^б хемијска померања одговарајућих језгара (водоника и угљеника) 3-метилхексанске киселине; за остале сигнале видети табелу у прилогу;

^в хемијска померања су прочитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала; слика 5.3.5 Б);

^г хемијска померања (4 децимале) и константе купловања (две децимале и знак) одређени су симулацијом помоћу *MestReNova* софтверског пакета;

/ – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

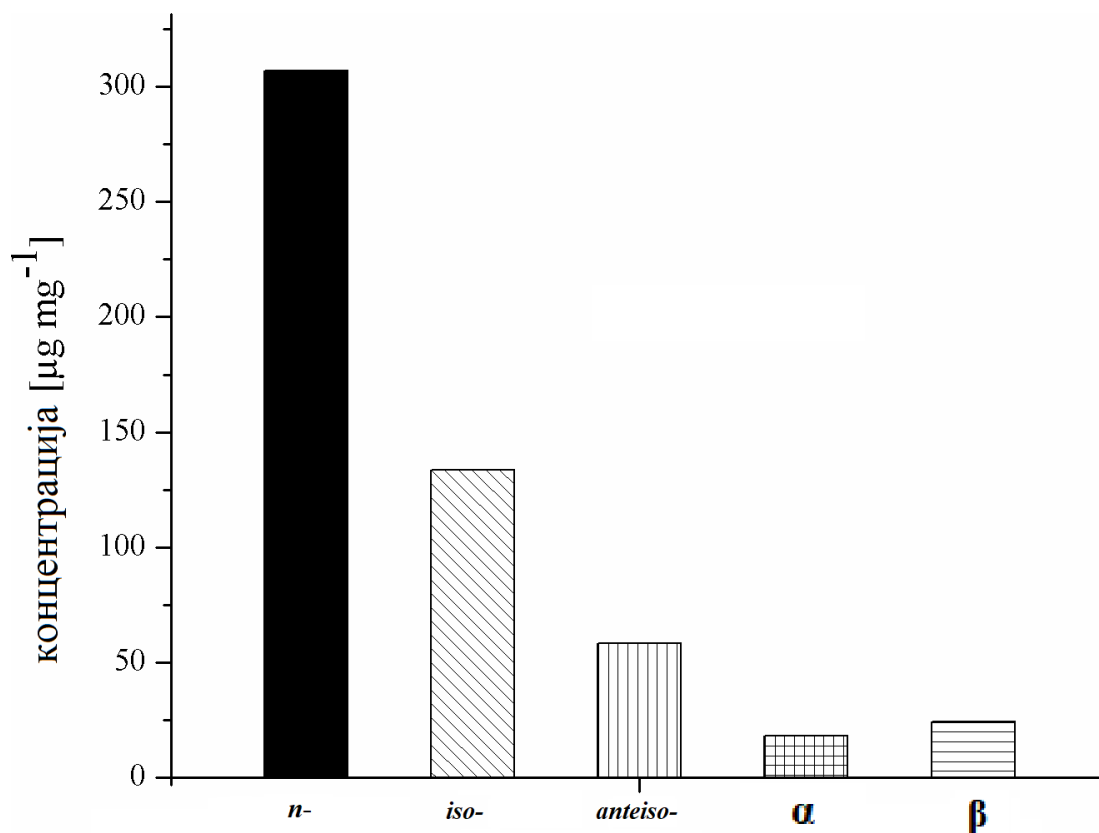
У овом раду су први пут идентификоване дуголанчане 2-метил- и 3-метилкиселине у биљном царству. 2-Метил- и 3-метилкиселине највероватније не настају истим биосинтетским путем као и *iso*- и *anteiso*-киселине (Kunst et al., 2006). Може се претпоставити да оне настају из *iso*- и *anteiso*-алкана оксидацијом одговарајуће метил-групе, јер је *iso*- и *anteiso*-тип рачви веома заступљен у свим класама једињења идентификованих метаболита врста *Primula*. Из тог разлога би требало очекивати да су у испирку присутне и 2-етил-масне киселине, које би настале оксидацијом метил-рачве *anteiso*-алкана. Међутим, овакве киселине нису детектоване у фракцији 4 или било којој другој фракцији из, вероватно два разлога, њихове мале заступљености и/или чињенице да је оксидација баш те метил-групе из неког разлога неповољна. Друга претпоставка је да током биосинтезе ових рачвастих масних киселина, косупстрат *S*-аденозил-метионин учествује у метиловању двогубе везе моноенске киселине. Након тога, добијени производ се редукује до једињења са метил-рачвом помоћу NADPH-кофактора (Buist, 2007). Трећа могућност је реакција ацетил-СоА карбоксилазе са пропионил-СоА. Метилмалонил-СоА се затим уграђује у масне киселине помоћу ензима синтазе. Такође, 3-метил-киселине се могу скратити за једну метиленску групу, α -декарбоксилацијом, чиме би се добиле 2-метил-киселине.



Слика 5.3.37. Корелација вредности еквивалентне дужине низа и ретенционих индекса пет изомерних естара масних киселина C_{21} и C_{22} ; корелациони коефицијент је у оба случаја био $R^2 > 0,99$

Табела 5.3.23. Дуголанчане 2-метил-масне киселине изоловане из узорак природног порекла (преглед литературе)

2-Метил-масне киселине	
2-Метилхексадеканска киселина	- Хидролизат секрета жлезди морског прасета (Harvey, 1991) - Жлезде патака (Kolattukudy et al., 1991) - Жлезде птица (Jacob et al., 1997) - <i>Musca domestica</i> L. (Blomquist et al., 1994) - Животињске масти (Indrasti, 2010) - Мишићи мужјка и женке <i>Ovibos moschatus</i> (Alves et al., 2015) - Седимент језера <i>Santa Olalla Lagoon, Spain</i> (Grimalt et al., 1991) - <i>Vernix caseosa</i> (Hauff & Vetter, 2010)
2-Метилнонадеканска киселина	- Хидролизат секрета жлезди морског прасета (Harvey, 1991)
2-Метилеикозанска киселина	- Идентификација ове киселине са присутном 2,4,6-триметилтетракозанском киселином је јединствен маркер за идентификацију <i>M. malmoense</i> врста <i>Mycobacterium</i> (Valero-Guillén et al., 1988; Jantzen et al., 1989; Perez et al., 1994)
2-Метилтетракозанска киселина	- Алге, <i>Chlorella kessleri</i> (Řezanka et al., 1983)
2-Метилнонакозанска киселина	- Седимент језера <i>Léman</i> , Женева (Mendoza et al., 2006)



Слика 5.3.38. Заступљеност дуголанчаних масних киселина (квантификоване као одговарајући метил-естри) хроматографске фракције 4 испирка *P. veris*: *n*-, *iso*-, *anteiso*-, α (2-метил-) и β (3-метил)-низа

5.3.7. Процена релативног односа количина одабраних састојака фракције 4 помоћу ^1H NMR спектроскопије и њихов садржај по површини органа

Као што је већ раније поменуто, састојци фракција испирака, као и самих испирака, квантификовани су интегралнењем површина испод пикова у GC-MS-хроматограмима, али услед различите осетљивости MS-детектора за различите анализе, ова квантификација је само орјентациона. Састојци неког узорка се могу квантификовати и интегралнењем карактеристичних сигнала у ^1H NMR спектру, али само оних који нису преклопљени. На основу интегралнења карактеристичних сигнала у ^1H NMR спектру фракције 4 (слика 5.3.15), уочава се да су изомери *iso*- и *n*-низа доминантнији у односу на *anteiso*-изомере. Симулацијом протона (Radulović et al., 2019) *n*-, *iso*- и *anteiso*-низа, било је могуће одредити релативни однос међу изомерима нормалног и рачвастог низа у фракцији 4: $n : iso : anteiso = 1 : 0,62 : 0,15$, где се увиђа да су *iso*-хомолози заступљени у високом уделу. Ипак, заступљеност *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера међу класама једињења није била једнака, јер су код неких класа *iso*-изомери били доминантнији у односу на *n*- и *anteiso*-изомере.

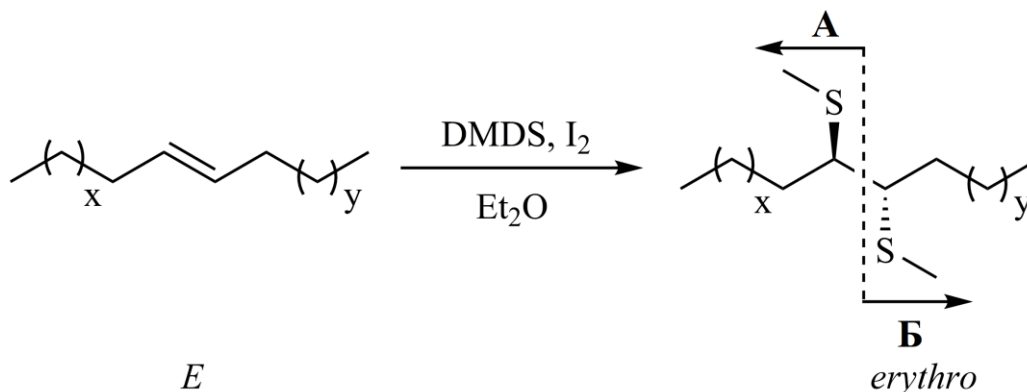
Однос *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, 1-фенил-1,3-алкадиона и 3-алканола (заједно са осталим *sec*-алкохолима) на основу интегралнења карактеристичних сигнала у протонском NMR спектру (слике 5.3.4 и 5.3.15) био је $1 : 0,08 : 0,03 : 0,57$, док је однос на основу интегралнења површина испод пикова у хроматограму метиловане фракције био $1 : 0,08 : 0,04 : 1,23$. Уочава се велико одступање релативног садржаја 3-алканола, што се може повезати са чињеницом да масени детектор има другачију осетљивост према ароматичним у односу на алифатична једињења. Иако је заступљеност масних киселина изражена као што је приказано у поглављу 5.3.6, уколико бисмо занемарили површину цветова у односу на површину листова *P. veris*, могла би се израчунати укупна количина (у μg) следећих класа једињења по cm^2 површине листа, *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата, 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата, 1-фенил-1,3-алкадиона и 3-алканола (заједно са осталим *sec*-алкохолима) и масних киселина: 0,49, 0,04, 0,02, 0,25 и 0,93.

5.4. Анализа састојака фракције 1 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8): алкани и алкени

Воскови са површине цветова *L. tulipifera* (P-8), у фази пуног цвета, испрани су помоћу ултразвука, краткотрајним потапањем у хлороформ. Након прелиминарне GC-MS анализе, састојци испирака раздвојени су градијентном *dry-flash* хроматографијом на силика-гелу (шема 4.3.3; поступак је описан у поглављу 4.3.3).

Анализом хексанске фракције испирка цветова *L. tulipifera* (P-8) идентификовани су дуголанчани алкани (C_{13} – C_{35}) и алкени (C_{16} – C_{33} ; табела 5.4.1). Идентификација *n*-алкана је, као и код испитиваних врста рода *Primula*, потврђена коинјекцијом комерцијалне смеше серије *n*-алкана од C_8 до C_{40} . За разлику од испитиваних врста рода *Primula*, испирци цветова *L. tulipifera* нису садржавали рачвасте алкане, али су поред *n*-алкана садржавали алкене (моноене) са различитим положајима двогубе везе. Како су региоизомерни алкени елуирали са колоне као један пик, није било могуће одредити ретенциони индекс сваког појединачног изомера. Одређени су ретенциони индекси алкена код којих је био присутан само један изомер (C_{16} и C_{28}). Да би се одредио тачан положај двогубе везе свих алкена, део фракције је дериватизован диметил-дисулфидом (поглавље 4.4.16) и узорак је поново анализиран GC-MS-ом. Већина дериватизованих региоизомерних алкена елуирала је као засебан пик. Најинтензивнији јони у оквиру сваког појединачног пика били су карактеристични алкил-метил-сулфидни јони $[CH_3(CH_2)_xCHSCH_3]^+$. На основу ових јона и M^+ јона, било је могуће прецизно одредити положај двогубе везе, као и дужину угљоводоничног ланца алкена. Ипак, један број дериватизованих региоизомерних алкена је коелуирао, па је њихово присуство утврђено на основу парцијалних јонских хроматограма, тј. на основу одговарајућег пара фрагментних јона (А и Б, слика 5.4.1 и табела 5.4.1) и M^+ јона. Да би се са потврдило да су сви идентификовани региоизомери део воска *L. tulipifera*, тј. да није дошло до промене положаја двогубе везе при дериватизацији, извршена је дериватизација метил-олеата диметил-дисулфидом. Анализом дериватизованог узорка утврђено је да није дошло до миграције двогубе везе током дериватизације и обраде реакционе смеше, као ни током анализе јер је хроматограм садржавао само један пик који потиче од диметил-дисулфидног деривата метил-олеата са очекиваним паром фрагментних јона у масеном

спектру. Стереохемија двогубе везе одређена је на основу раније познате чињенице да је дериватизација алкена диметил-дисулфидом стереоспецифична (Dekić et al., 2019; Scribe et al., 1988). Упоредени су експериментално добијени ретенциони индекси са ретенционим индексима *erythro/threo* деривата из литературе (Dekić et al., 2019). Свих 47 идентификованих алкена имало је *E*-конфигурацију.



Слика 5.4.1. Реакција дериватизације (*E*)-алкена диметил-дисулфидом са приказаном масеном фрагментацијом *erythro*-диметил-дисулфидног адукта (табела 5.4.1)

Релативна процентуална заступљеност *n*-алкана одређена је интегралнењем површина испод пикова у хроматограму. Како региоизомерни алкени коелуирају у оквиру истог пика, процентуална заступљеност алкена је дата као укупан проценат свих региоизомера. Укупно су идентификована 22 дуголанчана *n*-алкана, са најзаступљенијим хомолозима C_{23} (7,2%) и C_{25} (7,3%), и 47 алкена, где су најзаступљенији били региоизомери са C_{29} (19,1%). Хексанска фракција испирка са површине цветова *L. tulipifera* била је богатија алкенима у односу на алкане.

Као што је у претходним поглављима поменуто, код виших биљака, састојци воскова, са неразгранатим угљоводоничним ланцем, биосинтетишу се из дуголанчаних масних киселина нормалног низа. Помоћу елонгационог система синтетишу се дуголанчани ацил-низови, а хемијским трансформацијама ацил-низова могу се добити састојци воскова (Shepherd & Griffiths, 2006). Како није до краја разјашњено којим биосинтетским путем настају алкени у биљкама, у једном раду је предложено да се сва

незасићена једињења биосинтезишу путем незасићених киселина (*enoic pathway*; von Wettstein-Knowles, 2007). Да би се синтетисала незасићена једињења, потребно је да у елонгациони систем буде укључен ензим десатураза, који ће обезбедити супстрате за овај пут. Претпоставља се да би десатураза могла да уведе двогубу везу у ацил-низ у неколико корака: 1) пре него што почне процес елонгације, 2) у току елонгације, 3) након што се елонгација заврши или 4) након што се изврши декарбоксилација (редукција и декарбонилација) ацил-низа (von Wettstein-Knowles, 2007). У другом раду је показано да је ген β -кетоацил-СоА синтаза (*PotriKCS1*) одговоран за биосинтезу алкена у листовима врсте *Populus trichocarpa*, а да су прекурсори у биосинтези незасићене масне киселине (Gonzales-Vigil et al., 2017). Претходно је показано да је биосинтеза *cis*-9-алкена зависна од Δ^9 -десатуразе, која инсертује двогубу везу у C_{18} низове, пре него што они напусте пластиде и крене процес елонгације (Gülz, 1980). На основу овог, порекло алкена у испирку цветова *L. tulipifera* може бити вишеструко. Може се претпоставити да они настају истим биосинтетским путем као и алкани (поглавље 5.1), при чему би под утицајем ензима десатуразе дошло до укањања атома водоника и грађења двогубе везе. У том случају би доминантни хомолози алкана и алкена требали да имају исти број С-атома у угљоводоничном ланцу, што овде није случај. Једна од претпоставки може бити да алкени настају дехидратацијом алкохола. Међутим, као што се може видети у поглављу 5.6, у фракцијама 5 и 6 идентификовани су засићени примарни алкохоли међу којима су доминантни хомолози са парним бројем угљеникових атома, са најзаступљенијим хомологом C_{28} , што није у слози са дужином низа идентификованих алкена.

Воскови са површине цветова *L. tulipifera* до сада нису испитивани. У литератури се може наћи само један рад у коме су приказани састојци површинских воскова листова *L. tulipifera*, где пронађени алкани са дужином низа C_{19} и $C_{21} - C_{33}$ (Gülz et al., 1992). Испитивања воска са површине листова врсте *P. trichocarpa* показала су да су алкени заступљенији на абаксијалној у односу на адаксијалну страну листа, као и да се код неких примерака ове врсте њихова количина повећава током раста и старења листа, што доприноси смањењу пегавости листова (Gonzales-Vigil et al., 2017). Положај и конфигурација двогубе везе алкена, пронађених до сада у биљном свету, могу бити различити. У диетил-етарском испирку цветова врсте *Dianthus cruentus* Griseb. идентификовани су *E* и *Z*-алкени са различитим положајима двогубе везе, тј. хомолози са

непарним бројем угљеникових атома дужине низа од C_{23} до C_{33} (Dečić et al., 2019). У восковима су углавном доминантни алкени са непарним бројем угљеникових атома, па тако воскови са површине листова и цветова врста рода *Aloe* (Liliaceae) садрже алкене са дужином низа C_{27} , C_{29} и C_{31} (Herbin & Robins, 1968). Такође, неколико врста трава које се користе за испашу стоке садрже алкене са непарним бројем C-атома (C_{27} , C_{29} и C_{31}) који су *E*-конфигурације (Dove et al., 1996).

Табела 5.4.1. Алкани и алкени идентификовани у фракцији 1 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Једињење	RI ^b	<i>m/z</i> ^b	M ⁺	Садржај (%)	Метода идентификације ^d
			А, Б			
1300	Тридекан				тр. ^b	RI, MS, CoI
1400	Тетрадекан				0,1	RI, MS, CoI
1500	Пентадекан				1,8	RI, MS, CoI
1577	(<i>E</i>)-8-Хексадецен	2206	159, 159	318	0,7	MS, DMDS
1600	Хексадекан				0,3	RI, MS, CoI
1675-1679 ^c	(<i>E</i>)-8-Хептадецен	2308	159, 173	332	1,2 ^ж	MS, DMDS
	(<i>E</i>)-7-Хептадецен	2310	145, 187	332		MS, DMDS
1700	Хептадекан				2,2	RI, MS, CoI
1800	Октадекан				тр.	RI, MS, CoI
1872-1876	(<i>E</i>)-9-Нонадецен	2513	173, 187	360	1,4	MS, DMDS
	(<i>E</i>)-7-Нонадецен	2517	145, 215	360		MS, DMDS
1900	Нонадекан				0,4	RI, MS, CoI
2000	Еикозан				0,1	RI, MS, CoI
2069-2074	(<i>E</i>)-10-Хенеикозен	2718	187, 201	388	0,9	MS, DMDS
	(<i>E</i>)-9-Хенеикозен	2718	173, 215	388		MS, DMDS
	(<i>E</i>)-7-Хенеикозен	2724	145, 243	388		MS, DMDS
2100	Хенеикозан				2,4	RI, MS, CoI
2200	Докозан				0,3	RI, MS, CoI
2268-2273	(<i>E</i>)-11-Трикозен	2922	201, 215	416	2,7	MS, DMDS

	(E)-10-Трикозен	2923	187, 229	416		MS, DMDS
	(E)-9-Трикозен	2923	173, 243	416		MS, DMDS
	(E)-8-Трикозен	2925	159, 257	416		MS, DMDS
	(E)-7-Трикозен	2929	145, 271	416		MS, DMDS
2300	Трикозан				7,2	RI, MS, CoI
2368-2372	(E)-10-Тетракозен	3024	187, 243	430	0,1	MS, DMDS
	(E)-9-Тетракозен	3026	173, 257	430		MS, DMDS
	(E)-8-Тетракозен	3027	159, 271	430		MS, DMDS
2400	Тетракозан				0,6	RI, MS, CoI
2468-2473	(E)-12-Пентакозен	3127	215, 229	444	4,5	MS, DMDS
	(E)-11-Пентакозен	3128	201, 243	444		MS, DMDS
	(E)-10-Пентакозен	3130	187, 257	444		MS, DMDS
	(E)-9-Пентакозен	3131	173, 271	444		MS, DMDS
	(E)-8-Пентакозен	3133	159, 285	444		MS, DMDS
	(E)-7-Пентакозен	3137	145, 299	444		MS, DMDS
2500	Пентакозан				7,3	RI, MS, CoI
2569-2574	(E)-9-Хексакозен	3232	173, 285	458	0,1	RI, MS, CoI, DMDS
	(E)-8-Хексакозен	3236	159, 299	458		RI, MS, CoI, DMDS
2600	Хексакозан				0,8	RI, MS, CoI
2674-2678	(E)-9-Хептакозен	3336	173, 299	472	12,4	MS, DMDS
	(E)-7-Хептакозен	3343	145,327	472		MS, DMDS
2700	Хептакозан				6,5	RI, MS, CoI

2764	(E)-9-Октакозен	3439	173, 313	486	0,3	MS, DMDS
2800	Октакозан				0,6	RI, MS, CoI
2860-2865	(E)-11-Нонакозен	3538	201, 299	500	19,1	MS, DMDS
	(E)-10-Нонакозен	3540	187, 313	500		MS, DMDS
	(E)-9-Нонакозен	3541	173, 327	500		MS, DMDS
	(E)-8-Нонакозен	3544	159, 341	500		MS, DMDS
	(E)-7-Нонакозен	3550	145, 355	500		MS, DMDS
2900	Нонакозан				4,1	RI, MS, CoI
2961-2965	(E)-10-Триаконтен	3642	187, 327	514	0,2	MS, DMDS
	(E)-9-Триаконтен	3644	173, 341	514		MS, DMDS
	(E)-8-Триаконтен	3647	159, 355	514		MS, DMDS
3000	Триаконтан				0,2	RI, MS, CoI
3063-3069	(E)-11-Хентриаконтен	3742	201, 327	528	10,2	MS, DMDS
	(E)-10-Хентриаконтен	3745	187, 341	528		MS, DMDS
	(E)-9-Хентриаконтен	3747	173, 355	528		MS, DMDS
	(E)-8-Хентриаконтен	3750	159, 369	528		MS, DMDS
	(E)-7-Хентриаконтен	3756	145, 383	528		MS, DMDS
3100	Хентриаконтан				2,3	RI, MS, CoI
3168-3172	(E)-10-Дотриаконтен	3848	187, 355	542	0,3	MS, DMDS
	(E)-9-Дотриаконтен	3850	173, 369	542		MS, DMDS
3200	Дотриаконтан				0,1	RI, MS, CoI
3271-3276	(E)-12-Тритриаконтен	3944	215, 341	556	5,7	MS, DMDS

	(E)-11-Тритриаконтен	3946	201, 355	556		MS, DMDS
	(E)-10-Тритриаконтен	3951	187, 369	556		MS, DMDS
	(E)-9-Тритриаконтен	3953	173, 388	556		MS, DMDS
	(E)-8-Тритриаконтен	3956	159, 397	556		MS, DMDS
3300	Тритриаконтан				0,6	RI, MS, CoI
3500	Пентатриаконтан				тр.	RI, MS, CoI
	Укупно идентификовано <i>n</i>-алкана				37,9 (22) ³	
	Парни				3,1 (10) ^и	
	Непарни				34,8 (12) ^и	
	Укупно идентификовано алкена				59,8 (47) ³	
	Парни				1,7 (12) ^и	
	Непарни				58,1 (35) ^и	

^aRI – експериментално одређени ретенциони индекси алкана и алкена на DB-5MS колони коињекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^b експериментално одређени ретенциони индекси диметил-дисулфидних-деривата алкена на DB-5MS колони коињекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^b карактеристични фрагментни јони диметил-дисулфидних-деривата алкена (слика 5.4.1);

^г молекулска маса диметилдисулфидних-деривата алкена;

^д метода идентификације: RI – поклапање ретенционих индекса; MS – поређење масених спектра; CoI – додатна потврда коињекцијом одговарајућег стандардног узорка; DMDS – положај двогубе везе одређен је на основу карактеристичне фрагментације диметилдисулфидних деривата;

^ђ тр. – траг (<0,05%);

^е ширина пика (изражена у RI јединицама) у оквиру кога елуирају региоизомерни алкени;

^ж проценат представља укупни садржај свих изомера алкена са истим бројем угљеникових атома;

^з број у загради представља укупан број идентификованих алкана, тј. алкена;

^и број у загради представља укупан број идентификованих парних или непарних алкана, тј. алкена.

5.5. Анализа састојака фракција 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8): алдехиди и кетони

Хроматографске фракције 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* садржавале су засићене (C₂₄, C₂₆-C₃₀ и C₂₄) и незасићене (C₂₈, и C₃₀-C₃₂) дуголанчане алдехиде, као и засићене кетоне са различитим положајем кето-групе (табеле 5.5.1, 5.5.2 и 5.5.3). Пошто су фракције 2 и 3 биле истог састава, оне су спојене. Најзаступљеније једињење био је 16-хентриаконтанон (палмитон) са 78,2%.

Табела 5.5.1. Засићени алдехиди идентификовани у фракцијама 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Једињење	Садржај (%)
2626	Тетракозанал	тр. ^б
2827	Хексакозанал	0,8
2922	Хептакозанал	тр.
3023	Октакозанал	3,7
3125	Нонакозанал	тр.
3234	Триакоктанал	4,9
3446	Дотриакоктанал	0,3
Укупно идентификовано засићених алдехида		9,7 (7)

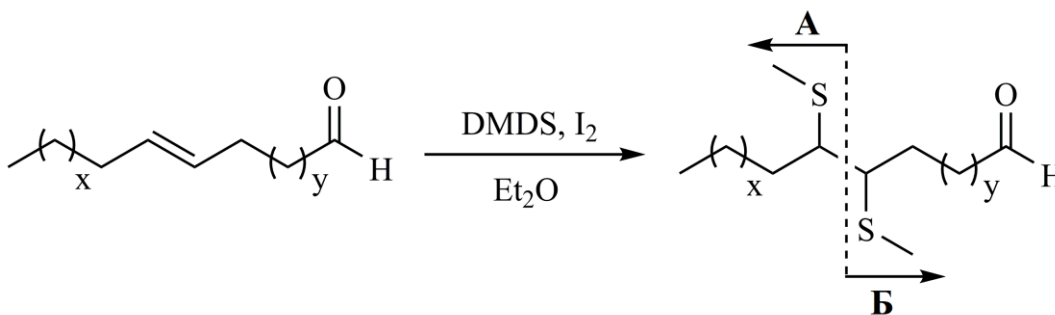
^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси засићених алдехида на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^б тр. – траг (<0,05%).

Дуголанчани засићени алдехиди *n*-низа су широко распрострањени у биљним восковима. Чести су у восковима алдехиди само парног броја угљеникових атома, као на пример у следећим врстама: плод боровнице (*Vaccinium myrtillus* L., C₁₈, C₂₄-C₂₈ и C₃₀; Trivedi et al., 2021); листови врсте *Camelina sativa* (C₂₄-C₃₀; Tomasi et al., 2018); *Arabidopsis thaliana* (C₂₆-C₃₄; Busta & Jetter, 2017); листови врсте *Phyllostachys aurea* (C₂₄-C₃₄; Racovita & Jetter, 2016); *Triticum aestivum* (C₂₂-C₃₂; Racovita et al., 2016); плодови јабуке (*Malus*

domestica, *golden delicious* и *granny smith*) и врсте *Populus tremula* (C₂₂-C₂₈; Fernandez-Moreno et al., 2015). У восковима следећих врста су поред алдехида са парним бројем угљеникових атома идентификовани и алдехиди са непарним бројем угљеникових атома: листови кромпира (*Solanum tuberosum*; C₂₂-C₃₂; Szafrank & Synak, 2006); врста *Mercurialis tomentosa* L. (C₂₂, C₂₄-C₂₈ и C₃₀; Lorenz et al., 2017). Плодови и листови врста цитруса богати су алдехидима: лимун (плод, C₂₃-C₃₂; лист, C₂₄-C₃₂); наранџа (плод, C₂₄-C₃₂; лист, C₂₄-C₃₄); клементина (плод, C₂₃-C₃₀; лист, C₂₄-C₃₄) и мандарина (плод, C₂₄-C₃₀; лист, C₂₄-C₃₄; Baker et al., 1975). Раније је показано да се током раста нектарине *Prunus persica* L. Vatsch, на површини плода повећава количина алдехида (C₁₈, C₂₂, C₂₄, и C₃₀), као и других састојака воска (алкана, примарних алкохола, масних киселина, итд.), како би састојци воска боље штитили биљку од напада патогена *Monilinia laxa* (Oliveira Lino et al., 2020). И код једне врсте крушке (*Pyrus bretschneideri* Rehd cv. Pinguoli) запажено је да се количина алдехида (C₂₀, C₂₄-C₃₀), повећава током раста плода и да се на тај начин биљка штити од напада гљивица (*Alternaria alternata*; Li et al., 2014). Показано је и да присуство алдехида на површини семена врста *Hordeum vulgare* и *Triticum aestivum* штити биљку од напада гљивица (*Blumeria graminis*, Hansjakob, 2010). Парни дуголанчани алдехиди нормалног низа идентификовани су у цветовима црвене малине (C₁₈-C₂₆; *Rubus idaeus*) и глога (C₂₀-C₂₆; *Crataegus monogyna*; Griffiths et al., 2000).

Поред засићених алдехида, у фракцијама 2 и 3 идентификовани су и незасићени алдехиди, са различитим положајима двогубе везе (табела 5.5.2). Да би се одредио положај двогубе везе, део пуловане фракције је дериватизован диметил-дисулфидом. На основу карактеристичних фрагмената (А и Б, слика 5.5.1 и табела 5.5.2), идентификовано је 6 незасићених дуголанчаних алдехида.



Слика 5.5.1. Реакција дериватизације незасићених алдехида диметил-дисулфидом са приказаном масеном фрагментацијом диметил-дисулфидног адукта (табела 5.5.2)

Табела 5.5.2. Незасићени алдехиди идентификовани у фракцијама 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Једињење	<i>m/z</i> ^b А, Б	M ^{+в}	Садржај (%)
2998	(?)-19-Октакозенал	173, 327	500	тр. ^д
3007	(?)-21-Октакозенал	145, 355	500	0,3
3211	(?)-21-Триакоктенал	173, 355	528	0,7
3220	(?)-23-Триакоктенал	145, 383	528	1,2
	(?)-24-Хентриакоктенал ^г	145, 397	542	тр.
3427	(?)-23-Дотриакоктенал	173, 383	556	1,4
Укупно				3,6 (6)
идентификовано				
незасићених алдехида				

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси незасићених алдехида на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^b карактеристични фрагментни јони диметил-дисулфидних-деривата алдехида (слика 5.5.1);

^в молекулска маса диметил-дисулфидних-деривата алдехида;

^д тр. – траг (<0,05%);

^г пик није уочен пре дериватизације.

Због мале заступљености, 24-хентриакоктенал је био идентификован тек након дериватизације фракција, па из тог разлога није одређен ретенциони индекс за ово једињење. Такође, због укупне мале заступљености свих незасићених алдехида у односу на друге састојке пуловане фракције, није било могуће одредити конфигурацију двогубих веза јер су сигнали ових молекула били испод границе детекције NMR спектрометра. Сви идентификовани незасићени алдехиди представљају нове природне производе.

Табела 5.5.3. Кетони идентификовани у фракцијама 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Једињење	Садржај (%)
3060-3070 ^b	14-Нонакозанон	0,3 ^b
	16-Нонакозанон	
3164-3071	15-Триакоктанон	0,3
	15-Триакоктанон	
3266	14-Хентриакоктанон	0,2
3283	16-Хентриакоктанон (палмитон)	78,7
3387	16-Дотриакоктанон	0,4
3483	16-Тритриакоктанон	тр. ^г
Укупно идентификовано кетона		3,6 (8)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси кетона на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^b ширина пика (изражена у RI јединицама) у оквиру кога елуирају региоизомерни кетони;

^b проценат представља укупни садржај изомерних кетона са истим бројем угљеникових атома;

^г тр. – траг (<0,05%).

У фракцијама 2 и 3 испирка цветова *L. tulipifera* су идентификовани кетони са различитим положајем кето-групе. На основу карактеристичне α -фрагментације и молекулске масе кетона, као и на основу правилности промене ретенционих индекса, идентификовано је 8 кетона са кето-групом у положају 14, 15 и 16 (табела 5.5.3). Међу њима је најзаступљенији био палмитон (78,7%). У литератури се може наћи да је палмитон идентификован као главни састојак воскова листова *L. tulipifera* (Gülz et al., 1992). Палмитон је идентификован и у восковима листова неколико других биљних врста: *Colocasia esculenta* (Krentscher et al., 2019), *Annona squamosa* (Shanker et al., 2007), *Annona muricata*, *Aristolochia arborea* и *Umbellularia californica* (Hennig et al., 1994), *Brassica napus* (Holloway et al. 1977) и *Clarkia elegans* (Hunt et al., 1976). Палмитон је и састојак воскова празилука (*Allium porrum*, Maier & Post-Beittenmiller, 1998), стабљике врсте *Arabidopsis*

thaliana (Hannoufa et al., 1993), а у восковима листова кромпира (*Solanum tuberosum*) идентификовани су 14-нонакозанон, 14-хентриаконтанон, 16-хентриаконтанон (палмитон) и 16-триаконтанон (Szafranek & Synak, 2006).

