

Kemijski profil isparljivih spojeva morske spužve *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789)

Maras, Elena

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:167:764830>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Kemijski profil isparljivih spojeva morske spužve
Petrosia ficiformis (Poiret, 1789)

DIPLOMSKI RAD

ELENA MARAS

Matični broj: 159

Split, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

Kemijski profil isparljivih spojeva morske spužve
Petrosia ficiformis (Poiret, 1789)

DIPLOMSKI RAD

ELENA MARAS

Matični broj: 159

Split, srpanj 2022.

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

Chemical profile of volatile compounds from marine sponge
Petrosia ficiformis (Poiret, 1789)

DIPLOMA THESIS

ELENA MARAS

159

Split, July 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Studij: Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta održanoj 18. ožujka 2022. godine

Mentor: dr. sc. Sanja Radman

Kemijски profil isparljivih spojeva morske spužve *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789)

Elena Maras, 159

Sažetak:

Spužve su vrlo jednostavno građene mnogostanične životinje. Morska spužva *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) spada u razred kremenorožnjača te je rasprostranjena duž cijele obale Sredozemnog mora i Makaronezije. Cilj ovoga rada bio je izolirati i analizirati isparljive spojeve spužve *P. ficiformis*. Pregledom literature nisu pronađena opsežna istraživanja na ovoj spužvi. Stoga, u ovome radu se nastojalo dobiti što potpuniji uvid u kemijски profil isparljivih spojeva navedene spužve. Isparljivi spojevi svježe i na zraku sušene *P. ficiformis*, uzorkovane na poluotoku Rtina kod Paškog mosta, dobiveni su hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi koristeći dva vlakna (HS-SPME). Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Identificiran je ravnolančani zasićeni alifatski ugljikovodik heptadekan ($C_{17}H_{36}$) kao dominantan spoj na oba vlakna. Jedino je u svježem uzorku na DVB/CAR/PDMS vlaknu oktan-3-ol bio u većem postotku. Također, na oba vlakna u svježim i suhim uzorcima, derivati benzena čine kvantitativno važne skupine s benzaldehidom i benzil-alkoholom kao glavnim komponentama. U destilatu alifatski spojevi su bili s najvećim udjelom. Spojevi s najvećim udjelom u svježem uzorku su okt-1-en-3-ol i diizobutil-ftalat, dok je u suhom uzorku najveći udio dimetil-trisulfida i indola.

Ključne riječi: morska spužva, kremenorožnjače, *Petrosia ficiformis*, isparljivi spojevi, GC-MS

Rad sadrži: 58 stranica, 10 slika, 2 tablice, 6 grafova, 14 priloga i 41 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Igor Jerković, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ante Prkić, član
3. dr. sc. Sanja Radman, znanstveni suradnik, član-mentor

Datum obrane: 19. srpanj 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Study: Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

Mentor: Sanja Radman, PhD

Chemical profile of volatile compounds from marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789)

Elena Maras, 159

Abstract:

Sponges are very simply built multicellular animals. The sea sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) belongs to the class of Demospongiae and can be found along the entire coast of the Mediterranean Sea and Macaronesia. The aim of this diploma thesis was to isolate and analyze the volatile compounds of the sponge *P. ficiformis*. Extensive research on this topic was not found in the literature. Therefore, an attempt was made to obtain a more complete profile of volatile compounds from this sponge. Volatile compounds of fresh and air-dried *P. ficiformis*, sampled on Rtina peninsula near the Pag bridge, were obtained by hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus and by headspace-solid phase microextraction on two fibers (HS-SPME). The analysis of all samples was performed by coupled gas chromatography - mass spectrometry on an HP-5MS column. A straight-chain saturated aliphatic hydrocarbon, heptadecane (C₁₇H₃₆), was identified as the dominant compound on both fibers. Only octan-3-ol had a higher abundance in the fresh sample on DVB/CAR/PDMS fiber. Also, on both fibers in both fresh and air-dried samples, benzene derivatives formed quantitatively important groups with benzaldehyde and benzyl alcohol as the major compounds. In the distillate, the aliphatic compounds are the group with the largest percentages. The compounds with the highest percentage in the fresh sample were oct-1-ene-3-ol and diisobutyl phthalate, while dimethyl trisulfide and indole were the most abundant in the dry sample.

Keywords: marine sponge, Demospongiae, *Petrosia ficiformis*, volatile compounds, GC-MS

Thesis contains: 58 pages, 10 figures, 2 tables, 6 graphs, 14 supplements, and 41 literature references

Original in Croatian

Defense committee:

1. full professor Igor Jerković, PhD, chair person
2. associate professor Ante Prkić, PhD, member
3. Sanja Radman, PhD, research associate, supervisor

Defense date: July 19, 2022

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

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

Neizmjerno sam zahvalna svojoj mentorici dr. sc. Sanji Radman što mi je svojim nesebičnim savjetima i podrškom prenijela znanje i pomogla u izradi ovog rada. Hvala Vam mentorice na svim pruženim prilikama i nadam se da ćete ostati tako nasmijana, vedra i uvijek puna dobrih ideja!

Najveću zahvalu upućujem roditeljima i nonama. Hvala što ste mi bili oslonac i imali razumijevanja od početka studiranja, kroz lijepe i one malo manje lijepe trenutke. Davide, hvala ti. Uz tebe je studiranje bilo puno ljepše.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Proučiti isparljive spojeve spužva i njihovu bioaktivnost.
2. Proučiti metode izolacije i analize isparljivih spojeva te njihovu primjenu u eksperimentalnom radu.
3. Izolirati isparljive spojeve spužve *Petrosia ficiformis* pomoću dvije metode: hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi koristeći dva vlakna (HS-SPME).
4. Provesti identifikaciju pojedinačnih spojeva analiziranih GC-MS sustavom na HP-5MS koloni usporedbom njihovih vremena i indeksa zadržavanja s literaturnim podacima te usporedbom spektara masa analiziranih spojeva sa spektrima masa iz komercijalne biblioteke spektara masa (Wiley 09 i NIST 17).
5. Provesti usporedbu i raspravu za dobivene i obrađene eksperimentalne podatke.

SAŽETAK

Spužve su vrlo jednostavno građene mnogostanične životinje. Morska spužva *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) spada u razred kremenorožnjača te je rasprostranjena duž cijele obale Sredozemnog mora i Makaronezije. Cilj ovoga rada bio je izolirati i analizirati isparljive spojeve spužve *P. ficiformis*. Pregledom literature nisu pronađena opsežna istraživanja na ovoj spužvi. Stoga, u ovome radu se nastojalo dobiti što potpuniji uvid u kemijski profil isparljivih spojeva navedene spužve. Isparljivi spojevi svježe i na zraku sušene *P. ficiformis*, uzorkovane na poluotoku Rtina kod Paškog mosta, dobiveni su hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi koristeći dva vlakna (HS-SPME). Analiza svih uzoraka provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Identificiran je ravnolančani zasićeni alifatski ugljikovodik heptadekan ($C_{17}H_{36}$) kao dominantan spoj na oba vlakna. Jedino je u svježem uzorku na DVB/CAR/PDMS vlaknu oktan-3-ol bio u većem postotku. Također, na oba vlakna u svježim i suhim uzorcima, derivati benzena čine kvantitativno važne skupine s benzaldehidom i benzil-alkoholom kao glavnim komponentama. U destilatu alifatski spojevi su bili s najvećim udjelom. Spojevi s najvećim udjelom u svježem uzorku su okt-1-en-3-ol i diizobutil-ftalat, dok je u suhom uzorku najveći udio dimetil-trisulfida i indola.

Ključne riječi: morska spužva, kremenorožnjače, *Petrosia ficiformis*, isparljivi spojevi, GC-MS

SUMMARY

Sponges are very simply built multicellular animals. The sea sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) belongs to the class of Demospongiae and can be found along the entire coast of the Mediterranean Sea and Macaronesia. The aim of this diploma thesis was to isolate and analyze the volatile compounds of the sponge *P. ficiformis*. Extensive research on this topic was not found in the literature. Therefore, an attempt was made to obtain a more complete profile of volatile compounds from this sponge. Volatile compounds of fresh and air-dried *P. ficiformis*, sampled on Rtina peninsula near the Pag bridge, were obtained by hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus and by headspace-solid phase microextraction on two fibers (HS-SPME). The analysis of all samples was performed by coupled gas chromatography - mass spectrometry on an HP-5MS column. A straight-chain saturated aliphatic hydrocarbon, heptadecane (C₁₇H₃₆), was identified as the dominant compound on both fibers. Only octan-3-ol had a higher abundance in the fresh sample on DVB/CAR/PDMS fiber. Also, on both fibers in both fresh and air-dried samples, benzene derivatives formed quantitatively important groups with benzaldehyde and benzyl alcohol as the major compounds. In the distillate, the aliphatic compounds are the group with the largest percentages. The compounds with the highest percentage in the fresh sample were oct-1-ene-3-ol and diisobutyl phthalate, while dimethyl trisulfide and indole were the most abundant in the dry sample.

Keywords: marine sponge, Demospongiae, *Petrosia ficiformis*, volatile compounds, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1.1. Podjela spužvi.....	3
1.1.2. Razred kremenorožnjača (<i>Demospongiae</i>).....	3
1.1.3. Isparljivi spojevi morskih spužva.....	4
1.1.4. Bioaktivnost morskih spužva	5
1.2. Metode izolacije i analize isparljivih spojeva u spužvama	6
1.2.1. Metode izolacije isparljivih spojeva.....	6
1.2.1.1. Ekstrakcija.....	6
1.2.1.2. Destilacija.....	6
1.2.1.3. Tehnike izolacije vršnih para	7
1.2.1.4. Sorpcijske tehnike	7
1.2.2. Analiza isparljivih spojeva	8
1.2.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija mase (GC-MS)	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO	12
2.1.1. Uzorak <i>Petrosia ficiformis</i>	13
2.1.2. Opis spužve <i>Petrosia ficiformis</i>	13
2.1.3. Kemikalije i aparatura	14
2.1.4. Izolacija isparljivih spojeva.....	15
2.1.5. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).....	15
2.1.6. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru	16
2.1.7. Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)	16
3. REZULTATI I RASPRAVA	18
3.1.1. Profil isparljivih spojeva <i>Petrosia ficiformis</i> izoliranih metodom HS- SPME.....	19
3.1.2. Profil isparljivih spojeva <i>Petrosia ficiformis</i> dobivenih hidrodestilacijom (HD).....	30
4. ZAKLJUČAK	44
5. LITERATURA	47
6. PRILOZI	52

UVOD

Koljeno Porifera čini najjednostavniju skupinu metazoa (mnogostaničnih životinja). Od četiri razreda u koje se spužve mogu taksonomski svrstati, kremenorožnjače (Demospongiae) čine najraznovrsniju skupinu. One nemaju pravog tkiva ni organe, a njihove stanice imaju znatan stupanj nezavisnosti. Spužve služe kao važan dio ekosistema. Mogu rasti na drugim životinjama (kao što su mekušci, školjke, rakovi,...) gdje im je jedna od mogućih uloga kamuflaža protiv predatora. Također, spužve često imaju simbiotske odnose s cijelim nizom mikroba, mikroalgi i gljiva koje zauzvrat provode čitav niz funkcija preživljavanja za spužvu domaćina, uključujući uklanjanje štetnih tvari.¹

Dosadašnja istraživanja ukazuju kako su spužve veliki izvor raznolikih kemijskih spojeva, od kojih neki imaju bioaktivna svojstva korisna za medicinske i farmaceutske svrhe.² U današnje vrijeme, osim kao izvor novih molekula, spužve se uglavnom koriste u komercijalne svrhe. Spužve ručno ubiru obučeni ronionci, tako da se dio spužve ostavi na staništu radi daljnje regeneracije. U RH postoje jasno određene smjernice kada i kako se mora obavljati gospodarski ribolov ronjenjem. Međutim, postoji zabrinutost za očuvanjem postojećih količina spužvi zbog klimatskih promjena. Iako prošlost spužva seže unatrag 500 milijuna godina, simbiotski mikrobi o kojima su spužve postale ovisne, iznimno su osjetljivi na blago povećanje temperatura. Ti mikrobi povećanjem temperatura postaju štetni paraziti koji uzrokuju bolesti i mogu znatno ugroziti cijelu zajednicu.³

1. OPĆI DIO

1.1.1. Podjela spužvi

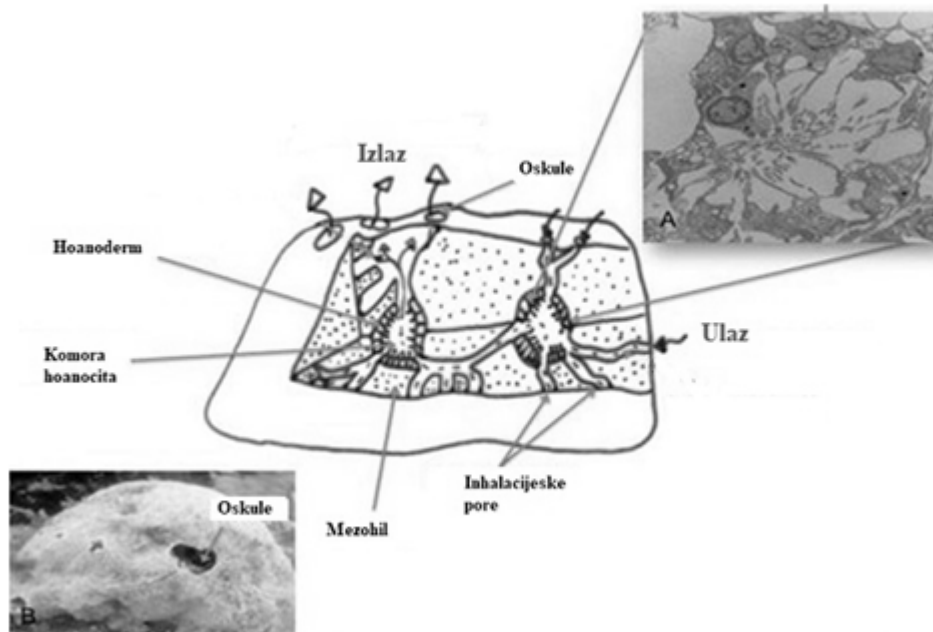
Spužve (koljeno Porifera) čine najjednostavniju skupinu metazoa (mnogostaničnih životinja). Njihovi fosilni zapisi sežu unatrag 500 milijuna godina. Nalaze se u svim vodenim ekosustavima, a većina opisanih spužva pripada u skupinu morskih spužva, dok su slatkovodne spužve pronađene u mnogo manjoj količini. Iako su višestanični organizmi, one nemaju prava tkiva i organe te su u odraslom stanju sjedilačke životinje i hrane se filtracijom. Njihove stanice imaju veliki stupanj autonomije. Tekućina u tijelo spužve ulazi kroz sitne otvore koji se nazivaju ostije ili pore, a izlazi kroz veliki otvor nazvan oskulum. Tijelo spužve izgrađeno je od tri sloja stanica: unutrašnjost tijela ili hoanoderm, središnji mezohil i vanjski sloj ili egzopinakoderm.⁴ Druge životinje uglavnom se ne hrane spužvama zbog njihovog neugodnog okusa. Međutim, neki organizmi mogu opstati na spužvama, a drugi žive u simbiozi sa spužvama.¹ Endosimbionti su češće prokarioti, a rjeđe eukarioti. Kod morskih spužva najčešći simbionti su modrozelenne alge koje spužvama mogu dati boju. Osim endosimbioze, spužve mogu služiti kao utočište raznim organizmima.⁵ Sistematika se temelji na morfologiji, anatomiji i citologiji zajedno s reproduktivnom, razvojnom i molekularnom biologijom pripadnika koljena. Razlikuju se četiri taksonomska razreda koljena Porifera:

1. Calcarea (vapnenjače) - skelet građen od kalcijevog karbonata,
2. Hexactinellida (staklače) – imaju kostur građen od četvero- i/ili šesterokrakih silikatnih spikula, a pretežno su to dubokomorske spužve,
3. Demospongiae (kremenorožnjače) - najveći i najraznolikiji razred u sklopu spužva, a skelet je građen od silicijevog dioksida, spongina ili oboje,
4. Homoscleromorpha – do nedavno pod kremenorožnjačama, a najmanja je skupina spužva.⁶

1.1.2. Razred kremenorožnjača (Demospongiae)

Razred kremenorožnjača (Slika 1.) obuhvaća više od 7500 različitih spužva svrstanih u 10 redova. Kremenorožnjače čine spužve asimetrične građe, veličine od par milimetara sve do 2 metra. Mogu biti različitih oblika, pa tako mogu tvoriti tanku koru, grudice, izrasline nalik prstu ili biti ovalnog oblika. Pripadnici ovog razreda često su jarkih boja te su rasprostranjeni i u mediolitoralu i u ponorskim dubinama do 5500 metara. Karakteristične strukture ovog razreda su: leukonoidna struktura s naboranim

hoanodermom i silicijskim spikulama, kontinuirani pinakoderm i karakteristično zadebljan mezenhim. Mogu se razmnožavati spolno i nespolno. Sve poznate slatkovodne spužve pripadaju u razred kremenorožnjača. Ove spužve najčešće se rabe kao spužve za kupanje. Ubiru ih roniaci, a mogu se i komercijalno uzgajati. Nakon ubiranja, izbjeljuju se te se plasiraju na tržište. Ono što spužvi daje prepoznatljivu mekoću i sposobnost upijanja je spongin, modificirani tip proteina kolagena.¹



Slika 1. Generalizirana struktura kremenorožnjača.⁷

1.1.3. Isparljivi spojevi morskih spužva

Holobionti spužva (kompleksni sistemi sastavljeni od eukariotskog domaćina i njegove mikrobiote) proizvode širok raspon metabolita koji se mogu koristiti u međustaničnoj komunikaciji ili kao zaštita od predatora i patogena.⁸ Provedena su istraživanja koja ukazuju kako pri obrani od grabežljivaca, spužve koriste određene odvrćajuće molekule, poput furanosesterterpenske tetronske kiseline, koje koriste spužve roda *Ircinia*. Isto tako, spužve roda *Agelas* brane se od predatorskih riba pomoću oroidina koji u svojoj strukturi sadrži imidazolni prsten i bromiranih alkaloida koji sadrže pirol u svojoj strukturi, poput 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kiseline. Pirolni dio navedene molekule nužan je za odvrćajući efekt, dok imidazolni nije neophodan, no doprinosi efektu. Promjenom atoma dušika u pirolnom prstenu s kisikom ili sumporom ne mijenja bitno učinak, međutim zamjena vodika s bromom ili povećanje polariteta spoja kao i dimerizacija bitno utječe na neugodan miris molekule.⁹

