

Isparljivi organski spojevi invanzivne crvene alge *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta): halogenirani ugljikovodici

Stipanović, Narda

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:167:804093>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO –TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA, SMJER ORGANSKA KEMIJA I
BIOKEMIJA

ISPARLJIVI ORGANSKI SPOJEVI INVAZIVNE CRVENE ALGE
Asparagopsis taxiformis (Rhodophyta): **HALOGENIRANI UGLJIKOVODICI**

DIPLOMSKI RAD

Narda Stipanović

103

Split, rujan 2020.

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

ISPARLJIVI ORGANSKI SPOJEVI INVAZIVNE CRVENE ALGE
Asparagopsis taxiformis (Rhodophyta): **HALOGENIRANI UGLJIKOVODICI**

DIPLOMSKI RAD

Narda Stipanović

103

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY, ORIENTATION ORGANIC
CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF INVASIVE RED ALGA
Asparagopsis taxiformis (Rhodophyta):
HALOGENATED HYDROCARBONS

GRADUATE THESIS

Narda Stipanović

103

Split, rujan 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemija, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Nastavni predmet: Organska kemija

Tema rada: je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta u Splitu

Mentor: prof. dr. sc. Igor Jerković

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Kranjac

ISPARLJIVI ORGANSKI SPOJEVI INVAZIVNE CRVENE ALGE *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta): HALOGENIRANI UGLJIKOVODICI

Narda Stipanović, 103

Sažetak

Alge su široka skupina fotosintetskih autotrofnih organizama nalik na biljke, ali bez korijena, lišća ili cvjetova. Osim što su najveći proizvođači kisika, pokazatelji su stanja okoliša, pročišćivači voda, ali i predmet različitih istraživanja. Pokazuju širok spektar bioaktivnosti (kao što su *anti-age*, antimikrobna, protuupalna i antidijabetična aktivnost). S obzirom da alge žive u ekstremnim uvjetima, morale su razvijati mehanizme obrane, a organohalogeni spojevi u morskim algama imaju važnu ulogu u preživljavanju. Crvena boja tih algi dolazi od pigmenta fikoeritrina koji im omogućuje fotosintezu u tami. Crvene alge sadrže terpene s citotoksičnim djelovanjem, a strukturna raznolikost halogeniranih monoterpena je važan faktor inteziteta različitih bioaktivnosti. U analiziranoj algi *Asparagopsis taxiformis* glavni halogenirani ugljikovodici bili su tribrommetan i dibromjodmetan. U radu su se za ekstrakciju vršnih para uzorka koristile dvije metode: a) mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) gdje je zastupljenost tribrommetana bila 53,57%, odnosno 69,79%, a dibromjodmetana 11,78%, odnosno 14,22% i b) izravna statička analiza vršnih para (HS) koristeći automatski sustav s postotkom tribrommetana 64,46% i dibromjodmetana 15,30%. Korištena je i hidrodestilacija u modificiranoj Clevenger aparaturi, a u isparljivom ulju zastupljenost glavnog spoja tribrommetana bila je 76,58% uz dibromjodmetan 13,39%. Organska analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (eng. *gas chromatography and mass spectrometry*, GC-MS).

Ključne riječi: makroalge, vršne pare, isparljivo ulje, plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS), halogenirani ugljikovodici

Rad sadrži: 39 stranica, 24 slike, 21 literalnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Marina Zekić – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović – član
3. Prof. dr. sc. Igor Jerković - član-mentor

Datum obrane: 21.9.2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Rudera Boškovića 35, Split

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry, Orientation Organic chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Course title: Organic chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology University of Split, Session no. 28.

Mentor: Igor Jerković –PhD.full prof.

Technical assistance: Marina Kranjac-PhD.

VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF INVASIVE RED ALGA *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta): HALOGENATED HYDROCARBONS

Narda Stipanović, 103

Abstract:

Algae are a broad group of photosynthetic autotrophic organisms resembling plants, but without roots, leaves or flowers. In addition to being the largest producer of oxygen, they are the indicators of the state of the environment, water purifiers, but also the subject of various research. They exhibit a wide range of bioactivities such as anti-age, antimicrobial, anti-inflammatory and antidiabetic. Since algae live in extreme conditions, defense mechanisms have to be developed, and organohalogen compounds in marine algae play an important role in survival. The red color of these algae originates from the pigment ficoeritrine, which enables photosynthesis in the dark. Red algae are the main source of terpenes with cytotoxic activity, and the structural diversity of halogenated monoterpenes is an important factor for the bioactivity intensity. In the analyzed alga *Asparagopsis taxiformis* the main halogenated hydrocarbons were tribromomethane and dibromiodomethane. In this work, two methods were used for the extraction of headspace compounds: a) headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) with the abundance of tribromomethane 53.57%, respectively 69.79% and dibromiodomethane with 11.78%, respectively 14.22% and direct headspace static analysis (HS) using an automatic system with the percentages of tribromomethane 64.46% and dibromiodomethane 15.30%. Hydrodistillation was also used in the modified Clevenger apparatus and the volatile oil contained the main compound tribromomethane (76.58%) along with dibromiodomethane (13.39%). The organic analysis was carried out by a gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS).