5.6. Анализа састојака фракција 5 и 6 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8): примарни алкохоли и масне киселине

У масеним спектрима молекулски јон примарних алкохола је углавном ниског интензитета, а често се не може ни уочити, а што је додатно отежано присуством јона $[M - 1]^+$, већег интензитета у односу на молекулски јон, а који настаје губитком водоника са α -угљеника. У масеном спектру примарних алкохола се лако може уочити јон $[M - 18]^+$, услед губитка молекула воде, који даље може да се фрагментише до јона који су такође карактеристични и за алкене (m/z 43, 57, 69, 83, 97; Friedel et al., 1956). Серија једињења у фракцијама 4 и 5 имала је описану фрагментацију. Пошто су фракције 5 и 6 биле истог састава, оне су спојене, па је део пуловане фракције силилован (поглавље 4.4.11). Након дериватизације, на основу карактеристичних масених фрагмената триметилсиллил-деривата (Harvey & Vouros, 2019), идентификовано је 13 засићених дуголанчаних примарних алкохола, са дужином угљоводоничног низа од C_{20} до C_{32} (табела 5.6.1 и слика 5.6.1). Најзаступљенији хомолог био је 1-октакозанол. Током анализе дериватизованог узорка фракције, уочени су пикови незасићених дуголанчаних алкохола. Да би се одредио положај двогубе везе, део фракција је дериватизован диметил-дисулфидом (поглавље 4.4.16), а након ове дериватизације извршено је силиловање истог узорка. Поновном GC-MS анализом, идентификовано је 12 незасићених дуголанчаних примарних алкохола, C_{21} , C_{23} , C_{24} , C_{26} - C_{28} , C_{30} , C_{32} и C_{34} , са ω -7 и ω -9 положајима двогубе везе. Најзаступљенији хомолози били су (*Z*)-21-октакозен-1-ол и (*Z*)-21-триаконтен-1-ол (табела 5.6.2 и слика 5.6.2). У 1H NMR спектру фракције уочен је сложени мултиплет на 5,35 ppm (слика 5.6.3), који потиче од скоро изохроних протона двогубе везе и сугерише да је двогуба веза удаљена од алкохолне групе, али и да није на крају ланца. У gHSQC спектру се уочава да ови протони корелишу са угљеницима двогубе везе који се налазе на 129,9 ppm. Такође се у gHSQC спектру уочава корелација водоника на 3,64 ppm и угљеника на 63,1 ppm који припадају CH_2 групи за коју је везана алкохолна група. Анализом gHMBC спектра уочава

се да не постоји корелација водоника и угљеника двогубе везе са водонцима и угљеницима CH_2 групе за коју је везана алкохолна група, што такође потврђује да се алкохолна група не налази близу двогубе везе.

Табела 5.6.1. Примарни засићени алкохоли идентификовани (као триметилсилил-деривати) у фракцијама 5 и 6 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Триметилсилил-дериват 1° алкохола	Садржај (%)
2359	1-Еикозанол	0,6
2457	1-Хенеикозанол	0,5
2555	1-Докозанол	1,9
2655	1-Трикозанол	0,9
2755	1-Тетракозанол	5,6
2854	1-Пентакозанол	1,6
2954	1-Хексакозанол	6,8
3051	1-Хептакозанол	1,4
3154	1-Октакозанол	9,2
3252	1-Нонакозанол	1,4
3355	1-Триакоктанол	5,5
3456	1-Хентриакоктанол	1,1
3554	1-Дотриакоктанол	1,2
Укупно идентификовано		37,7 (13)
1° алкохола		
Парни		30,8 (7)
Непарни		6,9 (6)

^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси триметилсилил-деривата засићених примарних алкохола на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана ($\text{C}_8\text{--C}_{40}$).

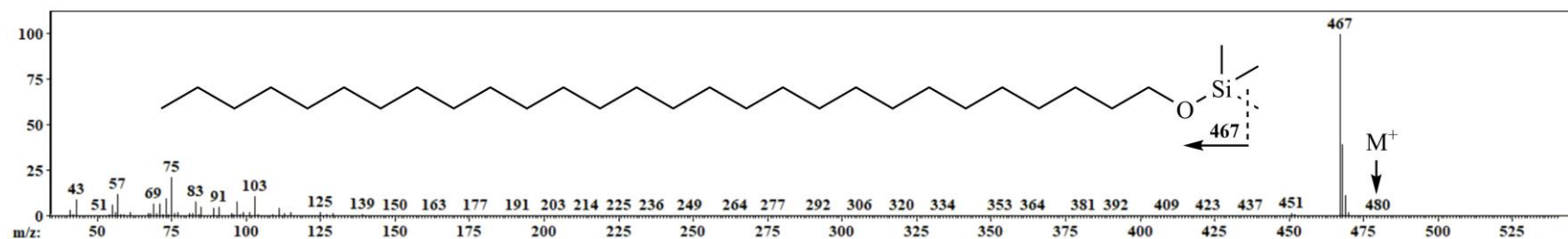
Табела 5.6.2. Примарни незасићени алкохоли идентификовани (као триметилсилил-деривати и диметил-дисулфидни-деривати) у фракцијама 5 и 6 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI ^a	Једињење	m/z ^b	M ^{+в}	Положај	Садржај (%)
3068	(Z)-12-Хенеикозен-1-ол	173, 213, 303	476	ω-9	0,7
3273	(Z)-14-Трикозен-1-ол	173, 241, 331	504	ω-9	0,6
3385	(Z)-17-Тетракозен-1-ол	145, 283, 373	518	ω-7	1,3
3574	(Z)-19-Хексакозен-1-ол	145, 311, 401	546	ω-7	2,1
3669	(Z)-20-Хептакозен-1-ол	145, 325, 415	560	ω-7	0,8
3782	(Z)-19-Октакозен-1-ол	173, 311, 401	574	ω-9	1,8
3800	(Z)-21-Октакозен-1-ол	145, 339, 429	574	ω-7	8,5
4076	(Z)-21-Триакоnten-1-ол	173, 339, 429	602	ω-9	9,1
4101	(Z)-23-Триакоnten-1-ол	145, 457, 367	602	ω-7	5,3
4482	(Z)-23-Дотриакоnten-1-ол	173, 367, 457	630	ω-9	5,4
4507	(Z)-25-Дотриакоnten-1-ол	145, 395, 485	630	ω-7	1,3
5072	(Z)-25-Тетратриакоnten-1-ол	173, 395, 485	658	ω-9	1,4
Укупно идентификовано незасићених алкохола					38,3 (12)

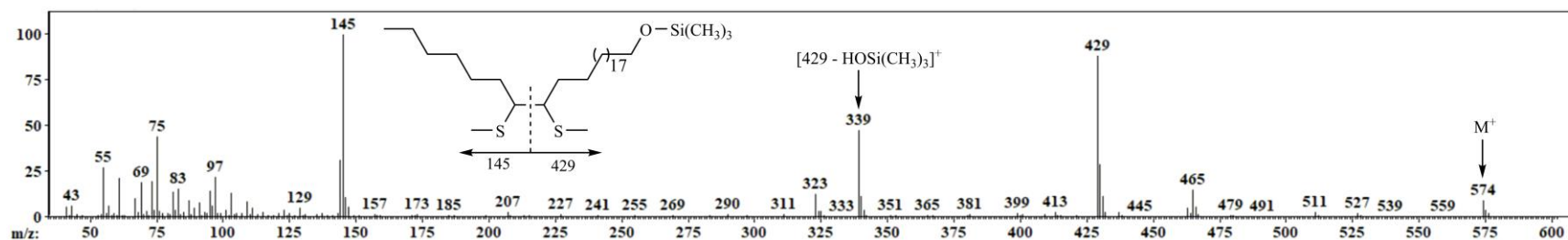
^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси триметилсилил-диметил-дисулфидних-деривата незасићених примарних алкохола на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀);

^b фрагментни јони триметилсилил-диметил-дисулфидних деривата незасићених примарних алкохола у масеним спектрима;

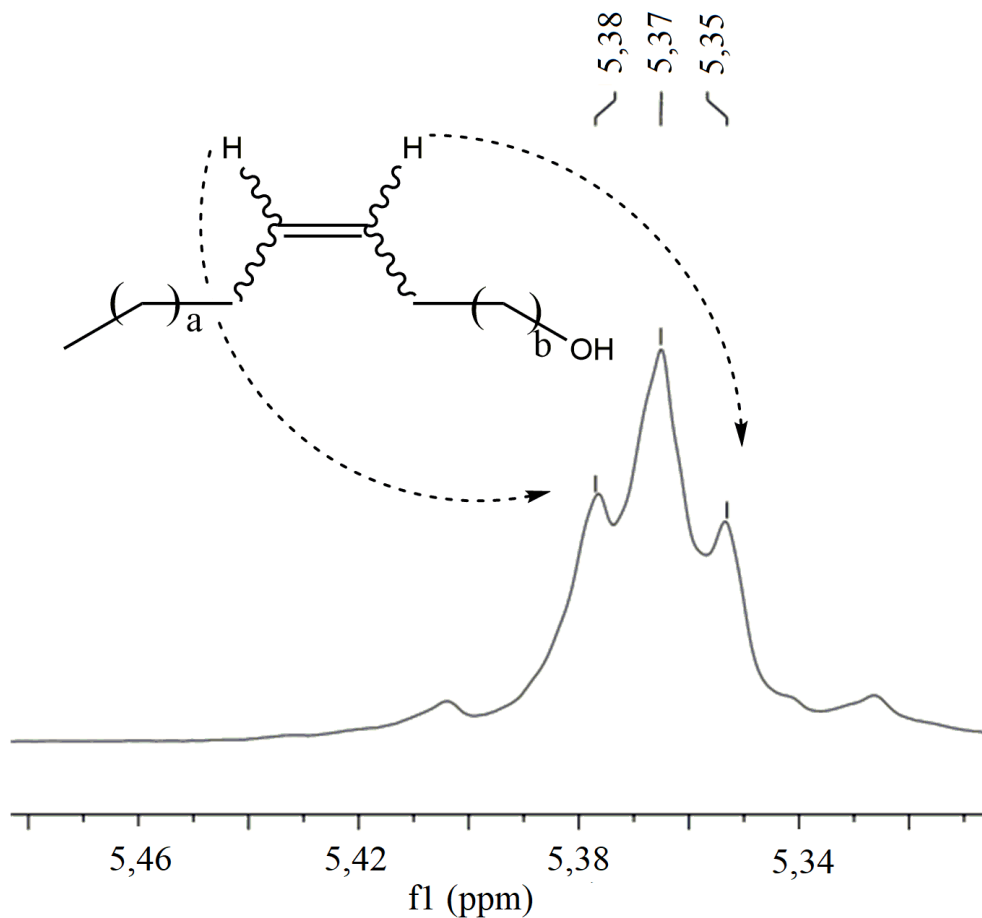
^в моларна маса триметилсилил-диметил-дисулфидних деривата незасићених примарних алкохола.



Слика 5.6.1. Масени спектар триметилсилил-деривата 1-октакозанола са приказаном масеном фрагментацијом



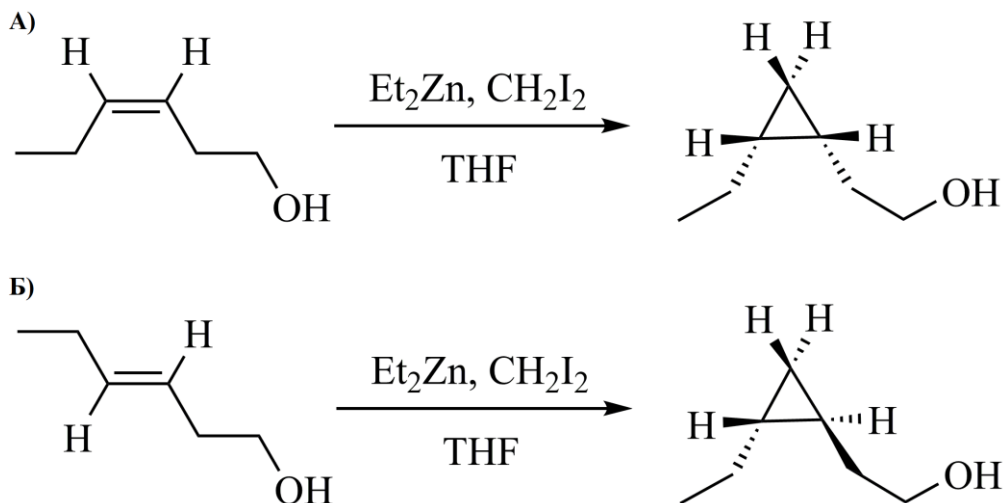
Слика 5.6.2. Масени спектар триметилсилил-диметилдисулфидног-деривата (Z)-21-октакозен-1-ола са приказаном масеном фрагментацијом



Слика 5.6.3. Увећање ^1H NMR спектра фракција 5 и 6 испирка цвета *L. tulipifera*: сигнал протона двоструке везе алкен-1-ола

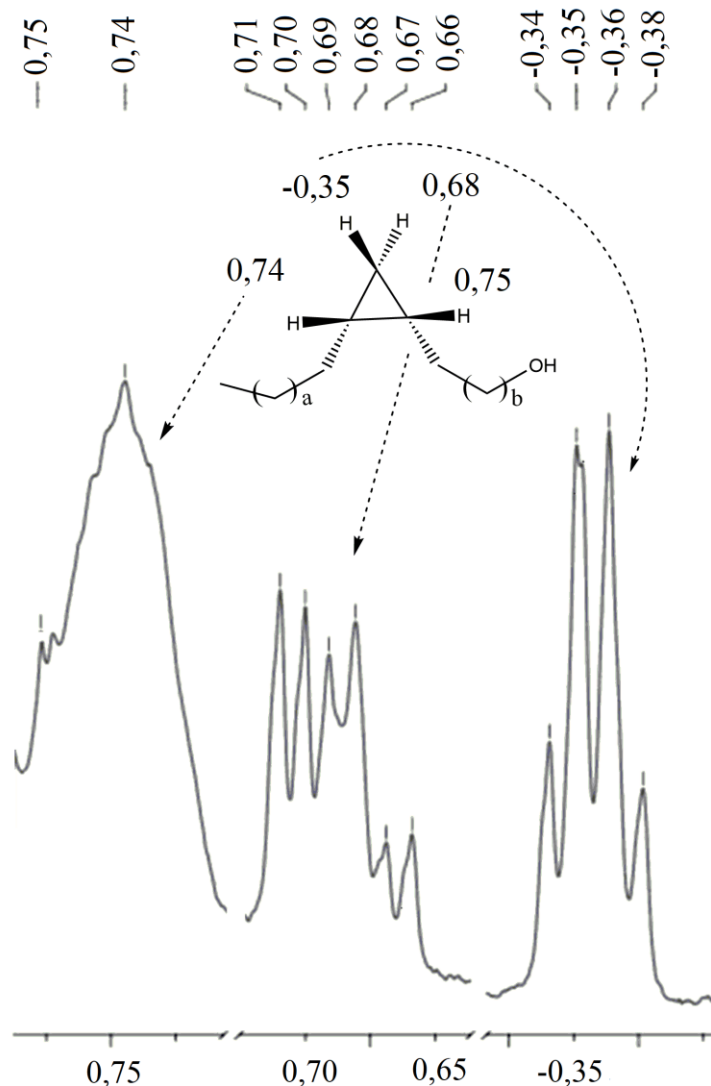
Следећи корак у одређивању структуре незасићених дуголанчаних примарних алкохола био је одређивање конфигурације двогубе везе. Сложени мултиплет на око 5,37 ppm у ^1H NMR спектру фракције (слика 5.6.3) потиче од скоро изохроних протона двогубе везе, одакле није било могуће одредити константе међусобног купловања ових протона. Како се у литератури може наћи, вредности хемијских померања алилних угљеника зависе од стереохемије двогубе везе, па је код *cis*-изомера ова вредност мања у поређењу са вредношћу хемијског померања одговарајућих угљеника у алканима, док је код *trans*-изомера обрнуто, вредност хемијских померања алилних угљеника се повећава (Dorman et al., 1971). Утврђено је да је конфигурација двогубе везе незасићених алкохола у фракцијама 5 и 6 *cis* на основу вредности хемијских померања алилних угљеника у ^{13}C

NMR спектру (δ_c 27,2) што је у слози са литературним подацима за *cis* дуголанчане деривате анакардичне киселине са изолованом двогубом везом (Ohta et al., 2021).



Слика 5.6.4. *Simmons-Smith*-ова реакција циклопропанације А) (*Z*)-3-хексен-1-ола и Б) (*E*)-3-хексен-1-ола

Да би се потврдила *cis*-стереохемија двогубе везе незасићених алкохола, извршена је стереоспецифична реакција циклопропанације дела пулованих фракција 5 и 6 по *Simmons-Smith*-у (слика 5.6.4, поглавље 4.4.17). Упоредо је, на исти начин и под истим условима, изведена и циклопропанација модел-једињења (*E*)-1-хексенола и (*Z*)-1-хексенола. Протони метиленске групе циклопропанског прстена изомерних модел-једињења имали су веома различита хемијска померања у ^1H NMR спектру. Оба псеудоенантиотопна протона *trans*-изомера била су на померањима 0,23 ppm, док су код *cis*-изомера ови дијастереотопни протони имали хемијска померања на -0,34 и 0,65 ppm, што јасно прави разлику између *cis* и *trans*-изомера. У ^1H NMR спектру дериватизованих фракција, могла су се очитати хемијска померања протона метиленске групе циклопропанског прстена алкохола на -0,35 и 0,68 ppm, што јасно показује да сви незасићени алкохоли у фракцијама 5 и 6 имају (*Z*)-конфигурацију (слика 5.6.5).



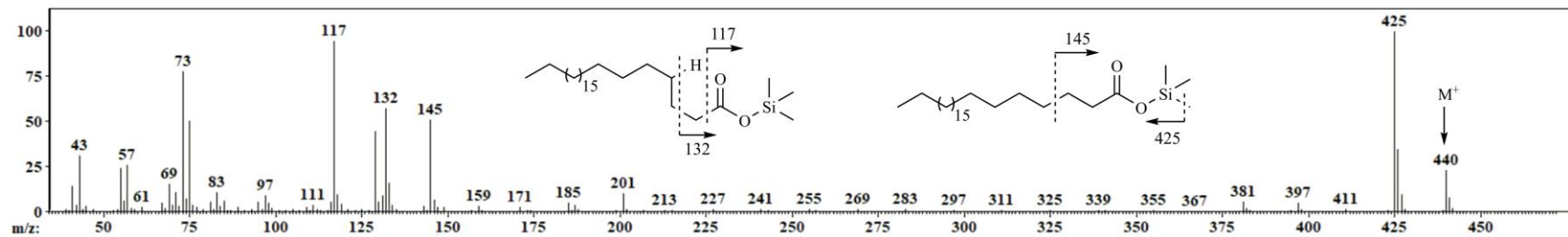
Слика 5.6.5. Увећање ^1H NMR спектра након циклопропанације дела фракција 5 и 6 испирка цвета *L. tulipifera*

Силиловање фракција је омогућило да се поред дуголанчаних zasiћених и незасићених примарних алкохола, идентификују и zasiћене дуголанчане масне киселине, које нису биле видљиве у хроматограму недериватизоване фракције. На основу масене фрагментације триметилсиллил-деривата идентификовано је 14 дуголанчаних масних киселина са дужином угљоводоничног ланца C_{10} , C_{12} , $\text{C}_{15}\text{-C}_{18}$, C_{20} , $\text{C}_{22}\text{-C}_{26}$, C_{28} и C_{30} са најзаступљенијим хомологом C_{24} . Укупни релативни садржај масних киселина је био знатно нижи у односу на алкохоле (слика 5.6.6 и табела 5.6.3).

Табела 5.6.3. Масне киселине идентификоване (као триметилсилил-деривати) у фракцијама 5 и 6 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

RI^a	Триметилсилил-деривати масних киселина	Садржај (%)
1448	Деканска киселина	0,1
1649	Додеканска киселина	0,1
1945	Пентадеканска киселина	0,6
2043	Хексадеканска киселина	0,8
2147	Хептадеканска киселина	0,6
2248	Октадеканска киселина	0,9
2446	Еикозанска киселина	0,5
2646	Докозанска киселина	0,7
2747	Трикозанска киселина	0,6
2845	Тетракозанска киселина	1,5
2945	Пентакозанска киселина	0,6
3045	Хексакозанска киселина	1,1
3244	Октакозанска киселина	0,9
3446	Триаконтанска киселина	0,9
Укупно идентификовано		9,9 (14)
масних киселина		

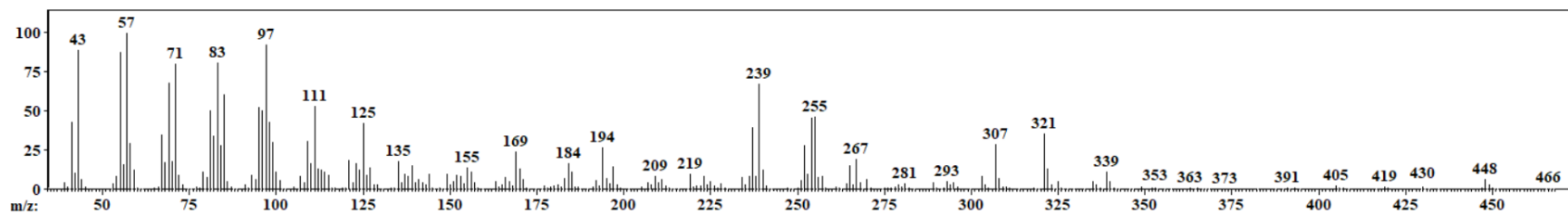
^a RI – експериментално одређени ретенциони индекси триметилсилил-деривата масних киселина на DB-5MS колони коинјекцијом хомологе серије *n*-алкана (C₈–C₄₀).



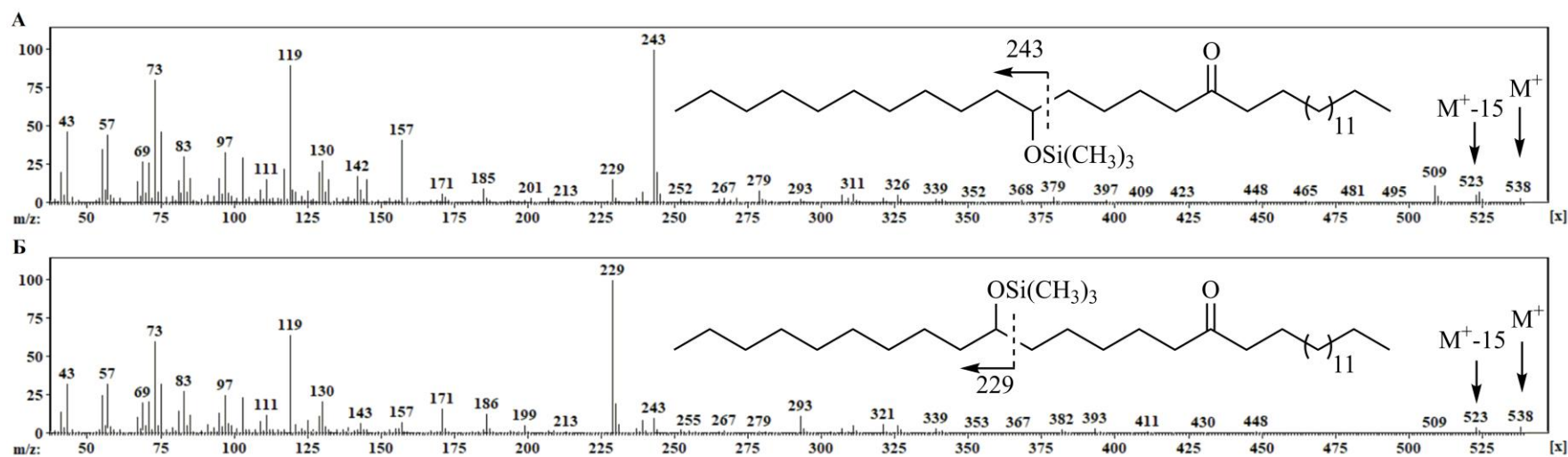
Слика 5.6.6. Масени спектар триметилсилил-деривата тетракозанске киселине са приказаном фрагментацијом

5.7. Анализа састојака фракције 8 испирка цветова *L. tulipifera* (P-8)

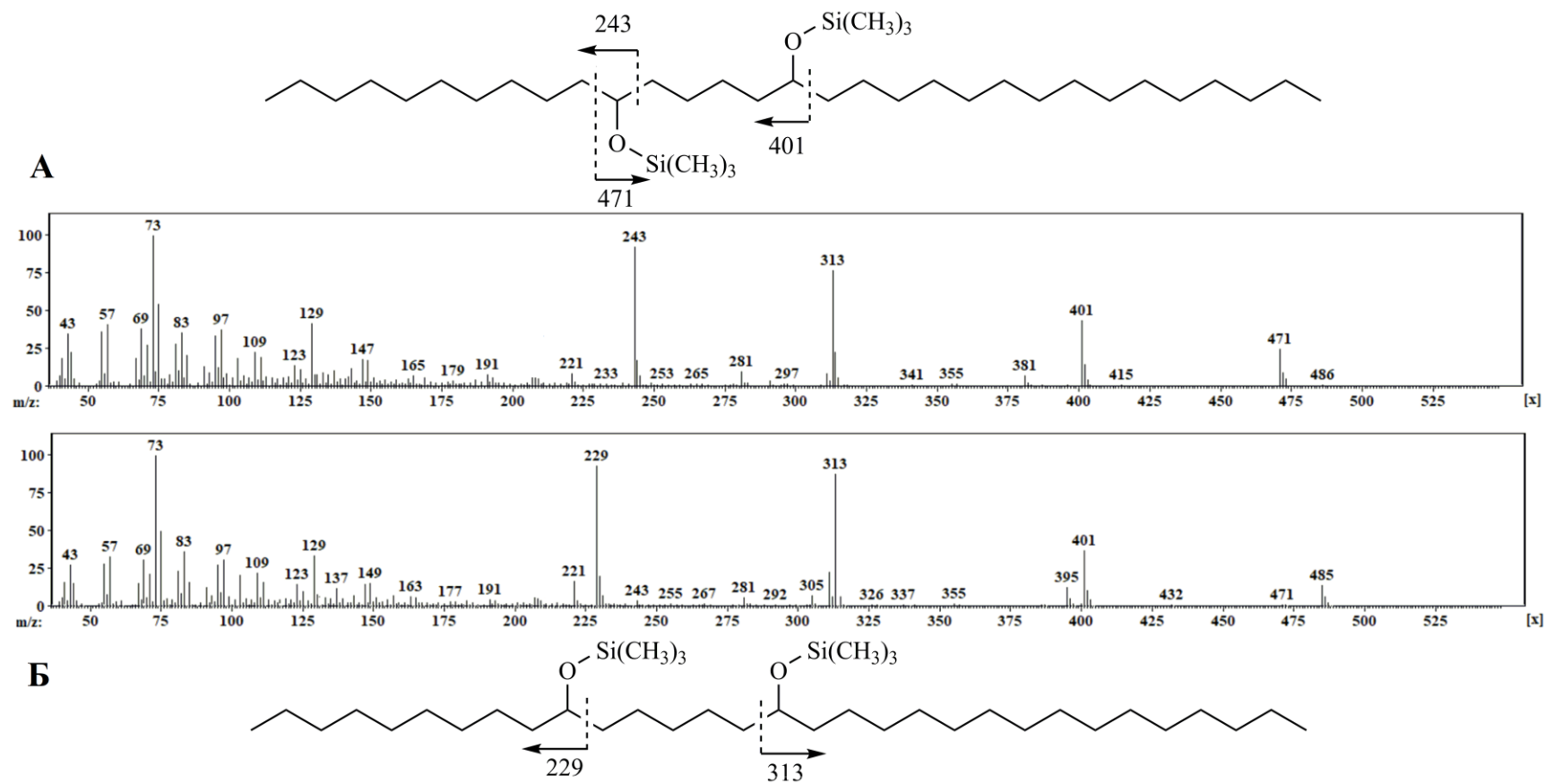
Хроматограм фракције 8 садржавао је широки пик, у чијем се масеном спектру уочавају фрагментни јони на m/z 239 и 255, као и у спектру 16-хентриаконтанона, али нижег интензитета. Међутим, интензивни јони нижих маса на m/z 69, 83 и 97 указивали су на то да је у молекулу можда присутно незасићење или хидроксилна група. У прилог овој претпоставци иду и јони на m/z 307 и 321, који у себи садрже кето-групу и једно незасићење (које је највероватније настало губитком молекула воде) и међусобно се разликују за једну метиленску групу, што указује да широки пик фракције 8 можда садржи два региоизомерна молекула. Додатно, јони на m/z 466 (M^+) и 448 (M^+-18) указују на то да су ови региоизомери хидроксикетони, тј. хидрокси-16-хентриаконтанони (слика 5.7.1). Да би се ова претпоставка потврдила и одредио положај хидроксилних група, део фракције 8 је силилован (поглавље 4.4.11) и поново анализиран GC-MS-ом. У хроматограму дериватизованог узорка била су присутна два пика, а масени спектри ових деривата су дати на слици 5.7.2. Оба једињења су имала исту вредност m/z за молекулски јон, која је износила 538, али различите основне јоне, m/z 243 и 229, јер се ова два молекула разликују само по положају хидроксилне групе. Да би се додатно потврдило присуство 10-хидрокси-16-хентриаконтанона и 11-хидрокси-16-хентриаконтанона, дериватизовани узорак је редукован литијум-алуминијум-хидридом, а затим поново силилован. Структура добијених диола потврђена је на основу карактеристичних масених фрагмената одговарајућих *bis*(триметилсилил)-деривата (слика 5.7.3). Подаци добијени анализом NMR спектра фракције, били су у слози са подацима за (10- и 11-)хидрокси-16-хентриаконтаноне из литературе (Shanker et al., 2007).



Слика 5.7.1. Масени скен који одговара преклопљеним масеним спектрима хидрокси-кетона



Слика 5.7.2. Масени спектри: **А** – триметилсиллил-дериват 11-хидрокси-16-хентриаконтанона и **Б** – триметилсиллил-дериват 10-хидрокси-16-хентриаконтанона



Слика 5.7.3. Масени спектри са приказаном фрагментацијом А – *bis*(триметилсилил)-деривата 11,16-хентриаконтандиола и Б – *bis*(триметилсилил)-деривата 10,16-хентриаконтандиола

Региоизомерни (10- и 11-)хидрокси-16-хентриаконтанони су по први пут идентификовани у восковима цветова *L. tulipifera*. Познато је да су ови хидрокси-кетони детектовани у восковима листова *Annona squamosa* (Shanker et al., 2007). У восковима листова врсте *Santalum album* Linn. идентификован је само 10-хидрокси-16-хентриаконтанон (Chibnall et al., 1937). Интересантно је поменути да је у овим восковима присутан и 16-хентриаконтанон (палмитон). Алифатични хидрокси-кетони, али са другачијим положајем функционалних група и дужином угљоводоничног ланца идентификовани су у восковима врсте *Neolitsea sericea* (13-хидрокси-16-хентриаконтанон; Такаоко et al., 1977) и врсте *Adenocalymma alliaceum* (32-хидрокси-4-хексатриаконтанон и 19-хидрокси-18-хексатриаконтанон; Misra et al., 1989).

5.8. Анализа састојака испирка листова *L. tulipifera* (P-8)

GC-MS анализом узорка испирка листова *L. tulipifera* (P-8) утврђено је да је главни састојак испирка 16-хентриаконтанон (палмитон, 65,7%). Поред палмитона, у хроматограму су се могли уочити и пикови других кетона, 14-нонакозанона и 16-триаконтанона са укупном релативном заступљеношћу од 3,5%. У хроматограму се уочавају и пикови који потичу од дуголанчаних алдехида парног броја угљеникових атома (C₂₄-C₃₂) и један пик који потиче од алдехида са непарним бројем угљеникових атома (C₂₇). Укупна релативна заступљеност алдехида у испирку износила је 22,8%. У испирку су у мањој мери били заступљени и алкани (C₂₇ и C₂₉, 4,3%).

5.9. Заступљеност палмитона у различитим деловима цвета узорка P-9 *L. tulipifera*

Најпре су делови цветова узорка *L. tulipifera* (P-9) раздвојени и посебно су припремљени хлороформски испирци латица, чашичних листића и тучка са прашницима, а потом су испирци анализирани GC-MS-ом. Палмитон (16-хентриаконтанон) је у испирцима латица и чашичних листића био присутан у око 85%, док остатак чине дуголанчани алдехиди и примарни засићени алкохоли. Међутим, у испирку тучка са прашницима, релативна заступљеност палмитона је око 15%, док већи део испирка чине

засићени и незасићени алкохоли (око 45%), а остатак су алкани, алкени, засићени и незасићени алдехиди. Као што је већ поменуто, у литератури се може наћи један рад у коме је описано да је палмитон идентификован као главни састојак воскова листова *L. tulipifera* (Gülz et al., 1992), а такође и да је идентификован у восковима неколико биљних врста (Krentscher et al., 2019; Shanker et al., 2007; Szafranek & Synak, 2006; Maier & Post-Beittenmiller, 1998; Hennig et al., 1994; Hannoufa et al., 1993; Holloway et al. 1977; Hunt et al., 1976). Воскови који доминантно садрже палмитон, формирају кристале у облику плочица (Jetter et al., 2006; Rhee et al., 1998; Holloway, 1994).

6. ИЗВОД

У докторској дисертацији под називом „Идентификација и синтеза одабраних састојака воскова биљних врста *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) и *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae)“ приказани су резултати анализа хемијског састава испирака биљних врста *Primula veris* L. и *Primula acaulis* (L.) L. из фамилије Primulaceae и биљне врсте *Liriodendron tulipifera* L. из фамилије Magnoliaceae. Извршена је *dry-flash* хроматографија испирака цветова и листова *P. veris* и *P. acaulis* и цветова *L. tulipifera*, а потом су фракције анализирани методама GC-MS и NMR. Структура нових природних производа одређена је на основу детаљне спектралне анализе (1D- и 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV-Vis), као и хемијске анализе, која је подразумевала различите реакције дериватизације (силиловање, естерификација, редукција, трансестерификација, метанолиза, циклопропанација, итд.). Структура и (релативна) конфигурација одабраних једињења, која није било могуће изоловати у чистом стању, потврђени су: 1 – синтезом стандарда, модел-једињења и њиховом коинјекцијом са реалним узорцима, 2 – NMR анализом реалних узорака и стандарда, односно модел-једињења, и поређењем добијених података и 3 – корелацијом структуре и ретенционих особина одабраних класа једињења идентификованих у воску.