1.1.4. Bioaktivnost morskih spužva

Morske kremenorožnjače pokazale su se kao jedan od najbogatijih izvora raznolikih kemijskih spojeva, od kojih neki imaju bioaktivna svojstva korisna za medicinske svrhe. Gotovo 5000 novih spojeva otkriveno je u razdoblju od 1970.-2010. godine.¹⁰ Izolirane molekule pokazuju raznoliko bioaktivno djelovanje, kao što je antimikrobno, antitumorsko, antivirusno, antifungalno, protuupalno, imunosupresivno i neurosupresivno djelovanje. Kao primjer dobre bioaktivnosti mogu se uzeti u obzir spužve iz roda *Erylus* koje mogu sintetizirati glikolipide. Oni su sposobni inhibirati rast bakterija, gljivica i virusa, uključujući virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV).²

Antibakterijsko djelovanje

Istraživanja su dokazala kako kemijski spojevi izolirani iz morskih spužvi imaju antibakterijsko djelovanje kako na gram pozitivne, tako i na gram negativne bakterije. Tako je lektin, glikoprotein izoliran iz spužve *Axinella donnani*, pokazao vrlo dobro antibakterijsko djelovanje protiv *Staphylococcus aureus*. Alkaloid 2,2-di(6-bromo-3-indolil)etilamin (izoliran iz spužve *Orina spongiosa*) istovremeno ima antibakterijsko djelovanje protiv *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella Pneumoniae* te inhibira nastanak biofilma bakterija.²

Antivirusno djelovanje

Više izoliranih bioaktivnih spojeva pokazalo je antivirusno djelovanje na viruse herpes simplex i hepatitis A. Metakromin A, seskviterpen iz *Dactylospongia metachromia* znatno je inhibirao proizvodnju virusa hepatitisa B. Smatra se da antivirusnom djelovanju spoja pridonosi prisutnost hidrokinnoskog dijela i prisutnost dvostrukih veza na C-5 i C-9. Osim virusa hepatitisa B, manolid, spoj izoliran iz spužve *Luffariella variabilis* pokazao je djelovanje protiv virusa hepatitisa C. Utvrđeno je da spoj inhibira aktivnosti RNA helikaze i ATPaze NS3 proteina virusa hepatitisa C.²

Protuupalno djelovanje

Manolid je među prvim sesterterpenskim protuupalnim lijekovima izoliranim iz morskih spužvi. Njegovo protuupalno djelovanje se temelji na nepovratnoj inhibiciji oslobađanja arahidonske kiseline iz fosfolipidne membrane. Djeluje tako da sprječava enzim fosfolipazu A2 da se veže na fosfolipidnu membranu, što povećava intracelularnu

koncentraciju arahidonske kiseline koja potom rezultira pojačanom regulacijom sinteze medijatora upale, kao što su leukotrieni.¹¹

1.2. Metode izolacije i analize isparljivih spojeva u spužvama

1.2.1. Metode izolacije isparljivih spojeva

Najčešće metode izolacije isparljivih spojeva mogu se općenito podijeliti na:

- metode ekstrakcije otapalom ili subkritičnim/superkritičnim otapalima,
- destilacijske metode,
- tehnike izolacije vršnih para,
- sorpcijske tehnike.

1.2.1.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava odjeljivanje tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Kod ekstrakcije otapalom, izbor otapala je vrlo važan. Ono mora biti niske temperature vrenja te mora biti pogodno za ekstrakciju polarnih i nepolarnih spojeva. Najčešće upotrebljavana otapala su: diklormetan, aceton, smjese pentana i dietil-etera, heksan, freoni i etanol. Nove metode ekstrakcije koriste superkritične ili subkritične fluide. Superkritična i subkritična ekstrakcija fluidima koriste se fluidima iznad ili ispod kritične točke u faznom dijagramu te se tako postiže iscrpna ekstrakcija. Većina superkritičnih ekstrakcija koristi ugljikov dioksid zbog njegove niske toksičnosti i kemijske inertnosti. Također, ultrazvučna ekstrakcija (USE) je često korištena tehnika. To je modificirana maceracija u kojoj je ekstrakcija olakšana upotrebom ultrazvuka. Glavne prednosti ove tehnike su jednostavnost i povećanje ekstrakcijskog iscrpka.¹²

1.2.1.2. Destilacija

Tijekom destilacije, tekuća smjesa se zagrijava do vrenja i prevodi u paru koja se potom ukapljuje (kondenzira) u hladilu. Komponente koje se s vodom ne miješaju, imaju svojstvo isparavanja zajedno s vodenom parom, na temperaturi nižoj od 100 °C. Vrijedi Daltonov zakon parcijalnih tlakova: tlak para iznad heterogene smjese je jednak zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenti za zadanu temperaturu. Destilacijske metode se mogu podijeliti u tri skupine: hidrodestilacija, vodeno-parna destilacija i parna destilacija. Dobiveni destilat ne sadrži visoko vrijuće ili neisparljive tvari. Međutim,

polarne i hidrofilne molekule se loše izoliraju, a također je moguć nastanak sekundarnih artefakata zbog toplinske razgradnje komponenata uzorka.^{12, 13}

1.2.1.3. Tehnike izolacije vršnih para

Vršne pare (engl. *headspace*) predstavljaju atmosferu iznad ili oko uzorka koji sadrži najisparljivije spojeve. Tehnike izolacije vršnih para su separacijske tehnike u kojima se lako isparljivi spojevi izdvajaju iz složenog matriksa, najčešće uz lagano, kontinuirano zagrijavanje. Mogu se podijeliti na statičke i dinamičke.

U statičkoj izolaciji vršnih para uzorak je postavljen u zatvorenu posudu, zagrijan na određenu temperaturu i ostavljen određeno vrijeme kako bi došlo do uravnoteženja vršnih para iznad uzorka u posudi. Po završetku procesa, atmosfera iznad uzorka se uzorkuje te se analizira. Glavni nedostatak izolacije vršnih para je diskriminacija spojeva na osnovi isparljivosti, budući da oni najisparljiviji spojevi ispune prostor iznad uzorka.¹⁴ Kod dinamičke izolacije vršnih para isparljivi spojevi iznad uzorka prevode se inertnim plinom nositeljem (to su najčešće helij ili dušik) na adsorbens koji se naziva zamka ili trap (engl. *trap*). Po završetku koncentriranja isparljivih spojeva na trapu, spojevi se desorbiraju eluiranjem odabranim otapalom ili se desorpcija vrši pomoću termalnog desorbera u injektor plinskog kromatografa. U ovoj vrsti izolacije volumen korištene posude nije važan. Kod ovakve izolacije veća je osjetljivost nego kod statičke i dobiveni pikovi na kromatogramu bit će veće površine (veće koncentracije).^{13, 14}

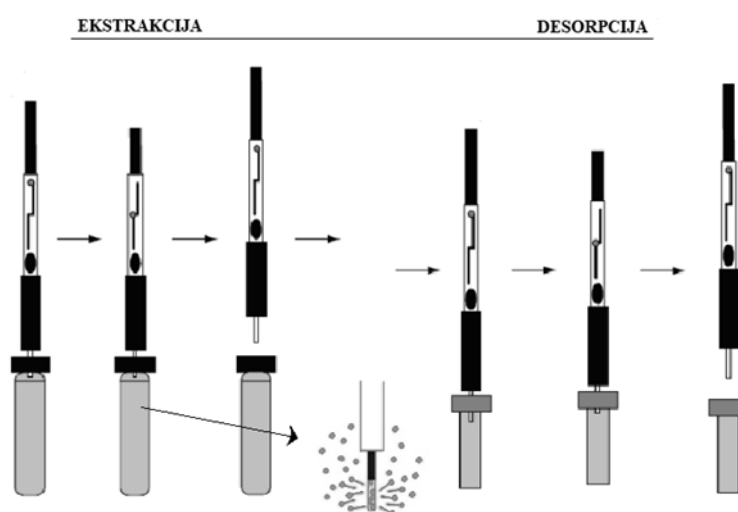
1.2.1.4. Sorpcijske tehnike

Prednost sorpcijskim tehnikama nad destilacijom i ekstrakcijom je to što nije potrebno upotrijebiti otapalo za ekstrakciju te nije potrebno vršiti predkoncentriranje aromatičnih spojeva. Ove tehnike se zasnivaju na particiji lako isparljivih organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma.¹⁴

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) (Slika 2.) je često upotrebljavana tehnika za izolaciju isparljivih spojeva. Temelji se na korištenju 1-2 centimetara dugog silikonskog vlakna presvučenog polimernim filmom. Vlakno može imati različite afinitete prema spojevima, pa tako vlakna mogu biti polarna, miješana ili nepolarna. Vlakno se nalazi unutar igle

injekcije koja je dio SPME držača. Cijeli postupak se sastoji od nekoliko koraka. Prije korištenja, vlakno se prvo mora kondicionirati prema uputama proizvođača. Uzorak se postavlja u SPME vijalu, zatvara sa septom i zagrijava. Zatim, vlakno uvučeno u iglu se uvodi u vršne pare iznad uzorka ili se uranja u tekući uzorak. Izvlači se vlakno iz metalne igle te se pusti određeno vrijeme kako bi se isparljivi spojevi adsorbirali. Po završetku tog procesa, vlakno s ekstrahiranim spojevima se ponovno uvlači u iglu te se izvlači iz vijale. Uvođenjem igle u injektor kromatografa, ekstrahirani spojevi se desorbiraju s vlakna toplinskom desorpcijom ukoliko se koristi plinska kromatografija ili desorpcijom u otapalu ukoliko se koristi tekućinska kromatografija.^{14, 15}



Slika 2. Ekstrakcija i desorpcija kod mikroekstrakcije na čvrstoj fazi.¹⁴

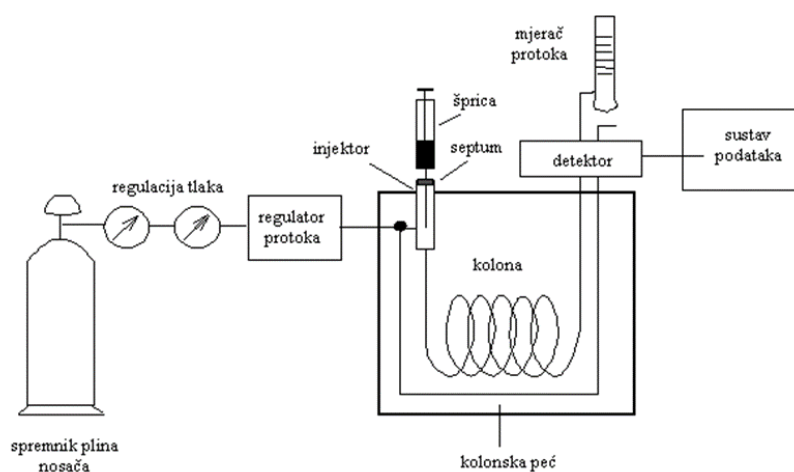
Prednosti ove tehnike uključuju brzu i laku uporabu bez potrebe za otapalom. Mane ove tehnike su diskriminacija određenih vlakana na polarne spojeve. Također, profil adsorbiranih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini upotrijebljenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.¹⁴

1.2.2. Analiza isparljivih spojeva

Kromatografske tehnike razvijane su za brzo i pouzdano odvajanje molekula sličnih kemijskih karakteristika iz složenih matrica. Plinska kromatografija danas je široko primijenjena tehnika. Temelji se na odjeljivanju komponenata smjese između nepokretne (stacionarne) i plinovite pokretne (mobilne) faze. Pod plinsku kromatografiju spadaju plinsko-tekućinska kromatografija (GLC) i plinsko-adsorpcijska kromatografija

(GSC). U GLC dolazi do odjeljivanja tvari između plinovite pokretne i neisparljive tekuće nepokretne faze, a u GSC odjeljivanje se zasniva na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između stacionarne i mobilne plinovite faze. Pokretna faza, plin, mora biti kemijski inertan, a najčešće se koriste helij, dušik, argon ili ugljikov dioksid. Glavne komponente uređaja za plinsku kromatografiju, plinskog kromatografa (Slika 3.) su: sustav za dopremu plinova, injektor, kromatografska kolona u termostatiranom prostoru i detektor. Ukoliko već nije plinovit, u plinskoj kromatografiji uzorak se mora prevesti u plinovito stanje. Volumeni injektiranih uzoraka u plinovitom stanju su od 1 do 10 mL, dok se za tekuće uzorke najčešće koristi 0.1 do 1 μ L.¹⁶ Volumni protok plina se razlikuje ovisno o korištenim kolonama. One mogu biti kapilarne ili punjene. Protok može varirati od 25 do 150 mL/min kod punjenih kolona te od 1 do 25 mL/min u kapilarnim kolonama.^[17] U cilju boljeg odjeljivanja komponenti prema isparljivosti, tijekom rada plinskog kromatografa, temperatura kolone obično je programirana u početku izotermno, a zatim slijedi linearno povećanje temperature te konačni izotermni period.¹³

Plinska kromatografija se smatra 'slijepom' tehnikom, što znači da nakon odjeljivanja uzorka mora postojati određen uređaj pomoću kojeg se detektiraju odijeljene komponente. Postoji više vrsta detektora, ovisno o potrebama, a neki od njih su: plamenoionizacijski detektor (FID), detektor toplinske vodljivosti (TCD), fotoionizacijski detektor (PID), detektor apsorpcije elektrona (ECD), spektrometar masa (MS) i dr.¹³



Slika 3. Opći shematski prikaz plinskog kromatografa.¹⁸

1.2.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija mase (GC-MS)

Plinska kromatografija (GC) je odlična tehnika za odjeljivanje isparljivih i poluisparljivih komponenata iz smjese, međutim odijeljene komponente nije moguće identificirati. Spektrometar masa (MS) ima mogućnost identificirati pojedine komponente uzorka određivanjem njihovih strukturnih podataka, no nema sposobnost odijeliti ih iz smjese. Stoga, koristi se vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography - mass spectrometry*, GC-MS). Tehnike su komplementarne i vrlo se dobro nadopunjuju.¹⁹ Njihovom kombinacijom se može postići osjetljivost tehnike u pikogramskim, pa čak i femtogramskim količinama tvari.¹³ Prednost je korištenje uzorka u plinovitoj fazi u obje tehnike. Mana je razlika u radnim tlakovima, GC radi pri tlaku od 760 torr (101 325 Pa) i prisutan je plin nositelj, dok MS radi u vakuumu (10^{-6} - 10^{-5} torr).¹⁹

Mala količina uzorka se injektira putem sustava za injektiranje. Nošen plinom nositeljem uzorak ulazi u kromatografsku kolonu, gdje dolazi do odjeljivanja komponenata iz uzorka raspodjelom između pokretne i nepokretne faze. Kako se komponente smjese odvajaju, svaki spoj eluira iz kolone u različito vrijeme na temelju svoje točke vrelišta i polariteta. Vrijeme eluiranja se naziva vrijeme zadržavanja spoja (retencijsko vrijeme).²⁰ Nakon što komponente napuste GC kolonu, ioniziraju se i fragmentiraju u spektrometru masa upotrebom elektronske (engl. *electron impact*, EI) ili kemijske ionizacije (engl. *chemical ionisation*, CI). U slučaju elektronske ionizacije, molekula se bombardira elektronima energije 50-70 eV, ionizira se te nastaje pozitivni molekulski ion (M^+) koji se dalje može razložiti u čitav niz fragmenata. Kemijska ionizacija koristi molekule inertnog plina (metan, amonijak, izobutan) u suvišku. Prvo dolazi do njihovog ioniziranja zrakom elektrona. Sudarima nastaju stabilne protonirane čestice plina koje zatim potiču ionizaciju uzorka.¹³

Ionizirane molekule i fragmenti se zatim ubrzavaju kroz analizator masa, što je najčešće kvadrupolni analizator masa. Kroz njega mogu proći samo ioni koji ostvaruju stabilnu putanju. Amplituda oscilacije ostaje malena samo za ione određenog omjera mase i naboja (m/z), pa samo ioni koji ne udare u elektrodu prolaze do detektora spektrometra masa.¹³

Dobiveni zapis naziva se kromatogram i predstavlja grafički prikaz odnosa vremena zadržavanja i intenziteta signala, a površina ispod krivulje koja je ujedno i kvantitativni

signal, proporcionalna je koncentraciji razmatrane komponente. Ovako je omogućena kvalitativna i kvantitativna analiza uzorka. Usporedbom indeksa zadržavanja (RI) svake pojedine komponente uz primjenu homologne serije *n*-alkana i/ili korištenjem spektara masa iz komercijalno dostupnih biblioteka moguća je identifikacija spojeva.^{16, 20}

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1.1. Uzorak *Petrosia ficiformis*

Spužva *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) (Slika 4.) uzorkovana je na poluotoku Rtina kod Paškog mosta (44° 19' 10" N; 15° 15' 37" E) krajem svibnja 2021. godine. Spužva je uzorkovana na dubini od 6 metara s temperaturom mora od 18 °C. Uzorak je stavljen u nepropusni spremnik, napunjen morskom vodom te se isti dan u prijenosnom hladnjaku dostavio u laboratorij Zavoda za organsku kemiju. Do obrade, svježi uzorak se čuvao u zamrzivaču, a suhi se sušio 10 dana na zraku u tami. Također, prije analize spužva je očišćena od kamenčića, račića i ostalih vidljivih stranih tijela.



