

Sezonska promjena u kemijskom sastavu hidrodestilata alge *Cladostephus spongiosus*

Brajković, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:206568>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

SEZONSKA PROMJENA U KEMIJSKOM SASTAVU HIDRODESTILATA ALGE
Cladostephus spongiosus

DIPLOMSKI RAD

MARIJA BRAJKOVIĆ

Matični broj:155

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA
(ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA)

SEZONSKA PROMJENA U KEMIJSKOM SASTAVU HIDRODESTILATA ALGE
Cladostephus spongiosus

DIPLOMSKI RAD

MARIJA BRAJKOVIĆ

Matični broj:155

Split, rujan 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY IN CHEMISTRY
(ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY)

SEASONAL DIFFERENCE IN HYDRODISTILLATES CHEMICAL COMPOSITION
OF ALGA *Cladostephus spongiosus*

DIPLOMA THESIS

MARIJA BRAJKOVIĆ

Parent number:155

Split, September 2022

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu održanoj 18. ožujka 2022.

Mentor: dr. sc. Sanja Radman

SEZONSKA PROMJENA U KEMIJSKOM SASTAVU HIDRODESTILATA ALGE

Cladostephus spongiosus

Marija Brajković, 155

Sažetak: Alge su fotosintetski autotrofni organizmi koji nastanjuju praktički sva staništa. Dije se na mikroalge i makroalge. Prema pigmentu kojeg sadržavaju dijele se u 3 grupe: smeđe (Phaeophyta), zelene (Chlorophyta) i crvene (Rhodophyta) alge. Smeđe alge žive isključivo u morima, najčešće su pričvršćene na kamenu podlogu, stijene ili druge organizme. Karakterističnu smeđu boju daje im smeđi pigment fukoksantin koji maskira klorofil i ostale karotenoide. Smeđa makroalga *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh 1817 široko je rasprostranjena u Sredozemnom moru, a može se naći i uz atlantske obale Maroka do Irske. Provedena je analiza na svježem i suhom uzorku alge *C. spongiosus* uzorkovane u svibnju (pri temperaturi mora 20,01 °C) i kolovoza (pri temperaturi mora 28,01 °C). Vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa analizirani su isparljivi spojevi hidrodestilata dobiveni primjenom hidrodestilacije modificiranom aparaturom po Clevengeru. Usporedbom dobivenih rezultata primijećene su razlike u udjelu terpena, derivata klorofila, masnih kiselina i derivata te alifatskih zasićenih i nezasićenih spojeva obzirom na mjesec uzorkovanja. U uzorku *C. spongiosus* uzorkovanom u svibnju najzastupljeniji su terpeni (48,70%, svježe; 38,05%, suho) dok u uzorku iz kolovoza njihov sadržaj značajno opada (12,57%, svježe; 17,20%, suho). Razlika je uočena i kod zastupljenosti derivata klorofila čiji je udio u uzorku iz kolovoza (16,07%, svježe; 19,37%, suho) gotovo trostruko veći od udjela iste skupine spojeva u uzorku iz svibnja (5,29%, svježe; 7,36%, suho). Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da temperatura mora utječe na kemijski sastav alge *C. spongiosus*.

Ključne riječi: makroalge, smeđe alge, hidrodestilacija, isparljivi spojevi, vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Rad sadrži: 35 stranica, 17 slika, 1 tablicu, 29 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Igor Jerković
2. izv. prof. dr. sc. Ante Prkić
3. dr. sc. Sanja Radman

Datum obrane: 26. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Graduate study in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25 held on March 18, 2022

Mentor: PhD Sanja Radman

SEASONAL DIFFERENCE IN HYDRODISTILLATES CHEMICAL COMPOSITION OF ALGA

Cladostephus spongiosus

Marija Brajković, 155

Abstract: Algae are photosynthetic autotrophic organisms that inhabit virtually all habitats. They are divided into microalgae and macroalgae. According to the pigment they contain, they are divided into 3 groups: brown (Phaeophyta), green (Chlorophyta) and red (Rhodophyta) algae. Brown algae live exclusively in the seas, they are most often attached to rock surfaces, rocks or other organisms. The brown pigment fucoxanthin, which masks chlorophyll and other carotenoids, gives them their characteristic brown colour. The brown macroalga *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh 1817 is widely distributed in the Mediterranean Sea and it could be found in the Atlantic coasts from Morocco to Ireland. The analysis was performed on a fresh and dry sample of *C. spongiosus* alga sampled in May (at a sea temperature of 20.01 °C) and August (at a sea temperature of 28.01 °C). The coupled gas chromatography system with mass spectrometry was used for the volatile hydrodistillate compounds analysis. By comparing the obtained results, differences in the abundance of terpenes, chlorophyll derivatives, fatty acids and derivatives and aliphatic saturated and unsaturated compounds were observed with respect to the month of sampling. In the sample of *C. spongiosus* from May, terpenes are most represented (48.70%, fresh; 38.05%, dry), while in the sample from August their content remarkably decreases (12.57%, fresh; 17.20%, dry). The difference was also observed in the presence of chlorophyll derivatives whose abundance in the sample from August (16.07%, fresh; 19.37%, dry) was almost three times higher than the abundance of the same group of compounds in the sample from May (5.29%, fresh; 7.36%, dry). On the basis of the conducted research, it can be concluded that the sea temperature affects the chemical composition of the alga *C. spongiosus*.

Keywords: macroalgae, brown algae, hydrodistillation, volatile compounds, gas chromatography with mass spectrometry

Thesis contains: 35 pages, 17 figures, 1 table, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. associate professor Ante Prkić, PhD
2. Sanja Radman, PhD
3. full professor Igor Jerković, PhD

Defence date: September 26, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of University of Split, Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organski kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom dr. sc. Sanje Radman, u razdoblju od listopada 2021. do rujna 2022.godine.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Sanji Radman na korisnim savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na neograničenoj podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem se i prijateljima i kolegama koji su bili uz mene tijekom ovih pet nezaboravnih godina.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA:

- Istražiti isparljive organske spojeve alge *Cladostephus spongiosus* te metode izolacije i analize isparljivih spojeva.
- Vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa analizirati isparljive spojeve hidrodestilata alge *C. spongiosus* dobivenih primjenom hidrodestilacije modificiranom aparaturom po Clevengeru.
- Usporedbom dobivenih retencijskih indeksa s literaturnim podacima i dobivenim retencijskim indeksima u ranijim istraživanjima Zavoda za organsku kemiju identificirati dobivene spojeve.
- Provesti identifikaciju spojeva i usporedbom spektara masa s bibliotekama spektara masa Wiley 9 i NIST 17.
- Proučiti sezonsku promjenu u kemijskom sastavu isparljivih spojeva alge.

SAŽETAK

Alge su fotosintetski autotrofni organizmi koji nastanjuju praktički sva staništa. Dijele se na mikroalge i makroalge. Prema pigmentu kojeg sadržavaju dijele se u 3 grupe: smeđe (Phaeophyta), zelene (Chlorophyta) i crvene (Rhodophyta) alge. Smeđe alge žive isključivo u morima, najčešće su pričvršćene na kamenu podlogu, stijene ili druge organizme pa čak i na druge alge. Karakterističnu smeđu boju daje im smeđi pigment fukoksantin koji maskira klorofil i ostale karotenoide. Smeđa makroalga *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh 1817 široko je rasprostranjena u Sredozemnom moru, a može se naći i uz atlantske obale Maroka (južna granica) do Irske (sjeverna granica). Provedena je analiza na svježem i suhom uzorku alge *C. spongiosus* uzorkovane u svibnju (pri temperaturi mora 20,01 °C) i kolovoza (pri temperaturi mora 28,01 °C). Vežanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa analizirani su isparljivi spojevi hidrodestilata dobiveni primjenom hidrodestilacije modificiranom aparaturom po Clevengeru. Usporedbom dobivenih rezultata primijećene su razlike u udjelu terpena, derivata klorofila, masnih kiselina i derivata te alifatskih zasićenih i nezasićenih spojeva obzirom na mjesec uzorkovanja. U uzorku *C. spongiosus* uzorkovanom u svibnju najzastupljeniji su terpeni (48,70%, svježe; 38,05%, suho) dok u uzorku iz kolovoza njihov sadržaj značajno opada (12,57%, svježe; 17,20%, suho). Razlika je uočena i kod zastupljenosti derivata klorofila čiji je udio u uzorku iz kolovoza (16,07%, svježe; 19,37%, suho) gotovo trostruko veći od udjela iste skupine spojeva u uzorku iz svibnja (5,29%, svježe; 7,36%, suho). Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da temperatura mora utječe na kemijski sastav alge *C. spongiosus*.

Ključne riječi: makroalge, smeđe alge, hidrodestilacija, isparljivi spojevi, GC-MS

SUMMARY

Algae are photosynthetic autotrophic organisms that inhabit virtually all habitats. They are divided into microalgae and macroalgae. According to the pigment they contain, they are divided into 3 groups: brown (Phaeophyta), green (Chlorophyta) and red (Rhodophyta) algae. Brown algae live exclusively in the seas, they are most often attached to rock surfaces, rocks or other organisms and even to other algae. The brown pigment fucoxanthin, which masks chlorophyll and other carotenoids, gives them their characteristic brown color. The brown macroalga *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh 1817 is widely distributed in the Mediterranean Sea and it could be found in the Atlantic coasts from Morocco (southern limit) to Ireland (northern limit). The analysis was performed on a fresh and dry sample of *C. spongiosus* alga sampled in May (at a sea temperature of 20.01 °C) and August (at a sea temperature of 28.01 °C). The coupled gas chromatography system with mass spectrometry was used for the volatile hydrodistillate compounds analysis. By comparing the obtained results, differences in the abundance of terpenes, chlorophyll derivatives, fatty acids and derivatives and aliphatic saturated and unsaturated compounds were observed with respect to the month of sampling. In the sample of *C. spongiosus* from May, terpenes are most represented (48.70%, fresh; 38.05%, dry), while in the sample from August their content remarkably decreases (12.57%, fresh; 17.20%, dry). The difference was also observed in the presence of chlorophyll derivatives whose abundance in the sample from August (16.07%, fresh; 19.37%, dry) was almost three times higher than the abundance of the same group of compounds in the sample from May (5.29%, fresh; 7.36%, dry). On the basis of the conducted research, it can be concluded that the sea temperature affects the chemical composition of the alga *C. spongiosus*.