Након извршених анализа, добијени су следећи резултати:

Хексанске хроматографске фракције испирака врста *P. veris* и *P. acaulis* биле су богате дуголанчаним рачвастим алканима; средња вредност заступљености *n- : iso- : anteiso-* алкана за *P. veris* износила је 73 : 21 : 6, а за *P. acaulis* 54 : 34 : 12. Примећено је и да заступљеност алкана у испирцима прати Гаусову расподелу. У мало поларнијој фракцији су по први пут идентификовани дуголанчани бензил-естри масних киселина у роду *Primula*. У узорцима испитиваних *Primula* врста, идентификовано је 19 нових дуголанчаних бензил-естара масних киселина, са дужином ацил-ланца од C₂₄ до C₃₂, подељених у три серије, *n-*, *iso-* и *anteiso-* низови. У наредној хроматографској фракцији испирака *P. veris* и *P. acaulis* идентификовани су дуголанчани 2-алканони (C₂₄–C₃₀), при чему су *iso-* (C₂₃–C₃₀, C₃₂, C₃₃) и *anteiso-2-* алканони (C₂₄–C₂₈, C₃₀) сада по први пут идентификовани у узорцима природног порекла. Добијени резултати су показали да врсте рода *Primula*, проучаване у овом раду, биосинтетишу у већој количини парне *iso-* алкане и

2-алканоне, као и *iso*-непарне бензил-естре масних киселина, што се сматра јединственим за биљно царство.

У следећој по поларности фракцији испирка *P. veris* идентификовано је укупно 16 *syn*-1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата са дужином низа од 14 до 20 угљеникових атома подељених у три серије *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера, који представљају нова једињења. Да би се одредила релативна конфигурација (*syn*-), извршена је синтеза стандарда, детаљна NMR анализа стандарда и фракције, као и поређење података доступних у литератури за слична једињења. Иста фракција је садржавала 7 *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера 3-оксо-1-фенилалкилацетата, који су по први пут идентификовани у узорцима природног порекла, а њихов релативни однос *iso*- и *n*-изомера 1 : 0,7 такође је јединствен. У овој фракцији је идентификовано и 8 нових *n*-, *iso*- и *anteiso*-изомера 1-фенил-1,3-алкадиона, заступљени у кето-енолном облику, са бројем угљеникових атома у ланцу од 24 до 29. Рачvasti изомери β-дикетона су по први пут идентификовани у овом раду. Силиловање ове фракције омогућило је да се детектују нова једињења, као на пример 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони, који под условима гасне хроматографије губе молекулу воде, у ињектору, па их није било могуће идентификовати пре дериватизације. Синтезом, а потом и силиловањем стандарда 1-фенил-1-хидрокси-3-тетрадеканона, потврђена је структура ове класе једињења. Подударане масених спектра и корелација ретенционих индекса силилованих деривата омогућило је идентификацију 10 1-фенил-1-хидрокси-3-алканона са 15, 17 и 25-29 угљеникових атома у ланцу. Молекули ове структуре, али различитог броја угљеникових атома, идентификовани су само у полену сунцокрета (Schulz et al., 2000), тако да сви идентификовани 1-фенил-1-хидрокси-3-алканони представљају нове природне производе. Након силиловања фракције, а на основу карактеристичних масених фрагмената, идентификовано је укупно 79 *sec*-алкохола са дужином низа од 21 до 31 угљеников атом од којих 66 представља нове природне производе. Међу њима, изомери *n*- низа 7-, 8- и 9-алканола, као и *n*- низа 3-алканола, са бројем угљеникових атома у ланцу: 21, 22, 24, 26, 28-31, као и сви рачvasti (*iso*- и *anteiso*-) 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- и 10-алканоли су по први пут идентификовани. Њихова структура је потврђена GC-MS анализом силиловане смеше секундарних алкохола (региоизомерних *sec*-додеканола и *sec*-пентадеканола). Пре него што је силилована, ова фракција је третирана етарским раствором CH₂N₂, чиме су све слободне масне киселине преведене у одговарајуће метил-

естре. На основу података добијених анализом масених спектра у комбинацији са ретенционим индексима метил-естара, а и на основу података добијених NMR анализом фракције, идентификовано је 77 засићених дуголанчаних масних киселина нормалног и рачвастог низа: *n*-, *iso*-, *anteiso*-, 2-метил и 3-метил-низа. Све дуголанчане 2-метил- и 3-метилкиселине су по први пут идентификоване у биљном царству. Потврда присуства изомера нормалног и рачвастог низа за све класе једињења извршена је анализом и поређењем NMR спектра фракција, као и стандарда. На основу корелације дужине низа и ретенционог индекса, на још један начин су недвосмислено поврђене структуре идентификованих једињења.

Као што је познато, алкани су присутни у кутикуларним восковима свих виших биљака, док је присуство дуголанчаних бензил-естара масних киселина ограничено на неколико врста. Испитиване су термалне особине следећих смеша (у различитим односима): 1 – смеша бензил-бехената и алкана који су добијени хроматографијом испирка *P. veris*, и 2 – смеша бензил-естара синтетисаних из пчелињег воска и алкана добијених хроматографијом испирка *P. veris*. Најнижа тачка топљења (еутектичка тачка, T_e) смеше 1 и 2 измерена је када су оне садржавале 30%, *w/w*, алкана; *n* (алкана) : *n* (бензил-бехената или бензил-естара масних киселина) = 1 : 2,3. Смеша 1 је имала вишу еутектичку тачку, као и ΔT ($T_e=51,9$ °C; $\Delta T=T_m(\text{алкани}) - T_e=11,4$ °C; ΔT – смањење температуре топљења), у односу на смешу 2 ($T_e=53,0$ °C; $\Delta T=10,3$ °C). Обе смеше су имале перитектничку тачку када је у смеси било 30%, *w/w*, бензил-бехената или смеше бензил-естара масних киселина (*n* (алкана) : *n* (бензил-бехената или бензил-естара масних киселина) = 2,4 : 1). Закључено је да присуство бензил-естара снижава тачку топљења смеше, чиме се обезбеђује боља пермеабилност кутикуле. Одређено је да бензил-естри масних киселина имају високу моларну апсорптивност, па се може закључити да они могу смањити штетан утицај UV-C-зрачења на биљке, што је јако важно за биљне врсте рода *Primula* spp. које цветају у рано пролеће.

Хексанска хроматографска фракција испирака цветова *L. tulipifera*, за разлику од хексанске фракције испитиваних врста рода *Primula*, није садржавали рачвасте алкане, већ *n*-алкане и *n*-алкене (моноене) са различитим положајима двогубе везе. Фракција је била богатија алкенима у односу на алкане; средња вредност заступљености алкана и алкена износила је 1 : 1,6. Положаји двогубих веза одређени су на основу карактеристичних

фрагмената диметил-дисулфидних деривата, а конфигурација двогубе везе на већ познатој чињеници да је дериватизација алкена диметил-дисулфидом стереоспецифична, а ретенционе особине адуката карактеристичне за *erythro/threo* изомере. Свих 47 идентификованих алкена имало је *E*-конфигурацију. У мало поларнијој фракцији идентификовани су алдехиди (засићени и незасићени) и кетони (засићени, са различитим положајем кето-групе). Најзаступљенији је био кетон, 16-хентриаконтанон (палмитон; 78,2%). Положаји двогубих веза незасићених алдехида одређени су, као и код алкена, на основу карактеристичних фрагмената диметил-дисулфидних деривата, али није било могуће одредити њихову конфигурацију због укупне мале заступљености незасићених алдехида у односу на друге састојке фракције. У наредној хроматографској фракцији, која је садржавала највећи део испирка, након силиловања идентификовани су дуголанчани примарни алкохоли (засићени и незасићени) са укупном заступљеношћу око 80% и засићене слободне масне киселине са укупном заступљеношћу око 10%. Положаји двогубих веза алкохола одређени су дериватизацијом као и код других незасићених састојака претходних фракција, а конфигурација двогубе везе незасићених алкохола одређена је на два начина: 1 – на основу карактеристичних хемијских померања алилних угљеника двогубе везе у ^{13}C NMR спектрима, која су знатно различита за *Z*- и *E*-изомере и 2 – на основу стереоспецифичне *Simmons-Smith*-ове реакције циклопропанације дела фракције, као и модел-једињења. Сви незасићени примарни алкохоли имали су *Z*-конфигурацију. Након ове фракције, изолована је фракција која је садржавала два хидрокси-кетона: (10- и 11-)хидрокси-16-хентриаконтаноне. Да би се одредила њихова структура, фракција је најпре силилована, а затим редукована, па опет силилована. На основу масених спектра триметилсилил-деривата хидрокси-кетона, као и *bis*(триметилсилил)деривата хентриаконтандиола, и анализом NMR спектра, потврђена је структура ових хидрокси-кетона. GC-MS анализом узорка испирка листова *L. tulipifera* утврђено је да је главни састојак 16-хентриаконтанон (палмитон, 65,7%). На основу засебних GC-MS анализа испирака латица, чашичних листића и тучка са прашницима узорка цветова *L. tulipifera* утврђено је да се палмитон (16-хентриаконтанон) доминантно налази на површини латица и чашичних листића (око 85%), а да је његова релативна заступљеност у испирку тучка са прашницима, око 15%, док већи део овог испирка чине засићени и незасићени алкохоли (око 45%). Део резултата приказаних у овој докторској

дисертацији објављен је у научним часописима категорије M_{21} , M_{22} и M_{52} (Živković Stošić, & Radulović, 2021; Živković Stošić et al., 2021; Radulović & Živković Stošić, 2021).

7. SUMMARY

The doctoral dissertation entitled “Identification and synthesis of selected wax constituents of plant species *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) and *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae)” presents the results of analyzes of the chemical composition of washings of plant species *Primula veris* L. and *Primula acaulis* (L.) L. from the family Primulaceae and the plant species *Liriodendron tulipifera* L. from the family Magnoliaceae. *Dry-flash* chromatography of the washings of the flowers and leaves of *P. veris* and *P. acaulis* and the flowers of *L. tulipifera* was performed, and then the fractions were analyzed by GC-MS and NMR. The structure of new natural products was determined based on detailed spectral analysis (1D and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV-Vis), as well as chemical analysis, which included different derivatization reactions (silylation, esterification, reduction, transesterification, methanolysis, etc.). The structure and (relative) configuration of selected compounds, which could not be isolated in pure state, were confirmed by 1 – synthesis of standards, model compounds, and their GC co-injection with the samples, 2 – NMR analysis of the samples, and standards, i.e., model compounds, and by comparison of the obtained data, and 3 – by correlating the structure and retention data of selected classes of compounds identified in the washings.

The following results were obtained:

The hexane chromatographic fractions of the washings of *P. veris* and *P. acaulis* were rich in long-chain branched alkanes; the mean value of the *n*-: *iso*-: *anteiso*-alkanes for *P. veris* were 73 : 21 : 6, and for *P. acaulis* 54 : 34 : 12. It was noticed that the relative amount of alkanes in the washings followed the Gaussian distribution. In the slightly more polar fraction, long-chain benzyl esters of fatty acids were identified for the first time in the genus *Primula*. In the samples of the herein studied *Primula* species, 19 previously unreported very-long-chain benzyl esters, having from 24 to 32 carbon atoms in the chains were distributed unevenly in the *n*-, *iso*-, and *anteiso*-series. The following chromatographic fractions of *P. veris* and *P. acaulis* washings contained long-chain 2-alkanones (C₂₄ – C₃₀), while *iso*- (C₂₃ – C₃₀, C₃₂, C₃₃) and *anteiso*-2-alkanones (C₂₄ – C₂₈, C₃₀) were identified for the first time in the samples of natural origin. The species of the genus *Primula*, studied in this paper, produced predominantly even-numbered *iso*-alkanes and 2-alkanones, as well as *iso*-odd-numbered fatty acid benzyl esters, which is unique for the Plant Kingdom. In one of the fractions of *P. veris* washings, 16 *syn*-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates were identified with a chain length from 14 to 20 carbon atoms long divided into

three series of *n*-, *iso*- and *anteiso*-isomers; all the identified *syn*-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates represent new compounds. To confirm the relative configuration (*syn*-), the corresponding standards were synthesized, a detailed NMR analysis of the standards and fractions was performed, and a comparison of the data available in the literature for similar compounds was done. The same fraction contained 7 *n*-, *iso*-, and *anteiso*-isomers of 3-oxo-1-phenylalkan-1-yl acetates. Not only that this is the first report of 3-oxo-1-phenylalkan-1-yl acetates, but the ratio between the *iso*-branched and *n*-isomers: 1 to 0.7, is unique, as well. Additionally, 8 new *n*-, *iso*-, and *anteiso*-isomers of 1-phenylalkane-1,3-diones (possessing 24-29 C-atoms in the chains), more precisely as their enol-keto forms, were identified. It should be stressed that this is the first detection of branched members of this class of compounds. After the silylation of this fraction, additional new compounds were detected, such as 1-hydroxy-1-phenylalkan-3-ones, eliminating a water molecule in the injector, making them impossible to detect by GC without silylation. The structure of this class of compounds was confirmed by the synthesis and subsequent silylation of the standard, 1-hydroxy-1-phenyltetradecan-3-one. The matching of MS data and RI correlations for the silylated derivatives allowed the identification of 10 1-hydroxy-1-phenylalkan-3-ones having 15, 17, and 25-29 C-atoms in the chains. Such compounds, but of differing chain lengths, were only once found in nature within lipids from sunflower pollen, hence all here identified compounds represent unreported natural products. After the silylation of this fraction and based on the characteristic mass fragmentation of trimethylsilyl-derivatives, 79 *sec*-alcohols (C₂₁-C₃₁) were identified. Among them, 66 were unreported from samples of natural origin. The normal-chained isomers of 7-, 8-, and 9-alkanols (and additional 3-alkanols with 21, 22, 24, 26, 28-31 C-atoms), as well as all branched (*iso*- and *anteiso*-) 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- and 10-alkanols are new natural products. The structure of the detected *sec*-alcohols was inferred from GC-MS analysis of the silylated mixture of *sec*-alcohols (regioisomers of *sec*-dodecanol and *sec*-pentadecanol). Before the silylation, this fraction was treated with CH₂N₂, to convert free fatty acids to their methyl esters and reanalyzed. The identification of saturated normal chain and branched fatty acids was based on a combination of data coming from the mass spectra and gas chromatographic retention behavior of the corresponding methyl esters and the NMR data of the chromatographic fraction. In total, 77 methyl esters were detected: *n*-, *iso*-, *anteiso*-, 2-methyl, and 3-methyl-isomers. All the identified long-chain 2-methyl- and 3-methyl-fatty acids were identified for the first time in the

Plant Kingdom. The presence of the isomers of normal and branched chains for all classes of compounds was confirmed by the analysis and comparison of the NMR data of the fraction, and standards. Once again, the structure of the identified compounds was confirmed by the correlation of retention indices and the number of carbons in the chains of the compounds.

Alkanes are present in the cuticular waxes of most higher plants, while long-chain benzyl esters are restricted to only several plant taxa. Thus, the thermal properties of benzyl esters and alkane mixtures were studied: 1 – the mixture of benzyl behenate and alkanes obtained after *dry-flash* chromatography of *P. veris* washings, and 2 – the mixture of benzyl ester synthesized from beeswax and alkanes obtained after *dry-flash* chromatography of *P. veris* washings. The minimum melting point (eutectic point; T_e) for both mixtures occurred at 30 mass percent of the higher melting component – alkanes; n (alkanes) : n (benzyl behenate or benzyl esters of fatty acids) = 1 : 2.3. Pure benzyl behenate caused a slightly higher melting point depression of the alkanes ($T_e=51.9$ °C; $\Delta T=T_{m(\text{alkanes})} - T_e=11.4$ °C) than the model mixture of benzyl esters ($T_e=53.0$ °C; $\Delta T=10.3$ °C). In both cases, a peritectic point was at 30 wt% of benzyl behenate or benzyl esters mixture (n (alkanes) : n (benzyl behenate or benzyl esters of fatty acids) = 2.4 : 1). It could be concluded that the presence of benzyl esters in the washings lowers the melting point of the mixture, which provides better permeability of the cuticle. As benzyl esters have been determined to have high molar absorbance, it can be concluded that they can reduce the harmful effects of UV-C radiation on plants, which is very important for plant species of the genus *Primula* spp. which bloom in early spring.

The hexane chromatographic fractions of the flower washings of *L. tulipifera* contained *n*-alkanes and regioisomeric *n*-alkenes (monoenes); the mean content of the alkanes and alkenes was 1: 1.6. The position of double bonds was determined based on the characteristic fragmentation of dimethyl disulfide adducts; the configuration of the double bond was based on the known fact that the addition of dimethyl disulfide to alkenes is stereospecific (Dekić et al., 2019; Scribe et al., 1988). All identified alkenes were *E*-isomers. The following chromatographic fraction consisted of aldehydes (saturated and unsaturated) and ketones (saturated, with different positions of keto-group). The most abundant ketone identified was 16-hentriacontanone (palmitone; 78.2%). The positions of the double bonds of unsaturated aldehydes were determined, as for alkenes, on the basis of the characteristic fragments of dimethyl disulfide derivatives. It was not possible to determine the configuration of the double bonds of unsaturated

aldehydes due to their overall low abundance. After the silylation of the fraction, accounting for most of the mass of the washings, long-chain primary alcohols (saturated and unsaturated), representing about 80% of the fraction, and saturated free fatty acids, with a total amount reaching 10%, were identified. The positions of the double bonds of the alcohols were determined based on the derivatization as was done for the other unsaturated constituents of the previous fractions. The configuration of the double bonds of unsaturated alcohols was determined in two ways: 1 – based on the characteristic chemical shifts of the allylic carbons of the double bond in ^{13}C NMR spectra, which are significantly different for the *Z*- and *E*-isomers (Ohta et al., 2021; Dorman et al., 1971) and 2 – based on the stereospecific *Simon-Smith* cyclopropanation reaction of the fraction, as well as the model compounds, followed by NMR analysis. All identified unsaturated alcohols were *Z*-isomers. A fraction containing two hydroxy-ketones was isolated: (10- and 11-)hydroxy-16-hentriacontanone. Their structure was determined by derivatization; the fraction was first silylated, then reduced, and then silylated again. Based on the mass spectra of trimethylsilyl derivatives of hydroxy-ketones as well as *bis*(trimethylsilyl) derivatives of hentriacontanediols, as well as the analysis of NMR spectra, the structure of these hydroxy-ketones was established. GC-MS analysis of samples of *L. tulipifera* leaf washings revealed that the main constituent was 16-hentriacontanone (palmitone, 65.7%). Based on separate GC-MS analyses of the washings of petals, sepals, and pistils with anthers of *L. tulipifera* flower samples, palmitone (16-hentriacontanone) was found to be predominant on the surface of petals and calyx leaves (about 85%). Its relative amount in the sample consisting of pistils with anthers was about 15%, while most of this sample represented saturated and unsaturated alcohols (about 45%). Part of the results presented in this doctoral dissertation were published in peer reviewed journals, categories M₂₁, M₂₂ and M₅₂ (Živković Stošić, & Radulović, 2021; Živković Stošić et al., 2021; Radulović & Živković Stošić, 2021).

ЛИТЕРАТУРА

- Agati, G, Tattini, M, 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection, *New Phytol.* 186, 786-793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Adams, RP, 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing, Carol Stream, Illinois.
- Alves, SP, Raundrup, K, Cabo, Â, Bessa, RJB, Almeida, AM, 2015. Fatty acid composition of muscle, adipose tissue and liver from muskoxen (*Ovibos moschatus*) living in West Greenland, *Plos One* 10, e0145241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145241>
- Ali, A, Demirci, B, Kiyani, HT, Bernier, UR, Tsikolia, M, Wedge, DE, Khan, IA, Başer, KH, Tabanca, N, 2013. Biting deterrence, repellency, and larvicidal activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) essential oil and its major individual constituents against mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 50, 1267-1274. <https://doi.org/10.1603/me12177>
- Alugupalli, S, Larsson, L, 1992. Secondary fatty alcohols of *Mycobacterium xenopi*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2499-2502. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2499>
- Apel, L, Kammerer, DR, Stintzing, FC, Spring, O, 2017. Comparative metabolite profiling of triterpenoid saponins and flavonoids in flower color mutations of *Primula veris* L. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 153. <https://doi.org/10.3390/ijms18010153>
- Apon, JMB, Nicolaidis, N, 1975. The determination of the position isomers of the methyl branched fatty acid methyl esters by capillary GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.* 13, 467-473. <https://doi.org/10.1093/chromsci/13.10.467>
- Ahmad, VU, Shah, MG, Noorwala, M, Mohammad, FV, 1992. Isolation of 3,3'-dihydroxychalcone from *Primula macrophylla*. *J. Nat. Prod.* 55, 956-958.
- Baker, EA, Procopioua, J, Hunt, GM, 1975. The cuticles of *Citrus* species. Composition of leaf and fruit waxes. *J. Sci. Fd Agric.* 26, 1093-1101. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2740260807>
- Beekwilder, J, Alvarez-Huerta, M, Neef, E, Verstappen, FWA, Bouwmeester, HJ, Aharoni, A, 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* 135, 1865-1878. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042580>

- Berim, A, Gang, DR, 2016. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochem. Rev.* 15, 363-390. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9426-0>
- Bianchi, G, Tava, A, Vlahov, G, Pozzi, N, 1994. Chemical structure of long-chain esters from “sansa” olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 365-369. <https://doi.org/10.1007/BF02540515>
- Blomquist, GJ, Guo, L, Gu, P, Blomquist, C, Reitz, RC, Reed, JR, 1994. Methyl-branched fatty acids and their biosynthesis in the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 803-810. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)90108-2)
- Boswell, PG, Carr, PW, Cohen, JD, Hegeman, AD, 2012. Easy and accurate calculation of programmed temperature gas chromatographic retention times by back-calculation of temperature and hold-up time profiles. *J. Chromatogr. A* 1263, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.048>
- Boyer, JS, Wong, SC, Farquhar, GD, 1997. CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials, *Plant Physiol.* 114, 185–191. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.185>
- Budzianowski, J, Morozowska, M, Wesołowska, M, 2005. Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and in vitro cultures. *Phytochemistry* 66, 1033-1039. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.024>
- Budzianowski, J, Wollenweber, E, 2007. Rare flavones from the glandular leaf exudate of the oxlip, *Primula elatior* L. *Nat. Prod. Commun.* 2, 267-270. <https://doi.org/10.1177/1934578X0700200308>
- Buist, PH, 2007. Exotic biomodification of fatty acids. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1110-1127. <https://doi.org/10.1039/b508584p>
- Busta, L, Jetter, R, 2017. Structure and biosynthesis of branched wax compounds on wild type and wax biosynthesis mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 58, 1059-1074. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx051>
- Bhutia, TD, 2013. Exudate flavonoids in Primulaceae: comparative studies of chemodiversity aspects, Doctoral dissertation, Wien.

- Bhutia, TD, Valant-Vetschera, KM, 2012. Diversification of exudate flavonoid profiles in further *Primula* spp. *Nat. Prod. Commun.* 7, 587-589. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700509>
- Bhutia, TD, Valant-Vetschera, KM, Adlassnig, W, Brecker, L, 2012. Flavonoids in selected *Primula* spp.: bridging micromorphology with chemodiversity, *Nat. Prod. Commun.* 7, 1469-1473. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701115>
- Bhutia, TD, Valant-Vetschera, KM, Breckerc, L, 2013. Orphan flavonoids and dihydrochalcones from *Primula* exudates. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1081-1084. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800812>
- Valant-Vetschera, KM, Bhutia, TD, Wollenweber, E, 2009. Exudate flavonoids of *Primula* spp: structural and biogenetic chemodiversity. *Nat. Prod. Commun.* 4, 365-370. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400310>
- Valero-Guillén, P, Martín-Luengo, F, Larsson, L, Jimenez, J, Juhlin, I, Portaels, F, 1988. Fatty and mycolic acids of *Mycobacterium malmoens*. *J. Clin. Microbiol.* 26, 153-154. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.1.153-154.1988>
- Van Den Dool, H, Kratz, PD, 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Vitalini, S, Flamini, G, Valaguzza, A, Rodondi, G, Iriti, M, Fico, G, 2011. *Primula spectabilis* Tratt. aerial parts: Morphology, volatile compounds and flavonoids. *Phytochemistry* 72, 1371-1378. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.010>
- Vlahov, G, Rinaldi, G, Del Re, P, Giuliani, AA, 2008. GC-MS and ¹³C NMR study of epicuticular waxes of olive fruit (*Olea europaea*) cv. Dritta. *Analytical Chemistry: An Indian Journal* 7, 131-137.
- von Wettstein-Knowles, P, 2007. Analyses of barley spike mutant waxes identify alkenes, cyclopanes and internally branched alkanes with dominating isomers at carbon 9. *Plant J.* 49, 250-264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02956.x>

- Genčić, MS, 2015. Izolovanje, sinteza i biološka aktivnost sekundarnih metabolita odabranih biljnih vrsta rodova *Lycopus* (Lamiaceae) i *Inula* (Asteraceae), doktorska disertacija, Niš.
- Gibbs, AG, 2002. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J. Insect Physiol.* 48, 391-400. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00059-8)
- Gibbs, A, Pomonis, JG, 1995. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp. Biochem. Phys. B* 112, 243-249. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00081-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00081-X)
- Gibbs, AG, Rajpurohit S, 2010. Cuticular lipids and water balance, in: Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G. (Eds.), *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*, Cambridge University Press, Cambridge, 100-120. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909.007>
- Gonzales-Vigil, E, Hefer, CA, von Loessl, ME, La Mantia, J, Mansfield, SD. 2017. Exploiting natural variation to uncover an alkene biosynthetic enzyme in poplar. *Plant Cell* 29, 2000-2015. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00338>
- Goodwin, SM, Rashotte, MA, Rahman, M, Feldmann, KA, Jenks, MA, 2005. Wax constituents on the inflorescence stems of double *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* reveal complex gene interactions. *Phytochemistry* 66, 771-780. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.001>
- Gosney, BJ, Potts, BM, O'Reilly-Wapstra, JM, Vaillancourt, RE, Fitzgerald, H, Davies, NW, Freeman, JS, 2016. Genetic control of cuticular wax compounds in *Eucalyptus globulus*. *New Phytol.* 11, 202-215. <https://doi.org/10.1111/nph.13600>
- Grimalt, JO, Yruela, I., Saiz-Jimenez, C., Toja, J., De Leeuw, J.W., Albaigés, J., 1991. Sedimentary lipid biogeochemistry of an hypereutrophic alkaline lagoon. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55, 2555-2577. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(91\)90373-D](https://doi.org/10.1016/0016-7037(91)90373-D)
- Griffiths, DW, Robertson, GW, Shepherd, T, Birch, AN, Gordon, SC, Woodford, JA, 2000. A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. *Phytochemistry* 55, 111-116. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00250-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00250-8)

- Grice, K, Lu, H, Zhou, Y, Stuart-Williams, H, Farquhar, GD, 2008. Biosynthetic and environmental effects on the stable carbon isotopic compositions of *anteiso*- (3-methyl) and *iso*- (2-methyl) alkanes in tobacco leaves. *Phytochemistry* 69, 2807-2814. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.024>
- Gülz P-G, 1980. Alkanes and alkenes in the epicuticular waxes from Cistus plants, in: Mazliak P, Benveniste P, Costes C, et al. (Eds.) Biogenesis and Function of Plant Lipids, Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 275-279.
- Gülz, P-G, Marner, F-J, 1986. Esters of benzyl alcohol and 2-phenyl-ethanol-1 in epicuticular waxes from *Jojoba* leaves. *Z. Naturforsch. C* 41, 673-676. <https://doi.org/10.1515/znc-1986-7-801>
- Gülz, P-G, Müller, E, Schmitz, K, Marner, F-J, Güth, S, 1992. Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*, *Z. Naturforsch. C* 47, 516-526. <https://doi.org/10.1515/znc-1992-7-805>
- Gülz, PG, Hangst, K, 1983, Chemistry and morphology of epicuticular waxes from various organs of *Jojoba* (*Simmondsia chinensis* [Link] Schneider), *Z. Naturforsch.* 38c, 683-688. <https://doi.org/10.1515/znc-1983-9-1002>
- Graziose, R, Rathinasabapathy, T, Lategan, C, Poulev, A, Smith, PJ, Grace, M, Lila, MA, Raskin, I, 2011. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L., *J. Ethnopharmacol.* 133, 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.059>
- Dekić, BR, Ristić, MN, Mladenović, MZ, Dekić, VS, Ristić, NR, Randelović, V, Radulović, NS, 2019. Diethyl-ether flower washings of *Dianthus cruentus* Griseb. (Caryophyllaceae): derivatization reactions leading to the identification of new wax constituents. *Chem. Biodivers.* 16, e1900153. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900153>
- Della Porta, G, Taddeo, R, D'Urso, E, Reverchon, E, 1998. Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction. *LWT – Food. Sci. Technol.* 31, 454-460. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0381>

- Denic V, Weissman JS, 2007. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* 130, 663-677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.031>
- Deno, NC, Jedziniak, EJ, Messer, LA, Meyer, MD, Stroud, SG, Tomezsko, ES, 1977. The hydroxylation of alkanes and alkyl chains. *Tetrahedron* 33, 2503-2508. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)80072-0](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80072-0)
- Dickschat, JS, Helmke, E, Schulz, S, 2005. Volatile organic compounds from arctic bacteria of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group: a retrobiosynthetic approach in chemotaxonomic investigations. *Chem. Biodivers.* 2, 318-353. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590014>
- Dove, H, Mayes, RW, Freer, M, 1996. Effects of species, plant part, and plant age on the *n*-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *Aust. J. Agric. Res.* 47, 1333-1347. <https://doi.org/10.1071/AR9961333>
- Doskotch, RW, Keely, SLJr, Hufford, CD, El-Feraly, FS, 1975. New sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry* 14, 769-773. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)83032-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)83032-9)
- Dorman, DE, Jautelat, M, Roberts, JD, 1971. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Quantitative correlations of the carbon chemical shifts of acyclic alkenes. *J. Org. Chem.* 36, 2757-2766. <https://doi.org/10.1021/jo00818a007>
- Ejchart, A, 1981. Substituent effects on ¹³C NMR. 2-chemical shifts in the saturated framework of secondary aliphatic derivatives. *Org. Magn. Reson.* 15, 22-24. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270150106>
- El Morchid, EM, Londoño, PT, Papagiannopoulos, M, Gobbo-Neto, L, Müller, C, 2014. Variation in flavonoid pattern in leaves and flowers of *Primula veris* of different origin and impact of UV-B, *Biochem. Syst. Ecol.* 53, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.032>
- Elser, D, Gilli, C, Brecker, L, Valant-Vetschera, KM, 2016. Striking diversification of exudate profiles in selected *Primula* lineages. *Nat. Prod. Commun.* 11, 585-590. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100506>

- Emmons, CLW, Scott, JW, 1997. Environmental and physiological effects on cuticle cracking in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122, 797–801. <https://doi.org/10.21273/JASHS.122.6.797>
- Essokne, RS, Grayer, RJ, Porter, E, Kite, GC, Simmonds, MSJ, Jury, SL, 2012. Flavonoids as chemosystematic markers for the genus *Adenocarpus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 42, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.023>
- Živković Stošić, MZ, Radulović, NS, 2021. Lithium aluminum hydride reduction of 1-phenylbutane-1,3-dione, and acetylation of the products: NMR and GC-MS analysis, *FU Phys. Chem. Tech.* 19, 31-43. <https://doi.org/10.2298/FUPCT2101031Z>
- Živković Stošić, MZ, Radulović, NS, Genčić, MS, Ranđelović, VN, 2021. Very-long-chain wax constituents from *Primula veris* and *P. acaulis*: does the paradigm of non-branched vs. branched chain dominance universally hold in all plant taxa? *Chem. Biodivers.* 18, e2100285. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100285>
- Zaikin, VG, Borisov, RS, 2002. Chromatographic–mass spectrometric analysis of Fischer–Tropsch synthesis products. *J. Anal. Chem.* 57, 653-660. <https://doi.org/10.1023/A:1015754120136>
- Zhang, L, Yan, H-F, Wu, W, Yu, H, Ge, X-J, 2013. Comparative transcriptome analysis and marker development of two closely related Primrose species (*Primula poissonii* and *Primula wilsonii*). *BMC Genomics* 14, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-329>
- Zhang, J-Y, Broeckling, CD, Sumner, LW, Wang, Z-Y, 2007. Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXPI* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol. Biol.* 64, 265-278. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9150-2>
- Zhou, Y, Grice, K, Stuart-Williams, H, Farquhar, GD, Hocart, CH, Lu, H, Liu, W, 2010. Biosynthetic origin of the saw-toothed profile in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ of *n*-alkanes and systematic isotopic differences between *n*-, *iso*- and *anteiso*-alkanes in leaf waxes of land plants. *Phytochemistry* 71, 388-403. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.11.009>
- Iinuma, M, Tanaka, T, Oyama, M, Wollenweber, E, 2006. Two novel natural flavonoids from *Primula palinurid*. *Nat. Prod. Commun.* 1. <https://doi.org/10.1177/1934578X0600101106>

- Ilic-Tomic, T, Genčić, MS, Živković, MZ, Vasiljevic, B, Djokic, L, Nikodinovic-Runic, J, Radulović, NS, 2015. Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Appl. Microbiol. Biot.* 99, 4815-4833. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6364-5>
- Indrasti, DC, Man, YB, Mustafa, S, Hashim, DM, 2010. Lard detection based on fatty acids profile using comprehensive gas chromatography hyphenated with time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 122, 1273-1277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.082>
- Isidorov, VA, Szczepaniak, L, 2009. Gas chromatographic retention indices of biologically and environmentally important organic compounds on capillary columns with low-polar stationary phases. *J. Chromatogr. A* 1216, 8998-9007. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.079>
- Iwashina, T, 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113, 287-299. <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
- Jana, S, Martini, S, 2016. Phase behavior of binary blends of four different waxes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 543 – 554. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2789-6>
- Jantzen, E, Tangen, T, Eng, J, 1989. Gas chromatography of mycobacterial fatty acids and alcohols: diagnostic applications. *APMIS* 97, 1037-1045. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1989.tb00515.x>
- Jackson, MA, Eller, FJ, 2006. Isolation of long-chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluid* 37, 173-177. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.08.008>
- Jacob, J, Eigener, U, Hoppe, U, 1997. The structure of preen gland waxes from pelecaniform birds containing 3,7-dimethyloctan-1-ol - an active ingredient against dermatophytes. *Z. Naturforsch. C* 52, 114-123. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-1-220>
- Jegorov, A, Šimek, P, Heydová, A, Cvak, L, Minář, J, 1997. Free and bonded homoisoleucine in sclerotia of the parasitic fungus *Claviceps purpurea*. *Amino Acids* 12, 9-19. <https://doi.org/10.1007/BF01373422>