Slika 4. Spužva *Petrosia ficiformis*.²¹

2.1.2. Opis spužve *Petrosia ficiformis*

Carstvo: Animalia

Koljeno: Porifera

Razred: Demospongiae

Podrazred: Heteroscleromorpha

Red: Haplosclerida

Porodica: Petrosiidae

Rod: *Petrosia*

Vrsta: *Petrosia*

Spužvu je prvi put opisao Poiret 1789. godine kao *Spongia ficiformis*. Ime joj dolazi od grčke riječi "pétra" – πέτρα – kamen, "physis" – φύση – priroda i "fórma" - φόρμα – oblik, što se prevodi kao kamen prirodnog oblika. Stanište joj je na donjoj strani stijena, prevjesima i u špiljama na dubini od 5 do 70 metara. Uobičajeno je ljubičasto-

smeđe boje do koje dolazi zbog simbiotskog odnosa s fotosintetskim cijanobakterijama. Međutim, ukoliko se nalazi u okolišu bez prisutnosti svjetla, poprima bijelu boju. Posjeduje kompaktnu i tvrdnu teksturu te ima sferične oskule (otvor sličan ustima kroz koji prolazi voda) nepravilno raspoređene po vanjskoj površini.²² Domaćin je raznim heterotrofnim bakterijama, od kojih većina živi, zajedno s cijanobakterijama, unutar specijaliziranih stanica zvanih bakteriociti.²³

P. ficiformis je sporo rastuća, oviparna (način razmnožavanja životinja jajima) vrsta koja posjeduje poseban tip trepetljastih puzajućih stereoblastula s vrlo ograničenim potencijalom raspršivanja. Takve značajke, spor rast i ograničeno širenje, čine ju vrlo ranjivom vrstom sa slabom sposobnošću oporavka u slučaju oboljenja. Vrsta je rasprostranjena duž cijele obale Sredozemnog mora te Makaronezije (Azorski otoci, Madeira te Kanarski otoci) (Slika 5.).²⁴



Slika 5. Rasprostranjenost spužve *P. ficiformis*. ^[25]

2.1.3. Kemikalije i aparatura

Sljedeće kemikalije korištene su u izradi ovog diplomskog rada:

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

- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) s automatiziranim PAL (PAL RSI 85, CTS Analytics AG, Zwingen, Švicarska) sistemom s dva različita SPME vlakna:
 - vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB), Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD,
 - vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/poli(dimetil-siloksan) (DVB/CAR/PDMS), Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD,
- vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD): plinski kromatograf model 8890A i spektrometar masa model 5977E.

2.1.4. Izolacija isparljivih spojeva

Isparljivi spojevi izolirani su iz svježe i osušene *P. ficiformis*. Korištene metode su bile hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi upotrebom dva vlakna različite polarnosti.

2.1.5. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME)

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) je provedena sa PAL sustavom za automatsko uzorkovanje (PAL RSI 85, CTC Analytics AG, Zwingen, Švicarska), koristeći SPME vlakna s polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) i divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) ovojnicama kupljenim od Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD). Prije upotrebe vlakna su kondicionirana prema uputama proizvođača.

U staklene vijalice od 20 mL je stavljeno 1 g svježeg ili suhog uzorka spužve te su hermetički zatvorene čepom na navoj koji sadrži politetrafluoretilen (PTFE)/silikonsku septu. Korišten je automatizirani PAL RSI sustav. Kondicioniranje SPME vlakna provedeno je prema uputama proizvođača Agilent Technologies. Uvjeti tijekom mikroekstrakcije su bili sljedeći: miješanje i ravnoteža tijekom 30 min na 60 °C, ekstrakcija isparljivih spojeva 40 minuta bez miješanja te uvođenje SPME vlakna u GC radi toplinske desorpcije ekstrahiranih tvari (7 minuta). Svaki uzorak je ekstrahiran tri puta.

2.1.6. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Hidrodestilacija svježeg i suhog uzorka spužve je provedena u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. U tikvicu s okruglim dnom od 2000 mL stavljeno je 100 grama svježeg uzorka, dok je u drugu identičnu tikvicu stavljeno 30 grama suhog uzorka spužve. Obje tikvice napunjene su destiliranom vodom tako da se uzorak prekrije te postavljene u kalotu za zagrijavanje. U središnji dio aparature po Clevengeru postavljena je smjesa organskih otapala pentan (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i dietil-eter (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u volumnom omjeru 1:2 v/v (trap). Korištenjem trapa smanjena je mogućnost gubitka isparljivih spojeva zbog njihove djelomične topljivosti u vodi. Zatim je na aparaturu postavljeno hladilo po Allinhu, uspostavljen je odgovarajući protok vode te se destilacija provodila 2 sata. Nakon završetka destilacije, organski ekstrakt je sakupljen u središnjem dijelu aparature te je pažljivo, pomoću pipete, odijeljen od vodenog sloja i prebačen u staklenu vijalicu. Uzorak je potom uparen pomoću struje dušika do par kapi. Zatim je ručno injektirano 4 μ L uzorka u GC injektor tri puta.

2.1.7. Analiza isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Analiza izoliranih isparljivih spojeva je provedena pomoću plinskog kromatografa-spektrometra masa (GC-MS) (Slika 6.). Korišten je vezani sustav proizvođača Agilent Technologies (SAD) koji se sastoji od plinskog kromatografa model 8890A i spektrometra masa model 5977E.

Korištena je HP-5MS kolona (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) koja sadržava nepolarnu nepokretnu fazu (5% difenil/ 95% dimetilpolisiloksan), dimenzija 30 m x 0.25 mm te 0.25 μ m debljine filma.

Korišteni su slijedeći radni uvjeti za plinski kromatograf:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C/min te zadržavanje 2 min pri 200 °C,
- „solvent delay“: 3 min (koristio se samo kada su analizirani ekstrakti s otapalom)
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja: 1:50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mL/min.

Uvjeti rada spektrometra masa su:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- temperatura detektora: 280 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 m/z .

Identifikacija pojedinačnih spojeva je vršena usporedbom njihovih vremena zadržavanja i indeksa zadržavanja s literaturnim podacima te usporedbom spektara masa analiziranih spojeva sa spektrima masa iz komercijalne biblioteke spektara masa Wiley9 (Wiley, New York, NY, SAD) i NIST17 (Gaithersburg, MD, SAD).



Slika 6. Korišteni vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1.1. Profil isparljivih spojeva *Petrosia ficiformis* izoliranih metodom HS-SPME

Kemijski sastav i udio komponenata u vršnim parama svježeg i suhog uzorka *P. ficiformis* korištenjem DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlakana prikazan je u tablici 1. Identificirano je ukupno 55 spojeva upotrebom HS-SPME/GC-MS analize. Sadržaj vršnih para je prikazan kao površinski udio spojeva.

Tablica 1. Isparljivi spojevi *P. ficiformis* izolirani mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) i analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS); (I: svježi uzorak *P. ficiformis* ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-SvPfs); II: suhi uzorak *P. ficiformis* ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-ShPfs); III: svježi uzorak *P. ficiformis* ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-SvPfr); IV: suhi uzorak *P. ficiformis* ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-ShPfr)

Redni broj	Uobičajen naziv spoja	IUPAC naziv spoja	RI	Površinski udio (%) ± SD			
				I	II	III	IV
1	izopropilamin	2-aminopropan	470	1,56±0,00	-	-	-
2		<i>N,N</i> -dimetilmetanamin	482	1,66±0,21	3,50±1,82	-	19,08±2,99
3		propan-2-ol	510	-	1,82±0,77	-	-
4		metilsulfanilmetan	515	-	-	-	2,38±0,00
5	izovaleraldehid	3-metilbutan-1-al	652	2,03±0,38	-	1,18±0,45	0,32±0,00
6		pentanal	698	1,04±0,20	-	0,27±0,00	-
7	izoamil-alkohol	3-metilbutan-1-ol	734	-	-	0,49±0,00	-
8		<i>N</i> -metilpirol	750	-	0,43±0,06	-	-
9		piridin	753	5,08±0,56	3,06±0,46	1,50±0,44	1,44±0,28
10		pentan-1-ol	765	-	-	-	0,53±0,00
11	izobuterna kiselina	2-metilpropanska kiselina	785	-	-	-	3,88±0,00
12		heksanal	800	-	0,24±0,07	-	-
13	izovalerična kiselina	3-metilbutanska kiselina	834	-	0,83±0,03	-	-
14	fukoseraten	(3 <i>E</i> ,5 <i>Z</i>)-okta-1,3,5-trien	880	1,15±0,25	-	0,86±0,10	-

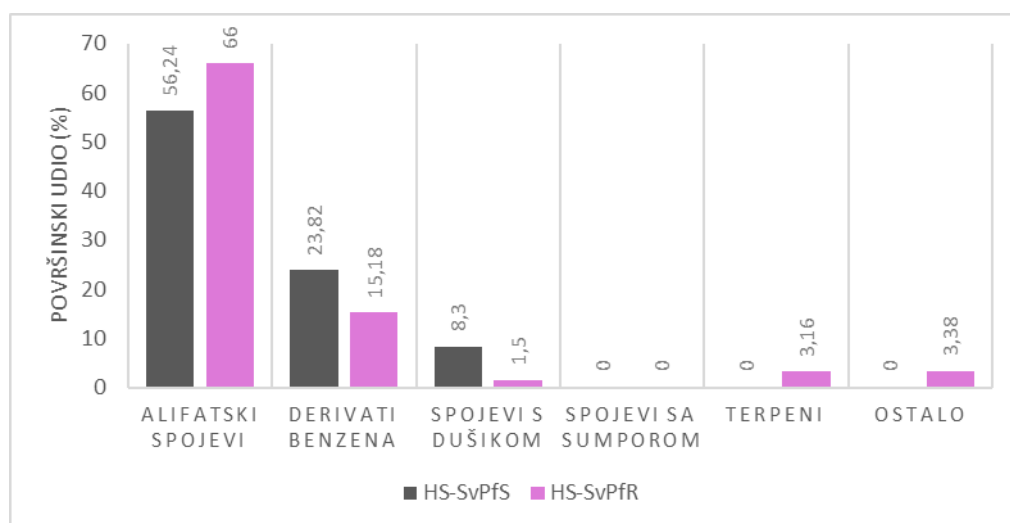
15		2,5-dietilfuran	888	-	-	-	0,60±0,00
16		bromoform	892	-	-	2,01±0,31	-
17		heptanal	901	-	1,11±0,15	-	0,88±0,00
18		2,6-dimetilpirazin	922	-	-	-	0,82±0,00
19		2-etilheksan-1-al	954	-	-	0,75±0,56	-
20		benzaldehyd	961	18,59±1,87	2,68±0,02	10,82±4,56	5,33±0,52
21	izoamil-propionat	3-metilbutil-propanoat	969	-	-	0,49±0,00	-
22	dimetil-trisulfid	(metiltrisulfanil)metan	972	-	-	-	0,66±0,00
23		okt-1-en-3-ol	980	-	-	2,13±0,52	-
24		okt-4-en-3-on	981	1,12±0,43	-	-	0,40±0,00
25		oktan-3-on	984	24,02±0,38	-	15,39±12,65	-
26		fenol	984	-	0,77±0,22	-	1,98±1,11
27		oktan-2,3-dion	987	-	-	-	0,78±0,00
28		oktan-2-on	992	-	-	0,78±0,12	-
29		oktanal	1005	-	-	-	0,87±0,00
30	<i>p</i> -cimen	1-metil-4-(propan-2-il)benzen	1026	-	-	0,24±0,05	-
31	eukaliptol	1,3,3-trimetil-2-oksabicyklo[2.2.2]oktan	1031	-	-	1,07±0,49	-
32	benzil-alkohol	fenilmetanol	1042	1,61±0,15	14,78±1,62	-	18,90±6,27
33	benzenacetaldehyd	2-fenilacetaldehyd	1050	1,80±0,90	-	1,50±1,22	-
34		(<i>E</i>)-okt-2-enal	1063	0,49±0,18	-	0,76±0,22	-
35	acetofenon	1-feniletanon	1072	-	-	0,55±0,08	-
36		nonan-2-on	1091	0,66±0,06	-	0,34±0,00	-

37		nonan-3-on	1091	-	-	0,42±0,00	-
38	fenhon	1,3,3-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan-2-on	1096	-	-	0,34±0,00	-
39	linalool	3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-ol	1102	-	-	1,16±0,00	-
40		nonanal	1102	-	-	-	2,41±0,13
41		2,6-dimetilcikloheksan-1-ol	1110	-	0,97±0,21	-	1,78±0,00
42	β-tujon	4-metil-1-propan-2-ilbiciklo[3.1.0]heksan-3-on	1110	-	-	0,34±0,00	-
43	fenetil-alkohol	2-feniletanol	1118	1,82±0,74	-	1,41±0,00	-
44		dodekan	1203	-	-	-	1,00±0,00
45		dodec-2-en	1213	-	-	-	1,44±0,03
46	β-ciklocitral	2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-karbaldehid	1226	-	0,77±0,18	-	-
47	β-citral	(2E)-3,7-dimetilokta-2,6,-dienal	1243	-	1,65±0,16	-	-
48		1H-indol	1292	-	0,95±0,10	-	1,56±0,78
49		undekan-2-on	1294	0,55±0,07	-	-	-
50	β-jonon	4-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)but-3-en-2-on	1485	-	0,88±0,00	0,88±0,00	0,65±0,00
51		pentadekan	1503	1,86±0,08	-	1,34±0,16	0,51±0,00
52		2,4-ditert-butilfenol	1513	-	-	0,89±0,00	-
53		heksadekan	1602	0,81±0,01	1,15±0,18	1,20±0,25	2,44±1,15
54		heptadec-8-en	1680	-	-	0,74±0,28	-
55		heptadekan	1703	22,51±0,36	59,85±2,48	39,37±6,66	24,03±0,56

U svježem uzorku *P. ficiformis* upotrebom DVB/CAR/PDMS vlakna (HS-SvPfS) identificirano je 18 spojeva koji ukupno čine 88,36% vršnih para uzorka. Od ukupnog sadržaja vršnih para 56,24% pripada alifatskim spojevima od čega 53,48% pripada zasićenim alifatskim ugljikovodicima. Najzastupljeniji su oktan-3-on (24,02%) i heptadekan (22,51%). Derivati benzena čine 23,82% od ukupno identificiranih 88,36% površine kromatograma vršnih para u HS-SvPfS s benzaldehidom kao kvantitativno važnim spojem (18,59%). 8,3% spojeva spada u skupinu spojeva s dušikom, a aromatski šesteročlani heterociklički spoj piridin je bio zastupljen s 5,08%.

Upotrebom PDMS/DVB vlakna na svježem uzorku *P. ficiformis* (HS-SvPfR) identificirano je ukupno 29 spojeva (89,22% ukupnog sastava vršnih para uzorka). Alifatski spojevi (66,00%) su najveća skupina, a većina (61,52%) pripada alifatskim zasićenim ugljikovodicima. Heptadekan (39,37%), oktan-3-on (15,39%) i okt-1-en-3-on (2,13%) su najzastupljeniji spojevi iz te skupine. Derivati benzena tvore 15,18% ukupnih vršnih para u HS-SvPfR, od čega 10,82% pripada benzaldehidu. U manjem postotku zastupljeni su terpeni (3,19%), spojevi s dušikom (1,5%) i skupina ostalih spojeva (3,38%) u koju su svrstani norizoprenoidi, organohalogeni spojevi i derivati masnih kiselina. Razlog smještanja tih kemijskih skupina u ostale spojeve bio je njihov manji udio u ukupnom sadržaju vršnih para. (Graf 1.)

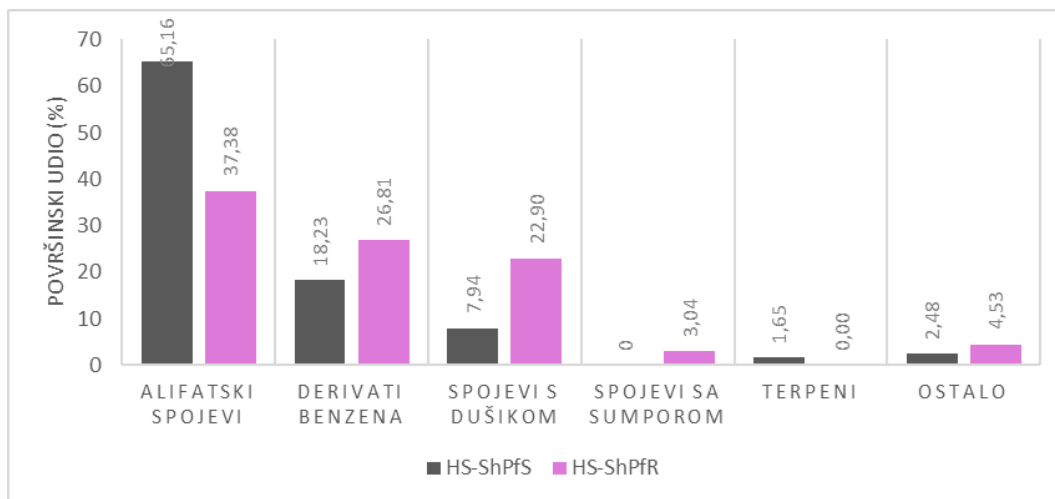
Graf 1. Histogramski prikaz strukturnih skupina spojeva u svježim uzorcima vršnih para *P. ficiformis* upotrebom DVB/CAR/PDMS vlakna (HS-SvPfS) i upotrebom PDMS/DVB vlakna (HS-SvPfR).



U sušenom uzorku spužve upotrebom DVB/CAR/PDMS vlakna (HS-ShPfS) identificirano je ukupno 17 spojeva koji predstavljaju 95,47% ukupne površine kromatograma vršnih para. Kao i u svježem uzorku, prevladavaju alifatski spojevi (65,16%), a nema nezasićenih alifatskih ugljikovodika. U skupini zasićenih alifatskih spojeva 59,85% pripada najzastupljenijem spoju, ravnolančanom zasićenom ugljikovodiku, heptadekanu. Sljedeća skupina spojeva po zastupljenosti su derivati benzena. U toj skupini najzastupljeniji su fenilmetanol (14,78%) i benzaldehid (2,68%). Spojevi s dušikom (7,94%) sadrže 3,50% *N,N*-dimetilmetanamina i 3,06% piridina. Identificirano je također 1,65% terpena i 2,48% ostalih spojeva (norizoprenoidi, organohalogeni spojevi i derivati masnih kiselina).