Keywords: macroalgae, headspace compounds, volatile oil, gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), halogenated hydrocarbons

Thesis contains: 39 pages, 24 figures, 21 references

Original in: Croatian

Defence Committee: 21.9.2020.

1. Marina Zekić-PhD. assistant prof - chairperson
2. Zvonimir Marijanović- PhD. assistant prof.- member
3. Igor Jerković-PhD.full prof.- supervisor

Defence date:

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Jerkovića, u razdoblju od siječnja do srpnja 2020. godine.

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću koji mi je svojim prenesenim znanjem pomogao u izradi ovog rada. Također se zahvaljujem i dr. sc. Marini Kranjac koja mi je pomogla kod izvedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i prijateljima na pruženoj potpori i vjeri u mene tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Proučiti isparljive spojeve algi te njihovu bioaktivnost.
- Proučiti metode izolacije i analize isparljivih spojeva, te ih primjeniti u eksperimentalnom radu.
- Provesti identifikaciju pojedinačnih spojeva usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja poznatih tvari prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju ili iz literaturnih podataka.
- Provesti identifikaciju usporedbom spektara masa analiziranih spojeva sa spektrima masa iz literature ili komercijalne biblioteke spektara masa (*Wiley 09 i NIST 17*).
- Usporediti dobivene rezultate s literaturnim podacima.

SAŽETAK

Alge su široka skupina fotosintetskih autotrofnih organizama nalik na biljke, ali bez korijena, lišća ili cvjetova. Osim što su najveći proizvođači kisika, pokazatelji su stanja okoliša, pročišćivači voda, ali i predmet različitih istraživanja. Pokazuju širok spektar bioaktivnosti (kao što su *anti-age*, antimikrobna, protuupalna i antidijabetična aktivnost). S obzirom da alge žive u ekstremnim uvjetima, morale su razvijati mehanizme obrane, a organohalogeni spojevi u morskim algama imaju važnu ulogu u preživljavanju. Crvena boja tih algi dolazi od pigmenta fikoeritrina koji im omogućuje fotosintezu u tami. Crvene alge sadrže terpene s citotoksičnim djelovanjem, a strukturna raznolikost halogeniranih monoterpena je važan faktor inteziteta različitih bioaktivnosti. U analiziranoj algi *Asparagopsis taxiformis* glavni halogenirani ugljikovodici bili su tribrommetan i dibromjodmetan. U radu su se za ekstrakciju vršnih para uzorka koristile dvije metode: a) mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) gdje je zastupljenost tribrommetana bila 53,57%, odnosno 69,79%, a dibromjodmetana 11,78%, odnosno 14,22% i b) izravna statička analiza vršnih para (HS) koristeći automatski sustav s postotkom tribrommetana 64,46% i dibromjodmetana 15,30%. Korištena je i hidrodestilacija u modificiranoj Clevenger aparaturi, a u isparljivom ulju zastupljenost glavnog spoja tribrommetana bila je 76,58% uz dibromjodmetan 13,39%. Organska analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (eng. *gas chromatography and mass spectrometry*, GC-MS).

ključne riječi: makroalge, vršne pare, isparljivo ulje, plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS), halogenirani ugljikovodici

SUMMARY

Algae are a broad group of photosynthetic autotrophic organisms resembling plants, but without roots, leaves or flowers. In addition to being the largest producer of oxygen, they are the indicators of the state of the environment, water purifiers, but also the subject of various research. They exhibit a wide range of bioactivities such as anti-age, antimicrobial, anti-inflammatory and antidiabetic. Since algae live in extreme conditions, defense mechanisms have to be developed, and organohalogen compounds in marine algae play an important role in survival. The red color of these algae originates from the pigment ficoeritrine, which enables photosynthesis in the dark. Red algae are the main source of terpenes with cytotoxic activity, and the structural diversity of halogenated monoterpenes is an important factor for the bioactivity intensity. In the analyzed alga *Asparagopsis taxiformis* the main halogenated hydrocarbons were tribromomethane and dibromiodomethane. In this work, two methods were used for the extraction of headspace compounds: a) headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) with the abundance of tribromomethane 53.57%, respectively 69.79% and dibromiodomethane with 11.78%, respectively 14.22% and direct headspace static analysis (HS) using an automatic system with the percentages of tribromomethane 64.46% and dibromiodomethane 15.30%. Hydrodistillation was also used in the modified Clevenger apparatus and the volatile oil contained the main compound tribromomethane (76.58%) along with dibromiodomethane (13.39%). The organic analysis was carried out by a gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS).