- Jones, TH, Potts, BM, Vaillancourt, RE, Davies, NW, 2002. Genetic resistance of *Eucalyptus globulus* to autumn gum moth defoliation and the role of cuticular waxes. *Can. J. Forest Res.* 32, 1961-1969. <http://dx.doi.org/10.1139/x02-118>
- Jetter, R, 2006. Examination of the processes involved in the emission of scent volatiles from flowers, in: Dudareva, N, Pichersky, E, (Eds.), *Biology of Floral Scent*, Taylor & Francis, Boca Raton, 125-146.
- Jetter, R, Kunst, Lj, Samuels, AL, 2006. Composition of plant cuticular waxes, in: Riederer, M, Müller, C, (Eds.), *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Germany, 145-181. <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch4>
- Kerstiens, G, 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance, *J. Exp. Bot.* 47, 1813–1832. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.12.1813>
- Kerstiens, G, 1994. Air pollutants and plant cuticles: mechanisms of gas and water transport, and effects on water permeability, in: Percy, KE, Cape, JN, Jagels R, Simpson, CJ, (Eds.), *Air Pollutants and the Leaf Cuticle*, Springer, Berlin, 39–53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79081-2_3
- Kerstiens, G, Federholzner, R, Lendzian, KJ, 1992. Dry deposition and cuticular uptake of pollutant gases, *Agric. Ecosyst. Environ.* 42, 239–253. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(92\)90002-S](https://doi.org/10.1016/0167-8809(92)90002-S)
- Kišgeci, J, 2005. *Lekovite i aromatične biljke*, Srpska književna zadruga, Beograd, 123-124.
- Knoche, M, Peschel, S, Hinz, M, 2002. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: III. Conductance of the cuticle in relation to fruit size, *Physiol. Plant.* 114, 414–421. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140311.x>
- Kojić, M, Stamenković, V, Jovanović, D, 1998. *Lekovite biljke jugoistočne Srbije*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 160-161.
- Kolattukudy, PE, Bohnet, S, Sasaki, G, Rogers, L, 1991. Developmental changes in the expression of S-acyl fatty acid synthase thioesterase gene and lipid composition in the

- uropygial gland of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 201-206. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90284-P](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90284-P)
- Коњевић, Р, Татић, Б, 2006. Речник назива биљака, ННК интернационал, Београд.
- Korkina, LG, 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53, 15-25. <https://doi.org/10.1170/T772>
- Krauss, P, Markstädter, C, Riederer, M, 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environ.* 1997, 20, 1079–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1997.tb00684.x>
- Krentscher, C, Dubois, N, Camperio, G, Prebble, M, Ladd, SN, 2019. Palmitone as a potential species-specific biomarker for the crop plant taro (*Colocasia esculenta* Schott) on remote Pacific islands. *Org. Geochem.* 132, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2019.03.006>
- Kubinec, R, Blaško, J, Górová, R, Addová, G, Ostrovský, I, Amann, A, Soják, L, 2011. Equivalent chain lengths of all C₄–C₂₃ saturated monomethyl branched fatty acid methyl esters on methylsilicone OV-1 stationary phase. *J. Chromatogr. A.* 1218, 1767-1774. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.065>
- Kunst, Lj, Jetter, R, Samuels, AL, 2006. Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes, in: Riederer, M., Müller, C., (Eds.), *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle.* Blackwell Publishing Ltd, Germany, 182-215. <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch5>
- Khanal, BP, Grimm, E, Finger, S, Blume, A, Knoche, M, 2013. Intracuticular wax fixes and restricts strain in leaf and fruit cuticles. *New Phytol.* 200, 134-143. <https://doi.org/10.1111/nph.12355>
- Leboeuf, M, Caré, A, Tohami, ME, Pusset, J, Forgacs, P, Provost, J, 1982. Alkaloids of Annonaceae. XXXV. Alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*. *J. Nat. Prod.* 45, 617-623. <https://doi.org/10.1021/np50023a017>
- Lee, JS, Kim, DH, Liu, KH, Oh, TK, Lee, CH, 2005. Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with

- an MS/MS library. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3539-3548. <https://doi.org/10.1002/rcm.2230>
- Lenzian, KJ, Kerstiens, G, 1991. Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles, In: Ware, GW, (Eds.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 66-121. Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3196-7_2
- Li, L, Ye, J, Li, H, Shi, Q, 2020. Characterization of metabolites and transcripts involved in flower pigmentation in *Primula vulgaris*. *Front. Plant Sci.* 11, 572517. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572517>
- Li, Y, Yin, Y, Chen, S, Bi, Y, Ge, Y, 2014. Chemical composition of cuticular waxes during fruit development of Pingguoli pear and their potential role on early events of *Alternaria alternata* infection. *Funct. Plant Biol.* 41, 313–320. <http://doi.org/10.1071/FP13184>
- Lorenz, P, Heinrich, M, Conrad, J, Heller, A, Stintzing, FC, Kammerer, DR, 2017. Comprehensive characterisation of *n*-alkylresorcinols and other lipid constituents of *Mercurialis tomentosa* L. from Alicata, Spain. *Chem. Biodivers.* 14, e1600255. [10.1002/cbdv.201600255](https://doi.org/10.1002/cbdv.201600255)
- Louw, S, Burger, BV, Le Roux, M, Van Wyk, JH, 2007, Lizard epidermal gland secretions I: Chemical characterization of the femoral gland secretion of the Sungazer, *Cordylus giganteus*. *J. Chem. Ecol.* 33, 1806-1818. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9348-4>
- Ma, S, Liu, J, Li, S, Chen, B, Cheng, J, Kuang, J, Liu, Y, Wan, B, Wang, Y, Ye, J, Yu, Q, Yuan, W, Yu, S, 2011. Development of a general and practical iron nitrate/TEMPO-catalyzed aerobic oxidation of alcohols to aldehydes/ketones: catalysis with table salt. *Adv. Synth. Catal.* 353, 1005-1017. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100033>
- Mabry, TJ, Markham, KR, Thomas, MB, 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*, first ed. Springer-Verlag, New York.
- Maier, CG-A, Post-Beittenmiller, D, 1998. Epicuticular wax on leek in vitro developmental stages and seedlings under varied growth conditions. *Plant Sci.* 134, 53-67. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00049-1)

- Mason, RT, Jones, TH, Fales, HM, Pannell, LK, Crews, D, 1990. Characterization, synthesis, and behavioral responses to sex attractiveness pheromones of red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *J. Chem. Ecol.* 16, 2353-2369. <https://doi.org/10.1007/BF01026943>
- Masur, M, Grützmacher, H-F, Münster, H, Budzikiewicz, H, 1987. Mass spectrometric fragmentation of the tautomers of 1,3-diketones. A gas chromatographic/mass spectrometric study. *J. Mass Spectrom.* 22, 493-500. <https://doi.org/10.1002/oms.1210220804>
- Mahmood, A, Ahmed, R, Kosar, S, 2009. Phytochemical screening and biological activities of the oil components of *Prunus domestica* Linn. *J. Saudi Chem. Soc.* 13, 273-277. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2009.10.008>
- Mendoza, YA, Gülaçar, FO, Hu, ZL, Buchs, A, 2006. Unsubstituted and hydroxy substituted fatty acids in a recent lacustrine sediment: (Lake Léman, Geneva, Switzerland). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 31, 107-127. <https://doi.org/10.1080/03067318708077136>
- Merad, J, Borkar, P, Caijo, F, Pons, J-M, Parrain, J-L, Chuzel, O, Bressy, C, 2017. Double catalytic kinetic resolution (DoCKR) of acyclic *anti*-1,3-diols: the additive horeau amplification. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 16052-16056. <https://doi.org/10.1002/anie.201709844>
- Merk, S, Blume, A, Riederer, M, 1998. Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* 204, 44-53. <https://doi.org/10.1007/s004250050228>
- Misra, TN, Singh, RS, Pandey, HS, Sharma, SC, 1989. Aliphatic hydroxy ketones from *Adenocalymma alliaceum* leaves. *Phytochemistry* 28, 933-936. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80147-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80147-5)
- Mold, JD, Stevens, RK, Means, RE, Ruth, JM, 1963. The paraffin hydrocarbons of tobacco; *normal*, *iso*-, and *anteiso*-homologs. *Biochemistry* 2, 605-610. <https://doi.org/10.1021/bi00903a037>
- Moss, GP, 1996. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* 68, 2193-2222. <https://doi.org/10.1351/pac199668122193>

- Mohan, RTS, Saral, AM, Marner, FJ, 1998. Chromatographic and spectroscopic analysis of epicuticular waxes of *Avicennia marina* (Forsk) vierh. *Orient. J. Chem.* 14, 181-183. <http://www.orientjchem.org/?p=21798>
- Muhammad, I, Hufford, CD, 1989. Phenylpropanoids, sesquiterpenes, and alkaloids from the seeds of *Liriodendron tulipifera*. *J. Nat. Prod.* 52, 1177–1179.
- Müller, C, 2006. Plant-insect interactions on cuticular surfaces, in: Riederer, M, Müller C, (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*, Annual Plant Reviews, Blackwell, Oxford, 398-422. <https://doi.org/10.7537/marslsj1204s15.08>
- Müller, H, 1915. XCVI.-The occurrence of flavones as the farina of the *Primula*. *J. Chem. Soc. Trans.* 107, 872-878. <https://doi.org/10.1039/CT9150700872>
- Николић, В, 1972. Флора СР Србије, Српска академија наука и уметности, Београд. III том, стр. 493-498.
- Niwa, M, Jiang, P-F, Hirata, Y, 1987. Constituents of *Wikstroemia sikokiana*. II. Absolute configurations of 1,5-diphenylpentane-1,3-diols. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 108-111. <https://doi.org/10.1248/cpb.35.108>
- Nunez, A, Hammond, GS, Weiss, RG, 1992. Liquid crystalline solvents as mechanistic probes. 47. Investigation of the modes of solubilization and Norrish II photoreactivity of 2- and *sym-n*-alkanones in the solid phases of *n*-heneicosane and two homologs. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10258-10271. <https://doi.org/10.1021/ja00052a023>
- Oliveira Lino, L, Quilot-Turion, B, Dufour, C, Corre, M-N, Lessire, R, Génard, M, Poëssel, J-L, 2020. Cuticular waxes of nectarines during fruit development in relation to surface conductance and susceptibility to *Monilinia laxa*. *J. Exp. Bot.* 71, 5521-5537. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa284>
- Osborn, JM, Taylor, TN, 1990. Morphological and ultrastructural studies of plant cuticular membranes. I. Sun and shade leaves of *Quercus velutina* (Fagaceae). *Bot. Gaz.* 151, 465–476. <https://doi.org/10.1086/337846>
- Ohta, S, Takeda, M, Ohta, E, Nehira, T, Omura, H, Uy, MM, Ishihara, Y, 2021. Janohigenins: Long-chain anacardic acid derivatives with neuroprotective activity from *Ophiopogon*

- japonicus* seeds. *Phytochemistry* 191, 112904.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112904>
- Parez, JJ, Fauville-Dufaux, M, Dossogne, JL, de Hoffmann, E, Pouthier, F, 1994. Faster identification of mycobacteria using gas liquid and thin layer chromatography. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 717-725. <https://doi.org/10.1007/BF02276054>
- Parks, CR, Wendel, JF, 1990. Molecular divergence between Asian and North American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implications for interpretation of fossil floras. *Amer. J. Bot.* 77, 1243-1256. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11376.x>
- Patel, S, Nelson, DR, Gibbs, AG, 2001. Chemical and physical analyses of wax ester properties. *J. Insect Sci.* 1, 1-7. <https://doi.org/10.1673/031.001.0401>
- Pelter, A, Vughan-Williams, GF, Rosser, RM, 1993. Hindered organoboron groups in organic chemistry. 21. The reactions of dimesitylboron stabilised carbanions with oxiranes. *Tetrahedron* 49, 3007-3034. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80394-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80394-X)
- Peng, CT, 2000. Prediction of retention indices V. Influence of electronic effects and column polarity on retention index. *J. Chromatogr. A* 903, 117-143.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00901-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00901-8)
- Peng, CT, 2010. Prediction of retention indices. VI: Isothermal and temperature-programmed retention indices, methylene value, functionality constant, electronic and steric effects. *J. Chromatogr. A* 1217, 3683-3694. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.005>
- Peng, CT, Ding, SF, Hua, RL, Yang, ZC, 1988. Prediction of retention indexes. I. Structure-retention index relationship on apolar columns. *J. Chromatogr.* 436, 137-172.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94575-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94575-8)
- Percy, KE, Manninen, S, Häberle, K-H, Heerdt, C, Werner, H, Henderson, GW, Matyssek, R, 2009. Effect of 3 years' free-air exposure to elevated ozone on mature Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) needle epicuticular wax physicochemical characteristics. *Environ. Pollut.* 157, 1657-1665. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.016>

- Petitjean D, Schmitt, JF, Laine, V, Bouroukba, M, Cunat, C, Dirand, M, 2008. Presence of isoalkanes in waxes and their influence on their physical properties. *Energ. Fuel* 22, 697-701. <https://doi.org/10.1021/ef700423g>
- Petitjean, D, Schmitt, JF, Laine, V, Cunat, C, Dirand, M, 2010. Influence of the alkane molar distribution on the physical properties of synthetic waxes. *Energ. Fuel* 24, 3028-3033. <https://doi.org/10.1021/ef100018j>
- Pretsch, E, Bühlmann, P, Badertscher, M, 2009. Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data, fourth ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Germany.
- Prouvost, O, Trabalon, M, Papke, M, Schulz, S, 1999. Contact sex signals on web and cuticle of *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae). *Arch. Insect Biochem.* 40, 194-202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1999\)40:4<194::AID-ARCH4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1999)40:4<194::AID-ARCH4>3.0.CO;2-P)
- Radulović, NS, Denić, MS, Stojanović-Radić, ZZ, 2014a. Synthesis of small combinatorial libraries of natural products: identification and quantification of new long-chain 3-methyl-2-alkanones from the root essential oil of *Inula helenium* L. (Asteraceae). *Phytochem. Anal.* 25, 75 – 80. <https://doi.org/10.1002/pca.2466>
- Radulović, N, Denić, M, Stojanović-Radić, Z, Skropeta, D, 2012. Fatty and volatile oils of the gypsywort *Lycopus europaeus* L. and the Gaussian-like distribution of its wax alkanes. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 89, 2165-2185. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2118-7>
- Radulović, NS, Živković Stošić, MZ, 2021. Long-chain *syn*-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, related phenylalkane derivatives, and sec-alcohols, all possessing dominantly *iso*-branched chain termini, and 2/3-methyl-branched fatty acids from *Primula veris* L. (Primulaceae) wax. *Phytochemistry* 186, 112732. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112732>
- Radulović, NS, Zlatković, DB, 2014. *n*-Octyl esters of long-chain fatty acids are not anthropogenic pollution markers. *Environ. Chem. Lett.* 12, 303-312. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0443-1>
- Radulović, NS, Mladenović, MZ, Stojanović-Radić, ZZ, 2014b. Synthesis of small libraries of natural products: new esters of long-chain alcohols from the essential oil of *Scandix*

- pecten-veneris* L. (Apiaceae). *Flavour Fragr. J.* 29, 255-266.
<https://doi.org/10.1002/ffj.3205>
- Radulović, NS, Mladenović, MZ, Stojanović, NM, Randjelović, PJ, Blagojević, PD, 2019. Structural elucidation of presilphiperfolane-7 α ,8 α -diol, a bioactive sesquiterpenoid from *Pulicaria vulgaris*: a combined approach of solvent-induced chemical shifts, GIAO calculation of chemical shifts, and full spin analysis. *J. Nat. Prod.* 82, 1874-1885.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00120>
- Ran-Ressler, RR, Lawrence, P, Brenna, JT, 2021. Structural characterization of saturated branched chain fatty acid methyl esters by collisional dissociation of molecular ions generated by electron ionization. *J. Lipid Res.* 53, 195-203.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D020651>
- Rapley, LP, Allen, GR, Potts, BM, 2004. Susceptibility of *Eucalyptus globulus* to *Mnesampela private* defoliation in relation to a specific foliar wax compound, *Chemoecology* 14, 157-163. <https://doi.org/10.1007/s00049-004-0279-z>
- Rathgeber, C, Schmit, H, Hiebler, S, Mixture of alkanes, fatty acids and alcohols as novel phase change materials: preparation and characterization with DSC and T-history, 2013. 2nd International Conference on Sustainable Energy Storage, Dublin, Ireland.
<https://doi.org/10.13140/2.1.4613.6322>
- Racovita, RC, Jetter, R, 2016. Composition of the epicuticular waxes coating the adaxial side of *Phyllostachys aurea* leaves: Identification of very-long-chain primary amides, *Phytochemistry* 130, 252-261. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.005>
- Racovita, RC, Hen-Avivi, S, Fernandez-Moreno, JP, Granell, A, Aharoni, A, Jetter, R, 2016. Composition of cuticular waxes coating flag leaf blades and peduncles of *Triticum aestivum* cv. Bethlehem, *Phytochemistry* 130, 182-192.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.05.003>
- Racovita, RC, Peng, C, Awakawa, T, Abe, I, Jetter, R, 2015. Very-long-chain 3-hydroxy fatty acids, 3-hydroxy fatty acid methyl esters and 2-alkanols from cuticular waxes of *Aloe arborescens* leaves. *Phytochemistry* 113, 183-194.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.005>

- Riederer, M, Schreiber, L, 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles, *J. Exp. Bot.* 52, 2023-2032. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2023>
- Richards, J, 2003. *Primula*, second ed. Timber Press Inc., Portland.
- Rottler, A-M, Schulz, S, Ayasse, M, 2013. Wax lipids signal nest identity in bumblebee colonies. *J. Chem. Ecol.* 39, 67-75. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0229-0>
- Rourke, BC, Gibbs, AG, 1999. Effects of lipid phase transitions on cuticular permeability: model membrane and in situ studies. *J. Exp. Biol.* 202, 3255-3262. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.22.3255>
- Rowe, JW, Conner, AH, 1979. Extractives in eastern hardwoods - a review, Forest Products Laboratory, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- Rhee, Y, Hlousek-Radojčić, A, Ponsamuel, J, Liu, D, Post-Beittenmiller, D, 1998. Epicuticular wax accumulation and fatty acid elongation activities are induced during leaf development of leeks. *Plant Physiol.* 116, 901–911. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.901>
- Řezanka, T, Vokoun, J, Slaviček, J, Podojil, M, 1983. Determination of fatty acids in algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 268, 71-78. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)95388-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95388-9)
- Sakai, A, 1971. Freezing resistance of relicts from the Arcto-Tertiary flora, *New Phytol.* 70, 1199-1205. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1971.tb04598.x>
- Szafranek, BM, Synak, EE, 2006. Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry* 67, 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.10.012>
- Siljeström, S, Parentau, MN, Jahnke, LL, Cady, SL, 2017. A comparative ToF-SIMS and GC–MS analysis of phototrophic communities collected from an alkaline silica-depositing hot spring. *Org. Geochem.* 109, 14-30. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.03.009>
- Singh, OV, Huang, W-J, Chen, C-H, Lee, S-S, 2007. Manganese(III) acetate mediated oxidation of aporphines: a convenient and useful synthesis of oxoaporphines. *Tetrahedron Lett.* 48, 8166–8169. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.096>
- Sljepcević, A, Gelosa, D, 2008. Gas and liquid chromatography, in: *Fundamentals of Chemistry*, (Eds.) Carrà, S, Eolls Publishers Co. Ltd., Oxford, 2008, Vol 1, 164-174.

- Spring O, Zipper R, Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Da Costa FB, 2003. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 62, 1185-1189. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00747-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00747-1)
- Stapleton, AE, 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell* 4, 1353-1358. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1353>
- Steinbauer, MJ, Davies, NW, Gaertner, C, Derridj, S, 2009. Epicuticular waxes and plant primary metabolites on the surfaces of juvenile *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* (Myrtaceae) leaves. *Aust. J. Bot.* 57, 474-485. <https://doi.org/10.1071/BT09108>
- Steinbauer, MJ, Schiestl, FP, Davies, NW, 2004. Monoterpenes and epicuticular waxes help female autumn gum moth differentiate between waxy and glossy *Eucalyptus* and leaves of different ages. *J. Chem. Ecol.* 30, 1117-1142. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000030267.75347.c1>
- Streibl, VM, Stránský, K, 1972. Natural Waxes XXII: Wax Ketones. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 74, 566-569. <https://doi.org/10.1002/lipi.19720741002>
- Steinkellner, S, Lenzemo, V, Langer, I, Schweiger, P, Khaosaad, T, Toussaint, JP, Vierheilig, H., 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12, 1290-1306. <https://doi.org/10.3390/12071290>
- Shepherd, T, Griffiths, DW, 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171, 469-499. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x>
- Scribe, P, Guezennec, J, Dagaut, J, Pepe, C, Saliot, A, 1988. Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* 60, 928-931. <https://doi.org/10.1021/ac00160a019>
- Schulz, S, 2001. Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. *Lipids* 36, 637-647. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0768-7>

- Schulz, S, Arsene, C, Tauber, M, McNeil, JN, 2000. Composition of lipids from sunflower pollen (*Helianthus annuus*). *Phytochemistry* 54, 325-336. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00089-3)
- Schönherr, J, Eckl, K, Gruler, H, 1979. Water permeability of plant cuticles: the effect of temperature on diffusion of water. *Planta* 147, 21-26. <https://doi.org/10.1007/BF00384585>
- Shanker, KS, Kanjilal, S, Rao, BVSK, Kishore, KH, Misra, S, Prasad RBN, 2007. Isolation and antimicrobial evaluation of isomeric hydroxy ketones in leaf cuticular waxes of *Annona squamosa*. *Phytochem. Anal.* 18, 7-12. <https://doi.org/10.1002/pca.942>
- Takaoko, D, Umeda, K, Hiroi, M, 1977. 13-Hydroxy hentriacontan-16-one from *Neolitsea sericea*. *Phytochemistry* 16, 1042-1043.
- Tokalov, SV, Kind, B, Wollenweber, E, Gutzeit, HO, 2004. Biological effects of epicuticular flavonoids from *Primula denticulata* on human leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.* 52, 239-245. <https://doi.org/10.1021/jf0347160>
- Tomasi, P, Dyer, JM, Jenks, MA, Abdel-Haleem, H, 2018. Characterization of leaf cuticular wax classes and constituents in a spring *Camelina sativa* diversity panel. *Ind. Crops Prod.* 112, 247-251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.054>
- Trivedi, P, Nguyen, N, Klavins, L, Kviesis, J, Heinonen, E, Remes, J, Jokipii-Lukkari, S, Klavins, M, Karppinen, K, Jaakola, L, Haggman, H, 2021. Analysis of composition, morphology, and biosynthesis of cuticular wax in wild type bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and its glossy mutant. *Food Chem.* 354, 129517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129517>
- Туцаков, Ј., 1990. Лечење биљем – фитотерапија, РАД, Београд, 360-361.
- Tynkkynen, T., Hassinen, T., Tiainen, M., Soininen, P., Laatikainen, R., 2012. ¹H NMR spectral analysis and conformational behavior of n-alkanes in different chemical environments. *Magn. Reson. Chem.* 50, 598-607. <https://doi.org/10.1002/mrc.3847>

- Ubik, K, Stránský, K, Streibl, VM, 1974. Gas chromatography-mass spectrometry determination of high aliphatic secondary alcohols. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 40, 1718-1730. <https://doi.org/10.1135/cccc19751718>
- Fernandez-Moreno, J-P, Malitsky, S, Lashbrooke, J, Kumar Biswal, A, Racovita, RC, Mellerowicz, EJ, Jetter, R, Orzaez, D, Aharoni, A, Granell, A, 2015. An efficient method for medium throughput screening of cuticular wax composition in different plant species. *Metabolomics* 12, 1-13. 10.1007/s11306-016-0982-0
- Furniss, BS, Hannaford, AJ, Smith, PWG, Tatchell, AR, 1989. Vogel's textbook of practical organic chemistry. Longman Scientific & Technical, England.
- Frankenfeld, JW, Tyler III, WE, 1971. Reductions of some aliphatic β -diketones with lithium aluminum hydride. *J. Org. Chem.* 36, 2110-2115. <https://doi.org/10.1021/jo00814a017>
- Friedel, RA, Shultz, JL, Sharkey, AG, 1956. Mass spectra of alcohols, *Anal. Chem.* 28, 926-934. <https://doi.org/10.1021/ac60114a002>
- Hamilton, RJ, 2004. Plant waxes, in: Hetherington, AM, (Ed), Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley Online & Sons Ltd., Chichester. <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0001919>
- Hannoufa, A, McNevin, JP, Lemieux, B, 1993. Epicuticular waxes of eceriferum mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 33, 851-855. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85289-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85289-4)
- Hansjakob, A, Bischof, S, Bringmann, G, Riederer, M, Hildebrandt, U, 2010. Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose- and chain length-dependent manner. *New Phytol.* 188, 1039-1054. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03419.x>
- Hao, S, Ma, Y, Zhao, S, Ji, Q, Zhang, K, Yang, M, Yao, Y, 2017. *McWR11*, a transcription factor of the AP2/SHEN family, regulates the biosynthesis of the cuticular waxes on the apple fruit surface under low temperature. *Plos One* 12, e0186996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186996>

- Harborne, JB, 1968. Comparative biochemistry of the flavonoids—VII : Correlations between flavonoid pigmentation and systematics in the family Primulaceae. *Phytochemistry* 7, 1215-1230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85616-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85616-2)
- Harborne, JB, 1965. Plant polyphenols-XV: Flavonols as yellow flower pigments, *Phytochemistry* 4, 647-657. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86234-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86234-2)
- Harborne, JB, Baxter, H, 1993. *Phytochemical Dictionary and Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor and Francis, London.
- Harborne JB, Sherratt HSA, 1961. Plant polyphenols: 3. Flavonoids in genotypes of *Primula sinensis*. *Biochem. J.* 78, 298-306. <https://doi.org/10.1042/bj0780298>
- Harborne, JB, Williams, CA, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00235-1)
- Harvey, DJ, 1991. Lipids from the guinea pig Harderian gland: use of picolinyl and other pyridine-containing derivatives to investigate the structures of novel branched-chain fatty acids and glycerol ethers. *Biol. Mass Spectrom.* 20, 61-69. <https://doi.org/10.1002/bms.1200200204>
- Harvey, DJ, Vouros, P, 2019. Mass spectrometric fragmentation of trimethylsilyl and related alkylsilyl derivatives. *Mass Spectrom. Rev.* 00, 1-107. <https://doi.org/10.1002/mas.21590>
- Harr J, Guggenheim R, Schulke G, Falk RH, 1991. *The Leaf Surface of Major Weeds*. Sandoz Agro Ltd, Witterswil, Switzerland.
- Harrigan, GG, Gunatilaka, AA, Kingston, DG, Chan, GW, Johnson, RK, 1994. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceous plants, *Xylopiya aethiopica* and *Miliusa* cf. *banacea*. *J. Nat. Prod.* 57, 68-73. <https://doi.org/10.1021/np50103a009>
- Hauff, S, Vetter, W, 2010. Exploring the fatty acids of *vernix caseosa* in form of their methyl esters by off-line coupling of non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 8270-8278. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.088>

- Hennig, S, Barthlott, W, Meusel, I, Theisen, I, 1994. Mikromorphologie der epicuticularwachse und die systematik der Magnoliidae, Ranunculidae und Hamamelididae. Publisher: Trop. subtrop. Pflanzenwelt 90, Akad. Wiss. Lit. Mainz. F. Steiner Verlag, Stuttgart
- Herbin, GA, Robins, PA, 1968. Studies on plant cuticular waxes—I: The chemotaxonomy of alkanes and alkenes of the genus *Aloe* (Liliaceae). *Phytochemistry* 7, 239-255. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86322-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86322-0)
- Hefetz, A, Taghizadeh, T, Francke, W, 1996. The exocrinology of the queen bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Z. Naturforsch. C* 51, 409 – 422. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-5-620>
- Hintze, U, Röper, H, Gercken, G, 1973. Gas chromatography-mass spectrometry of C₁-C₂₀ fatty acid benzyl esters. *J. Chromatogr.* 87, 482-489. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)91750-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)91750-9)
- Holloway, PJ, 1994. Plant cuticles: physicochemical characteristics and biosynthesis. In: Percy, K.E., Cape, J.N., Jagels, R., Simpson, C.J. (Eds.) Air Pollutants and the Leaf Cuticle. NATO ASI Series, vol 36. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79081-2_1
- Holloway, PJ, Brown, GA, Baker, EA, Macey, MJK, 1977. Chemical composition and ultrastructure of the epicuticular wax in three lines of *Brassica napus* L. *Chem. Phys. Lipids* 19, 114-127. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(77\)90092-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(77)90092-5)
- Hoffmann, RW, Weidmann, U, 1985. Stereoselective synthesis of alcohols, XIX. The sense of asymmetric induction on addition to α -chiral aldehydes. *Chem. Ber.* 118, 3966-3979. <https://doi.org/10.1002/cber.19851181010>
- Howell, DC, 2008. Fundamental Statistics for the Behavioral Sciences (6th edn.), Thomson Wadsworth, Belmont, CA, USA.
- Hunt, GM, Holloway, PJ, Baker, EA, 1976. Ultrastructure and chemistry of *Clarkia elegans* leaf wax: a comparative study with *Brassica* leaf waxes. *Plant Sci. Lett.* 6, 353-360. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(76\)90117-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(76)90117-6)

- Huck, CW, Huber, CG, Ongania, K-H, Bonn, GK, 2000. Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 870, 453-462. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00950-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00950-4)
- Häder, DP, Kumar, HD, Smith, RC, Worrest, RC, 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photoch. Photobio. Sci.* 6, 267-285. <https://doi.org/10.1039/b700020k>
- Hwang, YS, Navvab-Gojrati, HA, Mulla, MS, 1978. Overcrowding factors of mosquito larvae. 10. Structure-activity relationship of 3-methylalkanoic acids and their esters against mosquito larvae. *J. Agric. Food Chem.* 26, 557-560. <https://doi.org/10.1021/jf60217a068>
- Cava, MP, Noguchi, I, Buck, KT, 1973. Novel Pschorr reaction in the papaverine series. *J. Org. Chem.* 38, 2394-2397. <https://doi.org/10.1021/jo00953a024>
- Ceriani, RM, Pierce, S, Cerabolini, B, 2009. The survival strategy of the alpine endemic *Primula glaucescens* is fundamentally unchanged throughout its climate envelope despite superficial phenotypic variability. *Plant Ecol.* 204, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11258-008-9559-y>
- Colombo, PS, Flamini, G, Rodondi, G, Giuliani, C, Santagostini, L, Fico, G, 2017. Phytochemistry of European *Primula* species. *Phytochemistry* 143, 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.07.005>
- Costa, EVA, Marques, FA, Pinheiro, MLCB, Vaz, NP, Duarte, MCT, Delarmelina, C, Braga, RM, Maia, BHLNS, 2009. 7,7-Dimethylaporphine alkaloids from the stem of *Guatteropsis friesiana*. *J. Nat. Prod.* 72, 1516-1519. <https://doi.org/10.1021/np800788n>
- Couperus, PA, Clague, ADH, van Dongen, JPCM, 1978. Carbon-13 chemical shifts of some model carboxylic acids and esters. *Org. Magn. Reson.* 11, 590-597. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270111203>
- Cryle, MJ, Ortiz de Montellano, PR, De Voss, JJ, 2005. Cyclopropyl containing fatty acids as mechanistic probes for cytochromes P450. *J. Org. Chem.* 70, 2455-2469. <https://doi.org/10.1021/jo047985d>

- Chen-Loung, C, Hou-Min, C, Cowling, EB, Chi-Yin, HH, Gates, RP, 1976a. Aporphine alkaloids and lignans formed in response to injury of sapwood in *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry* 15, 1161-1167.
- Chen-Loung, C, Hou-Min, C, Cowling, EB, 1976b. Aporphine alkaloids and lignans in heartwood of *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry* 15, 547-550.
- Chibnall AC, Piper SH, Mongouri EL, Williams EF, Iyengar AVV, 1937. The wax from the leaves of sandal (*Santalum album* Linn.). *Biochem. J.* 31, 1981-1986. <https://doi.org/10.1042/bj0311981>
- Wagner, GJ, Wang E, Shepherd RW, 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann. Bot.* 93, 3-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mch011>
- Wagner, P, Furstner, R, Barthlott, W, Neinhuis, C, 2003. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *J. Exp. Bot.* 54, 1295-1303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg127>
- Wang, J-L, He, L-N, Miao, C-X, Lia, Y-N, 2009. Ethylene carbonate as a unique solvent for palladium-catalyzed Wacker oxidation using oxygen as the sole oxidant. *Green Chem.* 11, 1317-1320. <https://doi.org/10.1039/b913779n>
- Wang, F, Zhang, P, Qiang, S, Zhu, Y-Z, Xu, L-L, 2008. Effects of epicuticular wax from *Digitaria sanguinalis* and *Festuca arundinacea* on infection by *Curvularia eragrostidis*. *Australas. Plant Path.* 37, 43-52. <https://doi.org/10.1071/AP07077>
- Wen, M, Jetter, R, 2009. Composition of secondary alcohols, ketones, alkanediols, and ketols in *Arabidopsis thaliana* cuticular waxes. *J. Exp. Bot.* 60, 1811-1821. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp061>
- Werner, SR, Chen, H, Jiang, H, Morgan, JA, 2010. Synthesis of non-natural flavanones and dihydrochalcones in metabolically engineered yeast. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.017>
- Williams, CA, Grayer, RJ, 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539-573. <https://doi.org/10.1039/b311404j>