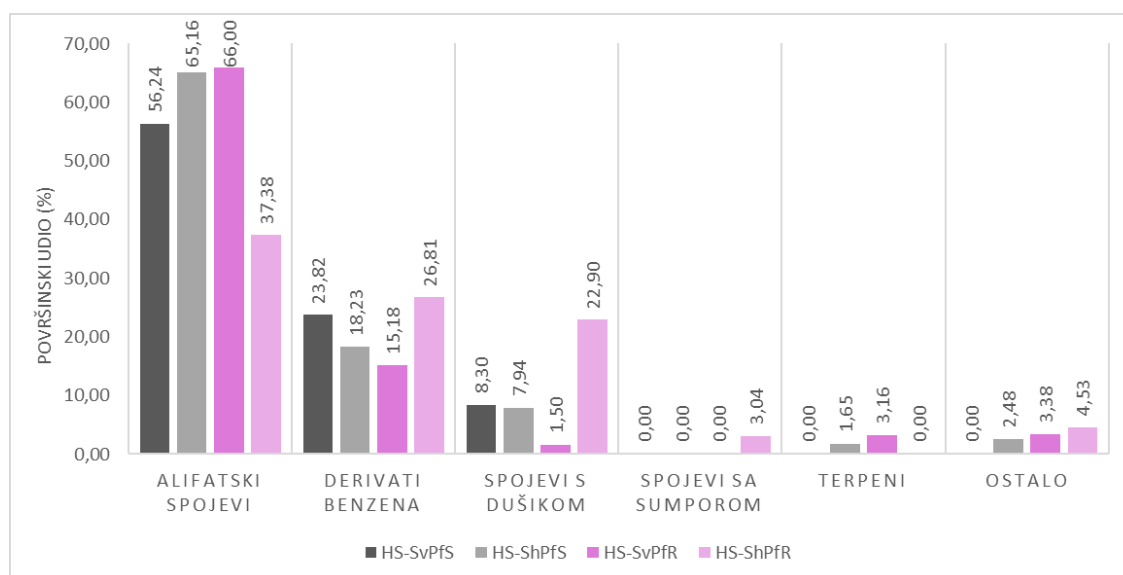
U suhom uzorku *P. ficiformis* (HS-ShPfR), upotrebom PDMS/DVB vlakna identificirano je 25 spojeva koji čine 94,65% ukupnog sadržaja vršnih para uzorka. U rezultatima analize na ovome uzorku uočena je drugačija raspodjela strukturnih skupina spojeva prema zastupljenosti. Najzastupljeniji su alifatski spojevi kao i u prethodnim uzorcima (37,38%) što je bitno manje od svježeg uzorka. Većinski su zastupljeni zasićeni alifatski ugljikovodici (35,54%) s heptadekanom (24,03%) kao najzastupljenijim spojem. Derivati benzena predstavljaju 26,81% ukupnih vršnih para, a fenilmetanol (benzil-alkohol) zauzima 18,90%. Velika razlika na ovome vlaknu je zastupljenost spojeva s dušikom (22,90%). U toj skupini najveći postotak (19,08%) pripada *N,N*-dimetilmetanaminu. Također, u ovom uzorku je identificirano prisustvo spojeva sa sumporom, od kojih je kvantitativno važan metilsulfanilmetan (2,38%). Ostali spojevi su prisutni (kategorizirani kao i u prijašnjim uzorcima) s 4,39%. (Graf 2.)

Graf 2. Histogramski prikaz strukturnih skupina spojeva u suhim uzorcima vršnih para *P. ficiformis* upotrebom DVB/CAR/PDMS vlakna (HS-ShPfs) i upotrebom PDMS/DVB vlakna (HS-ShPfr).



Prikazana je (Graf 3.) usporedba raspodjele strukturnih skupina spojeva u svježim i suhim uzorcima vršnih para spužve *P. ficiformis*, izoliranih HS-SPME tehnikom na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknu.

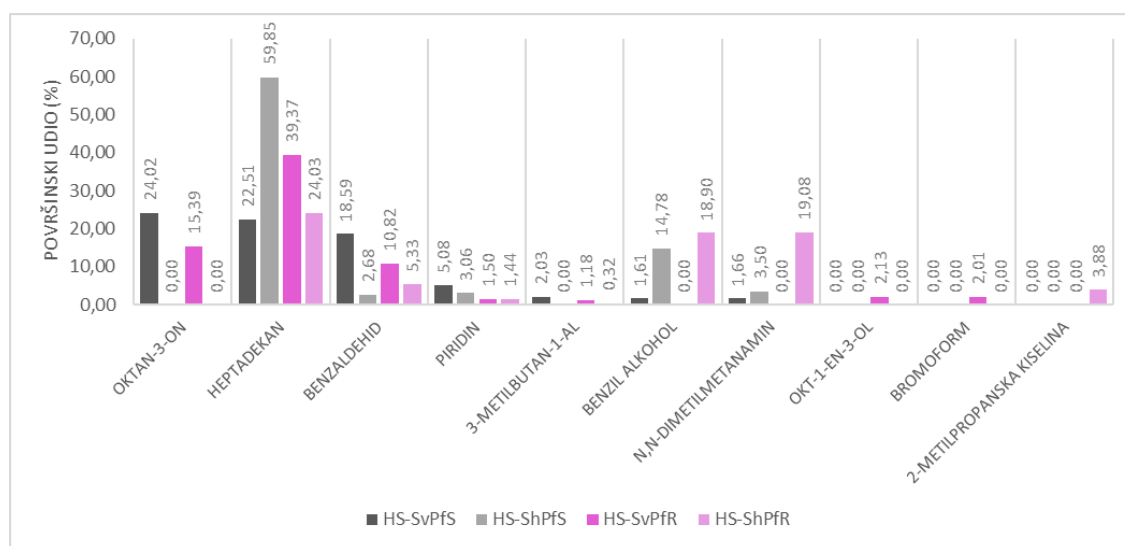
Graf 3. Histogramski prikaz usporedbe raspodjele strukturnih skupina spojeva u svježim i suhim uzorcima *P. ficiformis*. Svježi uzorak ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-SvPfs); suhi uzorak ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-ShPfs); svježi uzorak ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-SvPfr); suhi uzorak ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-ShPfr).



Rezultati HS-SPME/GC-MS (Graf 4.) analize ukazuju da je ravnolančani zasićeni alifatski C₁₇ ugljikovodik heptadekan dominantan spoj u oba uzorka koristeći oba vlakna. Ugljikovodici su karakteristični spojevi za morske beskralješnjake i alge te čine dio njihovog obrambenog sustava.²⁶ Može se uočiti kako suhi uzorak spužve na DVB/CAR/PDMS vlaknu (HS-ShPfS) sadrži najveći udio ovog spoja i to 2,65 puta veći u odnosu na analizirani svježi uzorak na istome vlaknu. Veći postotak heptadekana u suhom uzorku može se pripisati prisutnosti cijanobakterija koje žive simbiotski sa spužvama. Provedeno je istraživanje na temu biosintetskog puta alkana iz cijanobakterija. Otkriveno je da se biosintetski put sastoji od acil-acil nosećeg proteina reduktaze i aldehid dekarbonilaze koji zajedno pretvaraju međuprodukte metabolizma masnih kiselina u alkane i alkene.²⁷ Svježi uzorak sadrži 1,64 puta (PDMS/DVB vlakno) veći postotak heptadekana u odnosu na suhi uzorak. Nekoliko drugih zasićenih ugljikovodika poput heksadekana i pentadekana identificirano je u manjim udjelima u gotovom svim uzorcima. Identificirano je više C₈ alifatskih spojeva, poput okt-1-en-3-ola, okt-4-en-3-ola, oktan-2,3-diona, oktan-2-ona, oktanala i (*E*)-okt-2-en-1-ala. Oktan-3-on identificiran je samo u svježim uzorcima *P. ficiformis*, što ukazuje da proces sušenja ima izravan utjecaj na gubitak ovog spoja, vjerojatno zbog isparavanja.²⁸ Također, u svježim uzorcima *P. ficiformis* (HS-SvPfS, HS-SvPfR) pronađen je isparljivi feromon, C₈ ugljikovodik (*3E,5Z*)-okta-1,3,5-trien (fukoseraten) (1,15%; 0,86%).²⁹ U svježim uzorcima *P. ficiformis* (HS-SvPfS, HS-SvPfR) moguće je uočiti veću zastupljenost aromatskog spoja benzaldehida u odnosu na suhi uzorak. Gubitak benzaldehida tijekom sušenja na zraku mogao bi biti posljedica njegove veće isparljivosti u odnosu na benzilni alkohol, a ne njegove oksidacije u benzojevu kiselinu, koja nije pronađena u uzorcima.³⁰ Benzil-alkohol je fenilpropanski derivat čiji postotak raste u suhim uzorcima (9,18-18,90 puta). Fenilpropanski derivati se izvode iz fenilalanina gdje dolazi do skraćivanja bočnog lanca za dva ugljikova atoma što se može odvijati β-oksidacijskim putem ili neoksidativno.²⁹ Isparljivi amin, *N,N*-dimetilmetanamin (trimetilamin) često je korišten parametar svježine morskih organizama. Trimetilamin nastaje iz trimetilamin oksida (TMAO) kao rezultat djelovanja bakterija koje uzrokuju kvarenje³¹ što može objasniti veći postotak ovog amina u suhim uzorcima. U svim uzorcima utvrđen je aromatski heterociklički spoj piridin (5,08%; 3,06%; 1,50%; 1,44%). Piridina u prirodi nema u izobilju, osim u listovima i korijenu velebilja (*Atropa belladonna*).³² Derivati piridina, međutim, često su dio biomolekula u morskim spužvama kao što su alkaloidi.³³ β-citral (1,65%) identificiran je u HS-ShPfS, dok su preostali terpeni kao što su *p*-cimen (0,20%),

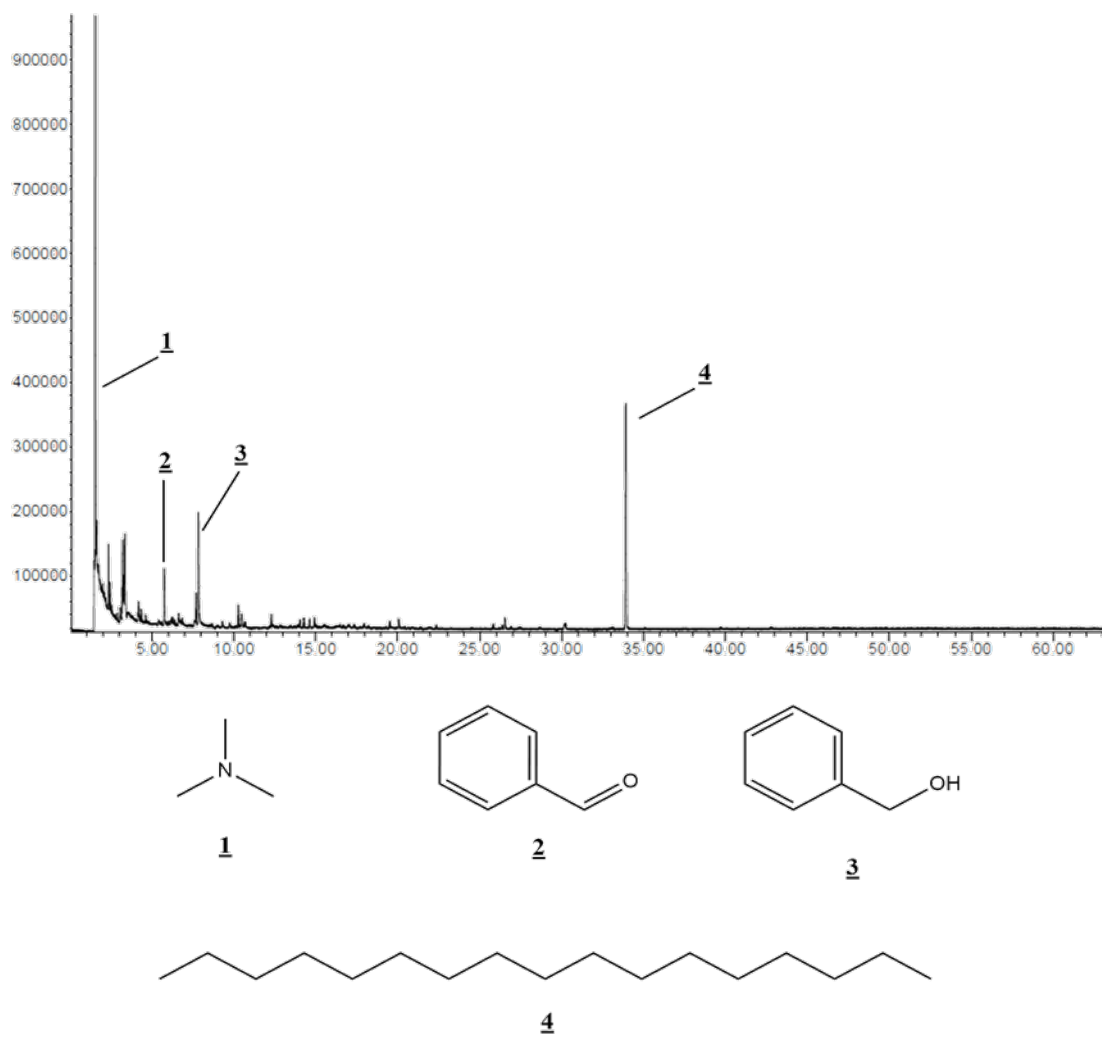
eukaliptol (1,07%), fenhon (0,34%), linalool (1,16%) i β -tujon (0,34%) identificirani na svježem uzorku upotrebom PDMS/DVB vlakna (HS-SvPfR). Jedino je u svježem uzorku pronađen bromoform koristeći PDMS/DVB vlakno (HS-SvPfR), halogenalkan koji se može pronaći kao dominantan spoj u invazivnoj crvenoj algi *A. taxiformis*.³⁴ (Slika 7., Slika 8.)

Graf 4. Usporedba raspodjele kvantitativno važnih isparljivih spojeva *P. ficiformis* izoliranih HS-SPME/GC-MS. Svježi uzorak ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-SvPfs); suhi uzorak ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom (HS-ShPfs); svježi uzorak ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-SvPfR); suhi uzorak ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom (HS-ShPfR).





Slika 7. Kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva HS-SvPFR s naznačenim kvantitativno važnim spojevima: 1. piridin; 2. benzaldehid; 3. oktan-3-on; 4. heptadekan.



Slika 8. Kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva HS-ShPfR s naznačenim kvantitativno važnim spojevima: 1. trimetilamin; 2. benzaldehid; 3. benzil-alkohol; 4. heptadekan.

3.1.2. Profil isparljivih spojeva *Petrosia ficiformis* dobivenih hidrodestilacijom (HD)

Kemijski sastav i udio komponenata u isparljivom ulju (destilatu) svježeg i suhog uzorka *P. ficiformis* upotrebom hidrodestilacije u aparaturi modificiranoj po Clevengeru prikazan je u tablici 2. Identificirano je ukupno 127 spojeva upotrebom HD/GC-MS analize što čini 88,25% ukupno identificiranih isparljivih spojeva u svježem uzorku *P. ficiformis* (HD-SvPf) i 77,02% u suhom uzorku (HD-ShPf). Kemijski sastav destilata je prikazan kao površinski udio identificiranih spojeva.

Tablica 2. Isparljivi spojevi *P. ficiformis* izolirani hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (HD) i analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS); (V: destilat svježeg uzorka *P. ficiformis* (HD-SvPf); VI: destilat suhog uzorka *P. ficiformis* (HD-ShPf).

Redni broj	Uobičajen naziv spoja	IUPAC naziv spoja	RI	Površinski udio (%) ± SD	
				V	VI
1		2-metil-1H-pirol	750	0,32±0,07	0,16±0,10
2	furfural	furan-2-karbaldehid	830	0,16±0,04	0,16±0,09
3		(<i>E</i>)-heks-2-enal	857	0,39±0,01	0,41±0,10
4		4-metiloktan	863	-	0,03±0,03
5		etilbenzen	868	1,00±0,01	0,67±0,03
6	<i>p</i> -ksilen	1,4-ksilen	878	2,87±0,15	2,37±0,08
7	fukoseraten	(3 <i>E</i> ,5 <i>Z</i>)-okta-1,3,5-trien	879	0,19±0,02	-
8		ciklookta-1,3,5,7-tetraen	880	-	0,08±0,03
9		heptan-2-on	889	0,71±0,04	0,28±0,07
10		stiren	890	0,10±0,00	-
11	<i>o</i> -ksilen	1,2-ksilen	894	-	0,61±0,03
12		nonan	900	-	0,58±0,01
13		(<i>Z</i>)-hept-4-enal	901	2,48±0,16	-
14		heptanal	902	0,61±0,01	0,22±0,07
15	metional	3-(metilsulfanil)propanal	906	0,19±0,01	0,22±0,07

16		benzaldehyd	961	2,43±0,16	2,38±0,68
17	dimetil-trisulfid	(metiltrisulfanil)metan	972	5,31±0,10	7,50±2,34
18		heptan-1-ol	975	0,30±0,01	-
19		okt-1-en-3-ol	982	8,65±0,58	0,29±0,04
20		oktan-2,5-dion	983	-	0,28±0,09
21		fenol	984	-	0,22±0,01
22		oktan-2,3-dion	987	0,18±0,05	-
23		benzotrilit	986	-	0,20±0,01
24		2,4,6-trimetilpiridin	987	-	0,45±0,01
25		oktan-3-on	988	1,60±0,03	-
26		oktan-2-on	992	0,38±0,03	-
27		oktanal	1005	0,18±0,01	0,12±0,01
28		1-metilpirol-2-karbaldehyd	1010	0,25±0,00	0,17±0,03
29		(<i>E,E</i>)-hepta-2,4-dienal	1012	0,07±0,00	-
30	diizopropil-disulfid	di(1-metiletil)-disulfid	1016	-	0,05±0,05
31		2-etilheksan-1-ol	1029	0,13±0,00	0,12±0,02
32	eukaliptol	1,3,3-trimetil-2-oksabicyklo[2.2.2]oktan	1035	0,26±0,08	-
33	benzil-alkohol	fenilmetanol	1040	0,59±0,20	0,61±0,07
34	benzenacetaldehyd	2-fenilacetaldehyd	1050	1,17±0,30	1,75±0,66
35		2-metildekan	1061	0,15±0,02	-
36		(<i>E</i>)-okt-2-enal	1063	0,66±0,06	0,22±0,03
37	acetofenon	1-feniletanon	1066	-	0,40±0,10

38		(<i>E</i>)-okt-2-en-1-ol	1071	2,12±0,07	-
39		oktan-1-ol	1074	-	0,03±0,01
40		oktilciklopropan	1075	2,65±0,18	0,11±0,00
41		(<i>E,E</i>)-okta-3,5-dien-2-on	1083	0,33±0,05	-
42		nonan-2-on	1091	0,10±0,02	0,20±0,04
43		nonanal	1102	0,15±0,01	0,32±0,07
44	linalool	3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-ol	1104	0,40±0,01	0,45±0,12
45		2,6-dimetilcikloheksan-1-ol	1110	0,17±0,03	0,24±0,05
46	fenetil-alkohol	2-feniletanol	1117	0,28±0,15	-
47	fenilacetone	fenilpropan-2-on	1124	-	0,10±0,01
48		1-(4-metilcikloheks-3-en-1-il)etanon	1130	-	0,34±0,05
49	kamfor	1,7,7-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan-2-on	1139	0,12±0,04	0,04±0,04
50		(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-dienal	1156	1,02±0,10	0,45±0,18
51		(<i>Z</i>)-non-2-en-1-al	1162	0,44±0,04	0,28±0,11
52	borneol	1,7,7-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan-2-ol	1167	-	0,03±0,03
53		dekan-2-on	1194	0,15±0,00	0,28±0,02
54		dekanal	1200	0,50±0,02	0,33±0,03
55	estragol	1-metoksi-4-(prop-2-en-1-il)benzen	1201	-	0,17±0,03
56		(<i>Z,Z</i>)-2,6-dimetilokta-3,5,7-trien-2-ol	1209	-	0,20±0,02
57	karvakril-metil-eter	2-metoksi-1-metil-4-(1-metiletil)benzen	1250	0,09±0,00	-
58	β-ciklohomocitral	2-(2,6,6-trimetilcikloheksen-1-il)acetaldehid	1261	-	0,20±0,03
59		dec-2-en-1-ol	1273	1,32±0,10	-