keywords: macroalgae, headspace compounds, volatile oil, gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), halogenated hydrocarbons

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1	OPĆI DIO	2
1.1	PODJELA ALGI.....	3
1.1.1	CRVENE ALGE.....	4
1.2	ISPARLJIVI SPOJEVI MORSKIH ALGI	5
1.2.1	BIOAKTIVNOST MORSKIH ALGI.....	6
1.3	METODE IZOLACIJE I ANALIZE ISPARLJIVIH SPOJEVA.....	6
1.3.1	METODE IZOLACIJE VRŠNIH PARA.....	8
1.3.2	METODE DESTILACIJE	9
1.3.3	PLINSKA KROMATOGRAFIJA	11
2	EKSPERIMENTALNI DIO	14
2.1	UZORAK <i>Asparagopsis taxiformis</i>	15
2.2	MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI (HS-SPME) I IZRAVNA STATIČKA ANALIZA VRŠNIH PARA (HS) KORISTEĆI AUTOMATSKI SUSTAV	17
2.3	HIDRODESTILACIJA (HD)	19
2.4	ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS).....	21
3	REZULTATI.....	23
4	RASPRAVA	30
4.1	VRŠNE PARE <i>Asparagopsis taxiformis</i>	30
4.2	ETERIČNO ULJE <i>Asparagopsis taxiformis</i>	32
4.3	BIOGENEZA HALOGENALKANA.....	33
4.4	ULOGA HALOGENIRANIH SPOJEVA U MORSKIM ALGAMA.....	36
5	ZAKLJUČAK.....	37
6	LITERATURA	38

1 UVOD

Alge su fotosintetski organizmi koji nastanjuju gotovo sva staništa, a mogu biti jednostanični, višestanični ili kolonijalni. Osim što su najveći proizvođači kisika, veoma bitnu ulogu imaju u uklanjanju viška ugljikovog dioksida iz okoliša. Pokazatelji su stanja okoliša, pročišćivači voda, ali i predmet različitih istraživanja (testovi toksičnosti, genetički inženjering, populacijska ekologija). Morske makroalge predstavljaju bogat izvor bioaktivnih spojeva koji se mogu implementirati u raznim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima za poboljšanje zdravlja.¹ Izvanredan su izvor proteina, vlakana, vitamina, minerala i ugljikohidrata. Crvene alge prepoznate su od 1800. godine kao bogat izvor halogena, posebno joda i broma.² Posjedovanjem karakteristika kao što su brzi rast, relativno lak uzgoj te iznimno visoka prehrambena vrijednost, alge postaju sve popularniji izvor ili nadomjestak u prehrani. Njihovo antioksidativno, antiviralno, antibakterijsko i antikancerogeno djelovanje ima veliki utjecaj na zdravlje kao što je moguća prevencija raka, kontroliranje težine i održavanje imunološkog sustava. Primjerice, proteini su važan sastojak prehrane ljudi, a unose se u organizam konzumiranjem mesa, a vegetarijanci i vegani ga moraju dobavljati na drugi način, te su upravo alge najbolja alternativa. Povrh svega, morske alge se smatraju alternativnim izvorom biogoriva.

1 OPĆI DIO

1.1 PODJELA ALGI

Alge su široka skupina fotosintetskih autotrofnih organizama nalik na biljke, ali bez korijena, lišća ili cvjetova. Pretpostavka je da postoji više od 25 000 vrsta algi. Zajednička osobina svih algi je vršenje fotosinteze. S iznimkom modrozelenih, alge su eukarioti tj. njihove stanice sadrže organele uključujući jezgru i mitohondrije odjeljene membranom od citoplazme. Alge su bogate ω -3 polinezasićenim masnim kiselinama koje pokazuju nekoliko prednosti za čovjekovo zdravlje poput prevencije kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i hipertenzije.¹ Pripadaju u nadcarstva prokariota i eukariota te carstvu monera, a dijelom i carstvu protista. Daljnja podjela je na kromiste, protozoa, plantae i eubacteria. Osim navedene podjele, alge se dijele u tri odijeljka ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi i distribuciji pigmenata (npr. klorofil i karotenoidi). Ti odijeljci su smeđe alge (Phaeophyta), crvene alge (Rhodophyta) i zelene alge (Chlorophyta).¹