Keywords: macroalgae, brown algae, hydrodistillation, volatile compounds, GC-MS

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Podjela algi..... | 3 |
| 1.1.1. Smeđe alge | 4 |
| 1.2. Isparljivi organski spojevi algi | 5 |
| 1.3. Metode izolacije isparljivih spojeva..... | 6 |
| 1.3.1. Hidrodestilacija modificiranom aparaturom po Clevengeru..... | 10 |
| 1.4. Analiza isparljivih spojeva..... | 11 |
| 1.4.1. Vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa | 12 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 14 |
| 2.1. Priprema uzorka <i>Cladostephus spongiosus</i> | 15 |
| 2.2. Kemikalije i aparatura | 16 |
| 2.3. Hidrodestilacija modificiranom aparaturom po Clevengeru | 16 |
| 2.4. Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija sa spektrometrijom masa..... | 18 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 31 |
| 5. LITERATURA | 33 |

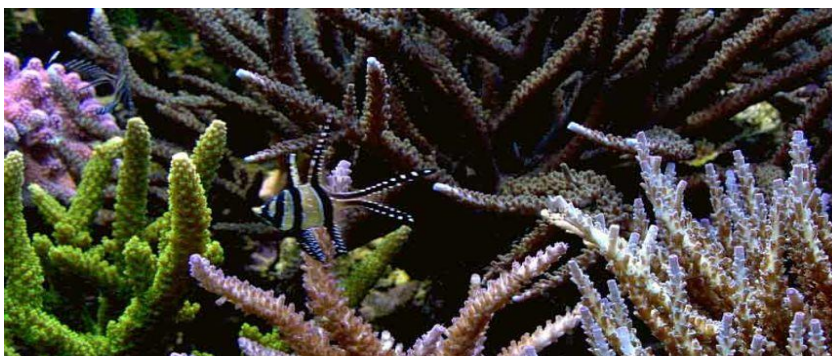
UVOD

Alge su fotosintetski, jednostanični, višestanični ili kolonijalni organizmi koji nastanjuju praktički sva staništa. Prema pigmentu koji sadržavaju dijele se u 3 grupe: smeđe (Phaeophyta), zelene (Chlorophyta) i crvene (Rhodophyta) alge.^[1] Najveći su proizvođači kisika i pročišćivači voda te jedni od glavnih bioloških indikatora u okolišu. Oko 3000 spojeva je identificirano u makroaglama, dok je u smeđim algama identificirano više od 1140 sekundarnih metabolita. Isparljivi spojevi koje smeđe alge oslobađaju pripadaju različitim grupama organskih spojeva kao što su alifatski i aromatski ugljikovodici, esteri, alkoholi, kiseline, fenoli, ketoni, aldehidi i terpeni.^[2] Proizvode mnoge strukturno različite spojeve čija se bioaktivnost očituje kroz različita farmakološka svojstva. Neka od njih su antivirusno, antibakterijsko, antifungalno, citotoksično, insekticidno, antihelminsko, antikancerogeno, antioksidativno i protuupalno djelovanje. Upravo ta svojstva mogu imati veliki utjecaj na zdravlje kao što je prevencija raka, kontrola tjelesne težine i zaštita imunološkog sustava, stoga se koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.^[3] U prehrambenoj industriji koriste se kao odličan izvor proteina, vlakana, vitamina, minerala i ugljikohidrata.^[4] Sadržaj sekundarnih metabolita u algama i njihova biološka aktivnost ovise o mnogim čimbenicima kao što su vrsta alge, sezona branja, lokacija uzorkovanja te ostalim utjecajima iz okoliša.

1. OPĆI DIO

1.1. Podjela algi

Alge su autotrofni, fotosintetski jednostanični ili višestanični organizmi koji pripadaju carstvu biljaka. Njihovo tijelo nije podijeljeno na stabljiku, list i korijen kao kod kopnenih biljaka, već se njihovo tijelo naziva steljka ili talus. Alge koje lebde ili plutaju u vodi čine skupinu planktona, a one pričvršćene za pijesak, stijene ili dno čine bentos. Sadrže prirodne pigmente kao što su klorofil i karotenoidi. Prema pigmentu kojeg sadrže makroalge se mogu svrstati u tri klase: zelene alge (Chlorophyta), smeđe alge (Phaeophyta) i crvene alge (Rhodophyta).^[1] Pripadaju u nadcarstva eukariota i prokariota te carstvu monera i protista. Nadalje, alge se dijele na plantae, eubacteria, kromiste i protozoa. Temeljna podjela je na mikroalge i makroalge. Mikroalge mogu biti jednostanični i višestanični organizmi, a često ih se naziva samostalnom vrstom između bakterija i biljaka. Zbog njihove jednostavne stanične građe imaju mogućnost rasta u nepovoljnim uvjetima, što je njihova osnovna karakteristika.^[5] Makroalge su brzorastuće morske i slatkovodne biljke koje mogu doseći visinu i do 60 m. Apsorbiraju hranjive tvari kroz samu strukturu stanica, površinom svoje steljke, jer nemaju korijen kao kopnene biljke. Sve makroalge su fotosintetski organizmi pa ovise o sunčevoj energiji. Temelj su prehranbenog lanca za vodene organizme jer im osiguravaju hranu, kisik i služe kao stanište. Procjenjuje se da postoji oko 25.000 vrsta algi s raznolikom upotrebom. Neke alge koriste se i u ishrani životinja i čovjeka, osobito u Aziji pa tamo dominira i njihov uzgoj.^[6] Služe i kao jedna od glavnih sirovina u farmaceutskoj, prehrambenoj i tekstilnoj industriji. Mnoge alge naseljavaju samo čiste vode pa se koriste u bioindikaciji kvalitete i zagađenosti vode.^[7]



Slika 1. Raznolikost algi, preuzeto s mrežne stranice

<https://ezadar.net.hr/dogadaji/2401375/upoznajte-morske-alge/>

1.1.1. Smeđe alge

Smeđe alge (lat. Phaeophyceae) su organizmi koji žive isključivo u morima. Obično su pričvršćene na kamenu podlogu, stijene ili druge organizme pa čak i na druge alge. Danas je u svijetu poznato oko 1.500 različitih vrsta smeđih algi koje uglavnom nastanjuju hladna predjela mora i oceana. Smeđe alge (Slika 2.) nastanjene u morskim predjelima toplijim od 20 °C su manje prikladne za proizvodnju alginata (natrijeve i kalcijeve soli prirodnog jestivog polisaharida alginske kiseline još nazvane algin) i rijetko se koriste kao hrana.^[8] Boja vrste varira od tamno smeđe do maslinastozelene, ovisno o udjelu dominantnog smeđeg pigmenta ksantofila, odnosno fukoksantina, i njegovom maskiranju klorofila *a* i *c* te ostalih karotenoida.^[7] S obzirom na građu i veličinu, vrste smeđih algi se međusobno znatno razlikuju. Smeđe alge su obično velike i kreću se od divovske morske trave (kelp) koja može biti dugačka do 45 m do manjih vrsta dugih 30-60 cm.^[8] Razmnožavanje ovih algi može biti vegetativno, spolno i nespolno. Produkti fotosinteze su polisaharidi, masti, male količine jednostavnih šećera i alkoholi.^[9] Jadransko more obiluje smeđim algama od kojih su najbrojnije alge roda *Sargassum*, *Padina* i *Cystoseira* te endemska vrsta smeđe alge Jadranski bračić (lat. *Fucus virsoides*) koji obitava samo u čistom moru pa je prirodni pokazatelj njegove čistoće (Slika 3.).^[10]



Slika 2. Smeđe alge, preuzeto s mrežne stranice

<https://www.istockphoto.com/photos/brown-algae>



Slika 3. Jadranski bračić, preuzeto s mrežne stranice

https://dalibor-andres.from.hr/uw/jas_002.htm

1.2. Isparljivi organski spojevi algi

Alge su bogate različitim isparljivim spojevima, a najzastupljenije skupine spojeva su terpeni, aldehidi i ketoni, alkoholi, kiseline, amini, halogenirani spojevi i dr. Halogenirani spojevi nisu prisutni u kopnenim biljkama i specifični su za alge i morske organizme.^[11] Ovisno o vrsti alge razlikuje se i njihov kemijski sastav. U smeđim algama prevladava *n*-pentadekan, a u crvenim algama *n*-heptadekan. Međutim, ugljikovodici smeđih algi značajno variraju (od gotovo zasićenih do potpuno olefinskih), a količina alkana i alkena može varirati unutar različitih dijelova iste alge.^[12] Budući da makroalge žive u ekstremnim uvjetima, moraju razviti mehanizme obrane i naučiti se prilagoditi tim promjenama u okolišu. Zbog toga makroalge proizvode sekundarne metabolite koji posjeduju bioaktivnost. Crvene alge najveći su proizvođači bioaktivnih spojeva koji se mogu primijeniti u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Neki od najvažnijih i najistraživanijih bioaktivnih spojeva iz morskih makroalgi su polifenoli, polisaharidi, karotenoidi i višestruko nezasićene masne kiseline. Karotenoidi predstavljaju pigmente koji algama, uz klorofil, daju karakterističnu boju. Karotenoidi fukoksantin,

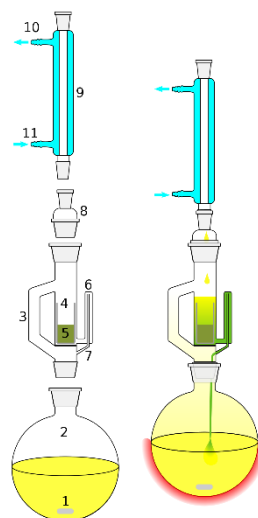
violaksantin i β -karoten su pronađeni u smeđim morskim makroalgama.^[13] Najzastupljenije višestruko nezasićene masne kiseline (*engl.* polyunsaturated fatty acid, PUFA) u smeđim algama su arahidonska i linoleinska kiselina. PUFA su pokazale antikancerogeno djelovanje (proapoptotičko djelovanje na HeLa stanice humanog adenokarcinoma vrata maternice).^[12] Florotanini, posebna vrsta polifenola, uglavnom prisutni u smeđim algama, pokazuju širok raspon bioloških aktivnosti kao što su antidijabetičko djelovanje, antiproliferativno djelovanje, aktivnost inhibicije acetilkolinesteraze, anti-HIV aktivnost i mnoge druge.^[14] Visoki udio ukupnih isparljivih spojeva algi čine terpeni (monoterpeni, seskviterpeni i diterpeni), specijalizirani metaboliti algi i biljaka koji čine veliku strukturno raznoliku skupina spojeva (izoprenoida) s općom formulom $(C_5H_8)_n$. Neki terpeni izolirani i identificirani iz smeđih algi su germakren D, gleenol, limonen, epi-bicikloseskvifelandren i dr. Germakren D se smatra odgovornim za citotoksičnu aktivnost. Epi-bicikloseskvifelandren se povezuje s antidermatofitnim djelovanjem, a gleenol je pokazao termiticidno i antihelminitičko svojstvo (protiv termita i parazita).^[15]

1.3. Metode izolacije isparljivih spojeva

Prije početka izolacije isparljivih spojeva potrebno je poznavati uzorak i pažljivo odabrati metodu izolacije koja treba osigurati izolaciju arome s minimalnim gubitcima i bez nastajanja neželjenih nusprodukata i artefakata. U cilju dobivanja cjelovitog profila isparljivih organskih spojeva treba imati na umu sve prednosti i nedostatke različitih metoda izolacije. Klasične metode za izolaciju isparljivih spojeva su: metode ekstrakcije otapalima, destilacijske metode, tehnike izolacije vršnih para, sorpcijske tehnike i prešanje.