60		2,6,11-trimetildodekan	1275	0,33±0,00	-
61		1H-indol	1292	0,52±0,02	6,00±0,83
62		2-deciloksiran	1307	0,28±0,01	-
63		undekanal	1308	-	0,12±0,02
64		4,6-dimetildodekan	1325	0,39±0,02	-
65	kaprilil-izobutirat	oktil-2-metilpropionat	1348	0,44±0,02	-
66		dodekan-2-on	1349	0,28±0,03	0,42±0,05
67		dodekan-3-on	1387	-	0,27±0,03
68	difenil-eter	fenoksibenzen	1396	0,25±0,00	0,26±0,02
69		dodekanal	1409	1,17±0,12	0,97±0,04
70		3-metildekanska kiselina	1417	-	0,26±0,26
71	(<i>E</i>)-geranilaceton	(<i>5E</i>)-6,10-dimetilundeka-5,9-dien-2-on	1452	0,19±0,00	0,59±0,01
72		(<i>Z</i>)-dodec-8-en-1-ol	1468	-	0,48±0,01
73		dodekan-1-ol	1468	-	1,20±0,03
74		(<i>E</i>)-dodec-2-en-1-ol	1473	0,62±0,00	-
75	γ-kurkumen	1-metil-4-[6-metilhept-5-en-2-il]cikloheksa-1,3-dien	1475	-	0,19±0,19
76	β-Jonon	(<i>E</i>)-4-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-en-1-il)but-3-en-2-on	1485	0,94±0,08	3,38±0,18
77		tridekan-2-on	1497	-	1,36±0,04
78		pentadekan	1503	0,48±0,05	-
79		2-bromododekan	1505	0,69±0,02	-
80		tridekanal	1511	1,33±0,16	1,22±0,05
81		2,5-ditert-butilfenol	1514	-	0,55±0,03

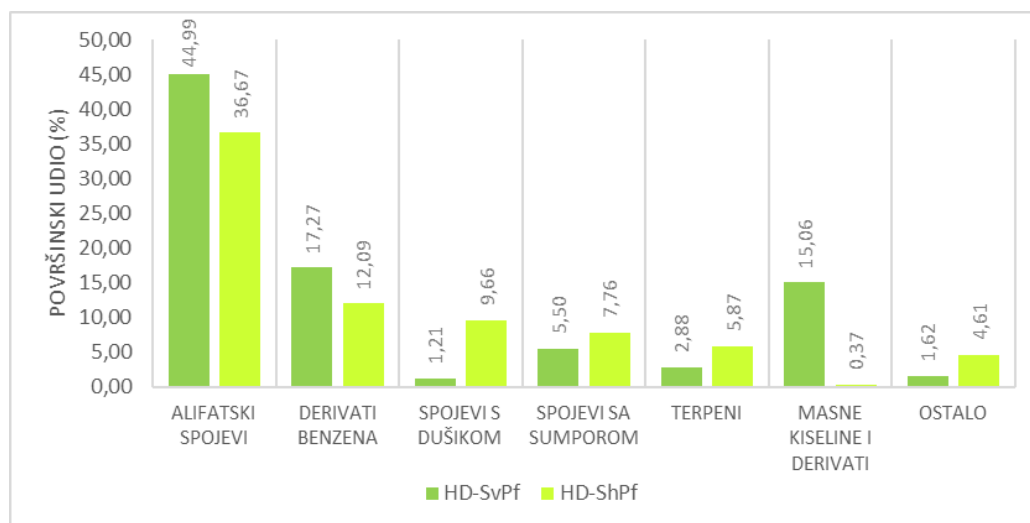
82	gvajacilaceton	1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propan-2-on	1531	0,45±0,01	1,96±0,09
83		1-bromododekan	1552	-	0,70±0,03
84	nerolidol	(6E)-3,7,11-trimetildodeka-1,6,10-trien-3-ol	1564	0,13±0,02	0,31±0,02
85		tetradekan-2-on	1569	0,30±0,15	1,18±0,04
86		heksadec-1-en	1579	1,29±0,17	1,39±0,03
87		tridekanonitril	1592	-	0,29±0,05
88		heksadekan	1600	0,45±0,02	1,07±0,07
89		(Z)-tetradec-9-en-1-al	1603	1,58±0,06	4,06±0,01
90		tetradekanal	1614	3,17±0,52	2,68±0,06
91	fenilefrin	3-[1-hidroksi-2-(metilamino)etil]fenol	1660	0,11±0,02	0,55±0,07
92		1-(4-izopropilfenil)-2-metilpropil-acetat	1667	-	0,45±0,15
93		(Z)-tetradec-11-en-1-ol	1678	-	3,89±0,12
94		tetradekanonitril	1679	-	0,51±0,04
95		13-metiltetradekanal	1681	0,40±0,11	-
96		(Z)-heptadec-3-en	1687	0,91±0,06	-
97		heptadekan	1703	5,85±0,26	2,45±0,01
98		pentadekanal	1711	0,63±0,10	1,08±0,06
99	metil-miristat	metil-tetradekanoat	1726	0,29±0,01	-
100		8-metilheptadekan	1758	0,73±0,04	0,88±0,05
101		4-metilheptadekan	1760	0,53±0,04	1,53±0,03
102		metil-12-metiltetradekanoat	1786	0,68±0,03	-
103		oktadec-1-en	1790	-	0,35±0,17

104		pentadekanonitril	1792	-	1,24±0,11
105		metil-9-metiltetradekanoat	1793	-	-
106		oktadekan	1804	0,14±0,05	-
107	fitan	2,6,10,14-tetrametilheksadekan	1809	-	0,32±0,05
108	difenil-glikol	2-fenoksietoksibenzen	1811	-	0,21±0,07
109		heksadekanal	1822	-	0,31±0,07
110	farnezil-acetat	3,7,11-trimetildodeka-2,6,10-trien-1-il-acetat	1844	-	0,27±0,27
111	heksahidrofarnezil-aceton (fiton)	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on	1846	0,14±0,01	0,45±0,27
112		(Z)-heksadeka-1,9-dien	1863	-	0,47±0,19
113		(Z)-heksadec-11-enal	1871	-	0,15±0,15
114	diizobutil-ftalat	di(2-metilpropil)-benzen-1,2-dikarboksilat	1872	8,44±1,12	1,80±0,57
115		heksadekan-1-ol	1883	0,37±0,08	2,04±0,52
116		nonadec-1-en	1895	0,41±0,01	0,35±0,17
117		(Z)-metilheksadec-7-enoat	1899	3,77±0,16	-
118	farnezil-aceton	(5E,9E)-6,10,14-trimetilpentadeka-5,9,13-trien-2-on	1919	0,17±0,03	0,31±0,10
119	metil-palmitat	metil-heksadekanoat	1926	0,63±0,05	-
120		1-(pentiloksi)tetradekan	1971	-	0,79±0,18
121		metil-14-metilheksadekanoat	1975	1,22±0,10	-
122		etil-(E)-heksadec-9-enoat	1979	3,66±0,26	-
123		ikos-1-en	1992	-	0,15±0,09
124		ikosan	2000	-	0,12±0,12

125		(<i>Z</i>)-metil-heptadec-10-enoat	2015	0,21±0,01	-
126	geranil-linalool	(6 <i>E</i> ,10 <i>E</i>)-3,7,11,15-tetrametilheksadeka-1,6,10,14-tetraen-3-ol	2032	0,21±0,03	0,64±0,21
127	izopačidiktol A	(3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-3,8-dimetil-5-[(2 <i>R</i>)-6-metilhept-5-en-2-il]- 1,3a,4,5,6,8a-heksahidroazulen- 4-ol	2130	0,73±0,04	-

U grafu 5. prikazana je usporedba raspodjele strukturnih skupina spojeva u isparljivom ulju (destilatu) svježeg i suhog uzorka *P. ficiformis*. U destilatu, kao i u analiziranim vršnim parama, prevladavaju alifatski spojevi. Veća zastupljenost alifatskih spojeva (44,99%) pronađena je u destilatu svježeg uzorka spužve (HD-SvPf), naspram 36,66% u suhom uzorku (HD-ShPf). U svježem uzorku je podjednak omjer zasićenih i nezasićenih alifatskih ugljikovodika, dok je u suhom uzorku gotovo duplo više zasićenih, naprema nezasićenim alifatskim spojevima. Iz ove skupine spojeva najzastupljeniji su okt-1-en-3-ol (8,65%, svježe; 0,29%, suho), heptadekan (5,31%, svježe; 7,50%, suho) i tetradekanal (3,17%, svježe; 2,68%, suho). Derivati benzena su zastupljeni s 17,18% u destilatu svježeg uzorka, a u suhom uzorku zastupljeni su s 12,09%, te su druga najzastupljenija skupina u destilatima. Predstavnik ove skupine je di(2-metilpropil)-benzen-1,2-dikarboksilat (diizobutil-ftalat), a njegova zastupljenost je 4,69 puta manja u suhom uzorku. Znatnija količina spojeva s dušikom identificirana je u osušenom uzorku spužve (9,66%) od čega 6,00% pripada heterocikličkom spoju (sastavljenom od benzenskog i pirolskog prstena) indolu. Većinu spojeva u ovoj skupini čine aromatski spojevi, međutim dokazana je i prisutnost dugolančanih nitrila (tridekanonitril, tetradekanonitril i pentadekanonitril). Najveća razlika u svježem i suhom uzorku uočena je u skupini masnih kiselina i njihovih derivata. U svježem uzorku identificirano je ukupno 15,06% navedenih spojeva, dok je u suhim uzorcima identificirano svega 0,37%. Postotak terpena i spojeva sa sumporom raste u destilatu suhog uzorka *P. ficiformis*. Terpeni su tako u destilatu suhog uzorka 2,06 puta zastupljeniji, a spojevi sa sumporom 1,45 puta. Predstavnik skupine terpena je gvajacil-aceton (0,45%; 1,96%), a skupine spojeva sa sumporom je dimetil-trisulfid (5,31%; 7,50%). U skupinu ostalih spojeva pripadaju norizoprenoidi, organohalogeni spojevi i derivati klorofila.

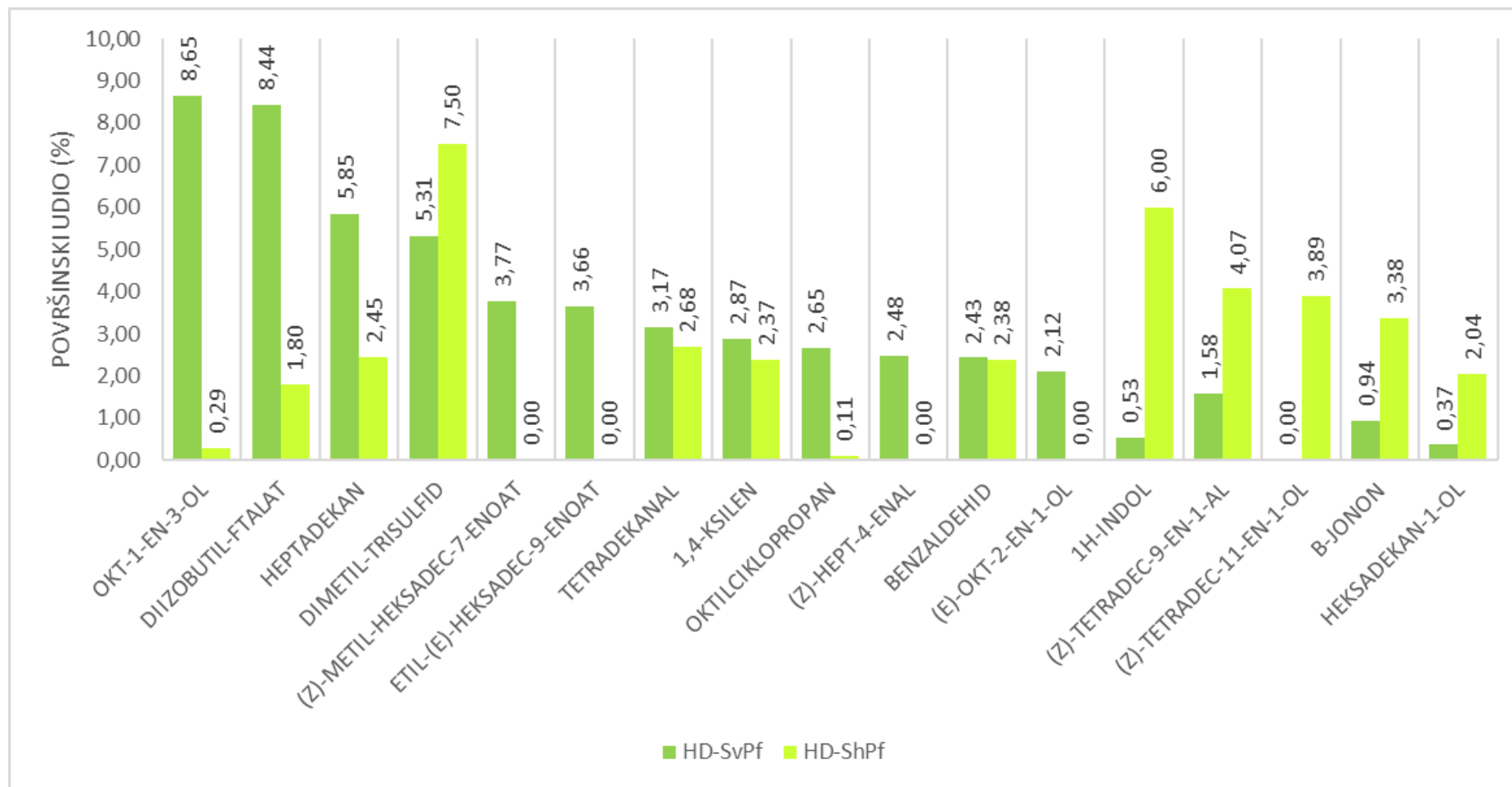
Graf 5. Histogramski prikaz raspodjele strukturnih grupa spojeva u destilatima svježeg (HD-SvPf) i suhog uzorka spužve (HD-ShPf).

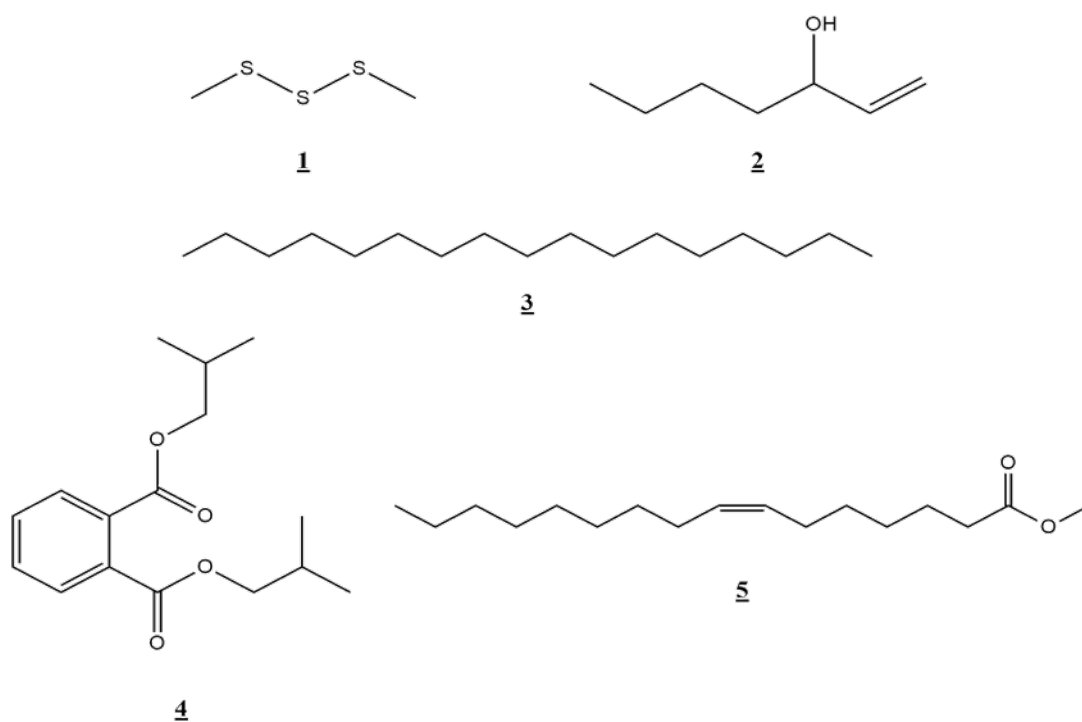
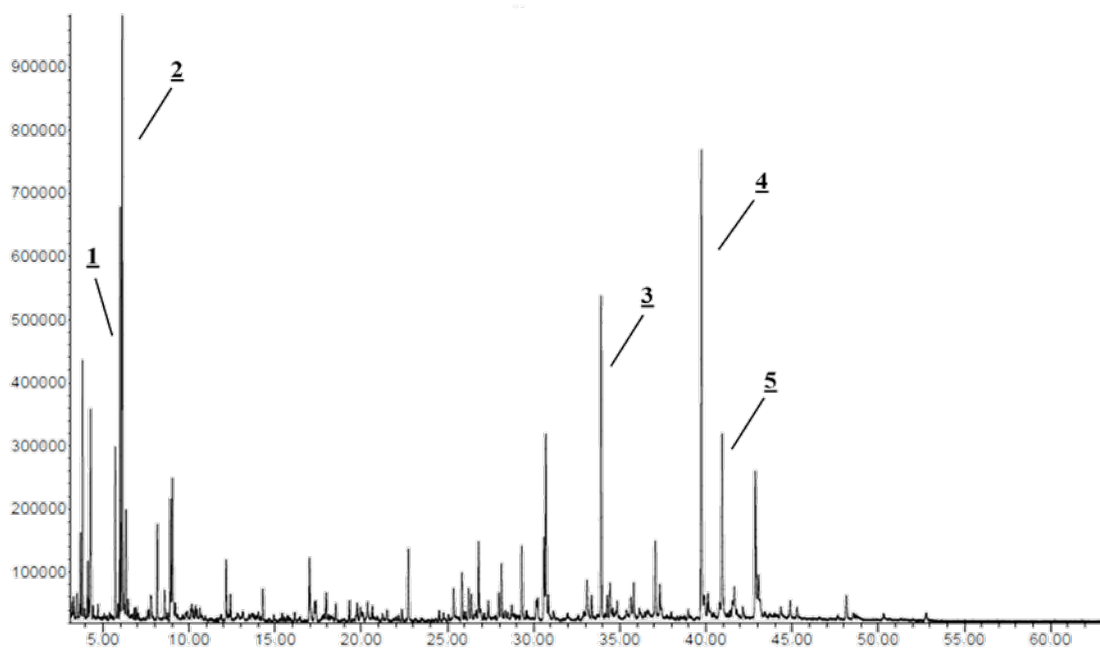