Slika 1. Raznolikost algi, preuzeto s mrežne stranice

<https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=3bnh8srO&id=32D0A8546D2E23D54CF89B798A42F9CE978A8C8F&thid=OIP.3bnh8srO20ahDAgnrqdXMAHaEK&mediaurl=http%3a%2f%2fpriondahrvarske.com%2fwpcontent%2fuploads%2f2018%2f02%2fkoraligen.jpg&exph=534&expw=950&q=crvene+alge&simid=608051456534776171&ck=30B9E37396214A7E1FA532B282679677&selectedIndex=15&FORM=IRPRST&ajaxhist=0>

1.1.1 CRVENE ALGE

Crvene alge žive do 230 metra dubine, po grebenima i stjenovitim obalama. Crvena boja tih algi potječe od pigmenta fikoeritrina koji im omogućuje fotosintezu u tami. One su višestanični organizmi prepoznati krajem 1800. godine kao bogat izvor halogena, posebno broma i joda. Halogenirani spojevi iz *Asparagopsis taxiformis* posjeduju širok raspon isparljivosti i topljivosti. U većini slučajeva stvaraju se terpeni, acetileni i fenoli koji sadrže halogen.² Crvene alge su glavni izvor monoterpena s citotoksičnim djelovanjem. Osim toga najveći su „proizvođači“ bioaktivnih spojeva koji se mogu primjeniti u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.³ U azijskim zemljama alge se tradicionalno koriste u prehrani. Visoka koncentracija vlakana zadržava vlagu, a koncentracija minerala obogaćuje tlo, stoga bi se mogle koristiti i kao visokovrijedno gnojivo. S obzirom da alge žive u ekstremnim uvjetima, morale su razvijati mehanizme obrane i naučiti kako se prilagoditi fluktacijama okoline. Zbog toga alge proizvode sekundarne metabolite koji posjeduju bioaktivnost.¹

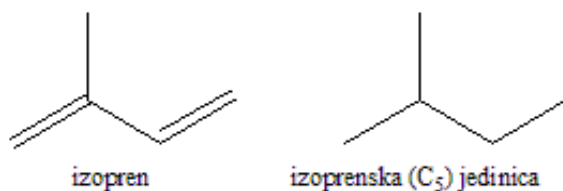


Slika 2. Crvena alga, preuzeto sa mrežne stranice

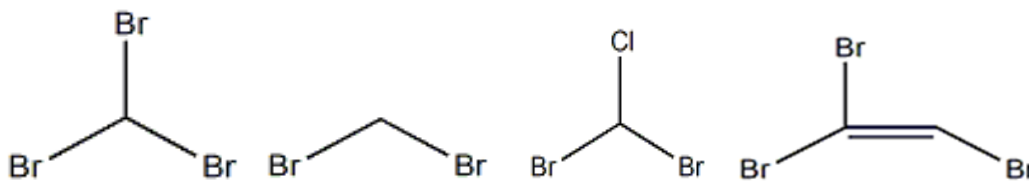
<http://www.niobioinformatics.in/seaweed/book/Asparagopsis%20taxiformis.jpg> .

1.2 ISPARLJIVI SPOJEVI MORSKIH ALGI

Makroalge proizvode širok spektar monoterpena kao sekundarnih metabolita mevalonata (MVA) i/ili metileritritol fosfata (MEP), a biosinteza najčešće uključuje djelovanje haloperoksidaze. Monoterpeni makroalga uključuju acikličke, monocikličke i bicikličke strukture. Halogenirani monoterpeni su pokazali značajnu biološku aktivnost na koju utječe broj prisutnih halogena. Naime, poželjan je što veći sadržaj halogena, posebno broma. Terpeni su velika i strukturno raznolika skupina spojeva opće formule $(C_5H_8)_n$ koja sadrži izoprensku jedinicu. Ciklički i halogenirani monoterpeni se ističu kao sredstva protiv tumora u eksperimentalnim uvjetima.³ Bromoform ($CHBr_3$), dibromometan (CH_2Br_2), dibromoklorometan ($CHBr_2Cl$) i tribromoetilen (C_2HBr_3) su također identificirani kao prirodni proizvodi algi.⁴ Haloacetoni su poznati enzimski inhibitori koji su sposobni za umrežavanje ostataka serina i histidina u različitim proteinima.² Dokazano je da morske makroalge sadrže polifenole, polisaharide, karotenoide i polinezasićene masne kiseline koje posjeduju bioaktivnost.