Ekstrakcija se temelji na različitoj topljivosti uzorka između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Kod provedbe ekstrakcije otapalima, otapalo mora biti niske temperature vrenja kako bi se moglo lako ukloniti, a da ne dođe do gubitaka željenih isparljivih spojeva te uz to treba biti pogodno za ekstrakciju polarnih i nepolarnih spojeva. Za izolaciju isparljivih spojeva iz krutog materijala najčešće se provodi kontinuirana ekstrakcija kruto-tekuće u aparaturi prema Soxhletu (Slika 4.). Glavne prednosti ekstrakcije u aparaturi prema Soxhletu su povećanje ekstrakcijskog iscrpka i provođenje procesa na

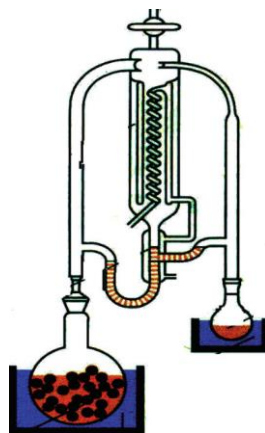
umjerenim temperaturama što je dobro zbog moguće prisutnih termički nestabilnih tvari. Uz ekstrakciju tekuće-tekuće, kruto-tekuće postoje i ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim i supkritičnim otapalom koje se također često koriste ovisno o tome što je cilj izolacije.^[16]



Slika 4. Aparatura po Soxhletu, preuzeto s mrežne stranice

https://en.wikipedia.org/wiki/File:Soxhlet_extractor.svg

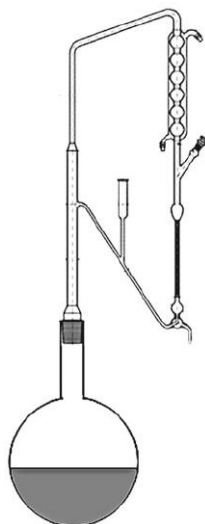
Aparatura po Likens–Nickersonu (Slika 5.) omogućava istovremenu izolaciju i koncentraciju isparljivih spojeva jer se njome provodi simultana ekstrakcija–destilacija. Prednosti ove metode izolacije su ušteda otapala zbog recikliranja otapala i kraće vrijeme provođenja procesa.



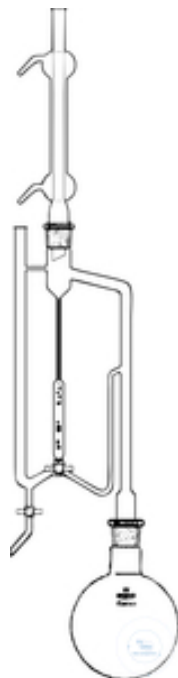
Slika 5. Aparatura po Likens-Nickersonu, preuzeto s mrežne stranice

<https://www.intechopen.com/chapters/66518>

Destilacija je metoda kod koje dolazi do zagrijavanja tekućine i njenog prevođenja u paru, a para se hlađenjem ukapljuje. Time se postiže razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, identifikacija tekućih tvari, čišćenje tekućih tvari te otparavanje organskih otapala. Navedena metoda dijeli se na vodenu destilaciju, vodeno–parnu destilaciju i destilaciju vodenom parom (parna destilacija). Sve vrste destilacije temelje se na istim principima, a razlikuju se u međusobnom kontaktu između biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare. Najpoznatije laboratorijske aparature za izolaciju isparljivih spojeva vodenom destilacijom su aparatura prema Europskoj farmakopeji (Slika 6.), aparatura po Ungeru (Slika 7.) te aparatura po Clevengeru.^[17]

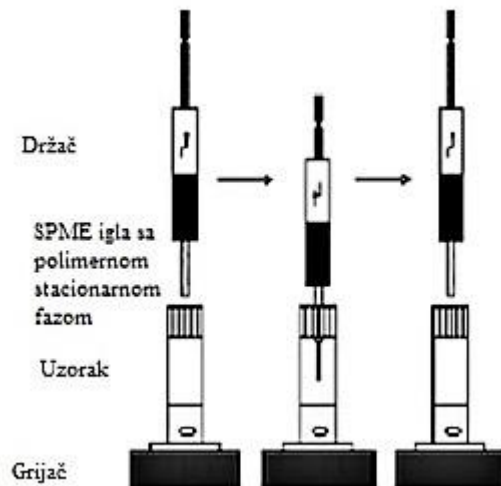


Slika 6. Aparatura prema Europskoj farmakopeji, preuzeto s mrežne stranice https://www.researchgate.net/figure/A-typical-Clevenger-circulatory-hydrodistillation-apparatus-reported-in-the-European_fig1_230671682



Slika 7. Aparatura po Ungeru, preuzeto s mrežne stranice <https://www.witeg.de/en/products/laboratory-glassware/miscellaneous/apparatus-for-the-determination-of-aromatic-oils>

Najčešće korištene sorpcijske tehnike su mikoekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. solid phase microextraction, SPME) i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću. Sorpcijske tehnike se temelje na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Tehnike izolacije vršnih para smatraju se učinkovitim i jednostavnim metodom jer u jednom koraku bez korištenja otapala omogućuju tri radnje: uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje.^[18] Dijele se na dinamičke i statičke. Kod dinamičke izolacije vršnih para isparljivi spojevi se nalaze iznad uzorka i kontinuirano se odnose plinom nositeljem (helij ili dušik) u zamke (engl. trap). Isparljivi spojevi se u trapu koncentriraju i time se postiže veća osjetljivost nego kod statičke izolacije vršnih para. Kod automatske statičke izolacije vršnih para igla se automatski umetne u hermetički zatvorenu bočicu s uzorkom, koja se zagrijava na određenu temperaturu te se vrši tlačjenje plinom nositeljem (Slika 8.). Nakon postizanja ravnoteže tankom iglom se uzorkuju pare iznad uzorka te odvede do GC injektora.^[19]

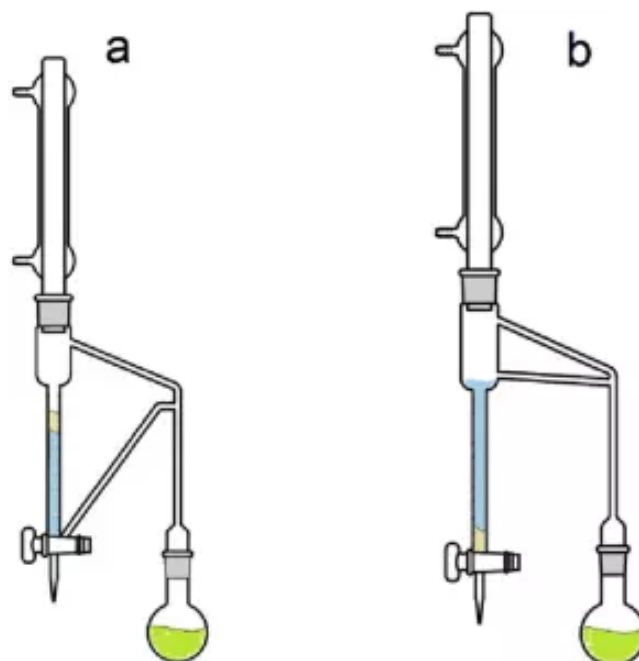


Slika 8. Uređaj za HS-SPME, preuzeto s mrežne stranice

<https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A309/datastream/PDF/view>

1.3.1. Hidrodestilacija modificiranom aparaturom po Clevengeru

Hidrodestilacija ili vodena destilacija je tehnika izolacije isparljivih spojeva koja se najčešće koristi u laboratorijima. Ova tehnika je pogodna za izolaciju isparljivih spojeva iz usitnjenih biljnih materijala. Izvodi se pri atmosferskom tlaku i temperaturi od oko 100 °C, to jest pri temperaturi vrenja vode. Usitnjeni biljni materijal se uronjen u vodi u tikvici zagrijava do vrenja preko kalote ili direktno plamenom. Isparljivi spojevi iz biljnog materijala isparavaju zajedno s vodom te se potom u hladilu kondenziraju i skupljaju u trapu u središnjoj cijevi aparature po Clevengeru (Slika 9.). Ovisno o tome je li eterično ulje veće ili manje gustoće od vode postoji modificirani dio aparature. Najveća mana hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru je trajanje postupka izolacije do nekoliko sati.^[17]



Slika 9. Aparatura po Clevengeru; a) za eterična ulja manje gustoće od vode;
b) za eterična ulja veće gustoće od vode

preuzeto s mrežne stranice <https://www.alibaba.com/showroom/clevenger-apparatus.html>

1.4. Analiza isparljivih spojeva

Kromatografske tehnike služe za analizu smjese isparljivih spojeva. Kromatografija se zasniva na različitoj raspodjeli uzoraka iz smjese između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze.^[20] Kromatografija se dijeli prema obliku kromatografske podloge (nosaču) te prema pokretnoj i nepokretnoj fazi.^[21]