U grafu 6. su prikazani najzastupljeniji spojevi dobiveni HD/GC-MS analizom. (Slika 9., Slika 10.) Alifatski nezasićeni alkohol okt-1-en-3-ol identificiran je kao glavna komponenta svježeg destilata *P. ficiformis* (HD-SvPf). Ovaj spoj prate drugi C₈ spojevi kao što su: (*E*)-okt-2-en-1-ol, oktan-2,3-dion, oktan-3-on ili oktan-2-on. U destilatu suhog uzorka (HD-ShPf) došlo je do značajnog smanjenja udjela okt-1-en-3-ola, kao i ostalih nižih alifatskih spojeva. Za razliku od vršnih para *P. ficiformis*, heptadekan je bio značajno manje zastupljen u destilatu svježeg (5,85%) i suhog (2,45%) uzorka spužve. U destilatu svježeg uzorka spužve utvrđena je prisutnost diizobutil-ftalata (8,44%). Di-ftalati pronađeni su u morskim spužvama *Cinachyrella cavernosa*³⁵ i *Halidcondria sp.*³⁶, a njihova prisutnost u spužvama potencijalno potječe od cijanobakterija na spužvama.³⁵ Identificirano je 2,87% *p*-ksilena u svježem i 2,37% u suhom uzorku. Ksilena i njegova tri izomera rijetki su u morskim organizmima, no mogu se pronaći u guavi, tropskom voću iz Srednje i Južne Amerike.³⁷ Odvijanje oksidacijskih reakcija tijekom sušenja očituje se i u povećanim udjelima spojeva s kisikom u destilatu suhog uzorka spužve kao što su pentadekanal, tetradekanal i heksadekan-1-ol. Uočeni su i produkti razgradnje karotenoida poput β-jonona čiji se udio povećao 3,60 puta u suhom uzorku te β-ciklohomocitral čija je prisutnost identificirana samo u suhom uzorku. Od spojeva sa sumporom, kvantitativno je važan dimetil-trisulfid, čiji udio raste u suhom uzorku (5,31%, svježe; 7,50%, suho). Dimetil-trisulfid, zajedno s ostalim sumpornim spojevima zaslužan je za jak, neugodan miris koji ova spužva može proizvesti. Postoji više istraživanja o ulozi sumpornih spojeva u morskim spužvama u odvrćajućim

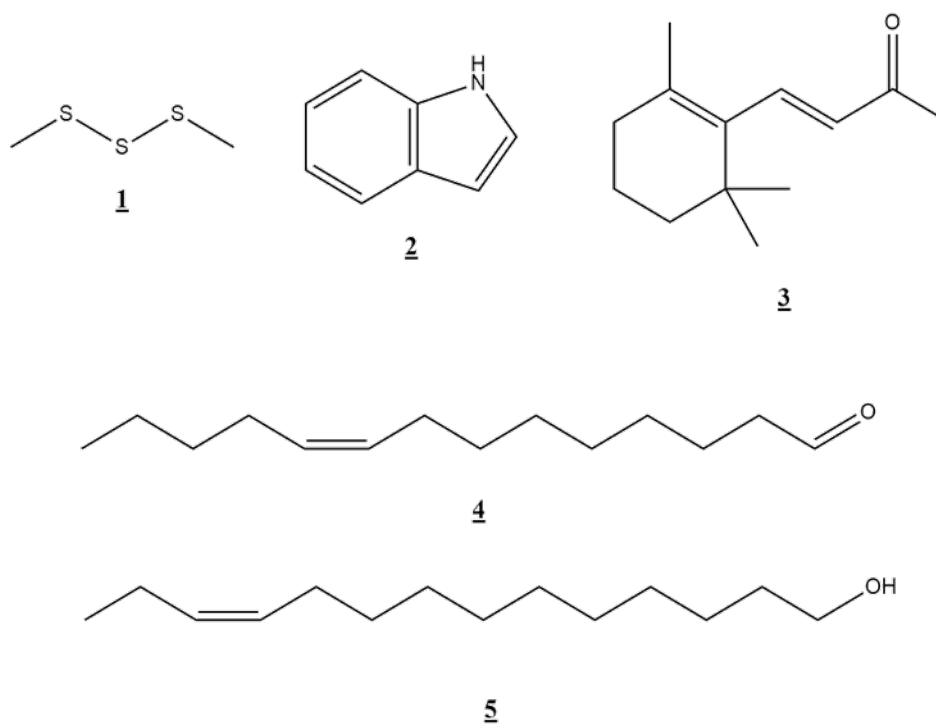
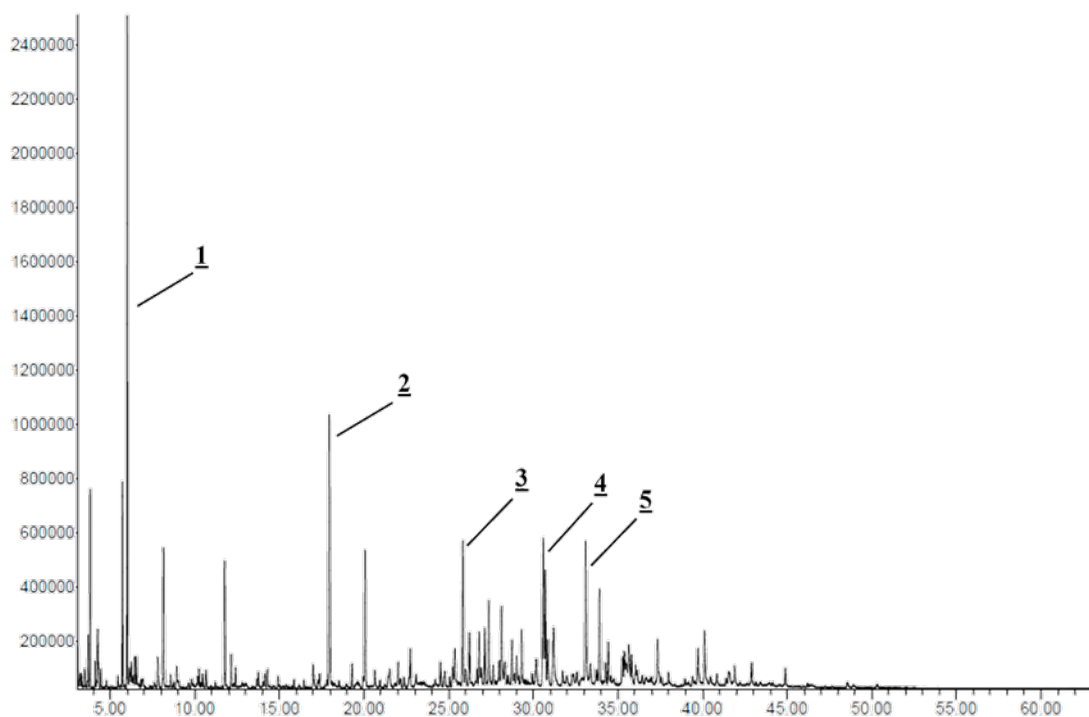
mehanizmima tijekom obrane od grabežljivaca, no provedena istraživanja pokazuju različite zaključke.^{38,39} Spojevi s dušikom su u većoj mjeri identificirani u destilatu suhog uzorka *P. ficiformis*. U HD-ShPf, iz ove grupe spojeva, najveći je udio indola (6,00%). Provedena su ekstenzivna istraživanja o indolnim alkaloidima iz morskih organizama kao perspektivnoj klasi spojeva za otkriće glavnih komponenata novih lijekova.⁴⁰ Od ostalih spojeva u ovoj grupi, identificirani su ravnolančani nitrili: tridekanonitril, tetradekanonitril i pentadekanonitril. Postotci spojeva u skupini masnih kiselina i njihovih derivata kao što su etil-(*E*)-heksadec-9-enoat, metil-14-metilheksadekanoat i (*Z*)-metilheksadec-7-enoat se znatno mijenjaju. Naime, spojevi ove skupine su pronađeni u destilatu svježeg uzorka spužve, dok u destilatu suhog uzorka spužve gotovo i da nije bilo spojeva ove skupine. Razlog tome mogu biti oksidacijske reakcije i razgradnja lipida tijekom procesa sušenja. Pronađeni su derivati klorofila fitan i heksahidrofarnesil-aceton (fiton). Prilikom sušenja porasla je koncentracija navedenih spojeva, vjerojatno zbog degradacije klorofila.⁴¹

Graf 6. Usporedba raspodjele kvantitativno važnih isparljivih spojeva svježeg uzorka *P. ficiformis* (HD-SvPf) i suhog uzorka *P. ficiformis* (HD-ShPf) izoliranih upotrebom HD/GC-MS.





Slika 9. Kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva HD-SvPf s naznačenim kvantitativno važnim spojevima: 1. dimetil-trisulfid; 2. okt-1-en-3-ol; 3. heptadekan; 4. diizobutil-ftalat; 5. (Z)-metil-heksadec-7-enoat.



Slika 10. Kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva HD-ShPf s naznačenim kvantitativno važnim spojevima: 1. dimetil-trisulfid; 2. indol; 3. β-jonon; 4. (Z)-tetradec-9-en-1-al; 5. (Z)-tetradec-11-en-1-ol.

4. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir dobivene rezultate, kao i raspravu ovog diplomskog rada, može se zaključiti sljedeće:

- Cilj ovog diplomskog rada bio je izolirati i proučiti kemijski profil isparljivih spojeva svježeg i na zraku sušenog uzorka morske spužve *Petrosia ficiformis*.
- Provedbom hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru dobiven je destilat svježeg i suhog uzorka spužve, dok su mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi ekstrahirane vršne pare uzoraka na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknima. Uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.
- U vršnim parama na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknima izolirano je ukupno 55 spojeva. Na DVB/CAR/PDMS vlaknu u svježem uzorku je identificirano 18 spojeva koji čine 88,36% ukupnog uzorka. Na istom vlaknu u suhom uzorku je identificirano 17 spojeva koji čine 95,47% ukupnih vršnih para. Na PDMS/DVB vlaknu u svježem uzorku identificirano je 29 spojeva koji predstavljaju 89,22% sastava vršnih para. Na istom vlaknu u suhom uzorku identificirano je 25 spojeva koji predstavljaju 94,65% sastava vršnih para uzorka.
- Rezultati HS-SPME/GC-MS analize ukazuju da je ravnolančani zasićeni alifatski C₁₇ ugljikovodik, heptadekan, dominantan spoj na oba vlakna. Jedino je u svježem uzorku na DVB/CAR/PDMS vlaknu identificiran oktan-3-ol s većim postotkom. Također, na oba vlakna derivati benzena čine kvantitativno važne skupine s benzaldehidom i benzil-alkoholom kao glavnim predstavnicima.
- U destilatu *P. ficiformis* identificirano je ukupno 127 spojeva, što predstavlja 88,25% ukupnih isparljivih spojeva u svježem uzorku *P. ficiformis* (HD-SvPf) i 77,02% u suhom uzorku (HD-ShPf). Najzastupljenija skupina spojeva su alifatski spojevi. Spojevi s najvećim udjelom u svježem uzorku su okt-1-en-3-ol (8,65%) i diizobutil-ftalat (8,44%), a u suhom uzorku najveći udio je dimetil-trisulfida (7,50%) i indola (6,00%)
- Odabirom različitih metoda izolacije isparljivih spojeva dobiva se potpuniji profil

isparljivih spojeva, odnosno pruža se cjelovitiji uvid u sastav i zastupljenost isparljivih spojeva u uzorku.

5. LITERATURA

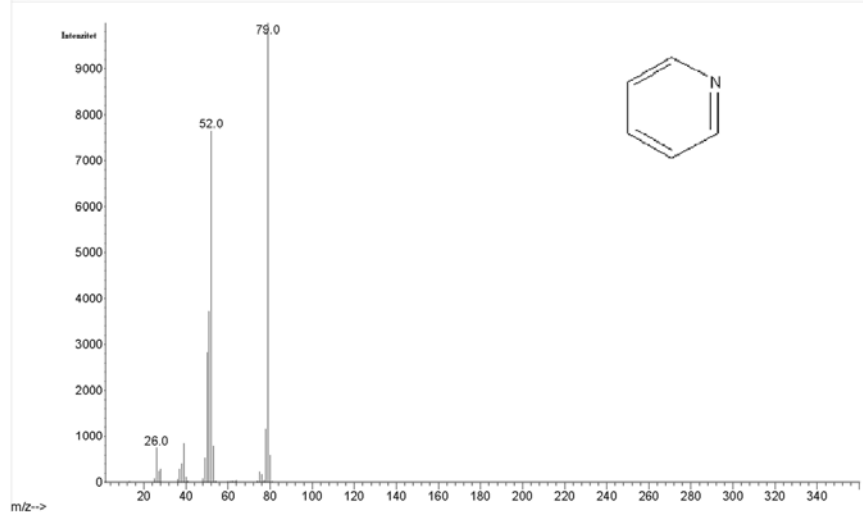
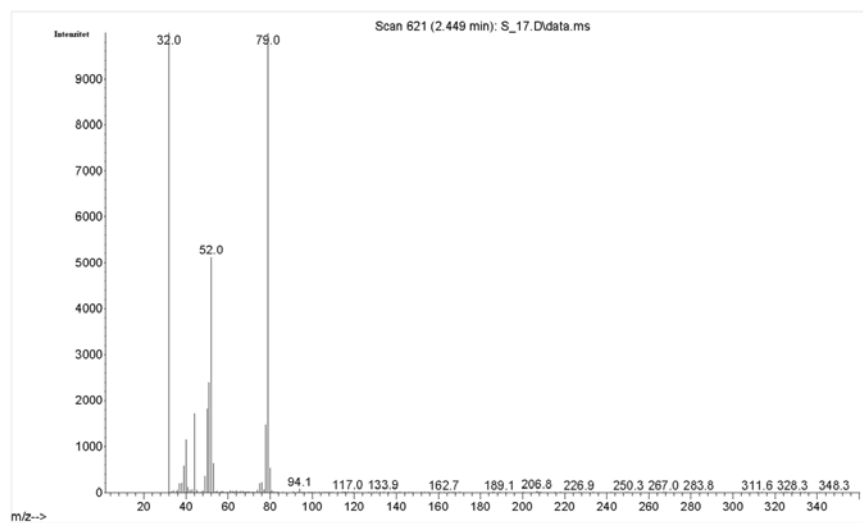
1. URL: <https://animaldiversity.org/accounts/Demospongiae/> [Pokušaj pristupa 13. 5. 2022.].
2. *D. Varijakzhan, L. Jiun-Lan, Y. Wai-Sum, Khatijah, Y., S. Rabiha, E. Swee-Hua, L. Kok-Sang, C. Chou-Min*, Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications, *Mar. Drugs* **19**, (2004) 246 doi: 10.3390/md19050246
3. URL: <https://www.themarinediaries.com/tmd-blog/its-a-spongy-world> [Pokušaj pristupa 08. 5. 2022.].
4. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=57548> [Pokušaj pristupa 08. 5. 2022.].
5. *J. Wulff*, Collaboration among sponge species increases sponge diversity and abundance in a seagrass meadow, *Mar. Ecol.* **29**, (2008) 193-204 doi:10.1111/j.1439-0485.2008.00224.x
6. *M. Klautau, C. Russo*, Metazoans, Origins of u R. M. Kliman (ur.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Vol.1, Elsevier Inc., 2016, 1-6.
7. *S. Benaksas*, Complexity Through Simplicity: An Ultrastructural Study of Four *Haliclona* Species in Support of Their Integrative Systematic Revision, Završni rad, The University of Sheffield, 2016.
8. *A. Aresta, P. Cotugno, N. De Vietro, C. Longo, M. Mercurio, P. Ferriol, C. Zambonin, C. Nonnis Marzano*, Volatile Organic Compounds, Indole, and Biogenic Amines Assessment in Two Mediterranean *Irciniidae* (Porifera, Demospongiae), *Mar. Drugs* **19** (2021) 711 doi: 10.3390/md19120711
9. *J. Pawlik*, The Chemical Ecology of Sponges on Caribbean Reefs: Natural Products Shape Natural Systems, *BioScience* **61** (2011) 888-898 <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.11.8>
10. *J. Hooper, G. Wörheide, E. Hajdu, E. Erpenbeck, N. Voogd, M. Klautau*, Zootaxa 20 years: Phylum Porifera, *Zootaxa*, **4979** (2021) 38-56 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4979.1.8>
11. *K. Anjum, S. Q. Abbas, S. A. Ali Shah, N. Akhter, S. Batool*, Marine Sponges as a Drug Treasure, *Biomol. Ther.* **4**, (2016) 347-362 doi: 10.4062/biomolther.2016.067