Slika 3. Strukturna formula izoprena i izoprenske strukturne jedinica.



Slika 4. Strukturne formule čestih halogeniranih spojeva algi (bromoforma, dibrommetana, dibromklorometana i tribrometilena).

1.2.1 BIOAKTIVNOST MORSKIH ALGI

Morske makroalge predstavljaju bogat izvor bioaktivnih spojeva koji se mogu implemenirati u raznim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima za poboljšanje zdravlja. Širok je spektar bioaktivnosti: *anti-age*, antioksidacijski, antimikrobni, protuupalni i antidijabetični učinak. S obzirom da se alge trebaju prilagođavati fluktacijama okoline, počele su proizvoditi sekundarne metabolite koji posjeduju bioaktivnost. Najčešće istraživani bioaktivni spojevi u morskim algama su polifenoli, polisaharidi, karotenoidi i ω -3 masne kiseline. Karotenoidi su prirodni antioksidansi, a najzastupljeniji je fukoksantin. Fukoksantin pokazuje antioksidacijsko, antimikrobno i antihipertenzivno djelovanje. Polinezasićene masne kiseline pokazuju protuupalno djelovanje i štite kardiovaskularni sustav što ih čini važnima za ljusko zdravlje. Makroalge sadrže veću količinu nezasićenih u odnosu na zasićene masne kiseline i zbog toga pokazuju inhibiciju acetilkolinesteraze što znači da mogu pružiti zaštitu od neurodegenerativnih poremećaja.¹ Alge proizvode polifenole, a posebna vrsta je florotanin koji pokazuje antidijabetičku i anti-HIV aktivnost, ali ipak je više zastupljen kod smeđih i zelenih algi. Crvene alge su glavni izvor monoterpena sa citotoksičnim djelovanjem. Strukturna raznolikost halogeniranih monoterpena je važan faktor inteziteta bioaktivnosti. Veći broj halogena dovodi do većeg antikancerogenog djelovanja, a halogen u položaju C-6 je ključan za aktivnost kod spoja halomona. Također, kod halomona za antiplazmatsko djelovanje važna je diklorometilna skupina u položaju C-7.³

1.3 METODE IZOLACIJE I ANALIZE ISPARLJIVIH SPOJEVA

Laboratorijske metode izolacije isparljivih spojeva mogu se načelno podijeliti na :

- metode ekstrakcije otapalima ili subkritičnim/superkritičnim fluidima
- destilacijske metode
- tehnike izolacije vršnih para
- sorpcijske tehnike

Kod ekstrakcija otapalima, samo otapalo mora biti niske temperature vrenja kako bi se lako uklonilo bez većeg gubitka isparljivih spojeva. Osim toga treba biti pogodno za ekstrakciju nepolarnih i polarnih spojeva. Obično se provodi kontinuirana ekstrakcija kruto-tekuće u aparaturi prema Soxhletu. Neke od modernijih oblika ekstrakcije su: ultrazvučna ekstrakcija (s ili bez otapala), te superkritična i subkritična ekstrakcija fluidima.⁵ Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava za ultrazvučnu ekstrakciju s otapalom: izravna ultrazvučna ekstrakcija s ultrazvučnim sondama koje se postavljaju u otopinu s uzorkom i neizravna ultrazvučna ekstrakcija koja koristi ultrazvučnu kupelj. Glavne prednosti ove metode su povećanje ekstrakcijskog iscrpka i brža kinetika, te provođenje ekstrakcije na umjerenim temperaturama što je poželjno za termički nestabilne tvari. Superkritična i subkritična ekstrakcija koriste fluide iznad ili ispod kritične točke u faznom dijagramu te se postiže iscrpna ekstrakcija. Superkritična ekstrakcija se obično provodi s CO₂, a temelji se na povećanju moći otapanja fluida iznad njihove kritične točke u faznom dijagramu. Ekstrakcija subkritičnom vodom temelji se na uporabi vode između 100 i 374 °C i tlaku dovoljno velikom za održavanje vode u tekućem stanju.

Destilacijske metode se mogu podijeliti na:

- hidrodestilacija (vodena destilacija)
- vodeno-parna destilacija
- parna destilacija

Prilikom destilacije vrijedi Daltonov zakon: tlak para iznad heterogene smjese je jednak zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenti za zadanu temperaturu čime se smanjuje temperatura vrelišta tvari koje se ne otapaju u vodi te tvari destiliraju s vodenom parom. Prednosti uporabe destilacijskih metoda su što dobiveni izolat (destilat) ne sadrži neisparljive tvari ili visoko vrijuće tvari te ne postoji opasnost kontaminacije GC kolone.⁶

Najčešće korištene sorpcijske tehnike su:

- mikoekstrakcija vršnih para na krutoj fazi
- sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću

Sorpcijske metode osiguravaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala.