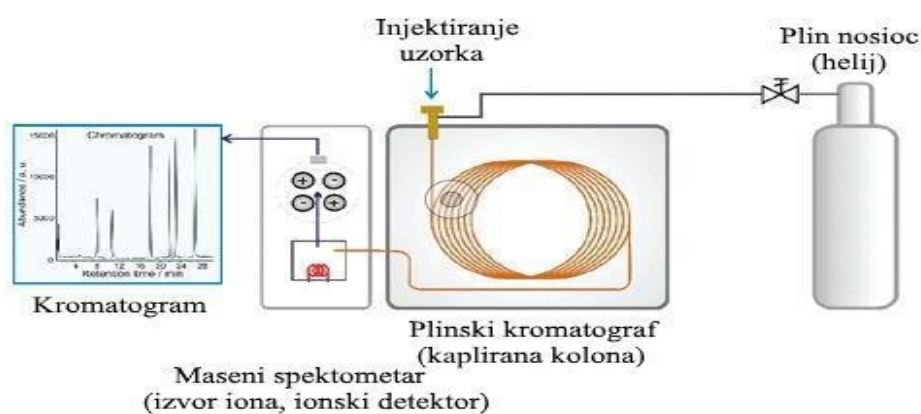
Prema obliku kromatografske podloge, tj. nosaču kromatografija se može podijeliti na plošnu (planarnu) i kolonsku kromatografiju (kromatografiju na stupcu). U plošnoj kromatografiji pokretna faza se kreće kroz nepokretnu fazu nanešenu na tanku plohu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije, a kod kromatografije na stupcu kolona je ispunjena nepokretnom fazom i pokretna faza prolazi kroz nju odjeljujući komponente iz smjese djelovanjem tlaka ili sile gravitacije.^[22]

Plošna kromatografija se s obzirom na pokretnu fazu dijeli se na kromatografiju na papiru (engl. paper chromatography, PC) i tankoslojnu (engl. thin layer chromatography, TLC), dok se s obzirom na agregatno stanje pokretne faze kolonska kromatografija dijeli se na: tekućinsku (engl. liquid chromatography, LC), plinsku (engl. gas chromatography, GC) i kromatografiju sa superkričnim fluidom (engl. supercritical fluid chromatography, SFC).^[21] Pokretnu fazu plinske kromatografije čini inertni plin (argon, dušik, helij) te se odvajanje komponenti na koloni ovisno o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. S obzirom na nepokretnu fazu, plinska kromatografija može biti plinsko adsorpcijska (engl. gas-solid chromatography GSC) i plinsko tekućinska (engl. gas-liquid chromatography GLC). Kod tekućinske kromatografije pokretna faza je tekućina kao što su *n*-heksan i etil-acetat.^[23] S obzirom na nepokretnu fazu može biti adsorpcijska, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna, razdjelna i kromatografija isključivanjem.^[24]

1.4.1. Vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) omogućuje identifikaciju malih količina tvari, tj. spojeva s niskim granicama detekcije (osjetljivost tehnike je u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari). (Slika 10.) GC-MS analize mogu se raditi na tekućim, plinovitim i čvrstim uzorcima, ali su ograničene na isparljive spojeve. Pokretnu fazu plinske kromatografije čini inertni plin (argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid) dok je nepokretna faza neisparljiva tekućina nanosena na kruti nosač. Mjesto za injektiranje uzorka i detektor griju se na temperaturu koja je malo viša od najviše temperature na koloni zbog osiguravanja brzog uplinjavanja te sprječavanja kondenzacije.^[21] Komponente smjese u pokretnoj fazi se na koloni odvajaju, eluiraju s kolone i dolaze do detektora. Dok uzorak putuje kroz kolonu, zbog različitih kemijskih svojstava komponente smjese se razdvajaju te trebaju različito vrijeme (vrijeme zadržavanja) za izlazak iz plinskog kromatografa. Odijeljene komponente ulaze u spektrometar masa jedna za drugom gdje se molekule analita pretvaraju u ione primjenom energije. Spektrometar masa se nalazi pod visokim vakuumom. Plinovita molekula analita ulazi u ionizator gdje se bombardira elektronima što dovodi do gubitka elektrona i formiranja molekuskog kationa M^+ koji se razlaže u niz

fragmenata. Rezultat fragmentiranja je veliki broj iona različitih masa među kojima je najteži molekularni kation, a fragmentirani ioni različitih nižih masa. O molekularnoj formuli, strukturi analita, gdje je došlo do prekida veze i koji je dio zadržao naboj ovisi kako će izgledati molekularni ion te fragmentirani ioni te se na taj način stvara ionski snop.^[25] Ionski snop se prolazi kroz leće i dolazi do kvadrupolnog filtra masa koji je sastavljen od četiri elektrode koje su paralelne s ionskim snopom. Kroz njega mogu proći samo ioni određenog omjera mase i naboja (m/z) sa stabilnom putanjom koji potom stižu na detektor dok se ostali uklanjaju. Detektor je elektronski multiplikator koji pojačava dobiveni signal.^[25] Rezultat analize je spektar masa s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) nastalih fragmenata. Na grafičkom prikazu spektrometra masa na osi apscisa označava se omjer mase i naboja (m/z) karakterističan za pojedinu komponentu, a na ordinati se nalaze njihovi relativni intenziteti. Omjer m/z i omjeri visina pika na osi y moraju se preklopiti ako se radi o istom spoju. Struktura spoja se određuje primjenom računalnih baza uspoređujući spektre masa. Prednosti GC-MS metode su visoka preciznost, osjetljivost, selektivnost, mala potrebna količina uzorka (najčešće 1 μ L) i relativno kratko vrijeme analize, a nedostatak je visoka temperatura injektora pa prolaskom kroz kolonu može doći do razgradnje termički labilnih komponenti iz uzorka. U ovoj metodi koriste se tvari koje se mogu prevesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C, a da se pri tom ne raspadnu.^[26] Krajnji rezultat analize isparljivih spojeva je kromatogram ukupnih iona i spektar masa.



Slika 10. Vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa preuzeto s mrežne stranice, [stancin_hrvoje_fsb_2018_diplo_sveuc.pdf](http://stancin.hrvoje.fsb.2018.diplo.sveuc.pdf)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprema uzorka *Cladostephus spongiosus*

Smeđa alga *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh 1817 je uzorkovana dva puta tijekom iste sezone, u svibnju i kolovozu 2021. godine, uz obalu otoka Čiova (43,493373° N; 16,272519° E) na dubini od 20 do 120 cm pri temperaturi mora od 20,1 °C (svibanj) i 28,1°C (kolovoz). Uzorci su odmah nakon uzorkovanja dostavljeni u laboratorij u nepropusnim vrećicama s morskom vodom. Dio uzoraka je sušen 10 dana u mraku na sobnoj temperaturi dok je drugi dio čuvan u zamrzivaču.

Smeđa makroalga *C. spongiosus*, nekada poznata kao *Cladostephus verticillatus*, je široko rasprostranjena i česta (Slika 11.). Široko je rasprostranjena u Sredozemnom moru, a može se naći i uz atlantske obale Maroka (južna granica) do Irske (sjeverna granica).^[27] Uglavnom nastanjuje stjenovita i kamenita područja zahvaćena pijeskom u plitkim predjelima. Prilično kruti, uski i razgranati listovi rastu iz diskoidnog držača, prekriveni malim grančicama raspoređenim u kolutove. Naraste do maksimalne duljine od oko 15 cm.^[28]



Slika 11. *C. spongiosus*, preuzeto s mrežne stranice

https://www.seaweed.ie/descriptions/Cladostephus_spongiosus.php

2.2. Kemikalije i aparatura

Kemikalije korištene u izradi ovog diplomskog rada su:

- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Korištene aparature su:

- tehnička vaga Kern, model 572, Balingen, Njemačka,
- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru, Deottolab d.o.o., Zagreb, Hrvatska),
- vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD): plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E.

2.3. Hidrodestilacija modificiranom aparaturom po Clevengeru

Proces hidrodestilacije uzoraka algi proveden je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (Slika 12.). Masa usitnjenog uzorka, 50 g svježeg i 30 g suhog uzorka, prenesena je zasebno u okruglu tikvicu od 2 L koja je sastavni dio modificirane aparature po Clevengeru. U središnju cijev aparature stavljen je „trap“ (1 mL smjese pentana i dietil-etera (1:2 v/v)) u kojem se skuplja destilat. Hidrodestilacija je provođena 2,5 sati te je po završetku procesa organski trap s destilatом, tj. eteričnim uljem alge prenesen u staklene bočice od 10 mL. Otapalo se naknadno uparilo zagrijavanjem.



Slika 12. Modificirana aparatura po Clevengeru

2.4. Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Analiza isparljivih spojeva provedena je pomoću vezanog sustava plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). GC-MS, proizvođača Agilent Technologies (Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD), sastoji se od plinskog kromatografa 8890A, spektrometra masa 5977E MSD i računala. Uzorci su injektirani automatskim injektorom PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Švicarska). Kapilarna kolona korištena u analizi uzoraka, HP-5MS dimenzija 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm debljina filma (Agilent Technologies, Palo Alto, Santa Clara, CA, SAD), sadrži nepokretnu fazu sastava 5% difenil–95% dimetilpolisiloksan (Slika 13.).



Slika 13. Vezani sustav plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Uvjeti rada plinskog kromatografa za kolonu HP-5MS :

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C /min,
- vrijeme u kojem izlazi otapalo tzv. „solvent delay“: 3 min (korišten da bi se izbjeglo otapalo trapa)
- plin nositelj: helij s protokom 1 mL/min
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja: 1:50

Uvjeti rada spektrometra masa:

- temperatura ionskog izvora: 230 °C
- energija ionizacije: 70 eV,
- interval snimanja masa: 30-350 m/z.

Identifikacija isparljivih spojeva prema dobivenim podacima s kromatograma i spektara masa vršila se usporedbom dobivenih indeksa zadržavanja (vrijeme zadržavanja interpolirano između susjednih *n*-alkana) te usporedbom spektara masa s bazama NIST 17 i WILEY 9 i rezultatima prijašnjih analiza izvršenih u Zavodu za organsku kemiju.

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proučavana je sezonska promjena u kemijskom sastavu hidrodestilata alge *C. spongiosus*. Uzorkovanje je provedeno u svibnju i kolovozu iste godine da bi se uočile eventualne razlike u kemijskom sastavu hidrodestilata obzirom na temperaturu mora i rast alge. Nakon provedene hidrodestilacije modificiranom aparaturom po Clevengeru, dobiveni hidrodestilat je analiziran vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Rezultati analize prikazani su tablicom, grafovima te određenim kromatogramima i spektrima masa.