- Wollenweber, E, Mann, K, 1988. 2',5'-Dihydroxyflavone and its 5'-acetate - Novel compounds from the farinose exudate of *Primula*. *Z. Naturforsch.* 43, 305- 307. <https://doi.org/10.1515/znc-1988-3-424>
- Wollenweber, E, Mann, K, 1986. Neue flati onoide aus primelmehl: new flavonoids from farinose *Primula* exudates. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 181, 665-669. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(86\)80072-5](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(86)80072-5)
- Wollenweber, E, Mann, K, Iinuma, M, Tanaka, T, Mizuno, M, 1989. 5,2',5'-Trihydroxyflavone and 2', β -dihydroxychalcone from *Primula pulverulenta*. *Phytochemistry* 28, 295-296. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)85067-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85067-8)
- Xu, C, Yuan, C, 2005. *Candida rugosa* lipase-catalyzed kinetic resolution of β -hydroxy- β -arylpropionates and δ -hydroxy- δ -aryl- β -oxo-pentanoates. *Tetrahedron* 61, 2169-2186. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.12.059>
- Xu, F, Xu, J, Hu, Y, Lin, X, Wu, Q, 2016. One-pot bienzymatic cascade combining decarboxylative aldol reaction and kinetic resolution to synthesize chiral β -hydroxy ketone derivatives. *RSC Advances* 6, 76829-76837. <https://doi.org/10.1039/C6RA12729K>
- Yaacob, K,B, Abdullah, CM, Joulain, D, 1989. Essential Oil of *Ruta graveolens* L. *J. Ess. Oil Res.* 1, 203-207. <https://doi.org/10.1080/10412905.1989.9697787>
- Yazaki, K, Sasaki, K, Tsurumaru, Y, 2009. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* 70, 1739-1745. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.023>
- Yildizhan, S, van Loon, J, Sramkova, A, Ayasse, M, Arsene, C, ten Broeke, C, Schulz, S, 2009. Aphrodisiac pheromones from the wings of the small cabbage white and large cabbage white butterflies, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. *Chembiochem* 10, 1666-1677. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900183>

Web извори

<https://webbook.nist.gov/chemistry/>

SDBSWeb: <https://sdfs.db.aist.go.jp> (*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*)

Flora Europaea: <https://eunis.eea.europa.eu/references/1780/species>

<https://www.britannica.com/plant/Magnoliaceae>

ПРИЛОЗИ

Списак прилога:

Прилог 1. Масена фрагментација (m/z) бензил-естара идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*

Прилог 2. Масена фрагментација (m/z) 2-алканона идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*

Прилог 3. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1,3-алкадирил-диацетата (***syn-1a, 2a-c, 3a-b, 4a-c, 5a-b, 6a-c, 7a-b***) идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*, као и оних добијених синтезом (*syn-* и ***anti-8a, 9a-c***)

Прилог 4. Масена фрагментација (m/z) синтетисаних *syn-* и *anti-*1-фенил-1,3-алкадиола (***12a, 13a-c***)

Прилог 5. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1-алкен-3-она који су настали из 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата под условима гасне хроматографије

Прилог 6. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1,3-алкадиона (***22a, 23b-c, 24a, 25b-c, 26a*** и ***27b***) идентификованих у испирку *P. veris*, као и оних добијених синтезом (***29a-c***)

Прилог 7. Масена фрагментација (m/z) 3-алканола (***50b, 51a, 52b-c, 53a, 54b-c, 55a*** и ***56b-c***) идентификованих у испирку *P. veris*

Прилог 8. Масени спектар бензил-бехената

Прилог 9. Масени спектар бензил-тетракозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 10. Масени спектар бензил-24-метилпентакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 11. Масени спектар бензил-хексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 12. Масени спектар бензил-25-метилхексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 13. Масени спектар бензил-24-метилхексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 14. Масени спектар бензил-26-метилхептакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 15. Масени спектар бензил-октакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 16. Масени спектар бензил-28-метилнонакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 17. Масени спектар бензил-триаконтаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 18. Масени спектар 2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 19. Масени спектар 24-метил-2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 20. Масени спектар 23-метил-2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 21. Масени спектар 2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 22. Масени спектар 26-метил-2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 23. Масени спектар 25-метил-2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*

Прилог 24. Масени спектар *syn*-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

Прилог 25. Масени спектар *syn*-13-метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

Прилог 26. Масени спектар *syn*-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

Прилог 27. Масени спектар *syn*-14-метил-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

Прилог 28. Масени спектар *syn*-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

Прилог 29. Масени спектар *syn*-17-метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*

- Прилог 30.** Масени спектар *syn*-16-метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 31.** Масени спектар 23-метил-1-фенил-1,3-тетракозадиона идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 32.** Масени спектар 1-фенил-1,3-хексакозадиона идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 33.** Масени спектар 24-метил-1-фенил-1,3-хексакозадиона идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 34.** Масени спектар 22-метил-3-трикозанола идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 35.** Масени спектар 24-метил-3-пентакозанола идентификованог у испирку *P. veris*
- Прилог 36.** Масени спектар триметилсилил-деривата синтетисаног 2-додеканола
- Прилог 37.** Масени спектар триметилсилил-деривата синтетисаног 3-додеканола
- Прилог 38.** Масени спектар триметилсилил-деривата синтетисаног 4-додеканола
- Прилог 39.** Масени спектар триметилсилил-деривата синтетисаног 5-додеканола
- Прилог 40.** Масени спектар триметилсилил-деривата синтетисаног 6-додеканола
- Прилог 41.** ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *syn*-1-фенил-1,3-алкадиола (**12a**, **13a-c**)
- Прилог 42.** ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *anti*-1-фенил-1,3-алкадиола (**12a**, **13a-c**)
- Прилог 43.** Алкани детектовани у траговима у испирку *P. acaulis* (P-2)
- Прилог 44.** ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци у CDCl_3 комерцијално доступних супстанци: 3-октанол, 2-метилхексанска киселина и 3-метилхексанска киселина
- Прилог 45.** GC-MS једначина калибрационе праве (са одговарајућим параметрима) за додекан, бензил-бехенат, 2-пентакозанон и метил-палмитат
- Прилог 46.** ^1H NMR спектар бензил-бехената у CDCl_3
- Прилог 47.** ^{13}C NMR спектар бензил-бехената у CDCl_3 .
- Прилог 48.** IR спектар бензил-бехената
- Прилог 49.** IR спектар комерцијалног 1-фенил-1,3-бутадиона
- Прилог 50.** IR спектар синтетисаног 7-метил-1-фенил-1,3-октадиил-диацетата

Прилог 51. UV-Vis спектар бензил-бехената

Прилог 52. UV-Vis спектар комерцијалног 1-фенил-1,3-бутадиона

Прилог 53. UV-Vis спектар (А) и увећање (В) синтетисаног 1-фенил-1,3-бутадиил-
диацетата

Прилог 1. Масена фрагментација (m/z) бензил-естара идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*

Једињење	m/z
Бензил-еикозаноат	402 $[M]^+$ (6), 311 $[M - PhCH_2]^+$ (9), 293 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (6), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (87), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (25), 57 $[C_4H_9]^+$ (42), 43 $[C_3H_7]^+$ (38)
Бензил-докозаноат	430 $[M]^+$ (5), 339 $[M - PhCH_2]^+$ (7), 321 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (5), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (90), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (28), 57 $[C_4H_9]^+$ (46), 43 $[C_3H_7]^+$ (40)
Бензил-трикозаноат	444 $[M]^+$ (3), 353 $[M - PhCH_2]^+$ (9), 335 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (8), 267 $[C_{19}H_{39}]^+$ (15), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (82), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (32), 57 $[C_4H_9]^+$ (45), 43 $[C_3H_7]^+$ (38)
Бензил-22-метилтрикозаноат	458 $[M]^+$ (2), 367 $[M - PhCH_2]^+$ (5), 349 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (6), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (85), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (28), 57 $[C_4H_9]^+$ (42), 43 $[C_3H_7]^+$ (37)
Бензил-тетракозаноат	458 $[M]^+$ (2), 367 $[M - PhCH_2]^+$ (8), 349 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (11), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (90), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (16), 57 $[C_4H_9]^+$ (25), 43 $[C_3H_7]^+$ (22)
Бензил-23-метилтетракозаноат	472 $[M]^+$ (3), 381 $[M - PhCH_2]^+$ (7), 363 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (10), 281 $[C_{20}H_{41}]^+$ (5), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (79), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (16), 57 $[C_4H_9]^+$ (18), 43 $[C_3H_7]^+$ (22)
Бензил-22-метилтетракозаноат	472 $[M]^+$ (2), 381 $[M - PhCH_2]^+$ (6), 363 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (11), 281 $[C_{20}H_{41}]^+$ (4), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (83), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (18), 57 $[C_4H_9]^+$ (21), 43 $[C_3H_7]^+$ (20)
Бензил-пентакозаноат	472 $[M]^+$ (3), 381 $[M - PhCH_2]^+$ (9), 363 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (13), 281 $[C_{20}H_{41}]^+$ (6), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (91), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (18), 57 $[C_4H_9]^+$ (29), 43 $[C_3H_7]^+$ (18)
Бензил-24-метилпентакозаноат	486 $[M]^+$ (3), 395 $[M - PhCH_2]^+$ (5), 377 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (11), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (87), 91 $[PhCH_2]^+$ (100), 71 $[C_5H_{11}]^+$ (13), 57 $[C_4H_9]^+$ (26), 43 $[C_3H_7]^+$ (22)
Бензил-23-метилпентакозаноат	486 $[M]^+$ (2), 395 $[M - PhCH_2]^+$ (4), 377 $[M - PhCH_2 - H_2O]^+$ (13), 108 $[PhCH_2OH]^+$ (88),

	91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (15), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (25), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (21)
Бензил-хексакозаноат	486 [M] ⁺ (2), 395 [M – PhCH ₂] ⁺ (6), 377 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (11), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (89), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (16), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (27), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (22)
Бензил-25-метилхексакозаноат	500 [M] ⁺ (1), 409 [M – PhCH ₂] ⁺ (7), 391 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (8), 281 [C ₂₀ H ₄₁] ⁺ (9), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (85), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (15), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (28), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (25)
Бензил-24-метилхексакозаноат	500 [M] ⁺ (1), 409 [M – PhCH ₂] ⁺ (6), 391 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (7), 281 [C ₂₀ H ₄₁] ⁺ (7), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (82), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (16), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (26), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (23)
Бензил-хептакозаноат	500 [M] ⁺ (2), 409 [M – PhCH ₂] ⁺ (9), 391 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (12), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (88), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (17), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (29), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (25)
Бензил-26-метилхептакозаноат	514 [M] ⁺ (1), 423 [M – PhCH ₂] ⁺ (11), 405 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (15), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (77), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (19), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (20), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (28)
Бензил-25-метилхептакозаноат	514 [M] ⁺ (1), 423 [M – PhCH ₂] ⁺ (12), 405 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (17), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (79), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (18), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (21), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (26)
Бензил-октакозаноат	514 [M] ⁺ (2), 423 [M – PhCH ₂] ⁺ (7), 405 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (16), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (87), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (20), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (32), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (23)
Бензил-27-метилоктакозаноат	528 [M] ⁺ (1), 437 [M – PhCH ₂] ⁺ (9), 419 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (12), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (81), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (23), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (34), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (25)
Бензил-26-метилоктакозаноат	528 [M] ⁺ (1), 437 [M – PhCH ₂] ⁺ (10), 419 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (13), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (84), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (24), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (31), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (27)
Бензил-нонакозаноат	528 [M] ⁺ (2), 437 [M – PhCH ₂] ⁺ (8), 419 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (11), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (85), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (25), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (35), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (24)

Бензил-28-метилнонакозаноат	542 [M] ⁺ (1), 451 [M – PhCH ₂] ⁺ (11), 433 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (14), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (87), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (27), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (38), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (25)
Бензил-27-метилнонакозаноат	542 [M] ⁺ (1), 451 [M – PhCH ₂] ⁺ (9), 433 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (13), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (84), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (25), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (35), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (22)
Бензил-триакоктаноат	542 [M] ⁺ (2), 451 [M – PhCH ₂] ⁺ (8), 433 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (16), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (88), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (24), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (32), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (16)
Бензил-29-метилтриакоктаноат	556 [M] ⁺ (1), 465 [M – PhCH ₂] ⁺ (8), 447 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (12), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (86), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (27), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (34), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (24)
Бензил-28-метилтриакоктаноат	556 [M] ⁺ (1), 465 [M – PhCH ₂] ⁺ (7), 447 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (10), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (83), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (24), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (33), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (22)
Бензил-хентриакоктаноат	556 [M] ⁺ (2), 465 [M – PhCH ₂] ⁺ (10), 447 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (15), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (88), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (27), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (36), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (25)
Бензил-30-метилхентриакоктаноат	570 [M] ⁺ (1), 479 [M – PhCH ₂] ⁺ (8), 461 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (14), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (83), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (26), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (35), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (22)
Бензил-дотриакоктаноат	570 [M] ⁺ (2), 479 [M – PhCH ₂] ⁺ (11), 461 [M – PhCH ₂ – H ₂ O] ⁺ (16), 108 [PhCH ₂ OH] ⁺ (87), 91 [PhCH ₂] ⁺ (100), 71 [C ₅ H ₁₁] ⁺ (27), 57 [C ₄ H ₉] ⁺ (38), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (26)

Прилог 2. Масена фрагментација (m/z) 2-алканона идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*

Једињење	m/z
14-Метил-2-пентадеканон	240 $[M]^+$ (4), 225 $[M - Me]^+$ (6), 222 $[M - H_2O]^+$ (5), 180 $[M - 60]^+$ (4), 59 $[M - C_{13}H_{27} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{13}H_{27} + H]^+$ (68), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (25)
15-Метил-2-хексадеканон	254 $[M]^+$ (5), 239 $[M - Me]^+$ (9), 236 $[M - H_2O]^+$ (7), 194 $[M - 60]^+$ (5), 59 $[M - C_{14}H_{29} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{14}H_{29} + H]^+$ (71), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (23)
21-Метил-2-докозанон	338 $[M]^+$ (6), 323 $[M - Me]^+$ (4), 320 $[M - H_2O]^+$ (4), 278 $[M - 60]^+$ (3), 59 $[M - C_{20}H_{41} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{20}H_{41} + H]^+$ (63), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (17)
2-Трикозанон	338 $[M]^+$ (8), 323 $[M - Me]^+$ (5), 320 $[M - H_2O]^+$ (3), 278 $[M - 60]^+$ (3), 59 $[M - C_{20}H_{41} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{20}H_{41} + H]^+$ (60), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (22)
22-Метил-2-трикозанон	352 $[M]^+$ (8), 337 $[M - Me]^+$ (4), 334 $[M - H_2O]^+$ (4), 292 $[M - 60]^+$ (4), 59 $[M - C_{21}H_{43} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{21}H_{43} + H]^+$ (72), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (50)
21-Метил-2-трикозанон	352 $[M]^+$ (10), 337 $[M - Me]^+$ (5), 334 $[M - H_2O]^+$ (8), 292 $[M - 60]^+$ (5), 59 $[M - C_{21}H_{43} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{21}H_{43} + H]^+$ (87), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (61)
2-Тетракозанон	352 $[M]^+$ (9), 337 $[M - Me]^+$ (5), 334 $[M - H_2O]^+$ (3), 292 $[M - 60]^+$ (3), 59 $[M - C_{21}H_{43} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{21}H_{43} + H]^+$ (80), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (60)
23-Метил-2-тетракозанон	366 $[M]^+$ (8), 351 $[M - Me]^+$ (4), 348 $[M - H_2O]^+$ (5), 306 $[M - 60]^+$ (4), 59 $[M - C_{22}H_{45} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{22}H_{45} + H]^+$ (72), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (57)
22-Метил-2-тетракозанон	366 $[M]^+$ (9), 351 $[M - Me]^+$ (3), 348 $[M - H_2O]^+$ (7), 306 $[M - 60]^+$ (5), 59 $[M - C_{22}H_{45} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{22}H_{45} + H]^+$ (87), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (68)
2-Пентакозанон	366 $[M]^+$ (11), 351 $[M - Me]^+$ (5), 348 $[M - H_2O]^+$ (4), 306 $[M - 60]^+$ (4), 59 $[M - C_{22}H_{45} + 2H]^+$ (100), 58 $[M - C_{22}H_{45} + H]^+$ (83), 43 $[CH_3C \equiv O]^+$ (63)

24-Метил-2-пентакозанон	380 [M] ⁺ (9), 365 [M – Me] ⁺ (4), 362 [M – H ₂ O] ⁺ (5), 320 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₃ H ₄₇ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₃ H ₄₇ + H] ⁺ (74), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (58)
23-Метил-2-пентакозанон	380 [M] ⁺ (11), 365 [M – Me] ⁺ (5), 362 [M – H ₂ O] ⁺ (9), 320 [M – 60] ⁺ (6), 59 [M – C ₂₃ H ₄₇ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₃ H ₄₇ + H] ⁺ (88), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (69)
2-Хексакозанон	380 [M] ⁺ (12), 365 [M – Me] ⁺ (5), 362 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 320 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₃ H ₄₇ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₃ H ₄₇ + H] ⁺ (80), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (70)
25-Метил-2-хексакозанон	394 [M] ⁺ (14), 379 [M – Me] ⁺ (6), 376 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 334 [M – 60] ⁺ (3), 59 [M – C ₂₄ H ₄₉ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₄ H ₄₉ + H] ⁺ (70), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (65)
24-Метил-2-хексакозанон	394 [M] ⁺ (7), 379 [M – Me] ⁺ (4), 376 [M – H ₂ O] ⁺ (8), 334 [M – 60] ⁺ (5), 59 [M – C ₂₄ H ₄₉ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₄ H ₄₉ + H] ⁺ (84), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (75)
2-Хептакозанон	394 [M] ⁺ (11), 379 [M – Me] ⁺ (5), 376 [M – H ₂ O] ⁺ (4), 334 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₄ H ₄₉ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₄ H ₄₉ + H] ⁺ (86), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (71)
26-Метил-2-хептакозанон	408 [M] ⁺ (11), 393 [M – Me] ⁺ (5), 390 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 348 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₅ H ₅₁ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₅ H ₅₁ + H] ⁺ (78), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (60)
25-Метил-2-хептакозанон	408 [M] ⁺ (13), 393 [M – Me] ⁺ (5), 390 [M – H ₂ O] ⁺ (10), 348 [M – 60] ⁺ (6), 59 [M – C ₂₅ H ₅₁ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₅ H ₅₁ + H] ⁺ (85), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (65)
2-Октакозанон	408 [M] ⁺ (7), 393 [M – Me] ⁺ (4), 390 [M – H ₂ O] ⁺ (7), 348 [M – 60] ⁺ (8), 59 [M – C ₂₅ H ₅₁ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₅ H ₅₁ + H] ⁺ (80), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (61)
27-Метил-2-октакозанон	422 [M] ⁺ (4), 407 [M – Me] ⁺ (6), 404 [M – H ₂ O] ⁺ (9), 362 [M – 60] ⁺ (7), 59 [M – C ₂₆ H ₅₃ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₆ H ₅₃ + H] ⁺ (65), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (48)
2-Нонакозанон	422 [M] ⁺ (14), 407 [M – Me] ⁺ (3), 404 [M – H ₂ O] ⁺ (5), 362 [M – 60] ⁺ (6), 59 [M – C ₂₆ H ₅₃ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₆ H ₅₃ + H] ⁺ (79), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (67)

28-Метил-2-нонакозанон	436 [M] ⁺ (6), 421 [M – Me] ⁺ (4), 418 [M – H ₂ O] ⁺ (4), 376 [M – 60] ⁺ (7), 59 [M – C ₂₇ H ₅₅ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₇ H ₅₅ + H] ⁺ (76), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (55)
27-Метил-2-нонакозанон	436 [M] ⁺ (5), 421 [M – Me] ⁺ (6), 418 [M – H ₂ O] ⁺ (4), 376 [M – 60] ⁺ (9), 59 [M – C ₂₇ H ₅₅ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₇ H ₅₅ + H] ⁺ (61), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (47)
2-Триакоктанон	436 [M] ⁺ (8), 421 [M – Me] ⁺ (11), 418 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 376 [M – 60] ⁺ (10), 59 [M – C ₂₇ H ₅₅ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₇ H ₅₅ + H] ⁺ (69), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (43)
2-Хентриакоктанон	450 [M] ⁺ (15), 435 [M – Me] ⁺ (6), 432 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 390 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₈ H ₅₇ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₈ H ₅₇ + H] ⁺ (87), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (55)
30-Метил-2-хентриакоктанон	464 [M] ⁺ (7), 435 [M – Me] ⁺ (5), 446 [M – H ₂ O] ⁺ (4), 404 [M – 60] ⁺ (4), 59 [M – C ₂₉ H ₅₇ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₉ H ₅₇ + H] ⁺ (85), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (68)
2-Дотриакоктанон	464 [M] ⁺ (11), 449 [M – Me] ⁺ (4), 446 [M – H ₂ O] ⁺ (9), 404 [M – 60] ⁺ (7), 59 [M – C ₂₉ H ₅₉ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₂₉ H ₅₉ + H] ⁺ (75), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (55)
31-Метил-2-дотриакоктанон	478 [M] ⁺ (8), 463 [M – Me] ⁺ (7), 460 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 418 [M – 60] ⁺ (5), 59 [M – C ₃₀ H ₆₁ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₃₀ H ₆₁ + H] ⁺ (81), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (77)
2-Тритриакоктанон	478 [M] ⁺ (18), 463 [M – Me] ⁺ (5), 460 [M – H ₂ O] ⁺ (7), 418 [M – 60] ⁺ (5), 59 [M – C ₃₀ H ₆₁ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₃₀ H ₆₁ + H] ⁺ (87), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (64)
2-Тетратриакоктанон	492 [M] ⁺ (15), 477 [M – Me] ⁺ (11), 474 [M – H ₂ O] ⁺ (9), 432 [M – 60] ⁺ (6), 59 [M – C ₃₁ H ₆₃ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₃₁ H ₆₃ + H] ⁺ (83), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (67)
2-Пентатриакоктанон	506 [M] ⁺ (13), 491 [M – Me] ⁺ (10), 488 [M – H ₂ O] ⁺ (8), 446 [M – 60] ⁺ (5), 59 [M – C ₃₂ H ₆₅ + 2H] ⁺ (100), 58 [M – C ₃₂ H ₆₅ + H] ⁺ (83), 43 [CH ₃ C≡O] ⁺ (67)

Прилог 3. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1,3-алкадиил-диацетата (*syn-1a*, *2a-c*, *3a-b*, *4a-c*, *5a-b*, *6a-c*, *7a-b*) идентификованих у проучаваним биљним врстама рода *Primula*, као и оних добијених синтезом (*syn-* и *anti-8a*, *9a-c*)

Једињење	m/z
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (1a)	330 $[M - CH_3COOH]^+$ (12), 288 $[M - CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (55), 176 $[M - CH_3COOH - C_{11}H_{22}]^+$ (87), 133 $[PhC_2O_2]^+$ (81), 120 $[PhC(OH)CH_2]^+$ (95), 107 $[PhCHOH]^+$ (43), 105 $[PhCO]^+$ (87), 91 (23), 43 $[CH_3CO]^+$ (100)
<i>syn</i> -13-Метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (2b)	361 $[M - CH(CH_3)_2]^+$ (3), 344 $[M - CH_3COOH]^+$ (11), 302 $[M - CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (49), 176 $[M - CH_3COOH - C_{12}H_{24}]^+$ (78), 133 $[PhC_2O_2]^+$ (67), 120 $[PhC(OH)CH_2]^+$ (77), 107 $[PhCHOH]^+$ (45), 105 $[PhCO]^+$ (69), 91 (20), 43 $[CH_3CO]^+$ (100)
<i>syn</i> -12-Метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетат (2c)	302 $[M - CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (55), 176 $[M - CH_3COOH - C_{12}H_{24}]^+$ (89), 133 $[PhC_2O_2]^+$ (74), 120 $[PhC(OH)CH_2]^+$ (71), 107 $[PhCHOH]^+$ (48), 105 $[PhCO]^+$ (82), 91 (19), 43 $[CH_3CO]^+$ (100)
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-пентадекадиил-диацетат (2a)	344 $[M - CH_3COOH]^+$ (10), 302 $[M - CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (53), 176 $[M - CH_3COOH - C_{11}H_{22}]^+$ (82), 133 $[PhC_2O_2]^+$ (78), 120 $[PhC(OH)CH_2]^+$ (91), 107 $[PhCHOH]^+$ (45), 105 $[PhCO]^+$ (85), 91 (25), 43 $[CH_3CO]^+$ (100)
<i>syn</i> -14-Метил-1-фенил-1,3-пентадекадиил-диацетат (3b)	358 $[M - CH_3COOH]^+$ (15), 316 $[M - CH_3COOH - CH_2CO]^+$ (67), 176 $[M - CH_3COOH - C_{13}H_{26}]^+$ (91), 133 $[PhC_2O_2]^+$ (85), 120 $[PhC(OH)CH_2]^+$ (92), 107 $[PhCHOH]^+$ (55), 105

	[PhCO] ⁺ (82), 91 (25), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-хексадекадиил- диацетат (3a)	358 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (13), 316 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (65), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₃ H ₂₆] ⁺ (93), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (81), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (96), 107 [PhCHOH] ⁺ (50), 105 [PhCO] ⁺ (86), 91 (21), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -15-Метил-1-фенил-1,3- хексадекадиил-диацетат (4b)	432 [M] ⁺ (2), 372 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (14), 330 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (64), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₄ H ₂₈] ⁺ (87), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (75), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (86), 107 [PhCHOH] ⁺ (47), 105 [PhCO] ⁺ (76), 91 (20), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -14-Метил-1-фенил-1,3- хексадекадиил-диацетат (4c)	372 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (13), 330 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (55), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₄ H ₂₈] ⁺ (84), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (77), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (90), 107 [PhCHOH] ⁺ (46), 105 [PhCO] ⁺ (80), 91 (18), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-хептадекадиил- диацетат (4a)	372 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (12), 330 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (65), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₄ H ₂₈] ⁺ (88), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (72), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (83), 107 [PhCHOH] ⁺ (44), 105 [PhCO] ⁺ (78), 91 (23), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -16-Метил-1-фенил-1,3- хептадекадиил-диацетат (5b)	386 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (15), 344 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (64), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₅ H ₃₀] ⁺ (85), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (74), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (89), 107 [PhCHOH] ⁺ (44), 105 [PhCO] ⁺ (76), 91 (21), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)

<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-октадекадиил- диацетат (5a)	386 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (12), 344 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (63), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₅ H ₃₀] ⁺ (83), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (73), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (87), 107 [PhCHOH] ⁺ (42), 105 [PhCO] ⁺ (77), 91 (19), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -17-Метил-1-фенил-1,3- октадекадиил-диацетат (6b)	400 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (11), 358 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (51), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₆ H ₃₂] ⁺ (95), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (72), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (86), 107 [PhCHOH] ⁺ (49), 105 [PhCO] ⁺ (75), 91 (21), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -16-Метил-1-фенил-1,3- октадекадиил-диацетат (6c)	400 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (9), 358 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (57), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₆ H ₃₂] ⁺ (99), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (53), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (27), 107 [PhCHOH] ⁺ (50), 105 [PhCO] ⁺ (58), 91 (20), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-нонадекадиил- диацетат (6a)	400 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (13), 358 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (53), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₆ H ₃₂] ⁺ (92), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (70), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (88), 107 [PhCHOH] ⁺ (51), 105 [PhCO] ⁺ (74), 91 (20), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -18-Метил-1-фенил-1,3- нонадекадиил-диацетат (7b)	414 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (11), 372 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (50), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₆ H ₃₂] ⁺ (95), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (73), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (83), 107 [PhCHOH] ⁺ (53), 105 [PhCO] ⁺ (76), 91 (20), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
<i>syn</i> -1-Фенил-1,3-еикозадиил- диацетат (7a)	414 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (12), 372 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (52), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₁₆ H ₃₂] ⁺ (90), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (71), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (86), 107 [PhCHOH] ⁺ (52), 105

	[PhCO] ⁺ (73), 91 (20), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
1-Фенил-1,3-бутадиил-диацетати (<i>syn</i> - и <i>anti</i> -8a)	190 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (32), 148 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (82), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (34), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (10), 107 [PhCHOH] ⁺ (52), 105 [PhCO] ⁺ (81), 91 (13), 77 [Ph] ⁺ (25), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
1-Фенил-1,3-нонадиил-диацетати (<i>syn</i> - и <i>anti</i> -9a)	260 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (7), 218 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (31), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₆ H ₁₃] ⁺ , 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (53), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (52), 107 [PhCHOH] ⁺ (50), 105 [PhCO] ⁺ (55), 91 (15), 77 [Ph] ⁺ (11), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
7-Метил-1-фенил-1,3-октадиил- диацетати (<i>syn</i> - и <i>anti</i> -9b)	277 [M – CH(CH ₃) ₂] ⁺ (6), 260 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (7), 218 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (31), 176 [M – CH ₃ COOH – C ₆ H ₁₂] ⁺ (42), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (38), 120 [PhC(OH)CH ₂] ⁺ (44), 107 [PhCHOH] ⁺ (51), 105 [PhCO] ⁺ (54), 91 (16), 77 [Ph] ⁺ (10), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)
7-Метил-1-фенил-1,3-октадиил- диацетати (<i>syn</i> - и <i>anti</i> -9c)	260 [M – CH ₃ COOH] ⁺ (12), 218 [M – CH ₃ COOH – CH ₂ CO] ⁺ (30), 176 [M – CH ₃ COO – C ₆ H ₁₃] ⁺ (51), 133 [PhC ₂ O ₂] ⁺ (46), 120 [PhCOCH ₃] ⁺ (52), 107 [PhCHOH] ⁺ (48), 105 [PhCO] ⁺ (70), 91 (18), 77 [Ph] ⁺ (15), 43 [CH ₃ CO] ⁺ (100)

Прилог 4. Масена фрагментација (m/z) синтетисаних *syn*- и *anti*-1-фенил-1,3-алкадиола (**12a**, **13a-c**)

Једињење	m/z
1-Фенил-1,3-бутадиол (<i>syn</i> - и <i>anti</i> - 12a)	166 $[M]^+$ (5), 148 $[M - H_2O]^+$ (31), 107 $[PhCH_2OH]^+$ (100), 77 $[Ph]^+$ (72)
1-Фенил-1,3-нонадиол (<i>syn</i> - и <i>anti</i> - 13a)	236 $[M]^+$ (1), 218 $[M - H_2O]^+$ (6), 133 $[PhCHOHCHCH]^+$ (27), 120 $[PhCH(OH)CH]^+$ (14), 107 $[PhCH_2OH]^+$ (100), 77 $[Ph]^+$ (28)
7-Метил-1-фенил-1,3-октадиол (<i>syn</i> - и <i>anti</i> - 13b)	236 $[M]^+$ (2), 218 $[M - H_2O]^+$ (4), 133 $[PhCHOHCHCH]^+$ (27), 120 $[PhCH(OH)CH]^+$ (14), 107 $[PhCH_2OH]^+$ (100), 77 $[Ph]^+$ (28)
6-Метил-1-фенил-1,3-октадиол (<i>syn</i> - и <i>anti</i> - 13c)	236 $[M]^+$ (2), 218 $[M - H_2O]^+$ (5), 133 $[PhCHOHCHCH]^+$ (23), 120 $[PhCH(OH)CH]^+$ (8), 107 $[PhCH_2OH]^+$ (100), 77 $[Ph]^+$ (22)

Прилог 5. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1-алкен-3-она који су настали из 3-оксо-1-фенилалкил-ацетата под условима гасне хроматографије

Једињење	m/z
(<i>E</i>)-1-Фенил-1-тетрадецен-3-он	146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (96), 103 [PhCHCH] ⁺ (33), 77 [Ph] ⁺ (14), 43 (3)
(<i>E</i>)-13-Метил-1-фенил-1-тетрадецен-3-он	300 [M] ⁺ (3), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (97), 103 [PhCHCH] ⁺ (31), 77 [Ph] ⁺ (13), 43 (8)
(<i>E</i>)-1-Фенил-1-хексадецен-3-он	314 [M] ⁺ (3), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (90), 103 [PhCHCH] ⁺ (28), 77 [Ph] ⁺ (7), 43 (11)
(<i>E</i>)-15-Метил-1-фенил-1-хексадецен-3-он	328 [M] ⁺ (3), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (83), 103 [PhCHCH] ⁺ (25), 77 [Ph] ⁺ (10), 43 (17)
(<i>E</i>)-14-Метил-1-фенил-1-хексадецен-3-он	328 [M] ⁺ (1), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (79), 103 [PhCHCH] ⁺ (28), 77 [Ph] ⁺ (4), 43 (18)
(<i>E</i>)-1-Фенил-1-октадецен-3-он	342 [M] ⁺ (2), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (78), 103 [PhCHCH] ⁺ (24), 77 [Ph] ⁺ (9), 43 (13)
(<i>E</i>)-17-Метил-1-фенил-1-октадецен-3-он	356 [M] ⁺ (1), 146 [PhCHCHCOCH ₃] ⁺ (100), 131 [PhCHCHCO] ⁺ (75), 103 [PhCHCH] ⁺ (22), 77 [Ph] ⁺ (7), 43 (3)

Прилог 6. Масена фрагментација (m/z) 1-фенил-1,3-алкадиона (**22а**, **23b-с**, **24а**, **25b-с**, **26а** и **27b**) идентификованих у испирку *P. veris*, као и оних добијених синтезом (**29а-с**)