Metoda organske analize smjese isparljivih spojeva je kromatografija kojom se odjeljuju komponente smjese. Do njihova razdvajanja dolazi zbog različitog afiniteta komponenti smjese prema stacionarnoj fazi. Ovisno o prirodi mobilne faze razlikuju se :

- superkrična fluidna kromatografija
- tekućinska kromatografija
- plinska kromatografija

Superkrična fluidna kromatografija (SFC) je metoda kod koje je mobilna faza plin pri tlaku i temperaturi iznad kritičnih vrijednosti.

U tekućinskim kromatografijama dolazi do razdvajanja komponenti između stacionarne faze koja je u čvrstom stanju i mobilne faze koja je u tekućem stanju. Najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i klasična tekućinska kromografija (LC).⁶

U plinskoj kromatografiji (GC) mobilna faza je plinovita, a stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća.

1.3.1 METODE IZOLACIJE VRŠNIH PARA

Vršne pare predstavljaju najisparljivije spojeve koji se nalaze u ravnoteži s uzorkom, stoga je izolacija vršnih para (engl. *headspace*) metoda koja je pogodna za uzorke sa intezivnim mirisima. U slučaju da uzorak ne sadrži komponente intezivnih mirisa primjenjuje se lagano zagrijavanje. Tehnike vršnih para mogu se podijeliti na :

- dinamičke
- statičke

Kod dinamičke izolacije vršnih para isparljivi spojevi su iznad uzorka i kontinuirano se odnose plinom nositeljem (obično helijem ili dušikom) u trapove. Postoji i druga opcija, a to je korištenje vakuum pumpe. Isparljivi spojevi se u trapu koncentriraju, čime se postiže veća osjetljivost nego kod statičke izolacije vršnih para. Kod automatske statičke izolacije vršnih para igla se automatski umetne u bočicu u kojoj se nalazi uzorak, koja se zagrijava na određenu

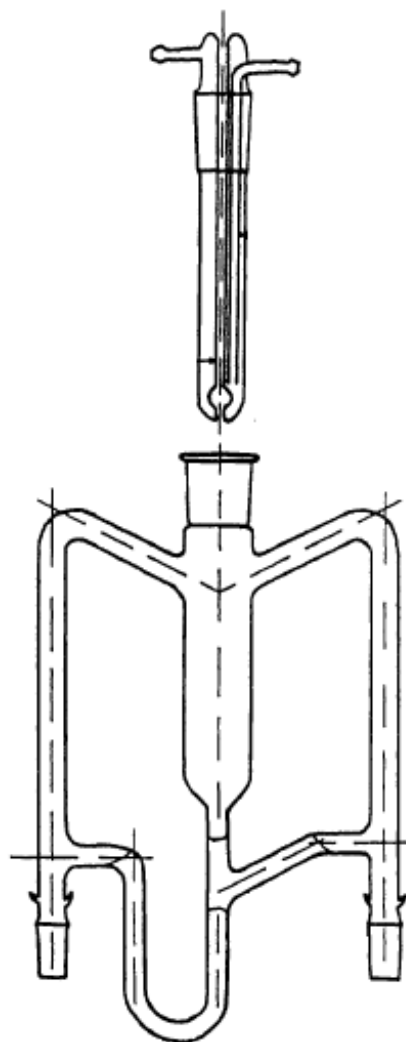
temperaturu i koja je hermetički zatvorena te se vrši tlačenje plinom nositeljem, a nakon tlačenja i postizanja ravnoteže, usmjerava se uzorak u prijenosnu liniju i kolonu. Statična izolacija vršnih para može se provesti i uzimajući uzorak vršnih para iz hermetički zatvorene bočice injekcijom i izravnim ubacivanjem u GC injektor.

Osim navedenog, moguća je i izravna termička desorpcija gdje se kruti uzorak usitnjava i miješa sa poroznim polimerom prije punjenja desorpcijske cijevi. Desorber omogućava kontrolirano zagrijavanje uzorka u struji inertnog plina nositelja koji odvodi isparljive spojeve u GC kolonu na analizu.⁶

1.3.2 METODE DESTILACIJE

Destilacija je općenito postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira. Destilacija se koristi za razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, čišćenje tekućih tvari, otparavanje organskih otapala i identifikacija tekućih tvari.⁵ Destilacijom aromatičnog bilja ili algi dobije se eterično ulje, a mogu se primijeniti sljedeće vrste destilacije: hidrodestilacija, vodeno-parna destilacija, parna destilacija te istovremena destilacija-ekstrakcija.