Tablica 1. Isparljivi spojevi hidrodestilata *C. spongiosus*.

| Broj | Spoj | RI | Površinski udio (%) | | | |
|------|--|------|---------------------|------|---------|------|
| | | | Svibanj | | Kolovoz | |
| | | | Svježe | Suho | Svježe | Suho |
| 1 | diaceton alkohol (4-hidroksi-4-metilpentan-2-on) | <900 | 0,10 | / | / | / |
| 2 | 1,2,5,5-tetrametilciklopenta-1,3-dien | <900 | / | 0,15 | / | / |
| 3 | (<i>E</i>)-heks-2-enal | <900 | 0,15 | 1,41 | 0,15 | 0,23 |
| 4 | etilbenzen | <900 | / | 0,15 | / | / |
| 5 | <i>m</i> -ksilen (1,3-dimetilbenzen) | <900 | 0,04 | 0,27 | 0,03 | / |
| 6 | heksan-1-ol | <900 | / | / | 0,08 | 0,02 |
| 7 | heptan-2-on | <900 | / | 0,14 | / | 0,07 |
| 8 | bromoform (tribrommetan) | <900 | / | / | 0,03 | / |
| 9 | <i>o</i> -ksilen (1,2-dimetilbenzen) | <900 | 0,09 | / | / | / |
| 10 | (<i>Z</i>)-hept-4-enal | 901 | / | 0,16 | 0,02 | / |
| 11 | heptanal | 906 | / | 0,64 | 0,02 | 0,10 |
| 12 | sorbaldehid ((<i>E,Z</i>)-heksa-2,4-dienal) | 913 | / | 0,06 | / | / |
| 13 | 2-metilciklopent-2-en-1-on | 914 | / | / | 0,04 | / |
| 14 | 2-jodopentan | 931 | / | 0,03 | 0,03 | 0,04 |
| 15 | brombenzen | 940 | / | 0,05 | / | / |
| 16 | 1-butoksiopropan-1-ol | 948 | / | / | 0,01 | / |
| 17 | (<i>E</i>)-hept-2-enal | 961 | / | 0,06 | / | / |
| 18 | benzaldehyd | 969 | 0,04 | 0,47 | 0,09 | 0,16 |
| 19 | dimetil-trisulfid | 978 | / | 0,13 | / | / |
| 20 | kapronska kiselina (heksanska kiselina) | 979 | / | / | 0,02 | / |
| 21 | dimetil-trisulfid | 979 | / | / | / | 0,03 |
| 22 | okt-1-en-3-on | 981 | 0,08 | / | / | |
| 23 | okt-1-en-3-ol | 983 | / | 0,29 | 0,04 | 0,05 |

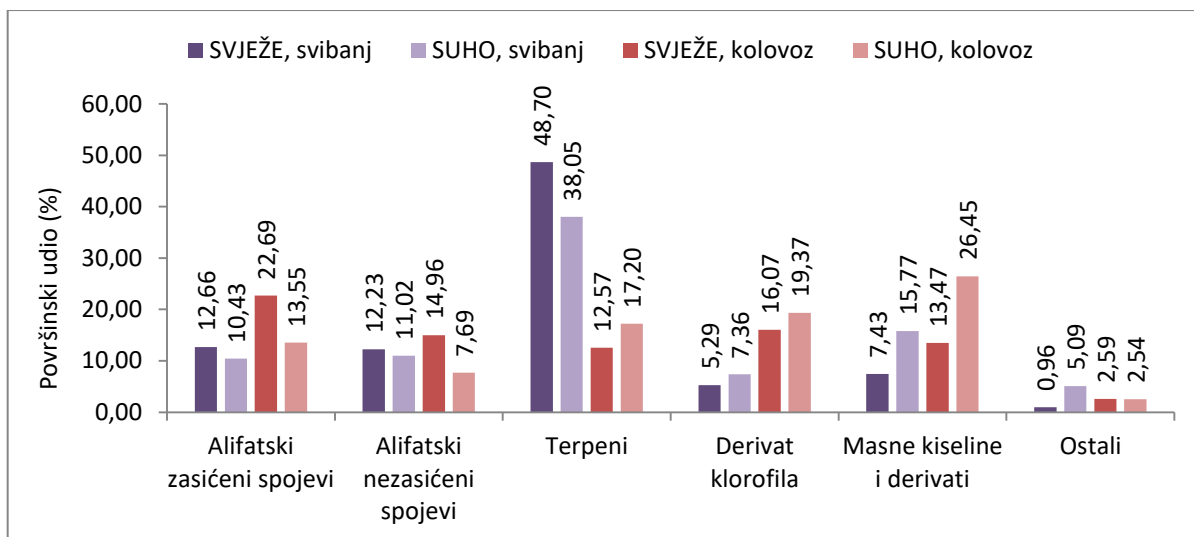
| | | | | | | |
|----|--|------|------|------|------|------|
| 24 | oktan-2,5-dion | 988 | / | 0,28 | 0,22 | / |
| 25 | oktan-3-on | 988 | / | / | / | 0,27 |
| 26 | 6-metilhept-5-en-2-on | 988 | / | 0,23 | / | / |
| 27 | 2-pentilfuran | 996 | 0,04 | 0,61 | 0,10 | 0,15 |
| 28 | 5-metilhept-4-en-3-on | 1000 | / | / | 0,05 | / |
| 29 | (Z)-2-(1-pentenil)furan | 1004 | / | 0,24 | / | / |
| 30 | oktanal | 1006 | / | / | 0,02 | 0,05 |
| 31 | (E,E)-hepta-2,4-dienal | 1016 | 0,10 | 0,11 | 0,05 | 0,03 |
| 32 | 2-etilheksan-1-ol | 1034 | / | / | 0,08 | 0,19 |
| 33 | limonen (1-metil-4-(1-metiletetil)cikloheksen) | 1036 | / | 0,04 | 0,04 | / |
| 34 | 2,2,6-trimetilcikloheksanon | 1041 | / | 0,12 | / | / |
| 35 | benzenacetaldehid (2-fenilacetaldehid) | 1051 | 0,08 | 0,40 | 0,13 | 0,15 |
| 36 | (E)-okt-2-enal | 1064 | / | 0,27 | 0,06 | 0,11 |
| 37 | (E)-okt-2-en-1-ol | 1072 | 0,06 | / | / | / |
| 38 | acetofenon (1-feniletanon) | 1073 | / | 0,10 | 0,04 | 0,05 |
| 39 | p-tolualdehid (4-metilbenzaldehid) | 1074 | / | 0,03 | / | / |
| 40 | oktan-1-ol | 1075 | 0,27 | / | / | / |
| 41 | (E,E)-okta-3,5-dien-2-on | 1076 | / | 0,14 | 0,13 | 0,08 |
| 42 | p-toluidin (4-metilbenzenamin) | 1080 | / | / | 0,05 | / |
| 43 | nonan-3-on | 1087 | / | 0,09 | 0,05 | 0,06 |
| 44 | 1-metiltipentan-3-on | 1090 | 0,21 | 0,10 | 0,04 | 0,06 |
| 45 | nonan-2-on | 1095 | / | 0,04 | / | / |
| 46 | (E,Z)-okta-3,5-dien-2-on | 1097 | 0,35 | 0,53 | / | 0,30 |
| 47 | 2-metiloktan-2-ol | 1098 | / | / | 0,53 | / |
| 48 | linalool (3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-ol) | 1103 | / | 0,10 | / | / |
| 49 | nonanal | 1108 | / | 0,37 | 0,02 | 0,05 |
| 50 | 2,6-dimetilcikloheksanol | 1114 | 0,07 | 0,27 | 0,09 | 0,09 |
| 51 | benzil-nitril (2-fenilacetoneitril) | 1146 | / | 0,05 | 0,02 | / |
| 52 | 4-ketoizoforon (3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1,4-dion) | 1150 | / | 0,25 | 0,03 | 0,04 |
| 53 | (E,Z)-nona-2,6-dienal | 1158 | / | 0,12 | 0,04 | 0,04 |
| 54 | (Z)-non-2-enal | 1165 | / | 0,15 | 0,03 | 0,04 |
| 55 | 3,5-dimetilbenzaldehid | 1168 | / | 0,03 | / | / |
| 56 | 2'-hidroksiacetofenon (1-(2-hidroksifenil)etanon) | 1168 | / | / | 0,03 | / |
| 57 | benzilmetil-sulfid (metil-sulfanil-metilbenzen) | 1170 | / | 0,12 | / | / |
| 58 | 2,4-dimetilbenzaldehid | 1180 | / | 0,18 | 0,06 | / |