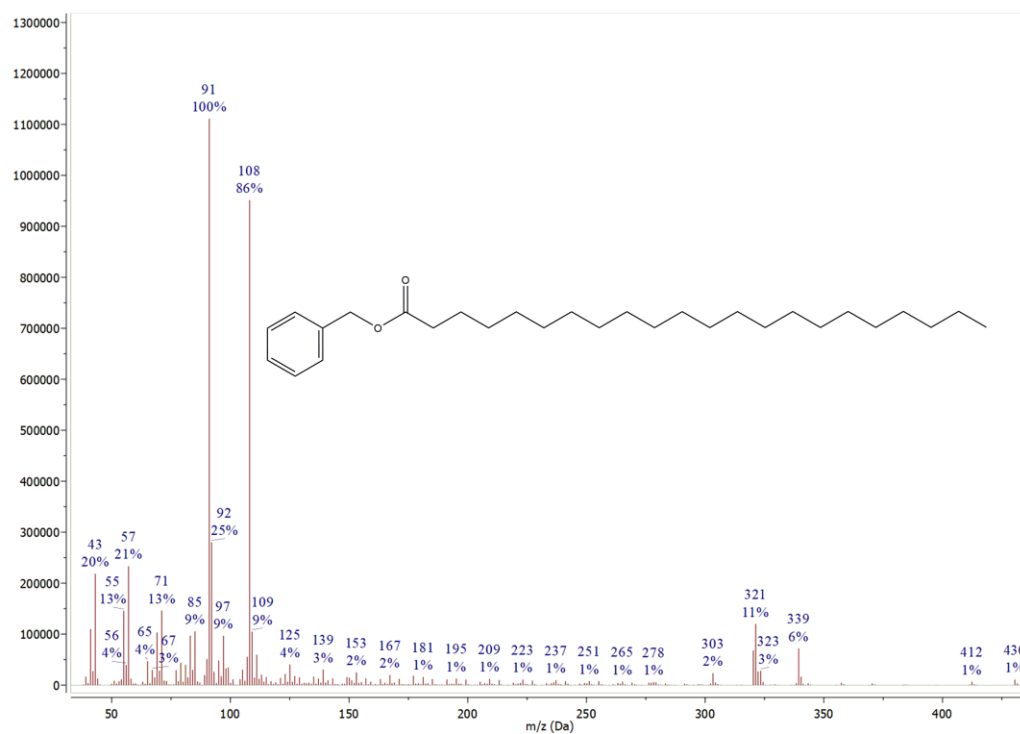
Једињење	m/z
1-Фенил-1,3-тетракозадион (22а)	162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (31), 105 [PhCO] ⁺ (77), 77 [Ph] ⁺ (15)
23-Метил-1-фенил-1,3-тетракозадион (23b)	456 [M] ⁺ (1), 438 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (25), 105 [PhCO] ⁺ (82), 77 [Ph] ⁺ (8)
22-Метил-1-фенил-1,3-тетракозадион (23с)	162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (20), 105 [PhCO] ⁺ (80), 77 [Ph] ⁺ (6)
1-Фенил-1,3-хексакозадион (24а)	452 [M – H ₂ O] ⁺ (5), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (30), 105 [PhCO] ⁺ (79), 77 [Ph] ⁺ (7)
25-Метил-1-фенил-1,3-хексакозадион (25b)	484 [M] ⁺ (1), 466 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (26), 105 [PhCO] ⁺ (75), 77 [Ph] ⁺ (7)
24-Метил-1-фенил-1,3-хексакозадион (25с)	466 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (35), 105 [PhCO] ⁺ (97), 77 [Ph] ⁺ (16)
1-Фенил-1,3-октакозадион (26а)	162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (29), 105 [PhCO] ⁺ (75), 77 [Ph] ⁺ (12)
27-Метил-1-фенил-1,3-октакозадион (27b)	162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (100), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (32), 105 [PhCO] ⁺ (62), 77 [Ph] ⁺ (9)
1-Фенил-1,3-нонадион (29а)	232 [M] ⁺ (6), 214 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 175 [PhCOCH ₂ CO(CH ₂) ₂] ⁺ (10), 162

	[PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (64), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (75), 105 [PhCO] ⁺ (100), 77 [Ph] ⁺ (35)
7-Метил-1-фенил-1,3-октадион (29b)	232 [M] ⁺ (7), 214 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 175 [PhCOCH ₂ CO(CH ₂) ₂] ⁺ (9), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (59), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (68), 105 [PhCO] ⁺ (100), 77 [Ph] ⁺ (31)
6-Метил-1-фенил-1,3-октадион (29c)	232 [M] ⁺ (3), 214 [M – H ₂ O] ⁺ (2), 175 [PhCOCH ₂ CO(CH ₂) ₂] ⁺ (7), 162 [PhC(OH)CHC(OH)CH ₂] ⁺ (64), 147 [PhCOCHC(OH)] ⁺ (62), 105 [PhCO] ⁺ (100), 77 [Ph] ⁺ (27)

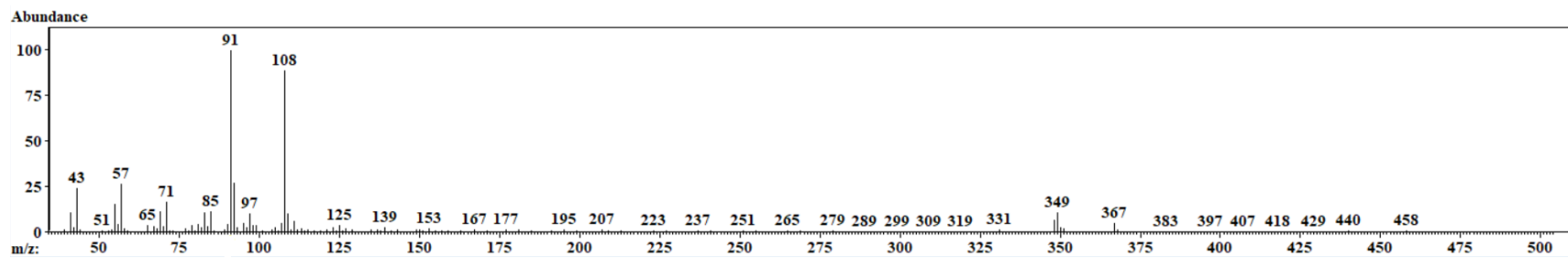
Прилог 7. Масена фрагментација (m/z) 3-алканола (**50b**, **51a**, **52b-c**, **53a**, **54b-c**, **55a** и **56b-c**) идентификованих у испирку *P. veris*

Једињење	m/z
20-Метил-3-хенеикозанол (50b)	111 $[C_8H_{15}]^+$ (28), 97 $[C_7H_{13}]^+$ (46), 83 $[C_6H_{11}]^+$ (40), 69 $[C_5H_9]^+$ (43), 59 $[CH_3CH_2CHOH]^+$ (100), 43 $[(CH_3)_2CH]^+$ (42)
3-Трикозанол (51a)	340 $[M]^+$ (1), 322 $[M - H_2O]^+$ (3), 311 $[M - CH_3CH_2]^+$ (29), 125 $[C_9H_{17}]^+$ (15), 111 $[C_8H_{15}]^+$ (30), 97 $[C_7H_{13}]^+$ (49), 83 $[C_6H_{11}]^+$ (41), 69 $[C_5H_9]^+$ (35), 59 $[CH_3CH_2CHOH]^+$ (100), 43 $[CH_3(CH_2)_2]^+$ (37)
22-Метил-3-трикозанол (52b)	354 $[M]^+$ (1), 336 $[M - H_2O]^+$ (6), 325 $[M - CH_3CH_2]^+$ (35), 125 $[C_9H_{17}]^+$ (15), 111 $[C_8H_{15}]^+$ (30), 97 $[C_7H_{13}]^+$ (46), 83 $[C_6H_{11}]^+$ (39), 69 $[C_5H_9]^+$ (36), 59 $[CH_3CH_2CHOH]^+$ (100), 43 $[(CH_3)_2CH]^+$ (42)
21-Метил-3-трикозанол (52c)	325 $[M - CH_3CH_2]^+$ (29), 125 $[C_9H_{17}]^+$ (16), 111 $[C_8H_{15}]^+$ (35), 97 $[C_7H_{13}]^+$ (75), 83 $[C_6H_{11}]^+$ (61), 69 $[C_5H_9]^+$ (47), 59 $[CH_3CH_2CHOH]^+$ (100), 57 $[CH_3CH_2CHCH_3]^+$ (93)
3-Пентакозанол (53a)	368 $[M]^+$ (1), 350 $[M - H_2O]^+$ (3), 339 $[M - CH_3CH_2]^+$ (28), 125 $[C_9H_{17}]^+$ (17), 111 $[C_8H_{15}]^+$ (34), 97 $[C_7H_{13}]^+$ (58), 83 $[C_6H_{11}]^+$ (47), 69 $[C_5H_9]^+$ (41), 59 $[CH_3CH_2CHOH]^+$ (100), 43 $[CH_3(CH_2)_2]^+$ (45)

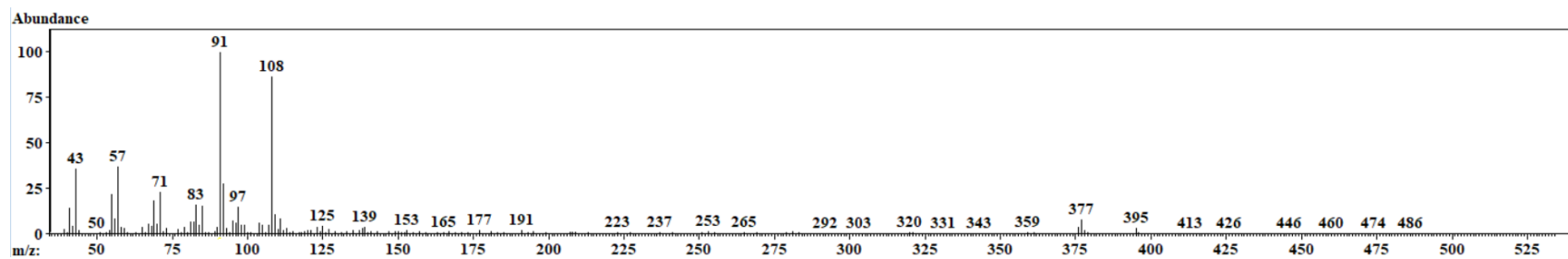
24-Метил-3-пентакозанол (54b)	382 [M] ⁺ (1), 364 [M – H ₂ O] ⁺ (6), 353 [M – CH ₃ CH ₂] ⁺ (27), 125 [C ₉ H ₁₇] ⁺ (14), 111 [C ₈ H ₁₅] ⁺ (30), 97 [C ₇ H ₁₃] ⁺ (48), 83 [C ₆ H ₁₁] ⁺ (41), 69 [C ₅ H ₉] ⁺ (38), 59 [CH ₃ CH ₂ CHOH] ⁺ (100), 43 [(CH ₃) ₂ CH] ⁺ (40)
23-Метил-3-пентакозанол (54c)	353 [M – CH ₃ CH ₂] ⁺ (27), 125 [C ₉ H ₁₇] ⁺ (12), 111 [C ₈ H ₁₅] ⁺ (29), 97 [C ₇ H ₁₃] ⁺ (60), 83 [C ₆ H ₁₁] ⁺ (57), 69 [C ₅ H ₉] ⁺ (45), 59 [CH ₃ CH ₂ CHOH] ⁺ (100), 57 [CH ₃ CH ₂ CHCH ₃] ⁺ (90)
3-Хептакозанол (55a)	396 [M] ⁺ (1), 378 [M – H ₂ O] ⁺ (4), 367 [M – CH ₃ CH ₂] ⁺ (21), 125 [C ₉ H ₁₇] ⁺ (22), 111 [C ₈ H ₁₅] ⁺ (42), 97 [C ₇ H ₁₃] ⁺ (74), 83 [C ₆ H ₁₁] ⁺ (62), 69 [C ₅ H ₉] ⁺ (52), 59 [CH ₃ CH ₂ CHOH] ⁺ (100), 43 [CH ₃ (CH ₂) ₂] ⁺ (59)
26-Метил-3-хептакозанол (56b)	392 [M – H ₂ O] ⁺ (8), 381 [M – CH ₃ CH ₂] ⁺ (20), 125 [C ₉ H ₁₇] ⁺ (18), 111 [C ₈ H ₁₅] ⁺ (38), 97 [C ₇ H ₁₃] ⁺ (64), 83 [C ₆ H ₁₁] ⁺ (57), 69 [C ₅ H ₉] ⁺ (38), 59 [CH ₃ CH ₂ CHOH] ⁺ (100), 43 [(CH ₃) ₂ CH] ⁺ (58)
25-Метил-3-хептакозанол (56c)	381 [M – CH ₃ CH ₂] ⁺ (20), 125 [C ₉ H ₁₇] ⁺ (22), 111 [C ₈ H ₁₅] ⁺ (47), 97 [C ₇ H ₁₃] ⁺ (75), 83 [C ₆ H ₁₁] ⁺ (69), 69 [C ₅ H ₉] ⁺ (11), 59 [CH ₃ CH ₂ CHOH] ⁺ (100), 57 [CH ₃ CH ₂ CHCH ₃] ⁺ (94)



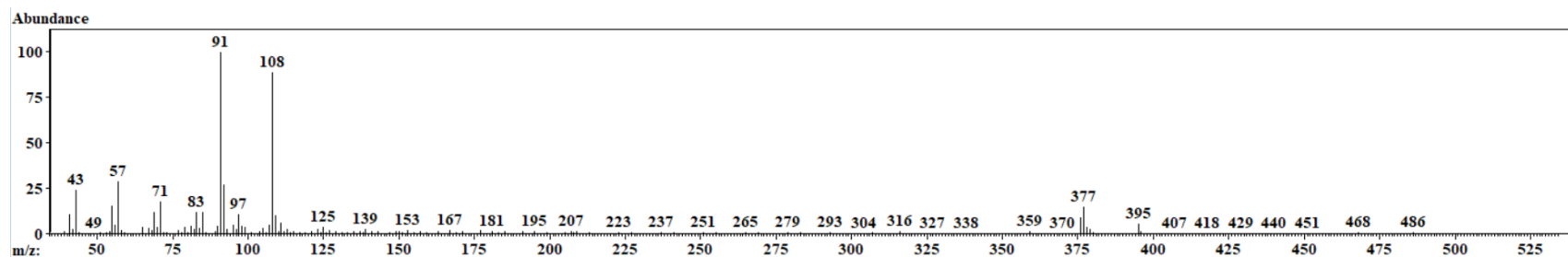
Прилог 8. Масени спектар бензил-бехената



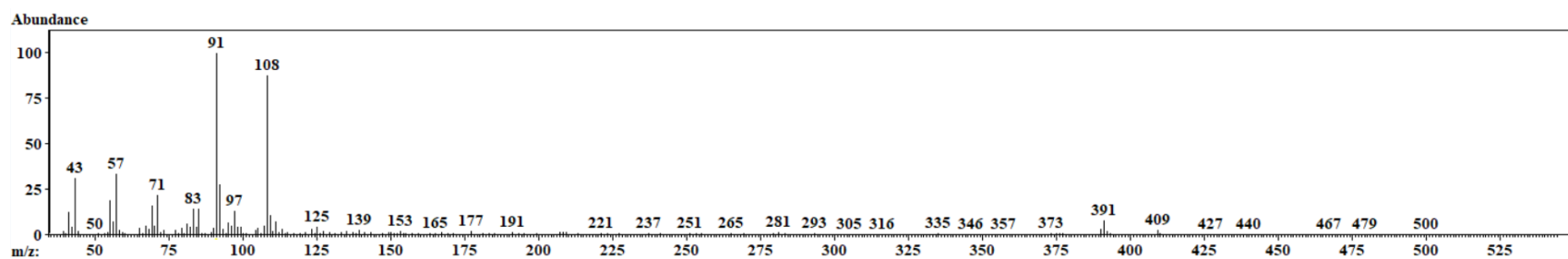
Прилог 9. Масени спектар бензил-тетракозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



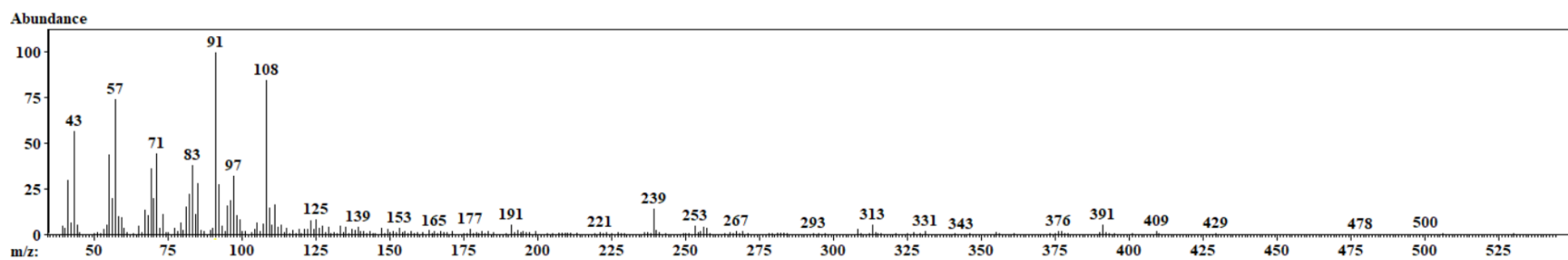
Прилог 10. Масени спектар бензил-24-метилпентакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



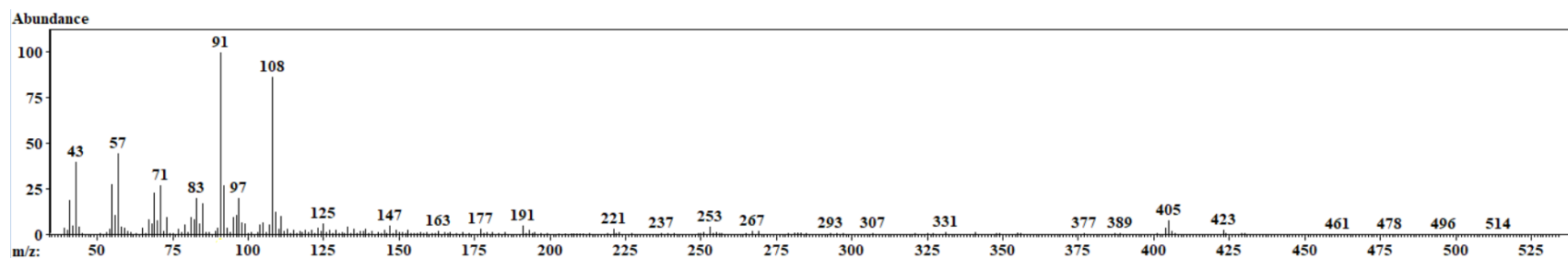
Прилог 11. Масени спектар бензил-хексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



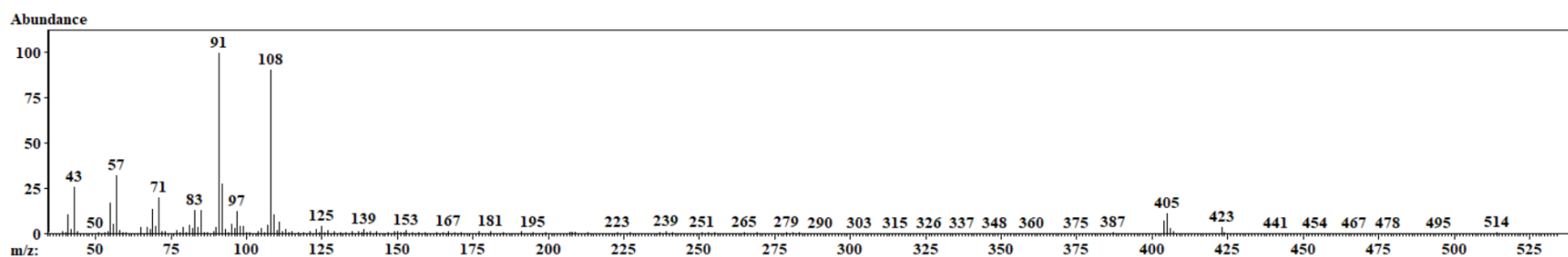
Прилог 12. Масени спектар бензил-25-метилхексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



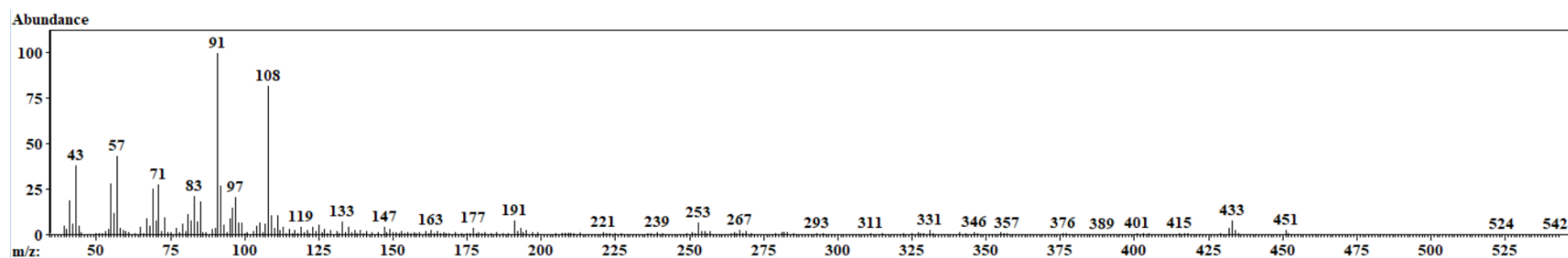
Прилог 13. Масени спектар бензил-24-метилхексакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



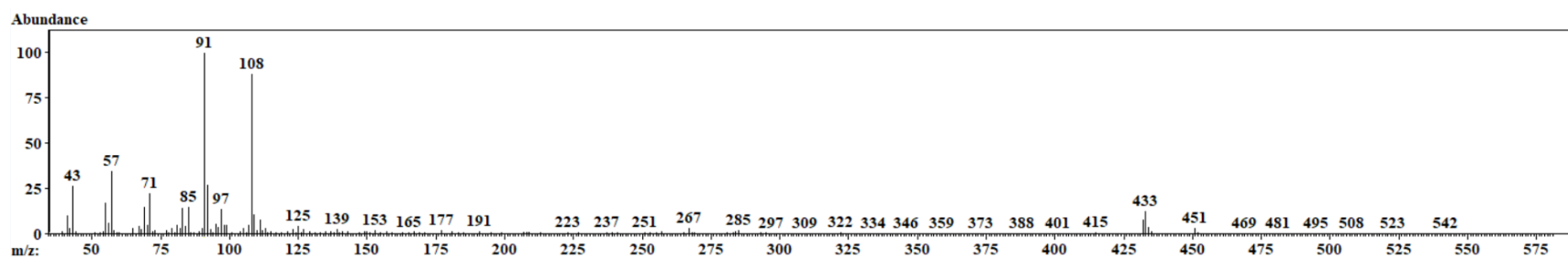
Прилог 14. Масени спектар бензил-26-метилхептакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



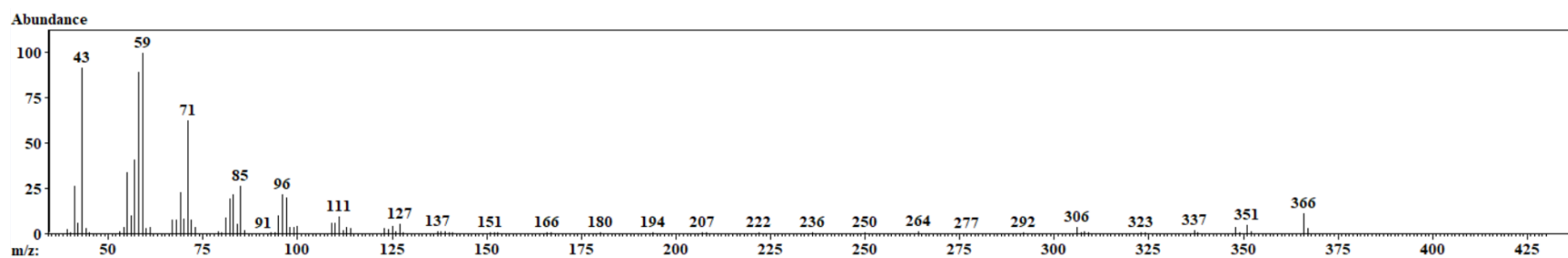
Прилог 15. Масени спектар бензил-октакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



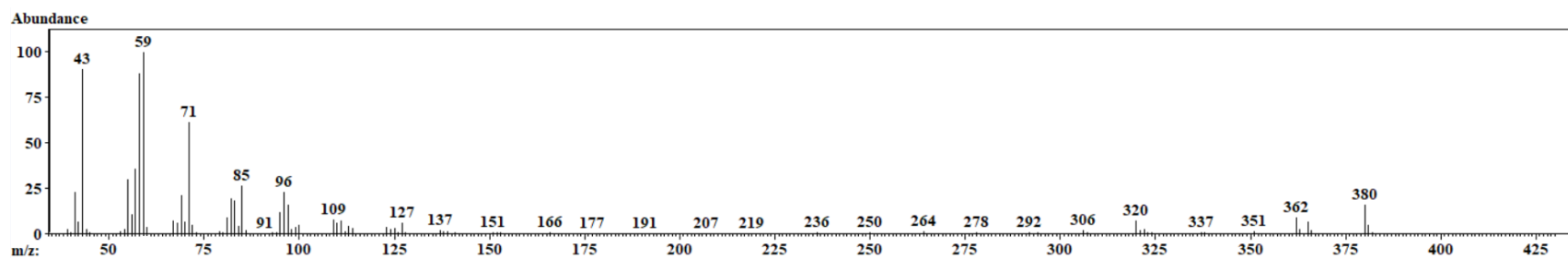
Прилог 16. Масени спектар бензил-28-метилнонакозаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



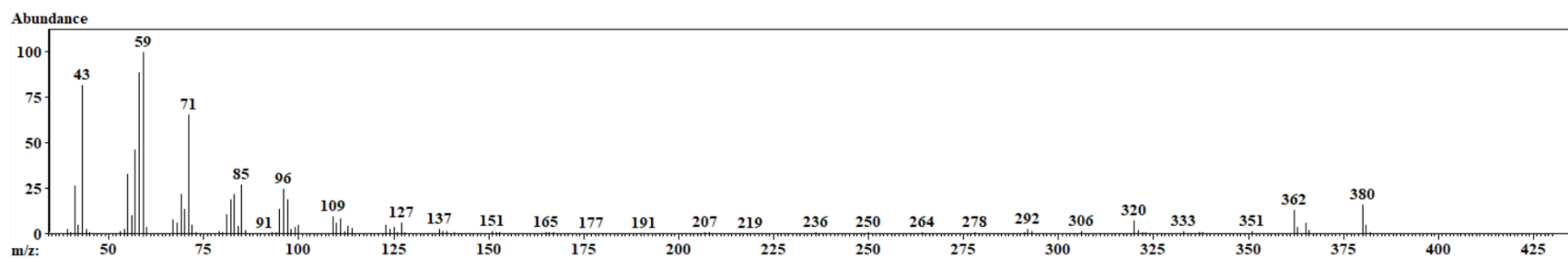
Прилог 17. Масени спектар бензил-триаконтаноата идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



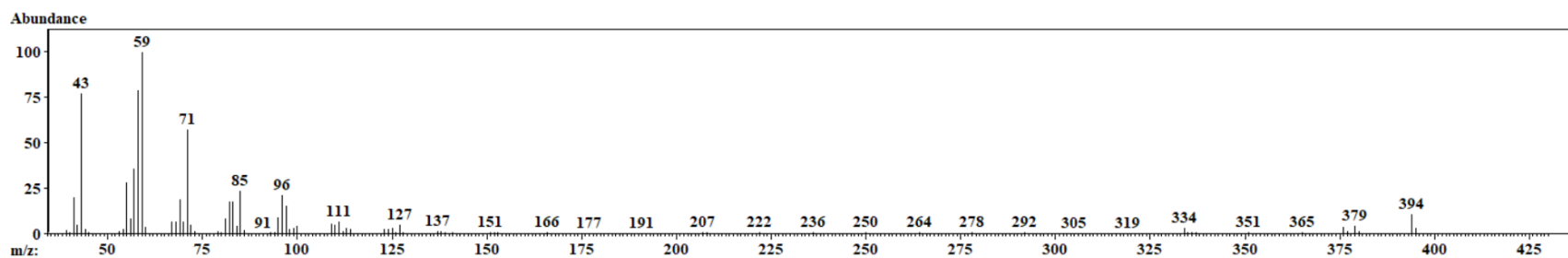
Прилог 18. Масени спектар 2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



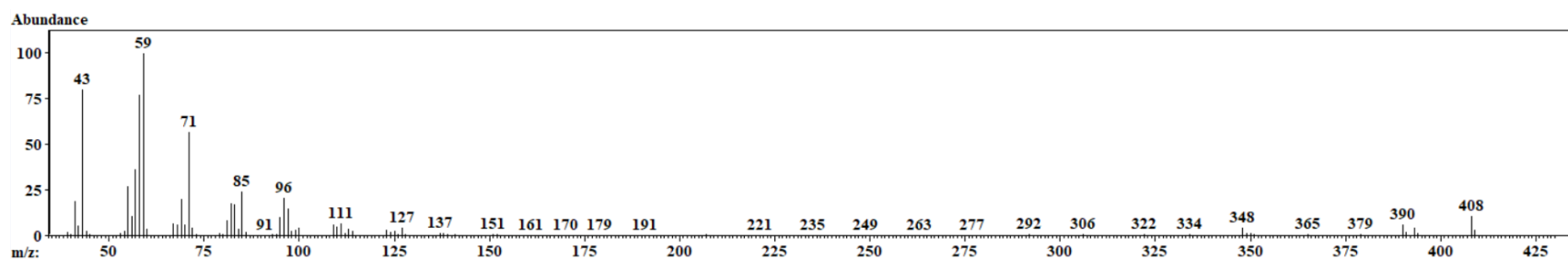
Прилог 19. Масени спектар 24-метил-2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



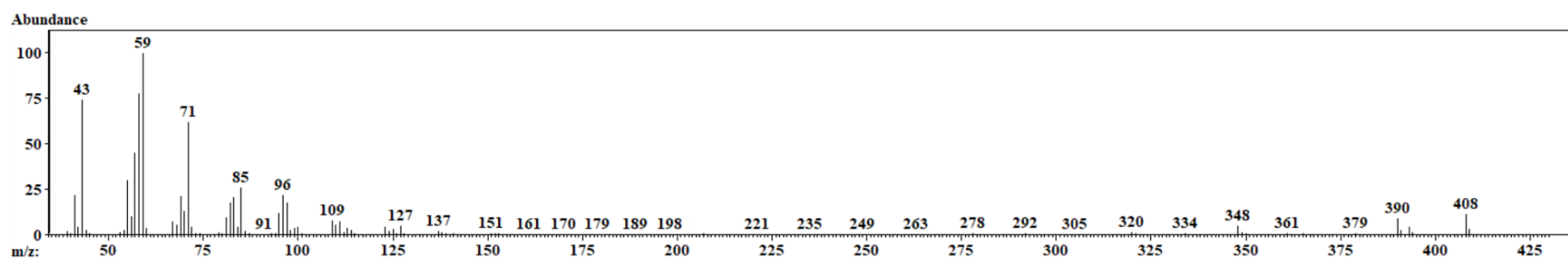
Прилог 20. Масени спектар 23-метил-2-пентакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



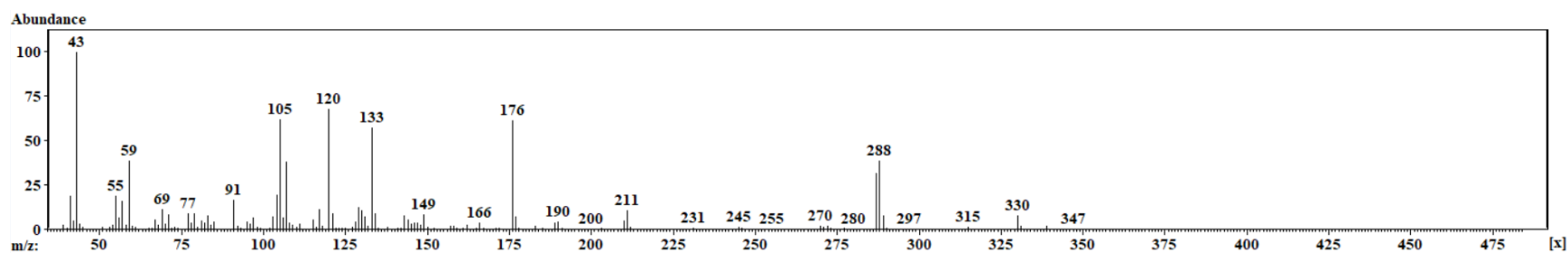
Прилог 21. Масени спектар 2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



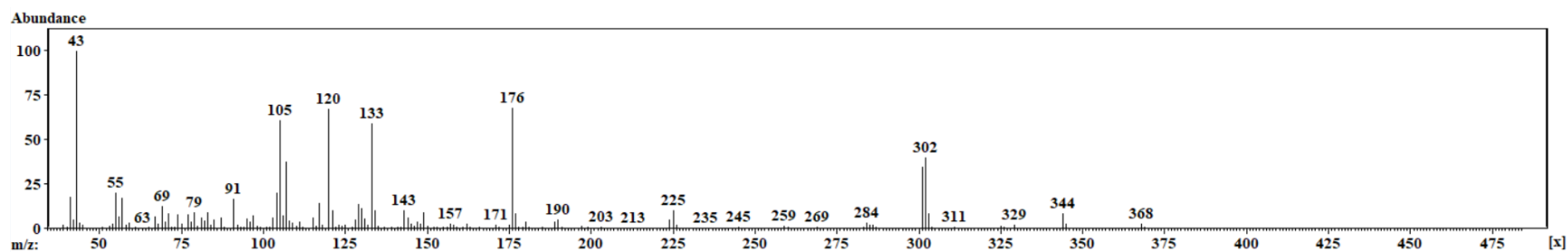
Прилог 22. Масени спектар 26-метил-2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



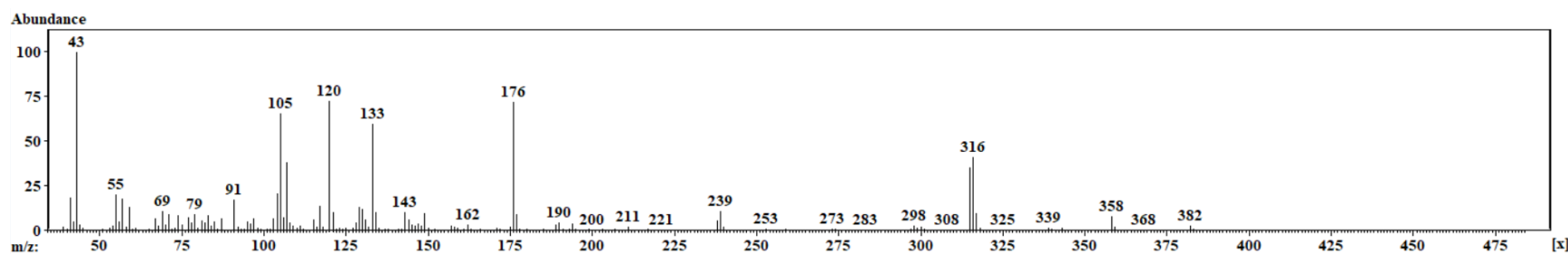
Прилог 23. Масени спектар 25-метил-2-хептакозанона идентификованог у испирцима *P. veris* и *P. acaulis*