Metoda istovremene destilacije i ekstrakcije omogućava izolaciju i koncentraciju isparljivih spojeva u jednom koraku. U Likens - Nickerson aparaturi kao sredstvo za ekstrakciju moguće je koristiti smjesu otapala ili otapalo koje je teže ili lakše od vode. U slučaju kada je otapalo lakše od vode uzorak se destilira u tikvici na lijevom dijelu aparature. Isparljivi spojevi destiliraju u lijevom ogranaku aparature dok istovremeno pare otapala destiliraju kroz desni ogranak. Na posljertku pare se kondenziraju u hladilu te se događa ekstrakcija otapalom. Kondenzirane tekućine se odvajaju u separatoru.⁶



Slika 5. Likens-Nickerson aparatura.⁶

Biljni materijal kod vodeno-parne destilacije se nalazi na perforiranoj podlozi posude u kojoj se nalazi voda koja se zagrijava, te para prolazi kroz biljni materijal. Za jednoličan prolaz para kroz biljni materijal važno je da isti ne bude previše usitnjen. Kod parne destilacija para se generira u generatoru pare te uvodi u posudu u kojoj se nalazi biljni materijal. Obje destilacija su pogodne za izolaciju manje osjetljivih (termolabilnih) eteričnih ulja.

Hidrodestilacija je najstariji oblik destilacije gdje je biljni materijal uronjen u vrelu vodu, a zagrijavanje se vrši ili izravno plamenom ispod destilacijskog kotla ili unutarnjim grijanjem sa spiralno oblikovanoj cijevi. Destilacijski kotao je cilindričnog oblika i zatvoren pokretnim poklopcem. Kondenzator je obično zračni ili klasičnog tipa za hlađenje vodom od 15°C.

Kondenzat se sakuplja u separatoru, a zatim se odijeli kondenzirano eterično ulje od vodenog sloja. U laboratoriju se za hidrodestilaciju primjenjuju različite aparature, a neke od njih su : aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji ili aparatura prema Clevengeru.⁵

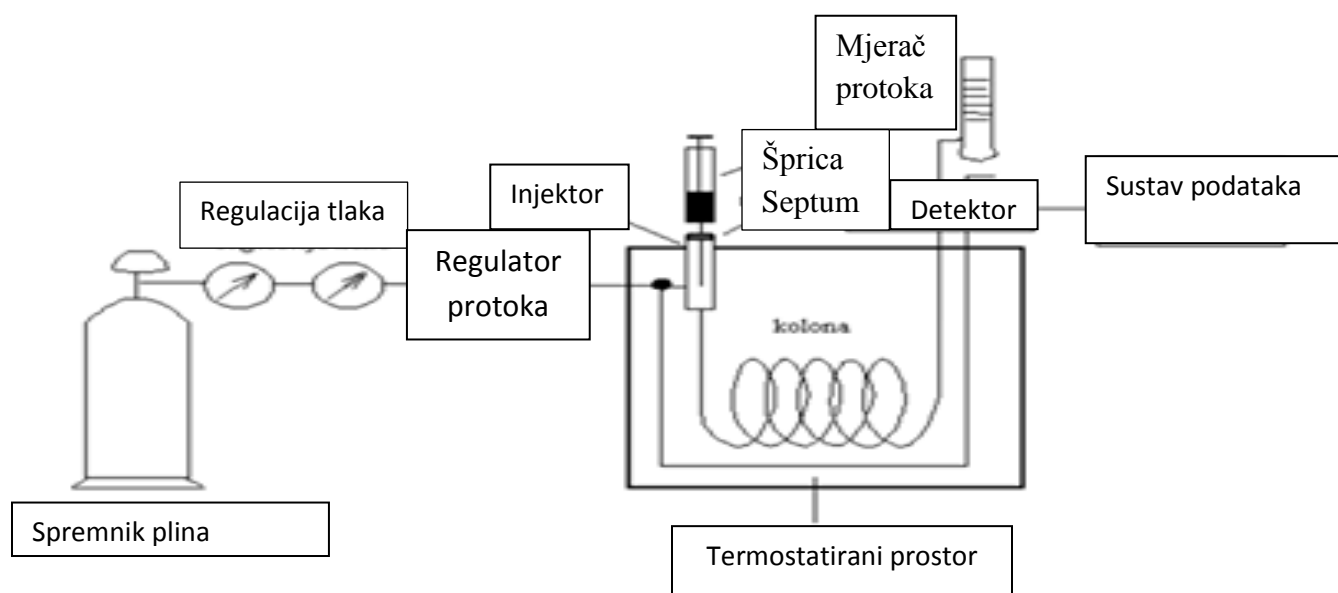
1.3.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Postoje dvije osnovne vrste plinske kromatografije, adsorpcijska i razdjelna. Kod adsorpcijske kromatografije pokretna faza je plin, a nepokretna je čvrsta faza, dok je kod razdjelne kromatografije pokretna faza plin, a nepokretna je neisparljiva tekućina.⁷ Mobilna faza, odnosno plin nositelj mora biti kemijski inertan, a neki od najčešće korištenih plinova su argon, dušik, vodik i helij. Uzorak se prije uvođenja u kromatografsku kolonu mora pretvoriti u plinsko stanje te mora biti isparljiv i stabilan na temperaturi grijanja kromatografske kolone. Glavni dijelovi plinskog kromatografa su injekcijski blok, kromatografska kolona smještena u termostatiranom prostoru, detektor i računalo.⁶ Plinska kromatografija je „slijepa“ tehnika što znači da se sastoji smjese koji se odvoje moraju detektirati odgovarajućim detektorom. Neki od detektora u plinskoj kromatografiji su :