| | | | | | | |
|----|---|------|------|------|------|------|
| 59 | 1,3-dimetiletibenzen | 1188 | / | 0,13 | / | / |
| 60 | <i>p</i> -metilacetofenon (1-(4-metilfenil)etanon) | 1190 | / | / | 0,09 | / |
| 61 | 3,4-ksilenol (3,4-dimetilfenol) | 1197 | 0,07 | / | / | 0,12 |
| 62 | dekanal | 1209 | / | 0,05 | 0,02 | / |
| 63 | β -ciklocitral (2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-karboksaldehid) | 1226 | / | 0,30 | 0,03 | / |
| 64 | benzotiazol (1,3-benzotiazol) | 1228 | / | / | 0,16 | 0,06 |
| 65 | β -ciklohomocitral (2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-acetaldehid) | 1263 | / | 0,17 | 0,04 | / |
| 66 | (<i>E</i>)-dec-2-enal | 1266 | / | 0,05 | / | / |
| 67 | (<i>E,Z</i>)-deka-2,4-dienal | 1296 | 0,05 | / | / | / |
| 68 | indol | 1297 | / | 0,33 | 0,09 | 0,06 |
| 69 | undekanal | 1311 | / | 0,07 | 0,08 | 0,09 |
| 70 | (<i>E,E</i>)-deka-2,4-dienal | 1321 | 0,23 | 0,34 | 0,17 | 0,12 |
| 71 | α -kubeben (4,10-dimetil-7-propan-2-iltriciklo[4.4.0.01,5]dek-3-en) | 1355 | 0,03 | / | / | / |
| 72 | β -burbonen (1-metil-5-metiliden-8-propan-2-iltriciklo[5.3.0.02,6]dekan) | 1388 | 0,26 | 0,14 | / | / |
| 73 | β -kubeben (10-metil-4-metiliden-7-propan-2-iltriciklo[4.4.0.01,5]dekan) | 1394 | 1,84 | 0,87 | 0,14 | / |
| 74 | dodekanal | 1412 | 0,08 | 0,14 | 0,18 | 0,14 |
| 75 | β -cedren (2,6,6-trimetil-8-metilidentriciklo[5.3.1.01,5]undekano) | 1423 | 0,16 | / | / | / |
| 76 | α -jonon ((<i>E</i>)-4-(2,6,6-trimetilcikloheks-2-en-1-il)but-3-en-2-on) | 1433 | 0,09 | 0,12 | 0,06 | 0,04 |
| 77 | endobergamoten (endo-2,6-dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)biciklo[3.1.1]hept-2-en) | 1441 | / | / | 0,03 | / |
| 78 | aromadendren (1,1,7-trimetil-4-metiliden-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-oktahidro-1aH-ciklopropa[e]azulen) | 1455 | 0,08 | / | / | / |
| 79 | geranil-aceton ((<i>5E</i>)-6,10-dimetilundeka-5,9-dien-2-on) | 1458 | 0,05 | 0,25 | / | / |
| 80 | aloaromadendren (1,1,7-trimetil-4-metiliden-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-oktahidro-1aH-ciklopropa[e]azulen) | 1465 | 0,09 | / | / | / |
| 81 | β -gurjunen (1,1,4-trimetil-7-metiliden-2,3,4,4a,5,6,7a,7b-oktahidro-1aH- | 1467 | / | / | 0,04 | / |

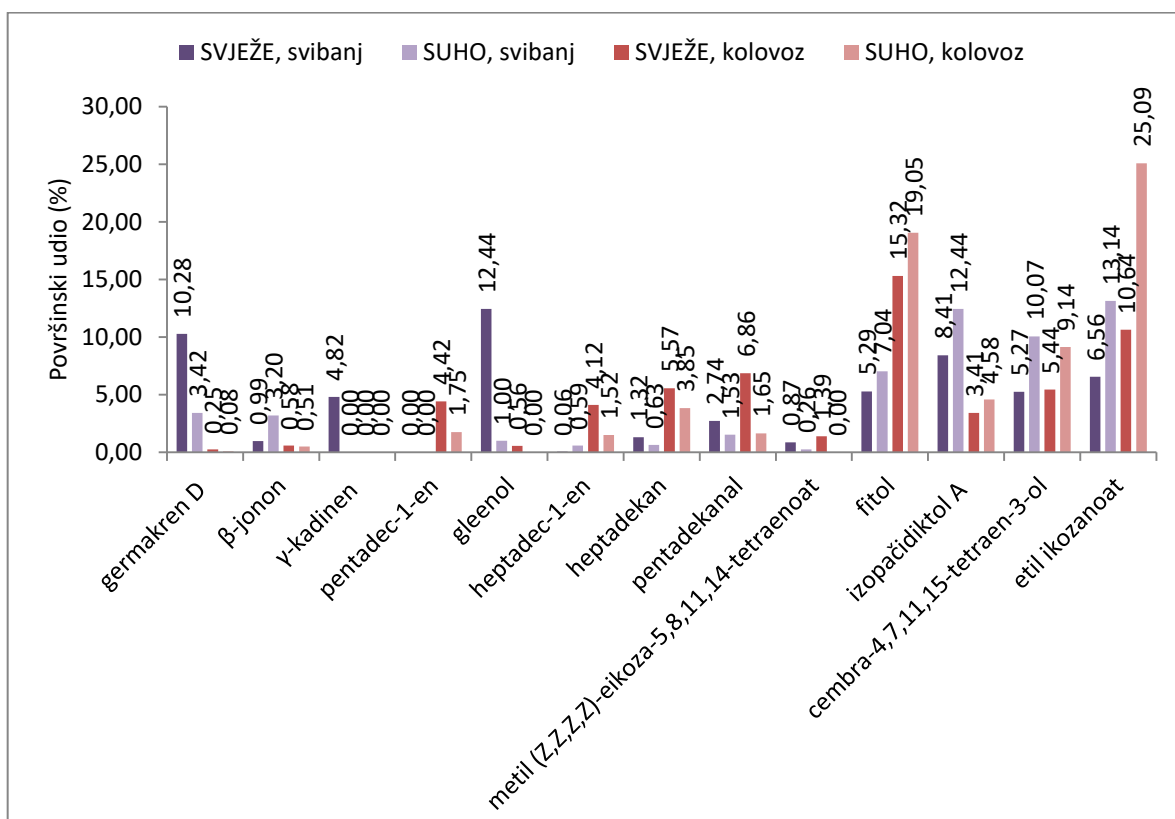
| | | | | | | |
|-----|--|------|-------|------|------|------|
| | ciklopropa[e]azulen) | | | | | |
| 82 | γ -gurjunen (1,4-dimetil-7-prop-1-en-2-il-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktahidroazulen) | 1476 | 0,07 | / | / | / |
| 83 | dodekan-1-ol | 1479 | 0,16 | 0,14 | 0,22 | / |
| 84 | α -murolen (1,2,4a,5,6,8a-heksahidro-4,7-dimetil-1-(1-metietil)naftalen) | 1481 | 0,08 | / | / | / |
| 85 | germakren D ((1E,6E)-1-metil-5-metiliden-8-propan-2-il-ciklodeka-1,6-dien) | 1485 | 10,28 | 3,42 | 0,25 | 0,08 |
| 86 | β -jonon ((E)-4-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)but-3-en-2-on) | 1490 | 0,99 | 3,20 | 0,58 | 0,51 |
| 87 | epi-bicikloseskvifelandren (4-metil-7-metiliden-1-propan-2-il-2,3,4,4a,5,6-heksahidro-1H-naftalen) | 1495 | / | 2,12 | / | / |
| 88 | γ -kadinen (4-metil-7-metiliden-1-propan-2-il-2,3,4,4a,5,6-heksahidro-1H-naftalen) | 1495 | 4,82 | / | / | / |
| 89 | γ -murolen (7-metil-4-metiliden-1-propan-2-il-2,3,4a,5,6,8a-heksahidro-1H-naftalen) | 1498 | 0,53 | / | / | / |
| 90 | pentadec-1-en | 1498 | / | 0,32 | 4,42 | 1,88 |
| 91 | pentadekan | 1503 | 1,65 | 0,96 | 2,40 | 1,21 |
| 92 | tridekanal | 1515 | 2,30 | 0,76 | 2,69 | 0,43 |
| 93 | 2,5-di- <i>tert</i> -butilfenol (2,5-di(1,1-dimetiletil)fenol) | 1519 | / | 0,28 | 0,57 | 0,33 |
| 94 | γ -kadinen (7-metil-4-metiliden-1-propan-2-il-2,3,4a,5,6,8a-heksahidro-1H-naftalen) | 1519 | 0,66 | / | / | / |
| 95 | δ -kadinen (4,7-dimetil-1-propan-2-il-1,2,3,5,6,8a-heksahidronaftalen) | 1530 | 0,84 | 0,38 | / | / |
| 96 | kadina-4,9-dien (3,8-dimetil-5-propan-2-il-1,2,3,5,6,8a-heksahidronaftalen) | 1557 | / | / | 0,11 | / |
| 97 | germakren-4-ol ((2E,7E)-1,7-dimetil-4-propan-2-il-ciklodeka-2,7-dien-1-ol) | 1580 | 0,23 | / | / | / |
| 98 | tridekan-1-ol | 1580 | / | 0,27 | / | 0,11 |
| 99 | gleenol (7-izopropil-2,10-dimetilspiro[4.5]dec-1-en-6-ol) | 1590 | 12,44 | 1,00 | 0,56 | / |
| 100 | 2-(metilmerkpto)benzotiazol | 1598 | / | / | 0,12 | / |
| 101 | tetradekanal | 1616 | 0,24 | 0,32 | 0,60 | 0,19 |
| 102 | benzofenon (difenilmetanon) | 1630 | / | / | 0,19 | 0,18 |
| 103 | τ -kadinol (1,6-dimetil-4-propan-2-il-3,4,4a,7,8,8a-heksahidro-2H-naftalen-1-ol) | 1647 | 0,42 | / | / | / |

| | | | | | | |
|-----|---|------|------|------|------|------|
| 104 | τ -murolol (1,6-dimetil-4-propan-2-il-3,4,4a,7,8,8a-heksahidro-2H-naftalen-1-ol) | 1647 | / | 0,14 | / | / |
| 105 | δ -kadinol (1,6-dimetil-4-propan-2-il-3,4,4a,7,8,8a-heksahidro-2H-naftalen-1-ol) | 1651 | 0,22 | / | / | / |
| 106 | α -kadinol (1,6-dimetil-4-propan-2-il-3,4,4a,7,8,8a-heksahidro-2H-naftalen-1-ol) | 1659 | 0,33 | 0,09 | / | / |
| 107 | heptadec-1-en | 1681 | 0,28 | / | / | / |
| 108 | ciklotetradekan | 1681 | / | / | 0,67 | / |
| 109 | tetradekanol | 1683 | / | 0,84 | / | 0,41 |
| 110 | heptadec-1-en | 1696 | 0,06 | 0,59 | 4,12 | 1,77 |
| 111 | heptadec-8-en | 1696 | 1,29 | / | / | / |
| 112 | heptadekan | 1704 | 1,32 | 0,63 | 5,57 | 3,85 |
| 113 | pristan (2,6,10,14-tetrametilpentadekan) | 1709 | / | / | 0,23 | / |
| 114 | pentadekanal | 1719 | 2,74 | 1,53 | 6,86 | 1,65 |
| 115 | 2-metil-8-metiliden-5-propan-2-il-11-tiatriciklo[5.3.1.02,6]undekan | 1740 | 0,24 | 0,15 | / | / |
| 116 | miristinska kiselina (tetradekanska kiselina) | 1770 | / | 0,13 | / | / |
| 117 | pentadekan-1-ol | 1778 | / | / | / | 0,13 |
| 118 | pentadekan-1-ol | 1783 | / | 0,62 | / | 0,45 |
| 119 | oktadec-1-en | 1788 | / | / | / | 0,17 |
| 120 | (Z)-heksadec-9-enal | 1796 | 0,12 | / | / | / |
| 121 | oktadec-1-en | 1796 | / | 0,04 | 0,17 | / |
| 122 | fitan (2,6,10,14-tetrametilheksadekan) | 1813 | / | / | 0,36 | 0,10 |
| 123 | heksadekanal | 1820 | / | / | 0,13 | 0,11 |
| 124 | heksahidrofarnezil-aceton (6,10,14-trimetilpentadekan-2-on) | 1850 | 0,41 | 2,44 | 1,59 | 1,92 |
| 125 | 4-(1-metil-1-feniletil)fenol | 1855 | / | / | 0,20 | / |
| 126 | <i>p</i> -kumilfenol (4-(1-feniletil)fenol) | 1855 | 0,14 | / | / | / |
| 127 | 4-(1-metil-1-feniletil)fenol | 1855 | / | 0,48 | / | 0,20 |
| 128 | (9Z)-heksadeka-1,9-dien | 1865 | / | 1,03 | / | 0,14 |
| 129 | diizobutil-ftalat (di(2-metilpropil) benzen-1,2-dikarboksilat) | 1872 | / | 0,51 | / | 0,96 |
| 130 | heksadekan-1-ol | 1885 | 0,24 | 1,52 | 0,42 | 0,65 |
| 131 | nonadec-1-en | 1897 | 2,94 | 0,87 | 2,51 | 0,65 |
| 132 | farnezil-aceton ((5E,9E)-6,10,14-trimetilpentadeka-5,9,13-trien-2-on) | 1923 | 0,08 | 0,51 | / | 0,29 |