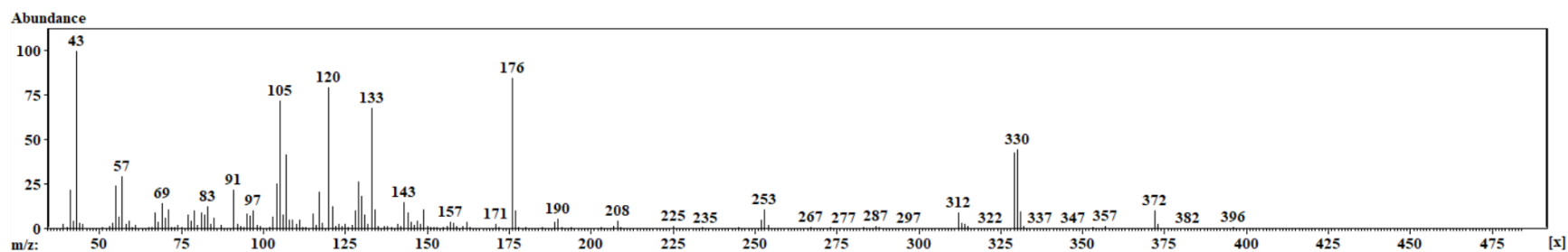
Прилог 24. Масени спектар *syn*-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



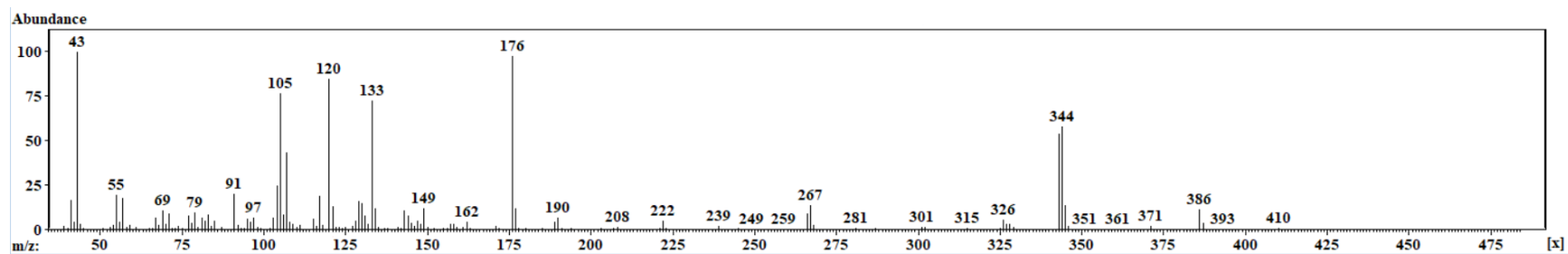
Прилог 25. Масени спектар *zup-13*-метил-1-фенил-1,3-тетрадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



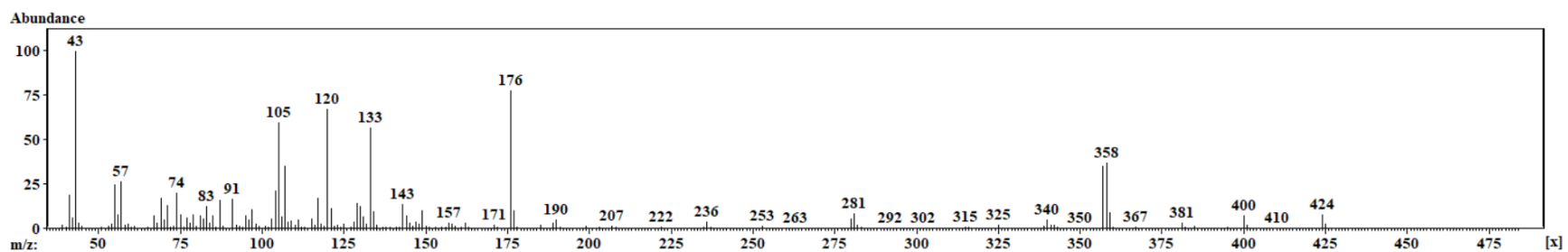
Прилог 26. Масени спектар *zup-1*-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



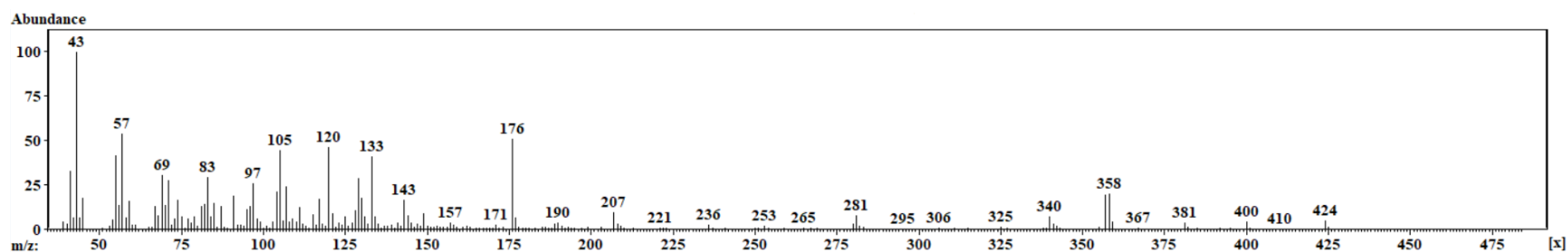
Прилог 27. Масени спектар *zup-14*-метил-1-фенил-1,3-хексадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



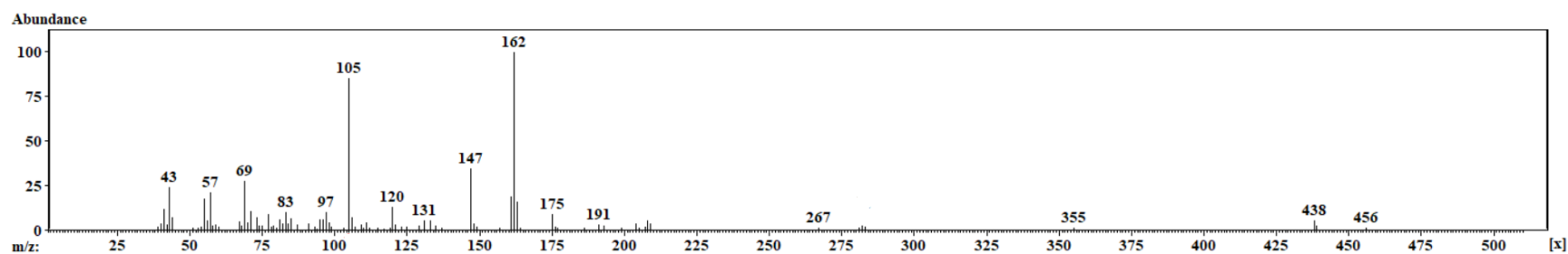
Прилог 28. Масени спектар *zup*-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



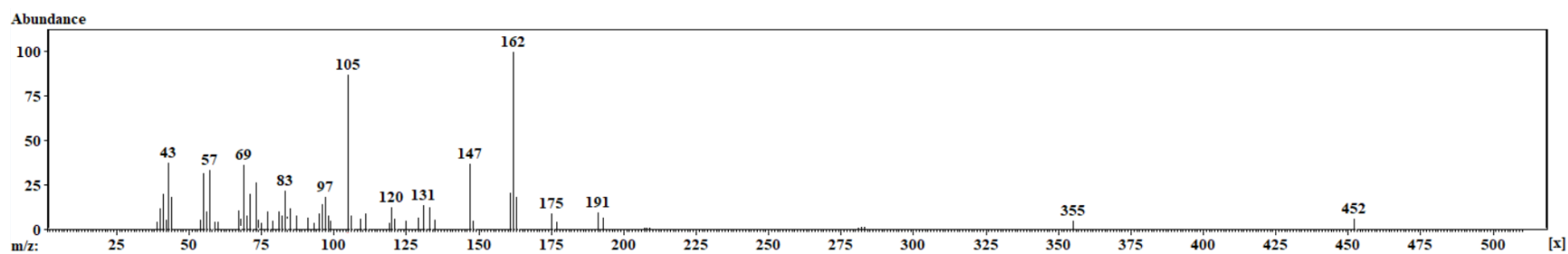
Прилог 29. Масени спектар *zup*-17-метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



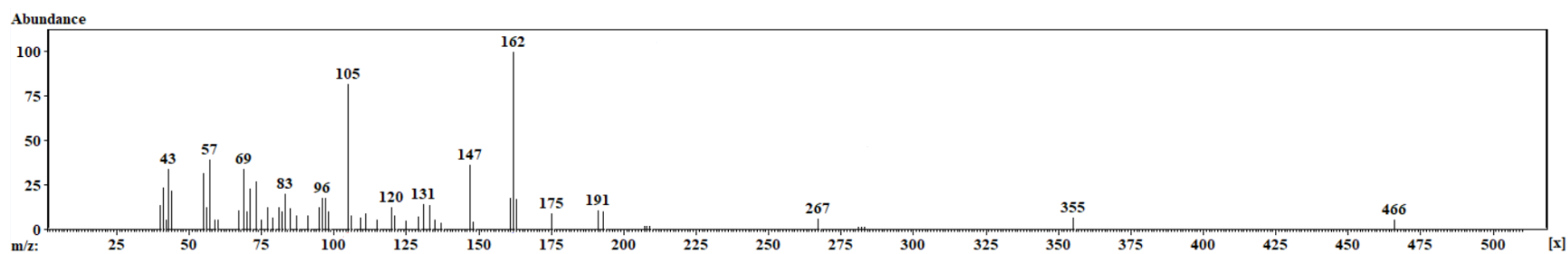
Прилог 30. Масени спектар *zup*-16-метил-1-фенил-1,3-октадекадиил-диацетата идентификованог у испирку *P. veris*



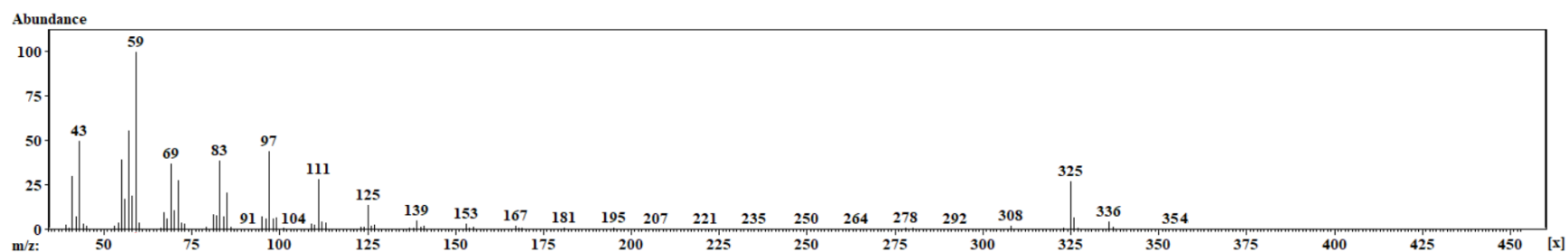
Прилог 31. Масени спектар 23-метил-1-фенил-1,3-тетракозадиона идентификованог у испирку *P. veris*



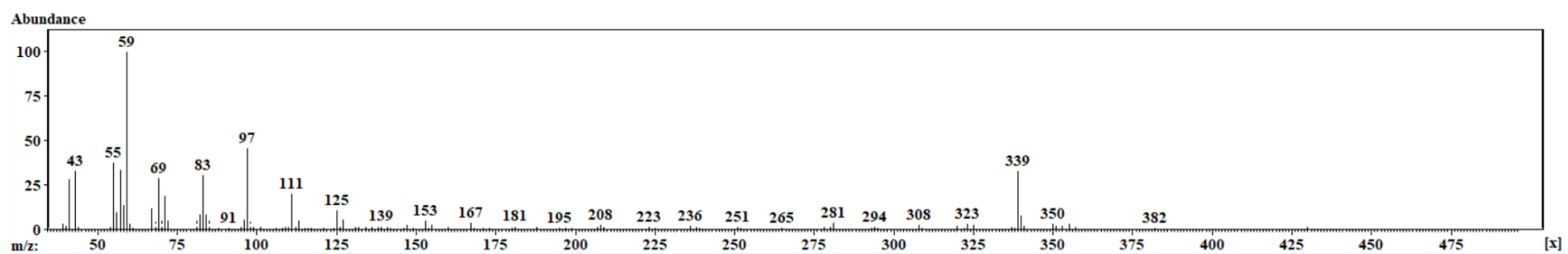
Прилог 32. Масени спектар 1-фенил-1,3-хексакозадиона идентификованог у испирку *P. veris*



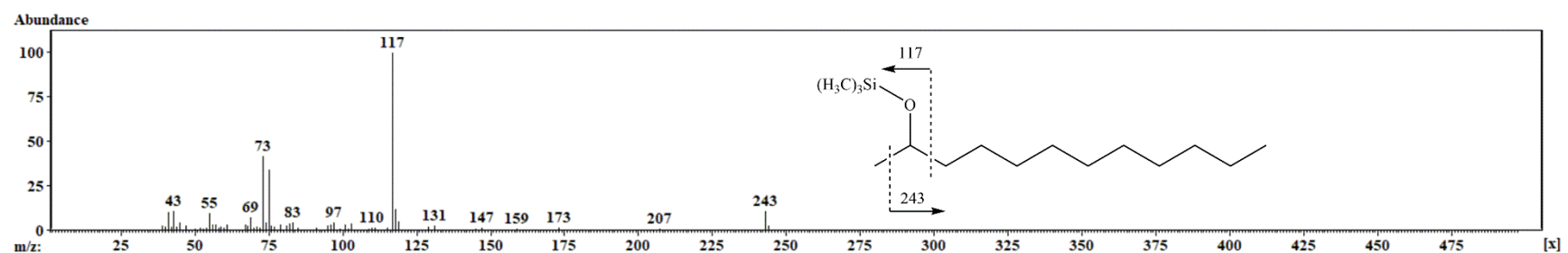
Прилог 33. Масени спектар 24-метил-1-фенил-1,3-хексакозадиона идентификованог у испирку *P. veris*



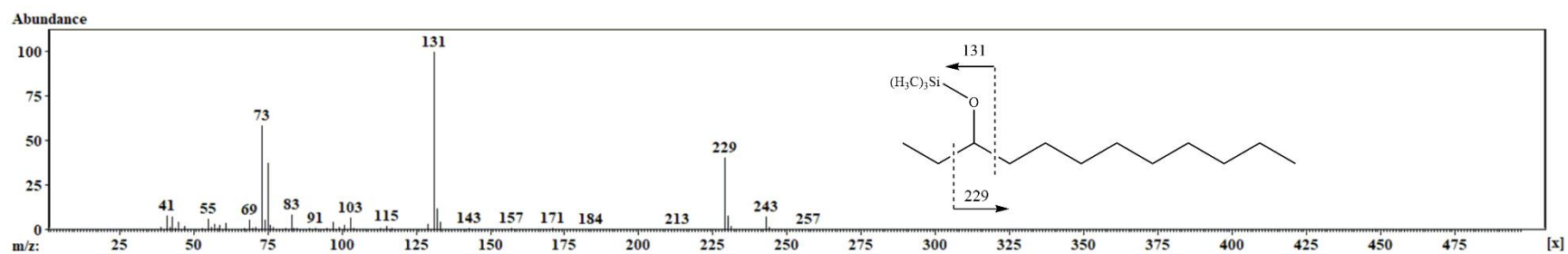
Прилог 34. Масени спектар 22-метил-3-трикозанола идентификованог у испирку *P. veris*



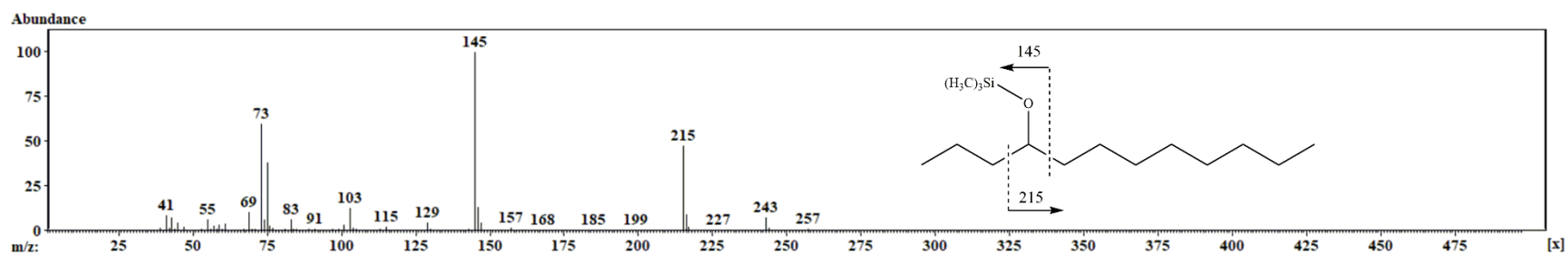
Прилог 35. Масени спектар 24-метил-3-пентакозанола идентификованог у испирку *P. veris*



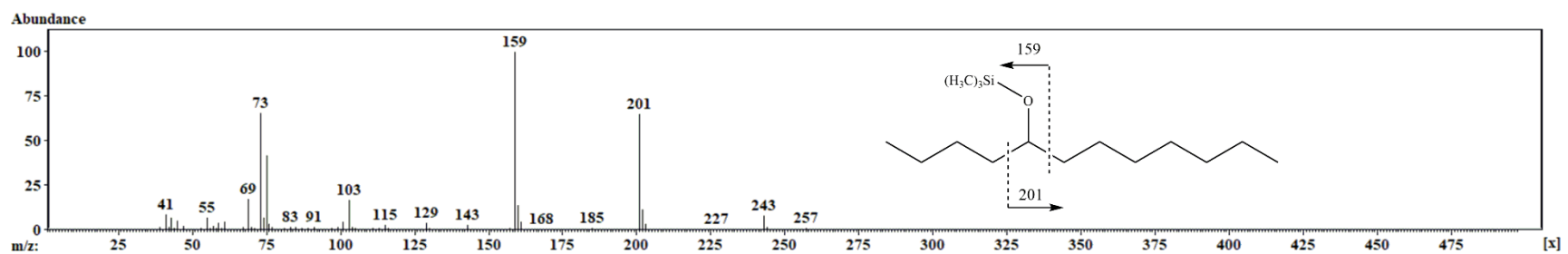
Прилог 36. Масени спектар триметилсиллил-деривата синтетисаног 2-додеканола



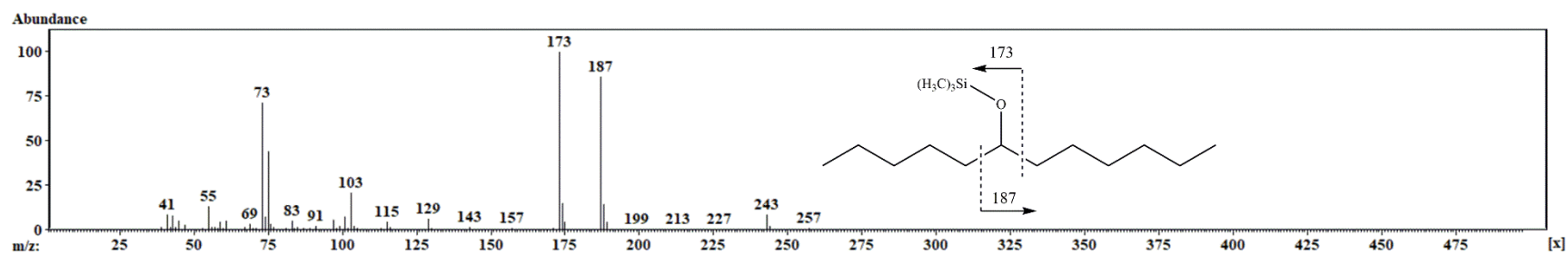
Прилог 37. Масени спектар триметилсиллил-деривата синтетисаног 3-додеканола



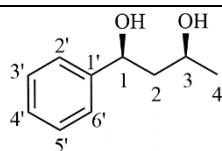
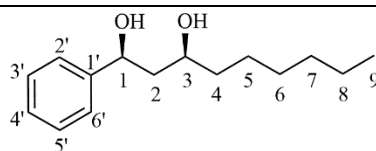
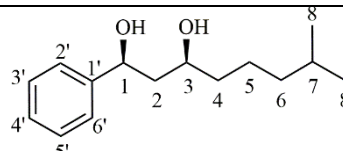
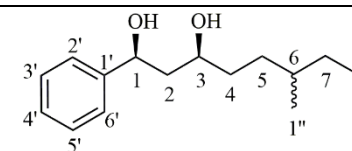
Прилог 38. Масени спектар триметилсиллил-деривата синтетисаног 4-додеканола



Прилог 39. Масени спектар триметилсиллил-деривата синтетисаног 5-додеканола



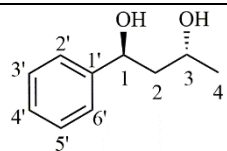
Прилог 40. Масени спектар триметилсиллил-деривата синтетисаног 6-додеканола

Прилог 41. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *syn*-1-фенил-1,3-алкадиола (**12a**, **13a-c**)

syn-12a

syn-13a

syn-13b

syn-13c^a

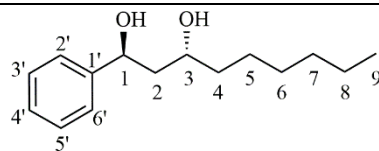
Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 ⁶	75,3	4,91 (dd, $J=10,1, 3,1$ Hz, 1H)	75,4	4,94 (dd, $J=9,3, 3,7$ Hz, 1H)	75,4	4,90 (dd, $J=9,0, 4,0$ Hz, 1H)	75,4	4,88 (dd, $J=8,9, 4,1$ Hz, 1H)
2	47,1	1,73 (ddd, $J=14,6, 3,1, 2,4$ Hz, 1H) 1,83 (1H, преклопљен са H-2 <i>anti</i> -изомера)	45,3	1,73 (m, 1H) 1,80 (m, 1H)	45,3	1,71 (m, 1H) 1,79 (m, 1H)	45,2	1,72 (m, 1H) 1,80 (m, 1H)
3 ⁶	68,9	4,12 (dq, $J=9,5, 6,0, 2,4$ Hz, 1H)	72,9	3,96 (tdd, $J=9,1, 5,0, 3,0$ Hz, 1H)	72,8	3,92 (m, 1H)	73,3	3,88 (tdd, $J=8,8, 6,2, 3,1$ Hz, 1H)
4	24,1	1,20 (t, $J=6,0$ Hz, 3H)	38,8	1,46 (m, 2H)	38,4	1,40 (m, 2H)	32,4	1,41 (m, 2H)
5	/	/	25,3	1,25 (m, 2H)	23,5	1,39 (m, 2H)	29,4	1,13 (m, 2H)
6	/	/	29,2	1,25 (m, 2H)	39,0	1,16 (m, 2H)	34,5	1,30 (m, 2H)
7	/	/	31,8	1,26 (m, 2H)	28,0	1,51 (m, 2H)	29,4	1,31 (m, 2H)
8	/	/	22,7	1,26 (m, 2H)	22,6	0,86 (d, $J=6,6$ Hz, 6H)	11,4	0,87 (t, $J=7,1$ Hz, 3H)
9	/	/	14,1	0,88 (t, $J\approx 7$ Hz, виртуелно купловање)	/	/	/	/
1''	/	/	/	/	/	/	19,2	0,84 (d, $J=6,7$ Hz, 3H)
1'	144,6	/	144,6	/	144,6	/	144,6	/
2', 6'	127,7	7,27 (m, 2H) ^b	127,7	7,27 (m, 2H) ^b	127,6	7,27 (m, 2H) ^b	127,4	7,27 (m, 2H) ^b
3', 5'	128,6	7,34 (m, 2H) ^b	128,6	7,34 (m, 2H) ^b	128,5	7,34 (m, 2H) ^b	128,4	7,34 (m, 2H) ^b
4'	125,8	7,34 (m, 1H) ^b	125,8	7,34 (m, 1H) ^b	125,7	7,34 (m, 1H) ^b	125,6	7,34 (m, 1H) ^b

^a хемијска померања два могућа стереоизомера, услед постојања стереоцентра на C-6, нису уочена; ⁶ сигнали протона хидроксилних група везаних за атоме C-1 и C-3 су широки и преклопљени; ^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала); / – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

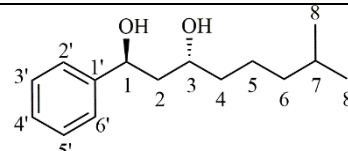
Прилог 42. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци (у CDCl_3) синтетисаних *anti*-1-фенил-1,3-алкадиола (**12a**, **13a-c**)



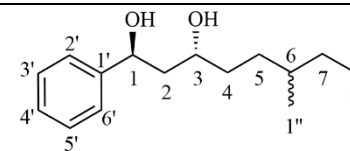
anti-12a



anti-13a



anti-13b



anti-13c^a

Положај	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1 ⁶	71,7	5,03 (dd, $J=7,7, 3,8$ Hz)	71,7	5,08 (dd, $J=11,5, 2,8$ Hz, 1H)	71,7	5,03 (dd, $J=8,3, 3,2$ Hz, 1H)	71,6	5,02 (dd, $J=8,0, 3,5$ Hz, 1H)
2	46,2	1,81 (m, 1H) 1,86 (m, 1H)	44,5	1,81 (m, 1H) 1,86 (m, 1H)	44,5	1,82 (m, 1H) 1,88 (m, 1H)	44,5	1,81 (m, 1H) 1,87 (m, 1H)
3 ⁶	65,5	4,04 (dq, $J=8,1, 6,2, 3,2$ Hz, 1H)	69,3	3,87 (tdd, $J=8,3, 5,3, 2,8$ Hz, 1H)	69,3	3,84 (tdd, $J=8,0, 4,7, 2,9$ Hz, 1H)	69,7	3,80 (tdd, $J=10,6, 5,6, 3,0$ Hz, 1H)
4	23,6	1,20 (t, $J=6,2$ Hz, 3H)	38,1	1,46 (m, 2H)	37,7	1,45 (m, 2H)	32,4	1,41 (m, 2H)
5	/	/	25,3	1,25 (m, 2H)	23,1	1,30 (m, 2H)	29,4	1,13 (m, 2H)
6	/	/	29,2	1,25 (m, 2H)	38,9	1,16 (m, 2H)	34,5	1,30 (m, 2H)
7	/	/	31,8	1,26 (m, 2H)	27,9	1,51 (m, 2H)	29,4	1,31 (m, 2H)
8	/	/	22,7	1,26 (m, 2H)	22,6	0,86 (d, $J=6,6$ Hz, 6H)	11,4	0,87 (t, $J=7,1$ Hz, 3H)
9	/	/	14,1	0,88 (t, $J \approx 7$ Hz, виртуелно купловање)	/	/	/	/
1''	/	/	/	/	/	/	19,2	0,84 (d, $J=6,7$ Hz, 3H)
1'	144,6	/	144,6	/	144,6	/	144,6	/
2', 6'	127,4	7,27 (m, 2H) ^b	127,4	7,27 (m, 2H) ^b	127,4	7,27 (m, 2H) ^b	127,4	7,27 (m, 2H) ^b
3', 5'	128,5	7,34 (m, 2H) ^b	128,5	7,34 (m, 2H) ^b	128,4	7,34 (m, 2H) ^b	128,4	7,34 (m, 2H) ^b
4'	125,7	7,34 (m, 1H) ^b	125,7	7,34 (m, 1H) ^b	125,5	7,34 (m, 1H) ^b	125,6	7,34 (m, 1H) ^b

^a хемијска померања два могућа стереоизомера, услед постојања стереоцентра на C-6, нису уочена; ⁶ сигнали протона хидроксилних група везаних за атоме C-1 и C-3 су широки и преклопљени; ^b хемијска померања су очитана у gHSQC спектру (средина одговарајућег сигнала); / – подаци нису доступни или нису релевантни/упоредиви.

Прилог 43. Алкани детектовани у траговима у испирку *P. ascaulis* (P-2)

RI	Класа	Једињење	Број С-атома
862	<i>I</i>	2-Метилоктан	9
900	<i>N</i>	Нонан	9
1000	<i>N</i>	Декан	10
1062	<i>I</i>	2-Метилундекан	11
1073	<i>A</i>	3-Метилундекан	11
1100	<i>N</i>	Ундекан	11
1163	<i>I</i>	2-Метилдодекан	12
1174	<i>A</i>	3-Метилдодекан	12
1200	<i>N</i>	Додекан	12
1300	<i>N</i>	Тридекан	13
1400	<i>N</i>	Тетрадекан	14
1500	<i>N</i>	Пентадекан	15
1600	<i>N</i>	Хексадекан	16
1700	<i>N</i>	Хептадекан	17
1800	<i>N</i>	Октадекан	18
1900	<i>N</i>	Нонадекан	19
1963	<i>I</i>	2-Метилнонадекан	20
2000	<i>N</i>	Еикозан	20

Прилог 44. ^1H (400 MHz) и ^{13}C (100,6 MHz) NMR спектрални подаци у CDCl_3 комерцијално доступних супстанци: 3-октанол, 2-метилхексанска киселина и 3-метилхексанска киселина

3-Октанол

δ_{C} 9,9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 14,1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 22,6 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25,4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 30,1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 32,1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 37,0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 73,3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$)

δ_{H} 0,89 (t, $J \approx 7\text{Hz}$, виртуелно купловање, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0,94 (t, $J=7,5$, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 1,30 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ и $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,31 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,44 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 1,50 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$), 1,54 (br s, 1H, -OH), 3,52 (br pseudo tt, $J=7,3$, 4,7, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$)

2-Метилхексанска киселина

δ_{C} 13,9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 16,8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 22,6 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29,3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33,2 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 39,4 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 183,5 ($\text{C}=\text{O}$)

δ_{H} 0,90 (t, $J \approx 7\text{ Hz}$, виртуелно купловање, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,18 (d, $J=6,9\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 1,32 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,32 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,42 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 1,69 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$), 2,46 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}=\text{O}$)

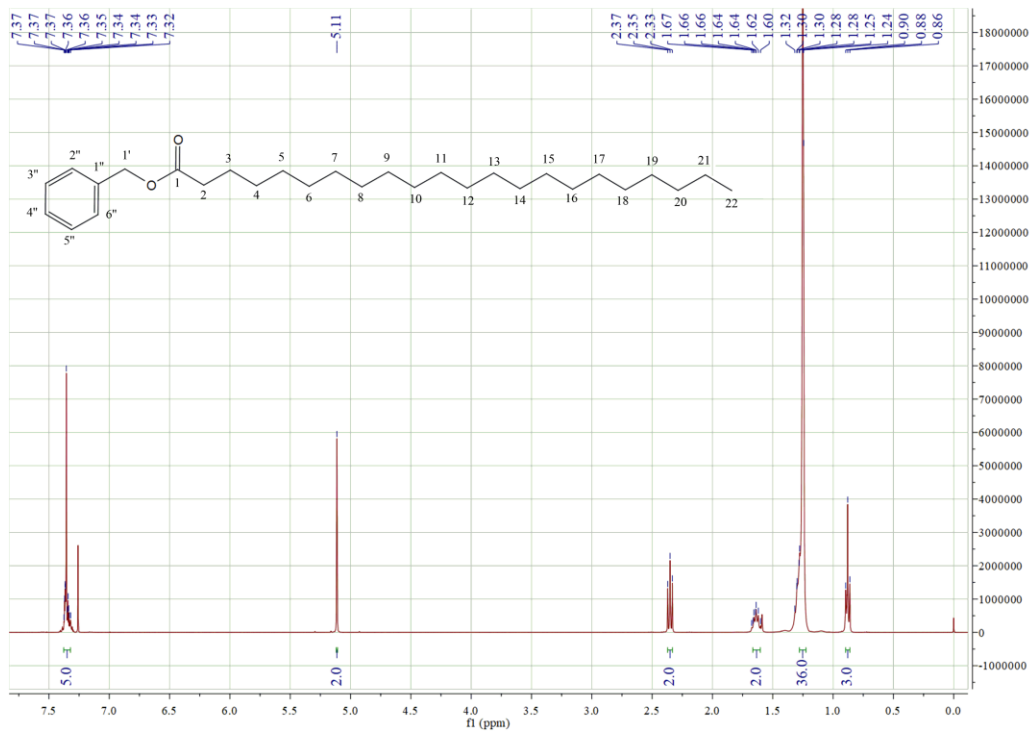
3-Метилхексанска киселина

δ_{C} 14,1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 19,6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 20,0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29,9 ($\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 38,9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 41,6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 179,6 ($\text{C}=\text{O}$)

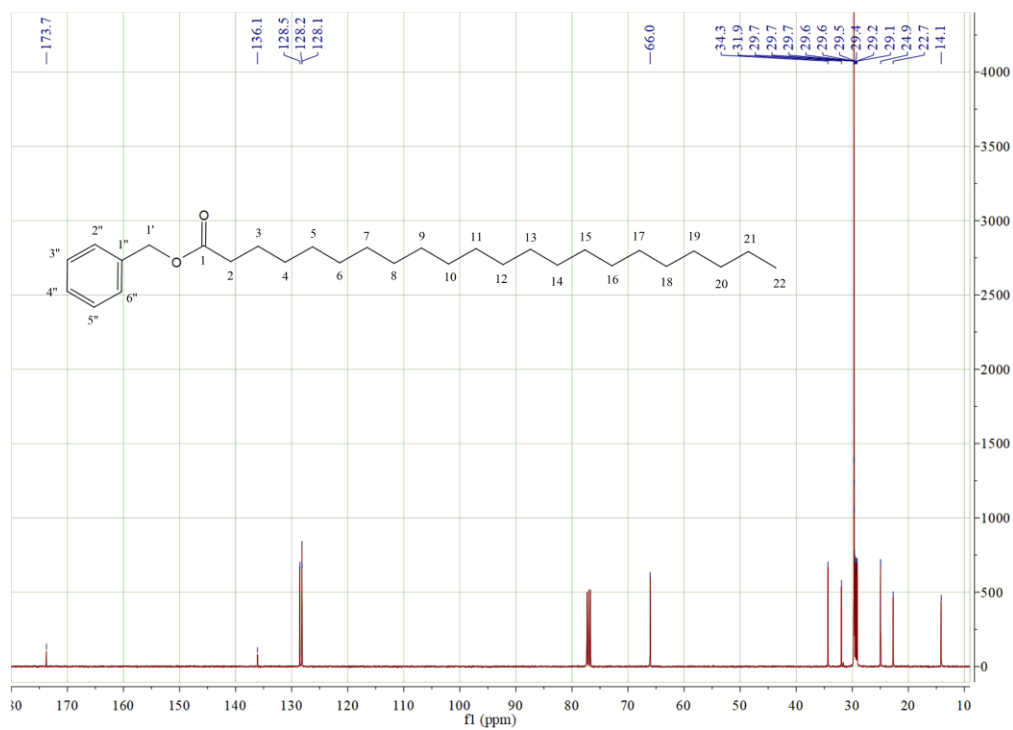
δ_{H} 0,90 (t, $J \approx 7\text{Hz}$, виртуелно купловање, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0,97 (d, $J=6,6\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1,23 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,32 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,33 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,98 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,15 (dd, $J=14,9$, 8,0 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 (dd, $J=14,9$, 6,0 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$)