12. *I. Jerković, A. Radonić*, Praktikum iz organske kemije, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2009.
13. *I. Jerković*, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, interni nastavni materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2011.
14. *I. Jerković*, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2011.
15. *J. Pawliszyn*, Development of SPME Devices and Coatings, u *J. Pawliszyn* (ur.), Handbook of Solid Phase Microextraction, Vol.1, Waltham:Elsevier Inc., London, 2012.
16. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
17. *D. Skoog, D. West, J. Holler, S. Chrouch*, Fundamentals of analytical chemistry, 9th edition, Brooks/Cole, Belmont, CA, 2014 str. 912-924
18. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/ [Pokušaj pristupa 20. 6. 2022.].
19. *P. Phalke, S. Kavadi*, Review on Hyphenated Techniques, Int. J. Chem. Stud. **1** (2013) 157-165
20. URL: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html> [Pokušaj pristupa 15. 5. 2022.].
21. URL: <https://www.blueyardhub.com/10-sponges-youre-sure-to-find-in-the-aegean/stony-sponge-petrosia-ficiformis/> [Pokušaj pristupa 7. 5. 2022.].
22. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Petrosia_ficiformis [Pokušaj pristupa 07. 5. 2022.].
23. *E. Chelossi, M. Milanese, A. Milano, R. Pronzato, G. Riccardi*, Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae), J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **309** (2004) 21-33 doi:10.1016/j.jembe.2004.03.006
24. *A. Riesgo, S. Taboada, R. Perez-Portela*, Genetic diversity, connectivity and gene flow along the distribution of the emblematic Atlanto-Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Demospongiae), BMC Evol Biol. **19** (2019) 24 doi: 10.1186/s12862-018-1343-6

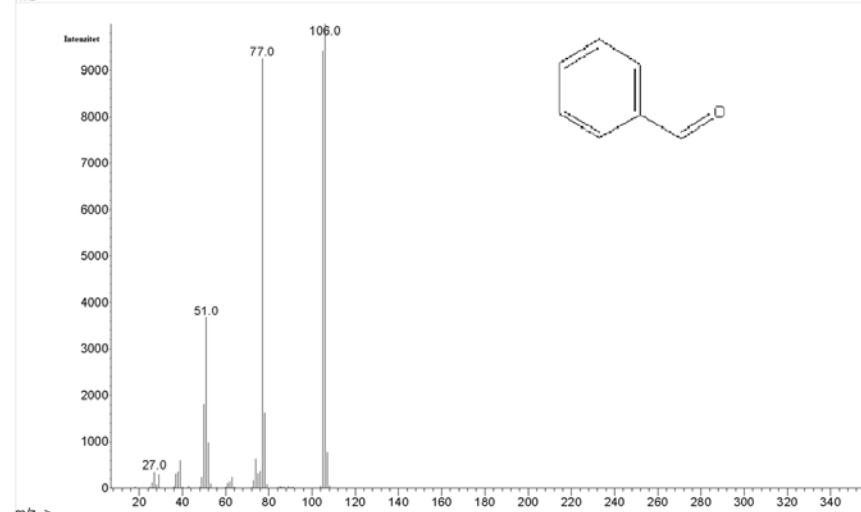
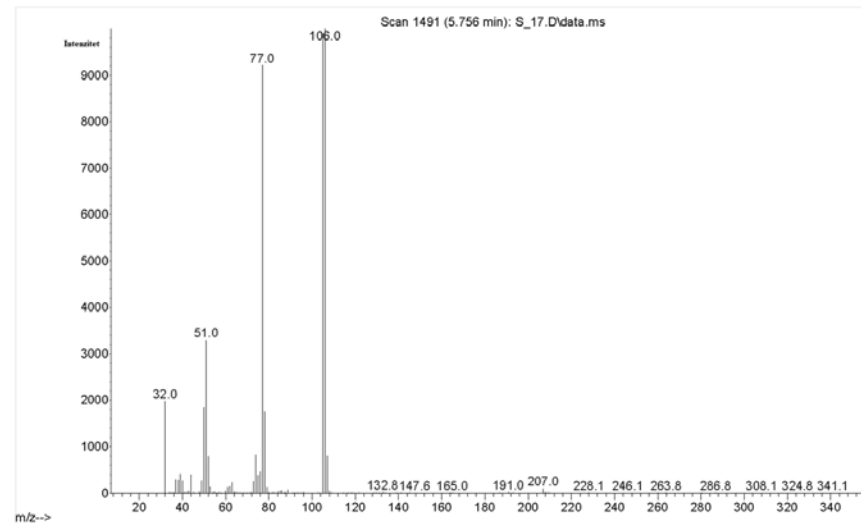
25. URL: <https://www.gbif.org/species/2246423> [Pokušaj pristupa 07. 5. 2022.].
26. S. De Rosa, Z. Kamenarska, K. Seizova, C. Iodice, A. Petrova, D. Nedelcheva, K. Stefanov, S. Popov, Volatile and polar compounds from *Geodia cydonium* and two *Tedania* species, *Bulg. Chem. Commun.* **40** (2008) 48-53
27. A. Schirmer, M. Rude, X. Li, E. Popova, S. Del Cardayre, Microbial Biosynthesis of Alkanes, *Science* **329** (2010) 559-562 doi: 10.1126/science.1187936
28. N. Ma, F. Pei, J. Yu, S. Wang, C.-T. Ho, K. Su, Q. Hu, Valid evaluation of volatile flavor composition of fresh and dehydrated *Tuber indicum* with different drying methods, *CyTA – J. Food* **16** (2018) 413-421 doi: 10.1080/19476337.2017.1413011
29. M. Kranjac, M. Zekić, A. Radonić, Z. Marijanović, S. Jokić, I. Jerković, BioProspecting Jadranskog mora: Pregled dosadašnjih istraživanja isparljivih organskih spojeva, *Kem. Ind.* **69** (2020) 521-529 doi:10.15255/KUI.2020.030
30. S. Radman, A-M. Cikoš, I. Flanjak, S. Babić, L. Čižmek, D. Šubarić, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, Less Polar Compounds and Targeted Antioxidant Potential (In Vitro and In Vivo) of *Codium adhaerens* C. Agardh 1822, *Pharmaceuticals* **14** (2021) 944 doi: 10.3390/ph14090944
31. M. Sato, Fish inspection u C. Devine, M. Dikeman (ur.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Vol.2, Elsevier Inc., 2004, str.474-483
32. G. A. Burdock, *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, Vol. 6, CRC.Press, Boca Raton, FL., 2010.
33. A. Elissawy, E. Dehkordi, N. Mehdinezhad, M. Ashour, Cytotoxic Alkaloids Derived from Marine Sponges: A Comprehensive Review, *Biomolecules* **11** (2021) 258 doi: 10.3390/biom11020258
34. N. Stipanović, Isparljivi organski spojevi invanzivne crvene alge *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta): halogenirani ugljikovodici, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2020.
35. S. Wahidullah, B. Naik, A. A. Al-Fadhli, Chemotaxonomic study of the demosponge *Cinachyrella cavernosa* (Lamarck), *Biochem. Syst. Ecol.* **58** (2014) 91-96 doi:10.1016/j.bse.2014.11.001

36. *J. F. Sun, Y. Wu, B. Yang, Y. Liu*, Chemical Constituents of Marine Sponge *Halichondria* sp. from South China Sea, *Chem. Nat. Compd.* **51** (2015) 975-977 doi:10.1007/s10600-015-1467-5
37. *O. Ekundayo, F. Ajani, T. Seppanen-Laakso, I. Laakso*, Volatile constituents of *Psidium Guajava* l. (guava) fruits, *Flavour Fragr. J.* **6** (1991) 233-236 <https://doi.org/10.1002/ffj.2730060314>
38. *C. Duque, A. Bonilla, E. Bautista, S. Zea*, Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*, *Biochem. Syst. Ecol.* **29** (2001) 459-467 doi: 10.1016/s0305-1978(00)00081-8
39. *J. Pawlik, G. McFall, S. Zea*, Does the Odor from Sponges of the Genus *Ircinia* Protect Them from Fish Predators?, *J. Chem. Ecol.* **28** (2002) 1103-1115 doi: 10.1023/a:1016221415028
40. *J. T. Wibowo, P. Ahmadi, S. I. Rahmawati, A. Bayu*, Marine-Derived Indole Alkaloids and Their Biological and Pharmacological Activities, *Mar. Drugs* **21** (2022) 3 doi: 10.3390/md20010003
41. *S. Radman, M. Zekić, I. Flanjak, A.-M. Cikoš, S. Jokić, I. Jerković*, Contribution to the chemodiversity of ex *Cystoseira* sp. - *Gongolaria barbata* and *Ericaria crinita* from the Adriatic Sea: Volatiles, fatty acids and major pigments, *Algal Res.* **63** (2022) 15 doi:10.1016/j.algal.2022.102653

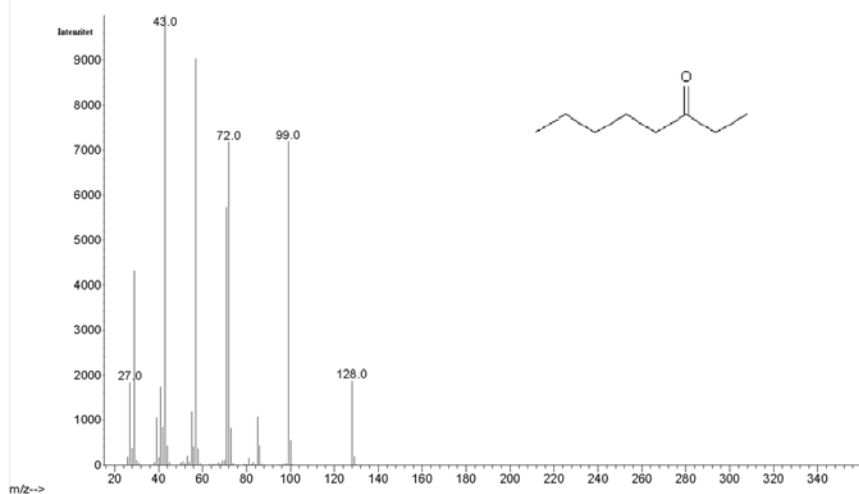
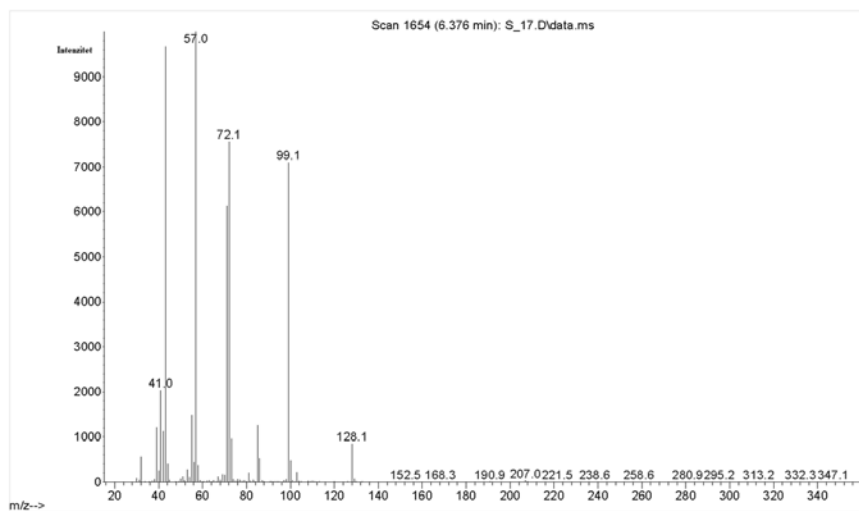
6. PRILOZI



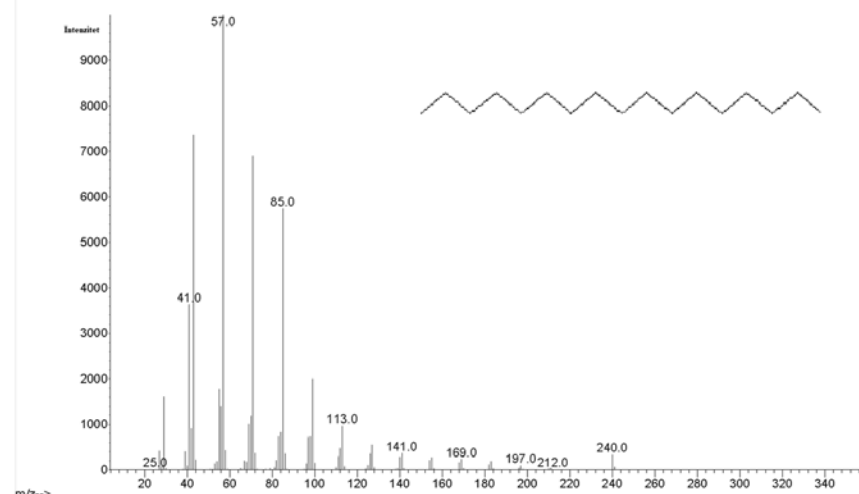
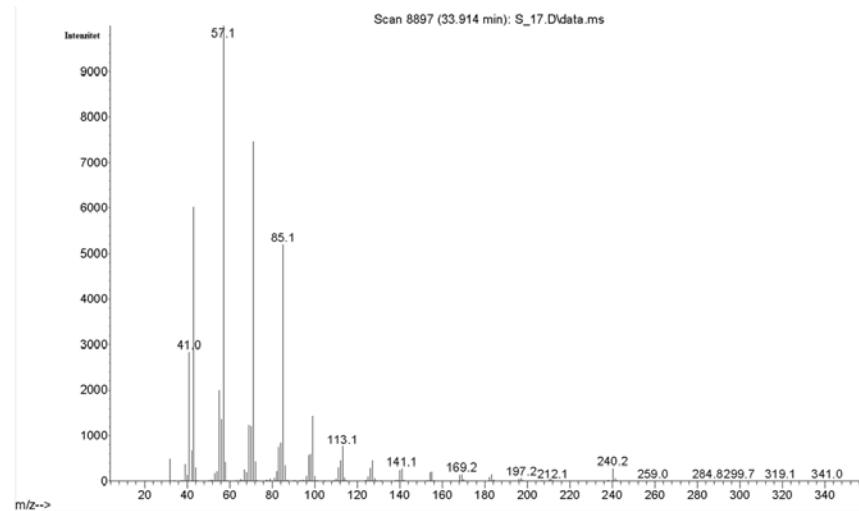
Slika 6. 1 Spektar masa piridina na HS-SvPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



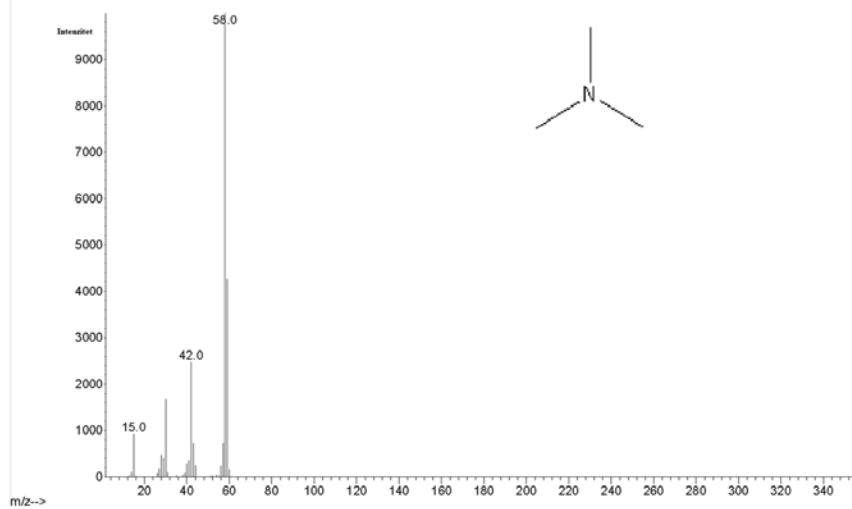
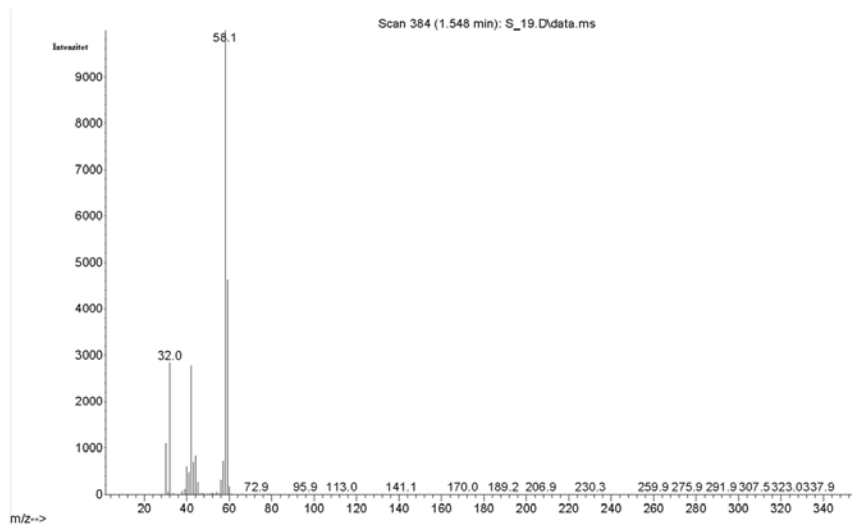
Slika 6. 2 Spektar masa benzaldehida na HS-SvPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



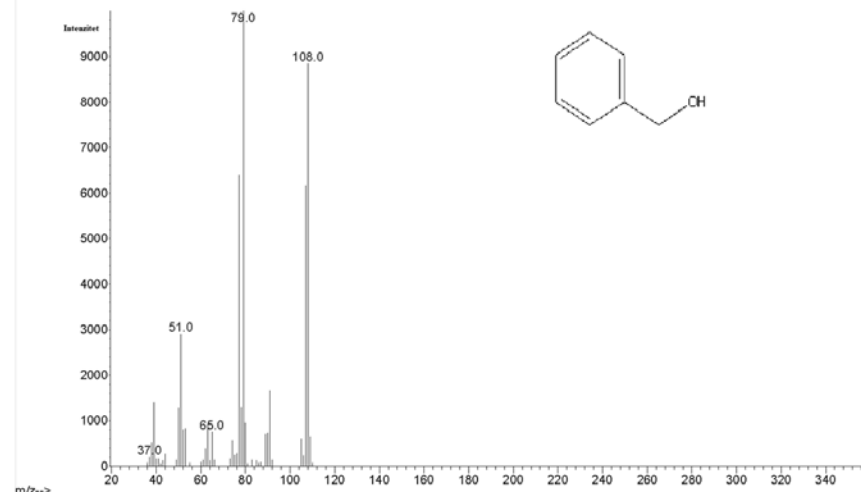
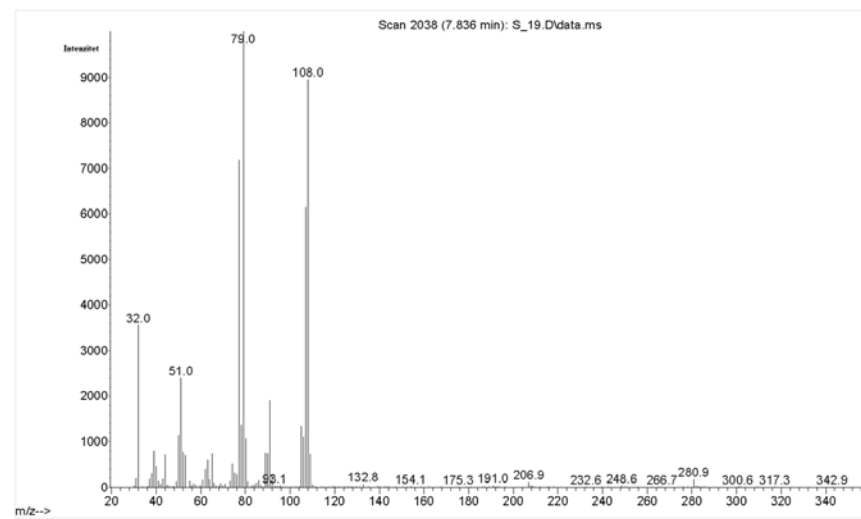
Slika 6. 3 Spektar masa oktan-3-ona na HS-SvPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