| | | | | | | |
|-----|---|------|------|-------|-------|-------|
| 133 | izofitol (3,7,11,15-tetrametilheksadec-1-en-3-ol) | 1953 | / | 0,33 | 0,39 | 0,22 |
| 134 | dibutil-ftalat (dibutil-benzen-1,2-dikarboksilat) | 1967 | / | 0,23 | / | / |
| 135 | palmitinska kiselina (heksadekanska kiselina) | 1972 | / | 2,24 | / | 0,96 |
| 136 | (Z)-oktadecen-9-al | 1981 | / | / | 0,11 | / |
| 137 | eikosan | 2003 | / | / | 0,25 | 1,08 |
| 138 | oktadekanal | 2024 | 0,68 | 0,35 | 0,13 | 0,23 |
| 139 | metil-oktadecil-eter (1-metoksioktadekan) | 2032 | 2,72 | / | 1,60 | 1,29 |
| 140 | tunbergol (4-izopropil-1,7,11-trimetilciklotetradeka-2,7,11-trien-1-ol) | 2045 | 2,63 | 2,57 | 0,91 | 0,83 |
| 141 | (Z,Z,Z)-oktadeka-9,12,15-trien-1-ol | 2050 | / | / | / | 0,47 |
| 142 | metil (Z,Z,Z,Z)-eikoza-5,8,11,14-tetraenoat | 2050 | 0,87 | 0,26 | 1,39 | / |
| 143 | (Z,Z,Z)-oktadeka-9,12,15-trien-1-ol | 2056 | 3,28 | 0,25 | 1,06 | / |
| 144 | (Z)-oktadec-9-en-1-ol | 2061 | 0,43 | 0,57 | 0,52 | 0,52 |
| 145 | (Z,Z)-oktadeka-3,13-dien-1-ol | 2070 | 0,17 | 0,42 | 0,37 | 0,26 |
| 146 | oktadekan-1-ol | 2084 | / | 0,20 | 0,29 | 0,66 |
| 147 | fitol (3,7,11,15-tetrametilheksadec-2-en-1-ol) | 2117 | 5,29 | 7,04 | 15,32 | 19,05 |
| 148 | izopačidiktol A (3,8-dimetil-5-[6-metilhept-5-en-2-il]-1,3a,4,5,6,8a-heksahidroazulen-4-ol) | 2128 | 8,41 | 12,44 | 3,41 | 4,58 |
| 149 | linoleinska kiselina ((Z,Z)-oktadeka-9,12-dienska kiselina) | 2181 | / | / | 0,38 | / |
| 150 | oleinska kiselina ((Z)-oktadec-9-enska kiselina) | 2189 | / | / | 1,04 | 0,40 |
| 151 | cembra-4,7,11,15-tetraen-3-ol | 2231 | 5,27 | 10,07 | 5,44 | 9,14 |
| 152 | etil-ikozanoat | 2398 | 6,56 | 13,14 | 10,64 | 25,09 |



Slika 14. Usporedba sastava hidrodestilata *C. spongiosus* prema skupinama spojeva obzirom na mjesec uzorkovanja



Slika 15. Usporedba sastava hidrodestilata *C. spongiosus* prema površinskom udjelu najzastupljenijih spojeva obzirom na mjesec uzorkovanja

U hidrodestilatu svježeg uzorka alge uzorkovane u svibnju identificirano je 87,27% (Tablica 1.) od ukupno detektiranih spojeva, od čega je 48,70% terpena (Slika 14.). U suhom uzorku istog mjeseca uočeno je smanjenje zastupljenosti terpena (38,05% od ukupno identificiranih 87,72% spojeva). U hidrodestilatu alge uzorkovane u kolovožu zastupljenost terpena je manja (12,57%, svježe; 17,20%, suho od ukupno identificiranih 82,35%, svježe i 86,79%, suho. (Tablica 1., Slika 14.)). Iz skupine terpena spoj s najvećim udjelom je gleenol s 12,44% u svježem uzorku iz svibnja (Slika 15.). Uočen je drastičan pad udjela glenola (1,00%) u suhom uzorku istog mjeseca. U svježem uzorku iz kolovoza gleenol je identificiran u tragovima (0,56%), dok u suhom uzorku nije pronađen. Među najzastupljenijim terpenima identificiran je i germakren D čiji sadržaj u uzorku iz svibnja opada sušenjem (10,28%, svježe; 3,42%, suho) dok je u uzorku iz kolovoza kao i gleenol identificiran u tragovima (0,25%, svježe; 0,08%, suho). Ciklizacijom germakrena D ili njegovih izomera s endocikličkom dvostrukom vezom mogu nastati spojevi s burbonen strukturom, kao što je β -burbonen, koji je također identificiran.^[29] γ -kadinen je identificiran samo u svježem uzorku iz svibnja s udjelom od 4,82% (Tablica 1., Slika 15.). Izopačidiktol A je najzastupljeniji u suhom uzorku iz svibnja (12,44%), a uočeno je da mu površinski udio raste sušenjem u uzorcima iz oba mjeseca uzorkovanja (1,5 puta, svibanj; 1,3 puta, kolovoz). Udio cembra-4,7,11,15-tetraen-3-ola raste sušenjem, ali je primijećeno da je podjednako zastupljen u svježim (5,27%, svibanj; 5,44%, kolovoz) i suhim uzorcima (10,07%, svibanj; 9,14%, kolovoz).

Uočeni su i C₉-, C₁₀- i C₁₃-norisoprenoidi, razgradni produkti karotenoida, od kojih je najzastupljeniji β -jonon i to u suhom uzorku iz svibnja (3,20%), a u svježem uzorku mu je postotak manji 3,2 puta. Takav trend u rastu udjela nakon procesa sušenja uočen je i u istraživanju endemične smeđe makroalge *Fucus virsoides* J. Agardh iz Jadranskog mora, što ukazuje na razgradnju karotenoida tijekom sušenja.^[12] U uzorcima iz kolovoza identificiran je u maloj količini te je podjednako zastupljen (0,58%, svježe; 0,51%, suho) (Tablica 1., Slika 15.).

Derivati klorofila zastupljeniji su u uzorku iz kolovoza (16,07%, svježe; 19,37%, suho), a najzastupljeniji spoj ove skupine je diterpenski alkohol fitol čiji površinski udio raste nakon procesa sušenja (1,3 puta, svibanj; 1,2 puta, kolovoz) (Slika 14., Slika 15.) što je posljedica

raspada klorofila.^[29] Oksidacijom fitolnog lanca klorofila može nastati metilirani keton dugolančane masne kiseline kao što je identificirani heksahidroksifarnezil-aceton.^[29]

Alifatski zasićeni spojevi najzastupljeniji su u hidrodestilatu svježeg uzorka alge uzorkovane u kolovozu (22,69%), a najveće udjele imaju heptadekan, čiji sadržaj je veći u uzorku iz kolovoza (5,57%, svježe; 3,85%, suho) u odnosu na uzorak iz svibnja (1,32%, svježe, 0,63%, suho), i pentadekanal (Slika 14., Slika 15.). Udio pentadekanala je najizraženiji u svježem uzorku uzorkovanom u kolovozu (5,57%), a zamijećena je njegova podjednaka zastupljenost u suhim uzorcima (1,53%, svibanj; 1,65%, kolovoz).

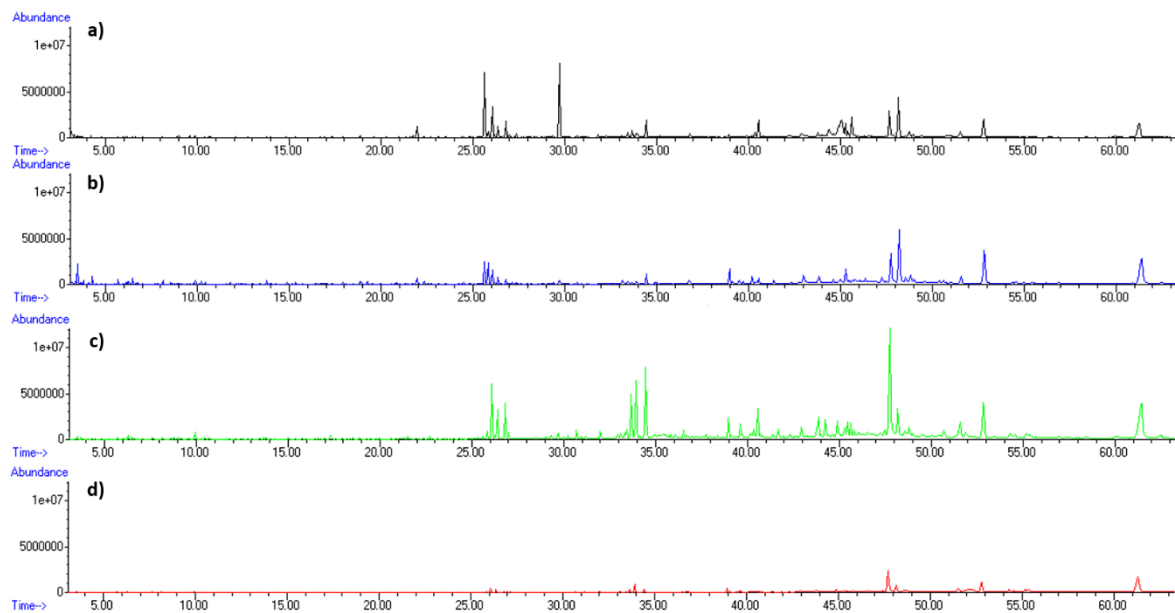
Skupina alifatskih nezasićenih spojeva ima najveći površinski udio u svježem uzorku iz kolovoza (14,96%) i njihov udio sušenjem uzorka istog mjeseca opada za 1,95 puta, dok takav trend nije uočen u uzorku iz svibnja (12,23%, svježe; 11,02%, suho) (Slika 15.). Iz ove skupine spojeva izdvojeni su pentadec-1-en i heksadec-1-en kao najizraženiji spojevi (Slika 15.). Pentadec-1-en je najzastupljeniji u svježem uzorku iz kolovoza (4,42%) kao i heksadec-1-en (4,12%). Primijećen je pad udjela sušenjem kod oba spoja 2,5 puta. U uzorku iz svibnja heksadec-1-en je identificiran u tragovima (0,06%, svježe; 0,59%, suho) dok pentadec-1-en nije identificiran.