Прилог 45. GC-MS једначина калибрационе праве (са одговарајућим параметрима) за додекан, бензил-бехенат, 2-пентакозанон и метил-палмитат

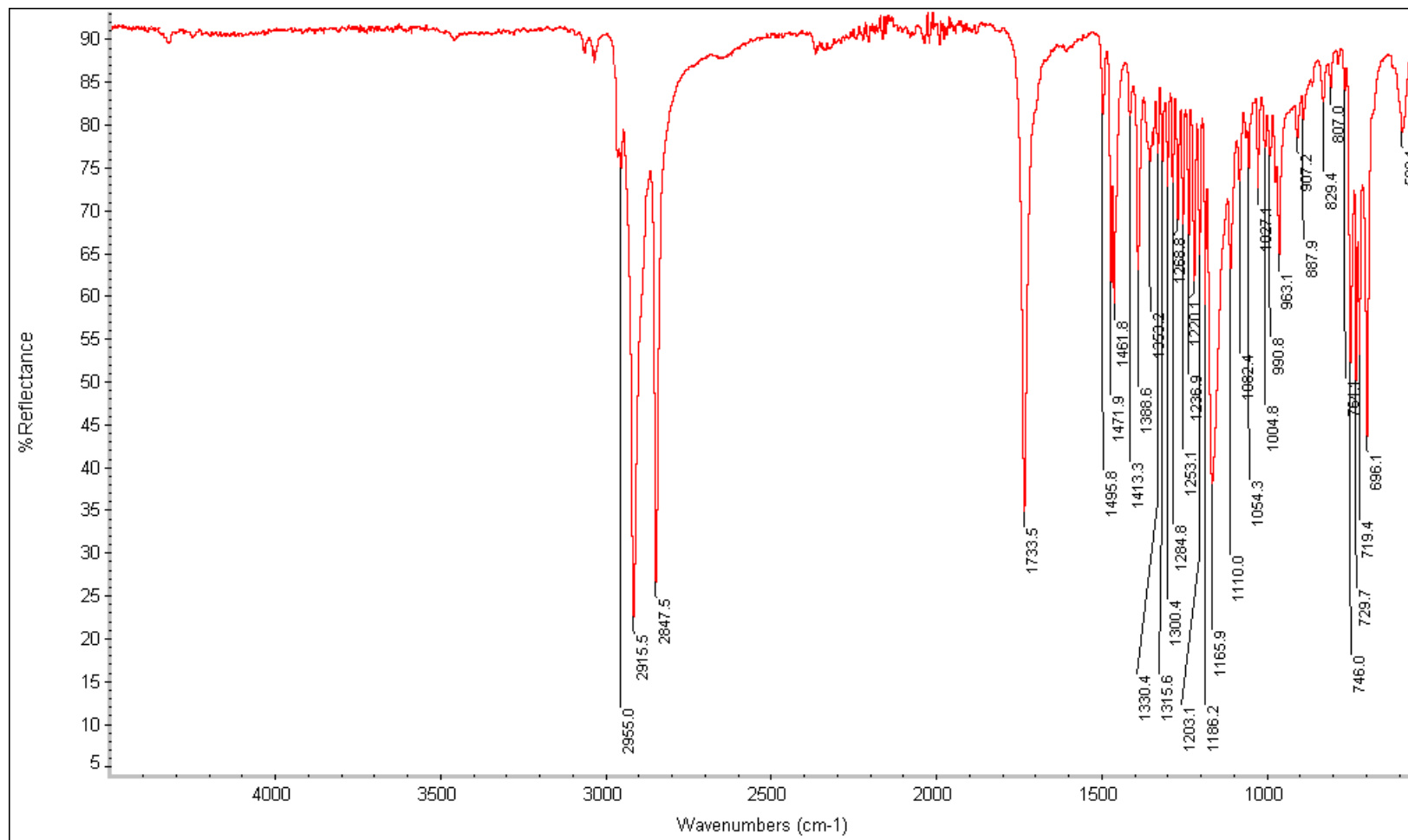
Стандарди	GC-MS калибрациони опсег (mg/ml)	Једначина калибрационе праве	R^2
Додекан	0,25 – 10	$C=2,334 \times 10^{-7} \times A + 0,12$	0,99963
Бензил-бехенат	0,0075 – 1	$C=4,437 \times 10^{-10} \times A + 7,269 \times 10^{-3}$	0,99989
2-Пентакозанон	0,5 – 5	$C=6,399 \times 10^{-7} \times A + 0,269$	0,99992
Метил-палмитат	0,001 – 1	$C=1,622 \times 10^{-6} \times A + 12,413$	0,99994



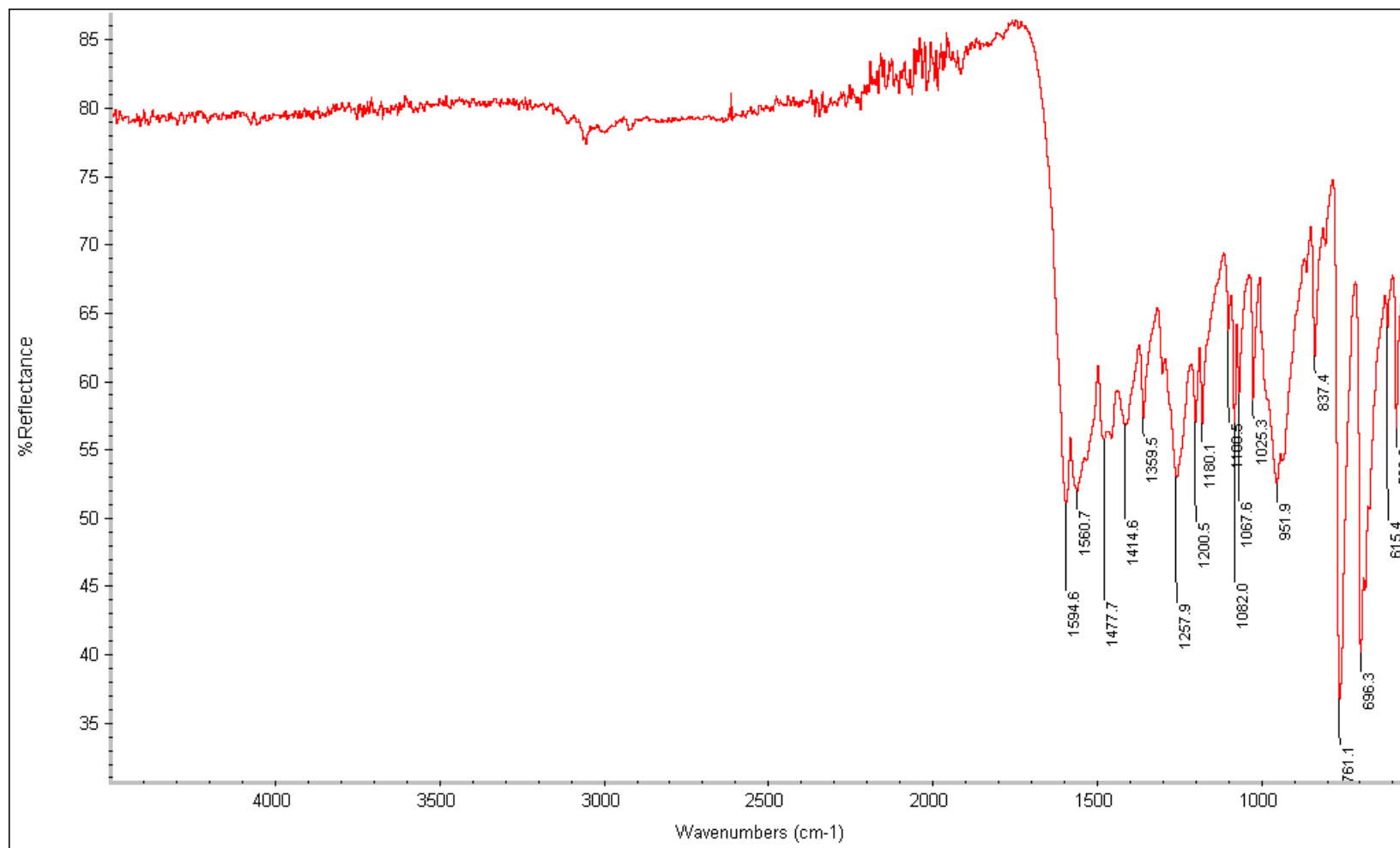
Прилог 46. ¹H NMR спектар бензил-бехената у CDCl₃



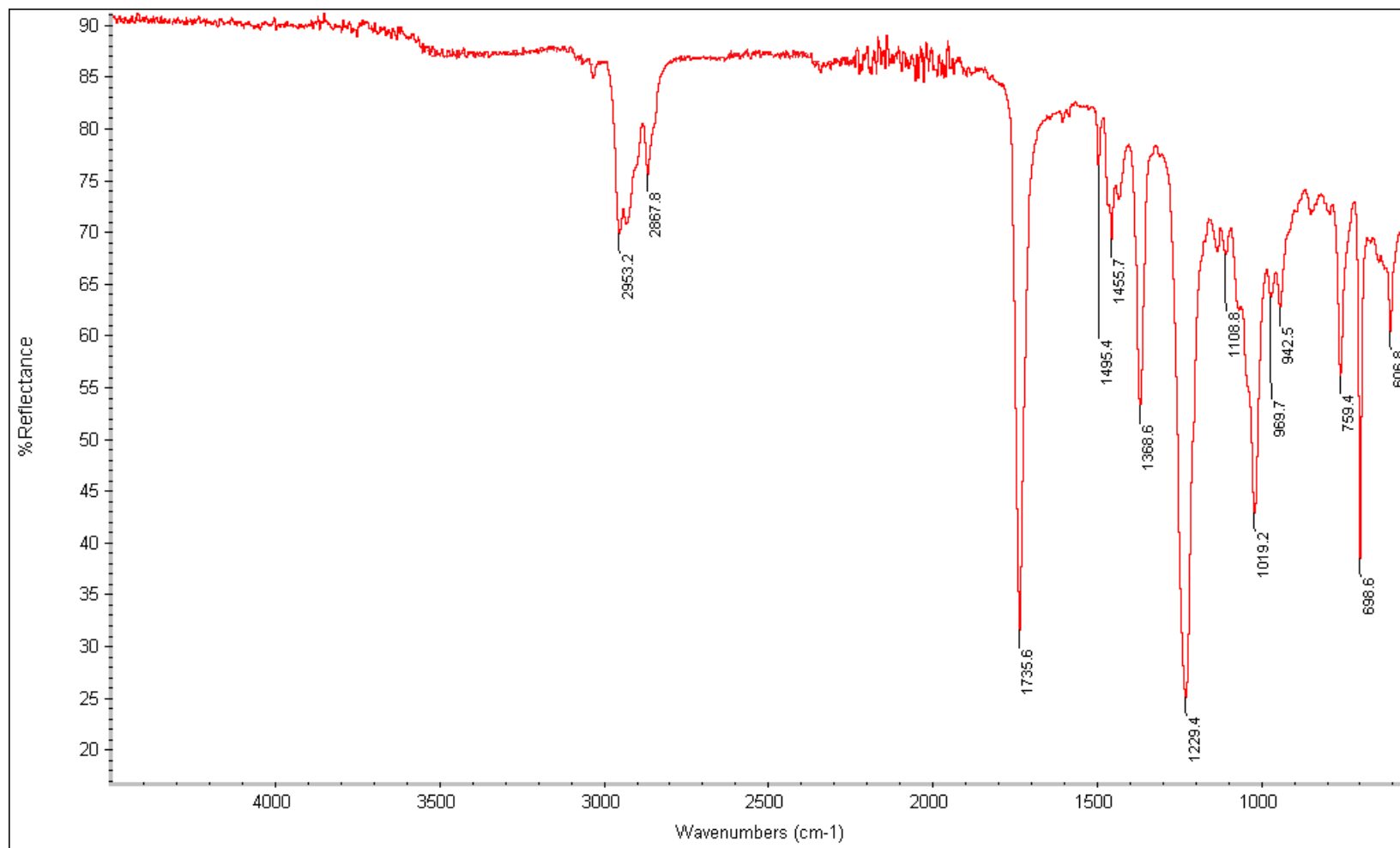
Прилог 47. ¹³C NMR спектар бензил-бехената у CDCl₃.



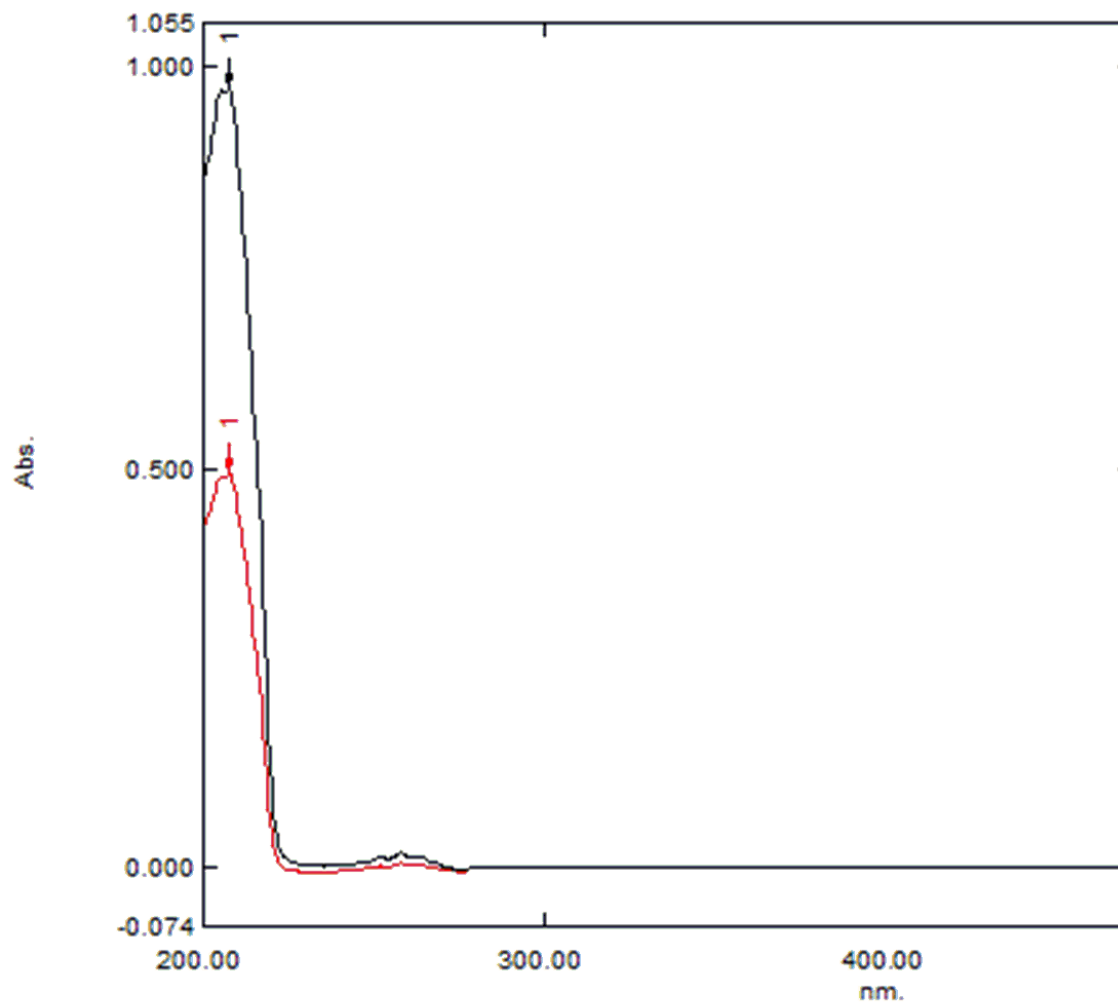
Прилог 48. IR спектар бензил-бехената



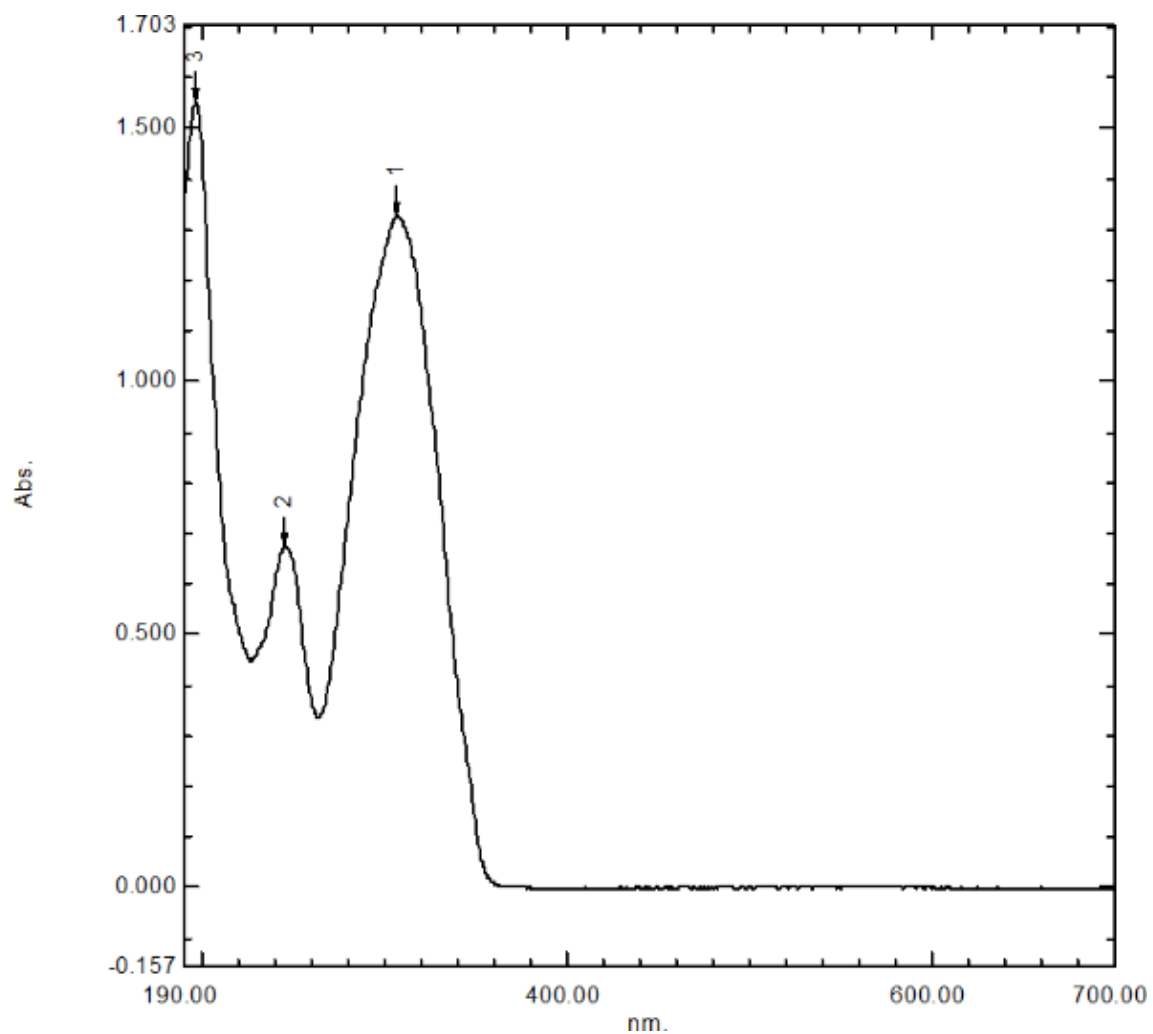
Прилог 49. IR спектар комерцијалног 1-фенил-1,3-бутадiona



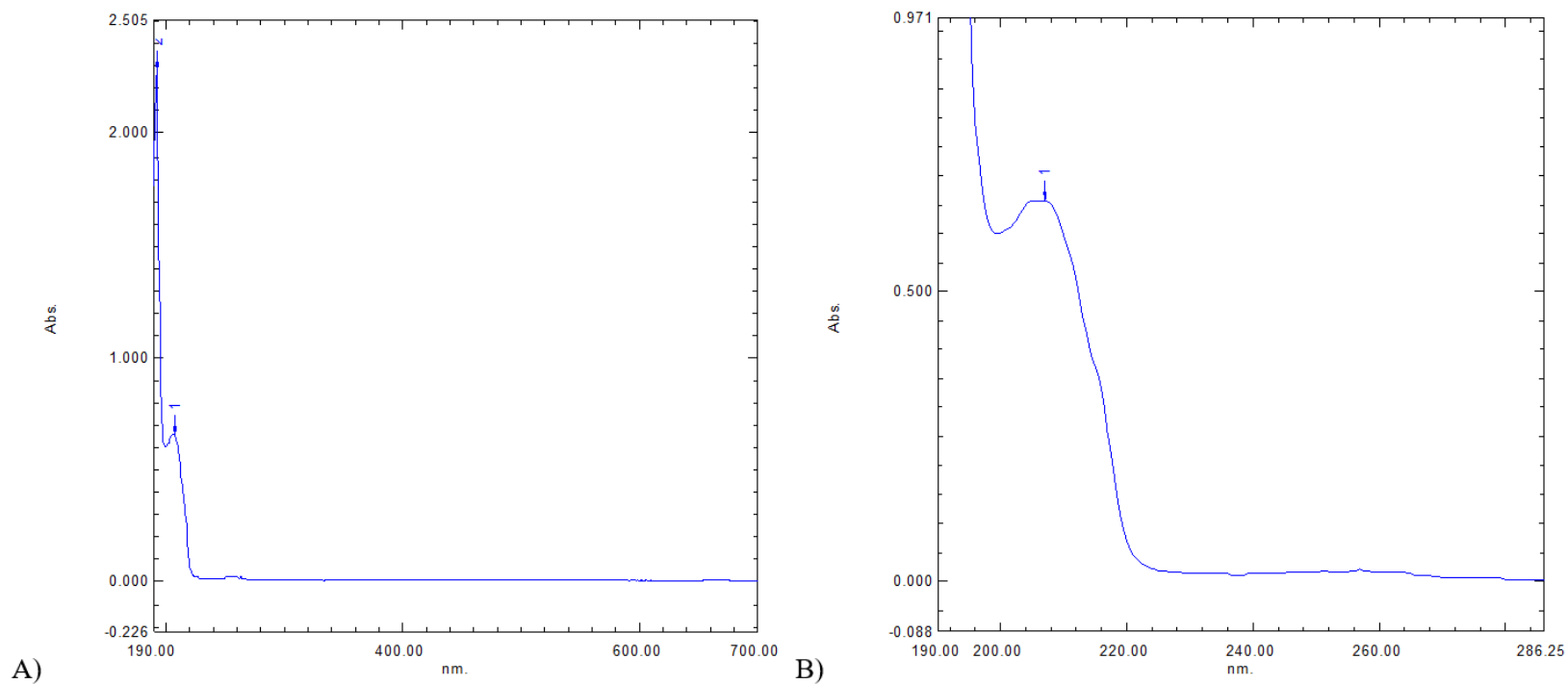
Прилог 50. IR спектар синтетисаног 7-метил-1-фенил-1,3-октадил-диацетата



Прилог 51. UV-Vis спектар бензил-бехената



Прилог 52. UV-Vis спектар комерцијалног 1-фенил-1,3-бутадиона



Прилог 53. UV-Vis спектар (A) и увећани део спектра (B) синтетисаног 1-фенил-1,3-бутадиил-диацетата

БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ

Милена Живковић Стошић рођена је 20.07.1987. године у Лесковцу. Завршила је основну школу Радоје Домановић у Манојловцу, као ученик генерације и носилац Вукове дипломе, а затим Медицинску школу у Лесковцу, смер фармацеутски техничар.

Природно-математички факултет у Нишу, Одсек за хемију, уписала је школске 2006/07. Студије је завршила 30.10.2012. године, са просечном оценом 9,32. Дипломски рад под називом: „Нова синтетска метода за добивање *N*-метил ароматичних имиња без употребе растварача“ одбранила је оценом 10. Изабрана је за најбољег студента на Департману за хемију Природно-математичког факултета у Нишу за школску 2012/13. годину, од стране фонда Ана Бјелетић и Иван Марковић.

Докторске академске студије на Департману за хемију Природно-математичког факултета у Нишу уписала је школске 2012/13. Положила је све испите предвиђене студијским програмом са просечном оценом 10. На Природно-математичком факултету у Нишу изабрана је у звање истраживач-приправник 24.04.2013. године, а у звање истраживач-сарадник 24.02.2016. године.

Од 01.07.2013. запослена је на Природно-математичком факултету у Нишу, као истраживач-приправник, а након тога и као истраживач-сарадник. У школској 2015/16, 2016/17. и 2017/2018. години била је ангажована као демонстратор на вежбама из предмета Органске синтезе, на Департману за хемију.

Добитница је награде за талентоване младе научнике (*Young Scientist Registration Fellowship*), на 49. Међународном симпозијуму о етарским уљима (*49th International Symposium on Essential Oils*), 2018. године, као и IUPAC-ове награде за постер презентацију рада (*IUPAC Poster Prize*), на 51. Саветовању Српског хемијског друштва, 2014. године, за рад под називом: „*Simple and efficient one-pot solvent-free synthesis of N-methyl imines of aromatic aldehydes*“. Изабрана је, као један од 70 најбољих студената завршних година студија на Универзитетима из Србије, за наградно путовање у Европу у оквиру пројекта Путујемо у Европу 2011, који је организовао Европски покрет у Србији, 2011. године. Члан је Српског друштва за фитохемију и фитомедицину.

Објавила је 4 рада у врхунским међународним часописима, 1 рад у истакнутом међународном часопису, 1 рад у међународном часопису, а поред тога, саопштила је и 7 радова на међународним научним скуповима и 5 радова на скуповима националног значаја (радови су објављени у изводу). Категоризација радова вршена је према критеријумима

Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Радови под редним бројевима 1, 6, 7, 15 и 17 део су ове докторске дисертације.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ВРХУНСКИМ МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА (M₂₁)

1. Radulović, NS, Živković Stošić, MZ, Long-chain syn-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, related phenylalkane derivatives, and sec-alcohols, all possessing dominantly *iso*-branched chain termini, and 2/3-methyl-branched fatty acids from *Primula veris* L. (Primulaceae) wax. *Phytochemistry* **2021.** 186, 112732. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112732> ИФ(2020)=4,072
2. Genčić, MS, Aksić, JM, Živković Stošić, MZ, Randjelović, PJ, Stojanovi, NM, Stojanović-Radić, ZZ, Radulović, NS, Linking the antimicrobial and anti-inflammatory effects of immortelle essential oil with its chemical composition – The interplay between the major and minor constituents. *Food Chem. Toxicol.* **2021.** 158, 112666. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112666> ИФ(2020)=6,025
3. Schneider, O, Ilic-Tomic, T, Rückert, C, Kalinowski, J, Genčić, M, Živković, M, Stanković, N, Radulović, N, Vasiljevic, B, Nikodinovic-Runic, J, Zotchev, S, Genomics-based insights into the biosynthesis and unusually high accumulation of free fatty acids by *Streptomyces* sp. NP10. *Front. Microbiol.* **2018.** 9, 1302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01302> ИФ(2018)=4,259
4. Ilic-Tomic, T, Genčić, M, Živković, M, Vasiljevic, Djokic, L, Nikodinovic-Runic, J, Radulović, N, Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015.** 99, 4815-4833. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6364-5> ИФ(2015)=3,376

РАД ОБЈАВЉЕН У ИСТАКНУТОМ МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ (M22)

5. Genčić, MS, Aksić, JM, Živković Stošić, MZ, Đorđević, MR, Mladenović, MZ, Radulović, NS, New neryl esters from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil. *Nat. Prod. Res.* **2020.** 36, 2002-2008. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1839462> ИФ(2020)=2,862

РАД ОБЈАВЉЕН У МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ (M23)

6. Živković Stošić, MZ, Radulović, NS, Genčić, MS, Randelović, VN, Very-long-chain wax constituents from *Primula veris* and *P. acaulis*: does the paradigm of non-branched vs. branched chain dominance universally hold in all plant taxa? *Chem. Biodivers.* **2021.** 18, e2100285. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100285> ИФ(2020)=2,408

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЧАСОПИСУ НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (M52)

7. Živković Stošić, MZ, Radulović, NS, Lithium aluminum hydride reduction of 1-phenylbutane-1,3-dione, and acetylation of the products: NMR and GC-MS analysis, *FU Phys. Chem. Tech.* **2021.** 19, 31-43. <https://doi.org/10.2298/FUPCT2101031Z>
8. Genčić, MS, Aksić, JM, Mladenović, MM, Živković Stošić, MZ, Radulović, NS, Phenethyl angelate – a new ester from immortelle essential oil? *FU Phys. Chem. Tech.* **2021.** 19, 17-29. <https://doi.org/10.2298/FUPCT2101017G>

РАДОВИ САОПШТЕНИ НА МЕЂУНАРОДНИМ СКУПОВИМА ОБЈАВЉЕНИ У ИЗВОДУ (М34)

9. Aksic, J, Gencic, M, Živković Stošić, M, Stojanović, N, Radulović, N, Effects of immortelle essential oil on macrophage NO production, In: *Programme and Book of Abstracts of the 50th International Symposium on Essential Oils*, Vienna (Austria), September 9-11, 2019, PP-07.
10. Aksic, J, Gencic, M, Živković Stošić, M, Stojanović, N, Radulović, N, New volatile free fatty acids from Balkan immortelle essential oil, In: *Programme and Book of Abstracts of the 50th International Symposium on Essential Oils*, Vienna (Austria), September 9-11, 2019, PP-109.
11. Gencic, M, Aksic, J, Živković Stošić, M, Đorđević, M, Mladenović, M, Stojanović, N, Radulović, N, New neryl esters from *Helichrysum italicum* essential oil, In: *Programme and Book of Abstracts of the 49th International Symposium on Essential Oils*, Niš (Serbia), September 13-16, 2018, PP-8.
12. Gencic, M, Aksic, J, Živković Stošić, M, Stojanović, N, Stojanović-Radić, Z, Radulović, N, Antimicrobial and anti-inflammatory potential of different immortelle essential-oil chemotypes, In: *Programme and Book of Abstracts of the 49th International Symposium on Essential Oils*, Niš (Serbia), September 13-16, 2018, PP-9.
13. Krstić, M, Živković, M, Radulović, N, New unsaturated lactones from the essential oil of *Tordylium apulum* L. (Apiaceae), In: *Programme and Book of Abstracts of the 49th International Symposium on Essential Oils* (Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Serbia), September 13-16, 2018, PP-154.
14. Živković, M, Radulović N, The chemical composition of the essential oil of *Hypericum hirsutum* L. from Suva planina (SE Serbia), In: *Programme and Book of Abstracts of the 49th International Symposium on Essential Oils* (Facta Universitatis, Series Physics,

Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Serbia), September 13-16, 2018, PP-155.

15. Živković, MZ, Radulović, NS, Stojković MB, Configuration assignment of internal double bonds with almost isochronous protons via cyclopropanation and NMR, In: Programme and Book of Abstracts of the 19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting CEUM, Timisoara (Romania), September 5-8, 2017, P-9.
16. Živković, M, Radulović, N, Genčić, M., Methyl 2-methylalkanoates from the essential oil of *Humulus lupulus* L., In: Programme and Book of Abstracts of the 47th International Symposium on Essential Oils, Nice (France), September 11-14, 2016, PP-84.
17. Živković, M, Genčić, M, Radulović, N, Comparative study of epicuticular alkane profiles of *Primula veris* L. and *P. acaulis* (L.) L. (Primulaceae), In: Programme and Book of Abstracts of the 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik (Serbia), June 16-19, 2016, PP-88-89.
18. Stojanović, N, Randelović, P, Živković, M, Nešić, M, Genčić, M, Radulović, N, Influence of *Hypericum perforatum* essential oil on the mice central nervous system, In: Programme and Book of Abstracts of the 46th International Symposium on Essential Oils, Lublin (Poland), September 13-16, 2015, PP-082.
19. Stojanović-Radić, Z, Radulović, N, Živković, M, Efficacy of parsley and celery essential oils against the growth of *Bacillus cereus* in commercial chicken soup, In: Programme and Book of Abstracts of the 45th International Symposium on Essential Oils, Istanbul (Turkey), September 7-10, 2014, PP-207.

**РАДОВИ САОПШТЕНИ НА СКУПОВИМА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА ОБЈАВЉЕНИ У ИЗВОДУ
(М64)**

20. Živković, M, Radulović, N, Volatiles of *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach flower diethyl ether extract, In: Programme and Book of Abstracts of the 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid (Macedonia), October 8-11, 2014, BC-007.
21. Živković, M, Ilić-Tomić, T, Denić, M, Nikodinovic-Runić, J, Radulović, N, *Streptomyces* NP10 produces a large amount of *n*- and branched free fatty acids as a response to the presence of short-chain fatty acids, In: Programme and Book of Abstracts of the 51st Meeting of the Serbian Chemical Society, Niš (Serbia), June 5-7, 2014, BH O-01.
22. Milojević, A, Radulović, N, Živković, M, Vukićević, R, Simple and efficient one-pot solvent-free synthesis of *N*-methyl imines of aromatic aldehydes, In: Programme and Book of Abstracts of the 51st Meeting of the Serbian Chemical Society, Niš (Serbia), June 5-7, 2014, OH P-04.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ИДЕНТИФИКАЦИЈА И СИНТЕЗА ОДАБРАНИХ САСТОЈАКА ВОСКОВА
БИЉНИХ ВРСТА *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) И
Liriodendron tulipifera L. (Magnoliaceae)**

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 26.4.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милена З. Живковић Стошић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ИДЕНТИФИКАЦИЈА И СИНТЕЗА ОДАБРАНИХ САСТОЈАКА ВОСКОВА
БИЉНИХ ВРСТА *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) И
Liriodendron tulipifera L. (Magnoliaceae)**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 26.4.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милена З. Живковић Стошић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИДЕНТИФИКАЦИЈА И СИНТЕЗА ОДАБРАНИХ САСТОЈАКА ВОСКОВА БИЉНИХ ВРСТА *Primula veris* L., *Primula acaulis* (L.) L. (Primulaceae) И *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae)

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 26.4.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милена З. Живковић Стошић