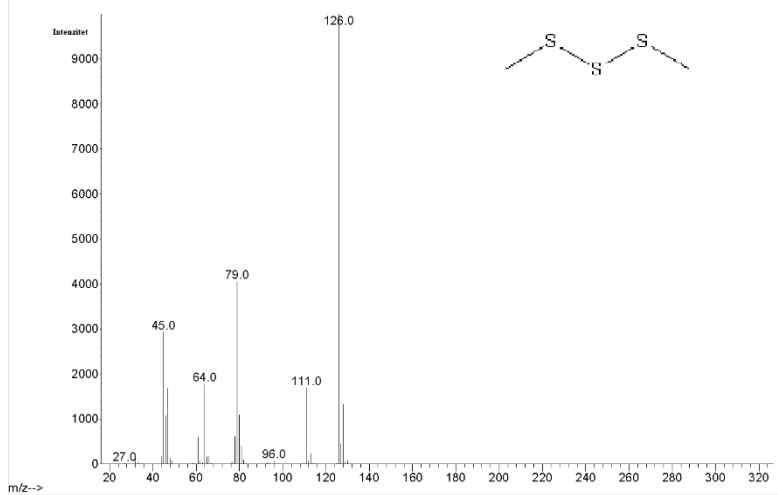
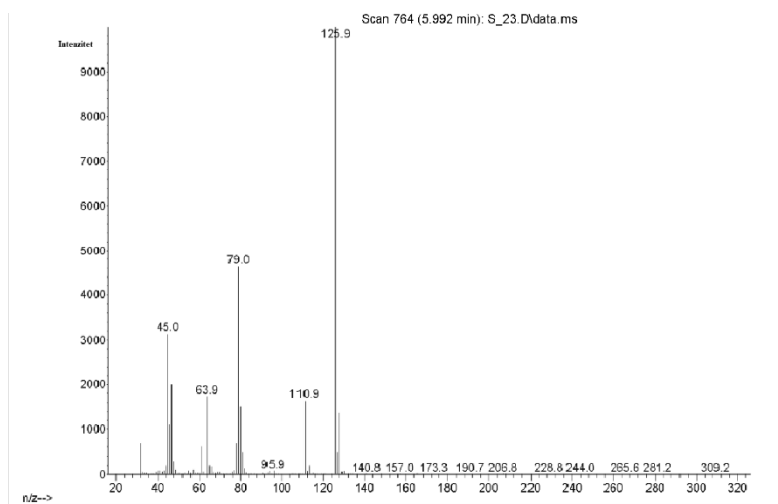
Slika 6. 4 Spektar masa heptadekana na HS-SvPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



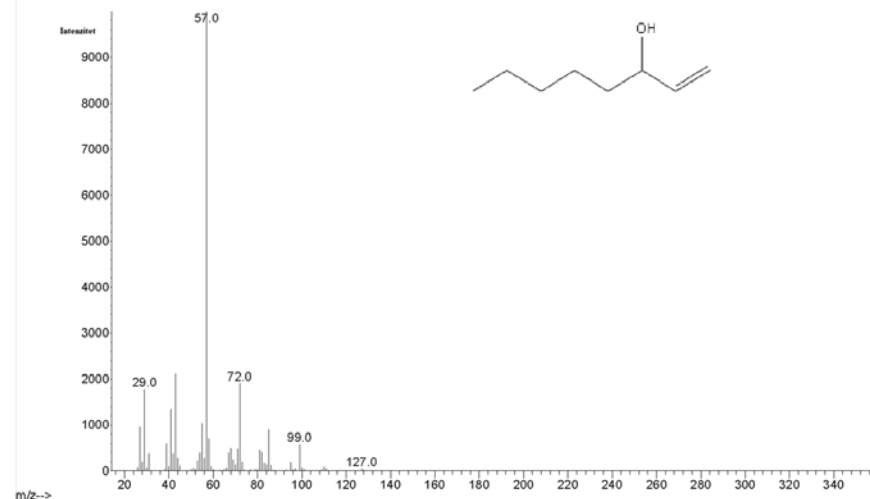
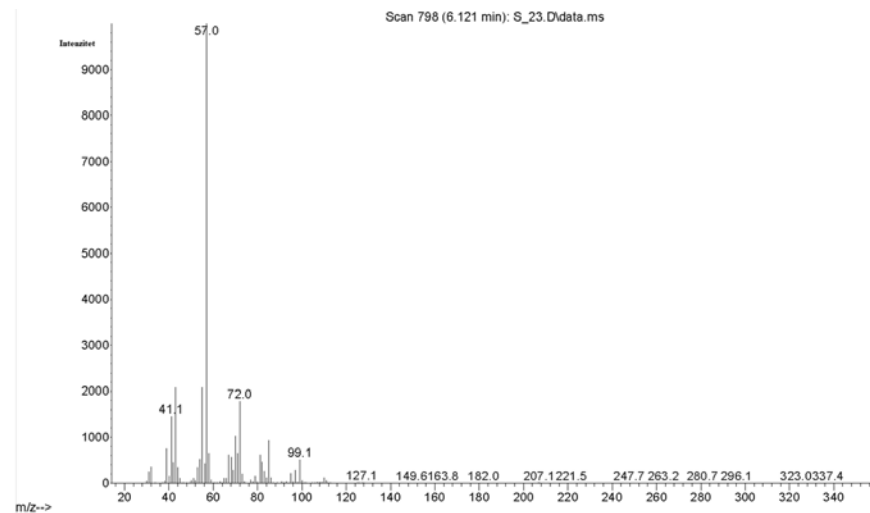
Slika 6. 5 Spektar masa trimetilamina dobiven na HS-ShPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



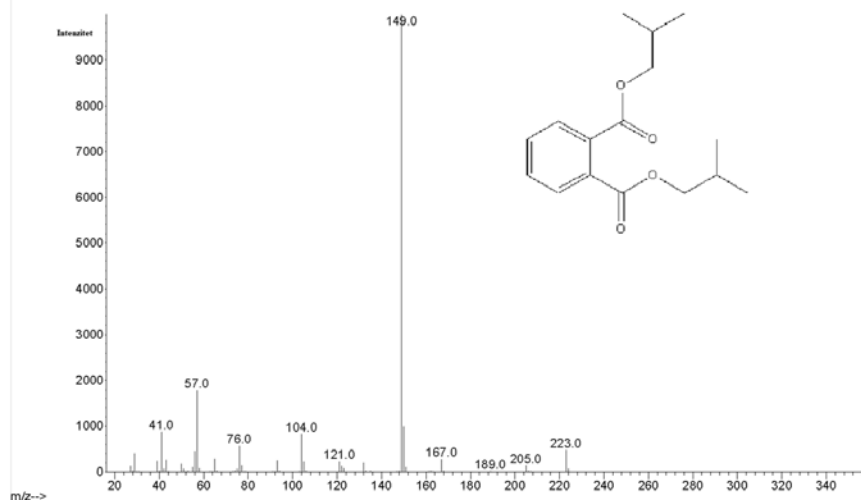
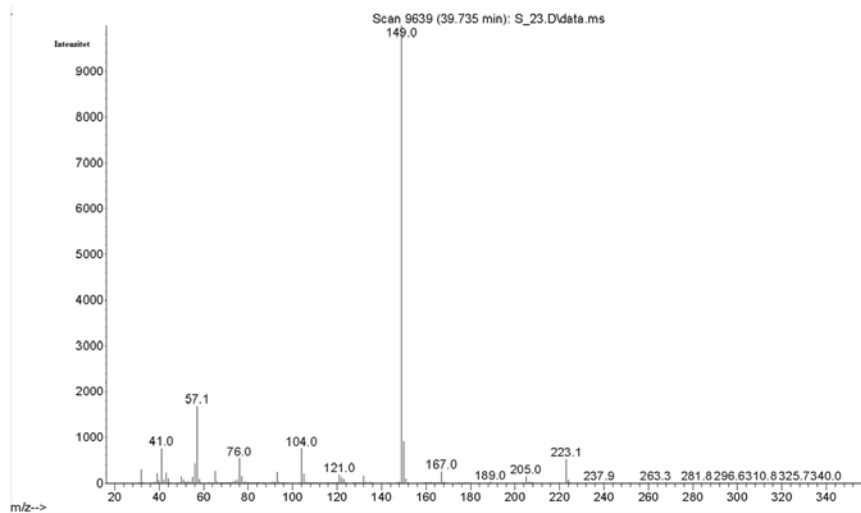
Slika 6. 6 Spektar masa benzil alkohola na HS-ShPFR (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



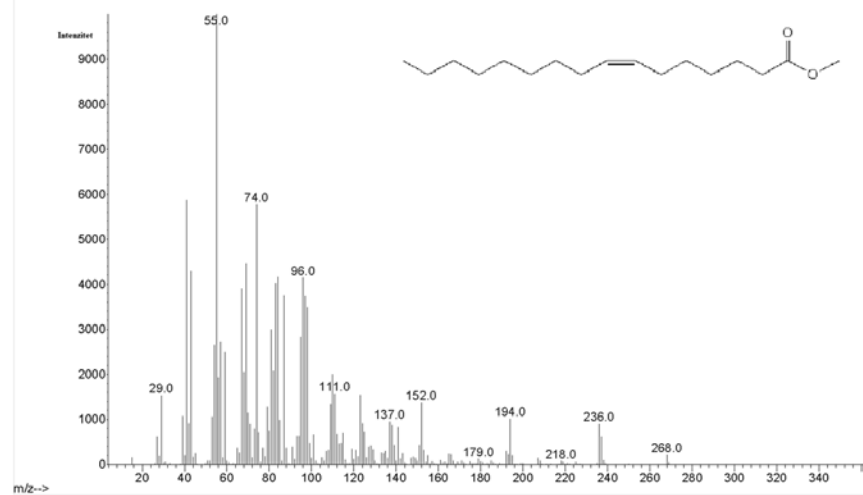
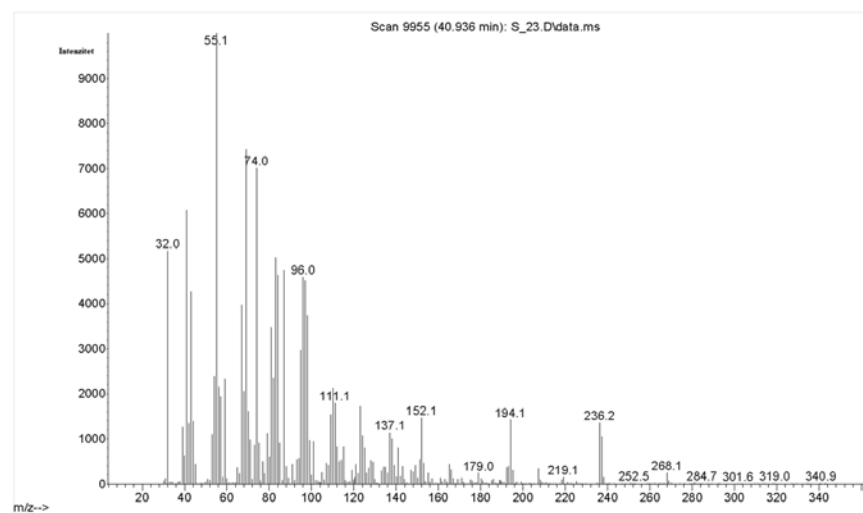
Slika 6. 7 Spektar masa dimetil-trisulfida na HD-SvPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



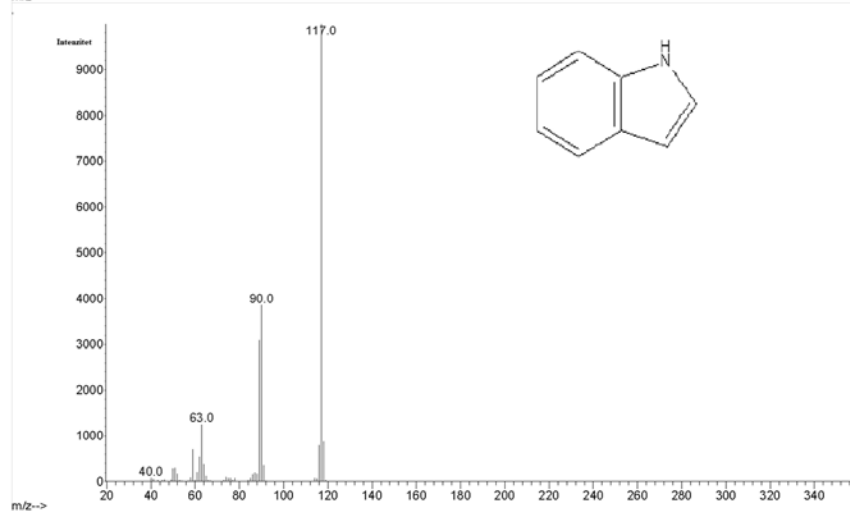
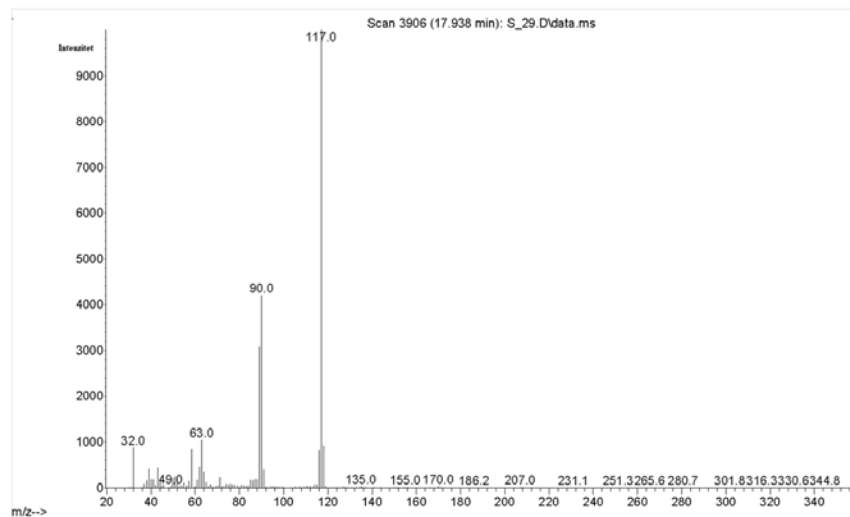
Slika 6. 8 Spektar masa okt-1-en-3-ola na HD-SvPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



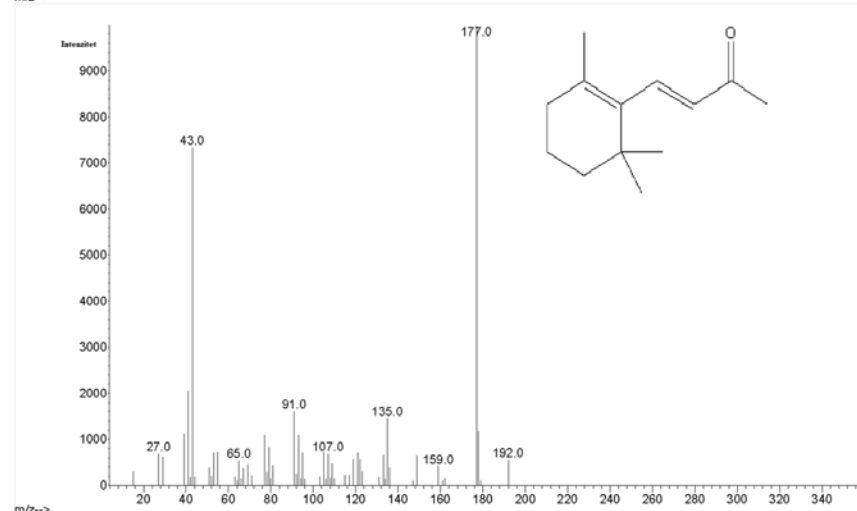
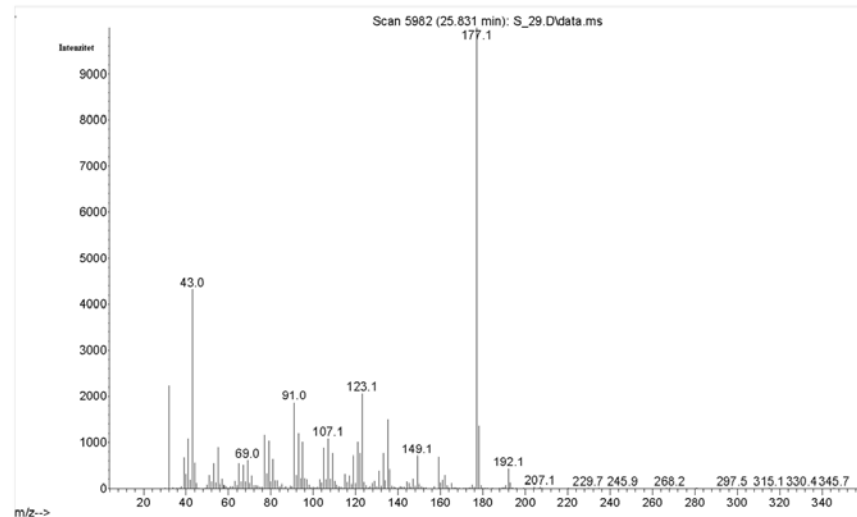
Slika 6. 9 Spektar masa diizobutil-ftalata na HD-SvPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



Slika 6. 10 Spektar masa (Z)-metil-heksadek-7-enoata na HD-SvPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



Slika 6. 11 Spektar masa indola na HD-ShPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)



Slika 6. 12 Spektar masa β -jonona na HD-ShPf (gore) i usporedba s bazom podataka (dolje)