Površinski udio masnih kiselina i njihovih derivata povećava se sušenjem, u uzorku iz svibnja 2,1 puta, a u uzorku iz kolovoza 1,9 puta (Slika 14.). Takav profil uočen je i kod najzastupljenijeg spoja iz ove skupine, etil-ikosanoata, čiji je udio najveći u suhom uzorku iz kolovoza (25,09%) (Tablica 1., Slika 15.).

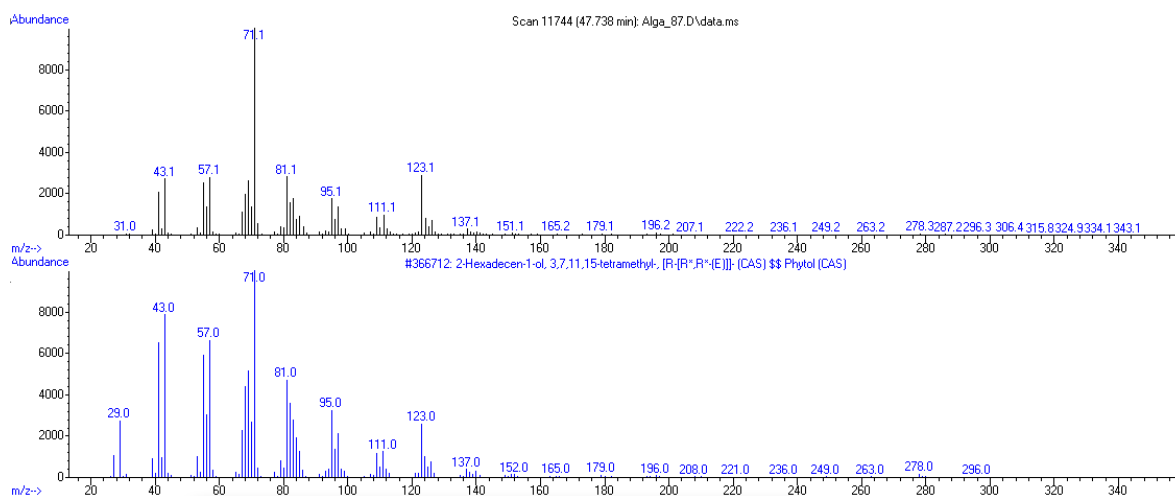
U ostale spojeve spadaju derivati benzena, organohalogeni spojevi i spojevi sa sumporom. Zastupljenost ove skupine spojeva raste sušenjem u uzorku iz svibnja (0,96%, svježe; 5,09%, suho), a u uzorku iz kolovoza jednaka je njihova zastupljenost (2,59%, svježe; 2,54%, suho) (Slika 14.).

Prikazani su kromatogrami ukupnih iona (engl. total ion chromatogram, TIC) analiziranih uzoraka *C. spongiosus* (Slika 16.) gdje se uočava razlika u kemijskom sastavu uzoraka (suho, svježe) i mjesecu uzorkovanja (svibanj, kolovoz). Prikazan je spektar masa fitola iz analiziranog svježeg uzorka *C. spongiosus* uzorkovanog u svibnju i spektar masa fitola iz

baze podataka Wiley9 (*Slika 17.*). To je primjer kako se vrši usporedba spektara masa kod identifikacije spojeva.



Slika 16. TIC analiziranih uzoraka *C. spongiosus*: a) svježi uzorak, svibanj; b) suhi uzorak, svibanj; c) svježi uzorak, kolovoz; d) suhi uzorak, kolovoz.



Slika 17. Spektar masa fitola iz analiziranog uzorka *C. spongiosus* (gore) i spektar masa fitola iz baze podataka Wiley9 (dolje).

4. ZAKLJUČAK

Alga *Cladostephus spongiosus* uzorkovana je dva puta tijekom iste godine, u svibnju i u kolovožu, u priobalju otoka Čiova. U radu su analizirani isparljivi spojevi navedene alge kako bi se uvidjele razlike u kemijskom sastavu obzirom na mjesec uzorkovanja, to jest temperaturu mora. Prilikom uzorkovanja temperatura mora je iznosila 20,1 °C u svibnju i 28,1 °C u kolovožu. Razlike u kemijskom sastavu hidrodestilata najuočljivije su kod terpena čiji udio je izrazito veći u uzorku alge iz svibnja. Germakren D i gleenol imali su najveći površinski udio u svježem uzorku iz svibnja, sušenjem se njihov udio znatno smanjio dok su u uzorcima iz kolovoža identificirani u tragovima. Alifatski zasićeni i nezasićeni spojevi su pokazali sličnost u profilu identifikacije, najizraženiji su u svježem uzorku iz kolovoža, a sušenjem im površinski udio opada. Pentadec-1-en u uzorcima iz svibnja nije identificiran, dok je heptadec-1-en identificiran u tragovima. Sadržaj derivata klorofila veći je u uzorcima iz kolovoža. Zastupljenost diterpenskog alkohola, fitola, veća je u suhim uzorcima obzirom na svježe, što je može objasniti raspadom klorofila. Derivatima masnih kiselina, čiji je najzastupljeniji spoj etil-ikosanoat, najbogatiji je suhi uzorak iz kolovoža, a sušenjem mu sadržaj raste. Razlike su primijećene i kod derivata benzena, norisoprenoida, organohalogenih spojeva i spojeva sa sumporom. Obzirom na navedene dobivene razlike u isparljivim spojevima hidrodestilata *C. spongiosus* može se zaključiti da različiti mjesec uzorkovanja, odnosno različita temperatura mora pri uzorkovanju, utječu na kemijski sastav alge.

5. LITERATURA

- [1] A.A. El Gamal in *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley-Blackwell, UK, **2012**, p. 4.
- [2] N. E. Awad, H. M. Motawe, M. A. Selim, A. A. Matloub, *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2009**, 3, 12.
- [3] A.Güner, *Food and Health* **2021**, 7, 31.
- [4] A. M. Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, *Mar. Drugs.* **2019**, 17, 537.
- [5] T. Rezić, J. Filipović, B. Šantek, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2014**, 9, 26.
- [6] I. A. Abbott, *Aquat. Bot.* **1982**, 12, 389.
- [7] <https://www.britannica.com/science/brown-algae>
- [8] <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>
- [9] K. M. Zia, M. Zuber, M. Ali, in *Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Material Science*, Elsevier, Amsterdam, **2017**, p. 77-110
- [10] <http://www.bioteka.hr/modules/zivisvijet/index.php/zivi-svijet.%C4%8Clanci.56/Zanimljiv-svijet-morskih-algi.html>
- [11] K. G. Ramawat, J. M. Mérillon in *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpens*, Springer, New York, **2013**, p. 2883-2912.
- [12] I. Jerković, A. M. Cikoš, S. Babić, L. Čižmek, K. Bojanić, K. Aladić, S. Jokić, *Mar. Drugs.* **2021**, 19, 235.
- [13] L. Mišurcová in *Handbook of Marine Macroalgae, Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley-Blackwell, UK, **2012**, p. 171-192.
- [14] A. M. Cikoš, S. Jokić, D. Šubarić, I. Jerković, *Mar. Drugs.* **2018**, 16, 348.
- [15] I. Jerković, M. Kranjac, Z. Marijanović, M. Roje, S. Jokić, *Molecules* **2019**, 24, 495.
- [16] I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije (za preddiplomski studij kemije i kemijske tehnologije), Split: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilište u Splitu. **2009**, pp. 52-54.
- [17] I. Jerković, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, **2011**.

- [18] Bao Jiang, Zhenwen Zhang, Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China, *Molecules*, 2010, 15, 9184- 9196
- [19] N. C. Da Costa, S. Eri in *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, **2005**, p. 20-25.
- [20] F. J. Holler, D. A. Skoog, D. M. West, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, **1999**, p. 802-815., 895.
- [21] L. Kukoč-Modun i Nj. Radić, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, **2016**, p. 654-658.
- [22] A. Douglas, F. Skoog, J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Chemistry*, Cengage Learning, Boston, USA, **2016**, p. 696-720.
- [23] Mukherjee, P. K. *Evidence-based validation of herbal medicine*. Elsevier, Amsterdam, **2015**, p. 405-425.
- [24]https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/05_Dario%20Mandic%20-%20Uvod%20u%20kromatografske%20separacije.pdf
- [25] [GC-MS Principle, Instrument and Analyses and GC-MS/MS | Technology Networks](#)
- [26] D. Sutlović, *Osnove forenzične toksikologije* Tisak, Split, Hrvatska, **2011**, p. 335-48.
- [27] M. El Hattab, G. Culioli, R. Valls, M. Richou, L. Piovetti, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2008**, 36, 447.
- [28] <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZR4390>
- [29] M. Kranjac, M. Zekić, A. Radonić, Z. Marijanović, S. Jokić, I. Jerković, *Kem. Ind.* **2020**, 69, 521.