- detektor toplinske vodljivosti
- detektor apsorpcije elektrona
- plamenoionizacijski detektor
- spektrometar masa

Plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) je tehnika koja se primjenjuje za odijeljivanje, strukturnu analizu i detekciju složenih smjesa isparljivih spojeva kada su dostupne količine izrazito male. Najčešće se njime određuju isparljivi sekundarni metaboliti. GC i MS rade sa plinovitim uzorkom pa se vrlo dobro nadopunjuju.⁵ Plinska kromatografija je vrlo uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, a spektrometrija masa je pogodna za kvalitativnu analizu. Plinski kromatograf koristi kapilarne kolone čija svojstva u pogledu razdvajanja molekula ovise o dimenzijama kolone kao i o polarosti stacionarne faze. Razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima između različitih molekula u smjesi i njihov relativni afinitet

prema stacionarnoj fazi kolone pospješit će odvajanje molekula dok uzorak putuje kolonom. Molekule se zadržavaju u koloni, a zatim u različitom vremenu (retencijsko vrijeme) eluiraju iz kolone, a to omogućava spektrometru mase da zasebno hvata, ionizira te detektira ionizirane molekule. Maseni spektrometar inonizira molekule u ionizirane fragmente koji su karakterizirani omjerom mase i naboja te njihovim intenzitetom. Analizom dobivenih spektara masa može se identificirati struktura molekule.



Slika 6. Plinska kromatografija. ²⁰

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 UZORAK *Asparagopsis taxiformis*

Crvena alga *Asparagopsis taxiformis* (Delile) uzorkovana je na području grada Splita, uvala Ježinac u siječnju 2020. god. sa dubine od 30 cm. Alga je ručno sakupljena i postavljena u plastičnu vrećicu koja je sadržavala okolnu morsku vodu. Vrećica s uzorkom je dobro zatvorena te postavljena u ručni prijenosni hladnjak te je odmah transportirana u laboratorij Zavoda za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu. Uzorak u vrećici je čuvan u hladnjaku na +4°C do analize. Alga je obrađena u roku od 72 h.



Slika 7. *Asparagopsis taxiformis*, slika preuzeta s mrežne stranice

https://www.google.hr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.atlantisgozo.com%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F01%2FAsparagopsis-taxiformis-Red-Algae_1.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.atlantisgozo.com%2Fasparagopsis-taxiformis-red-algae%2F&tbnid=B9o7vuxpIKDxrM&vet=12ahUKEwidn_z6pYbpAhXOxqQKHc2KCKsQMygBegUIARDLAQ..i&docid=RnzOOB3f0gxG7M&w=3310&h=2482&q=Asparagopsis%20taxiformis&ved=2ahUKEwidn_z6pYbpAhXOxqQKHc2KCKsQMygBegUIARDLAQ#h=2482&imgdii=0rt0Gb1_mI-CUM:&vet=12ahUKEwidn_z6pYbpAhXOxqQKHc2KCKsQMygBegUIARDLAQ..i&w=3310

Opis alge *Asparagopsis taxiformis*:

Dužina alge *Asparagopsis taxiformis* je do 30 cm, a stablo je oblika čempresa te se prihvaća za stijene i druge alge. Obično više ogranaka raste iz zajedničkog bazalnog dijela koji se drži za podlogu. Najčešće raste od površine do 5 m dubine. Alga je najvjerojatnije porijeklom iz Australije, a način na koji je dospjela u Sredozemno more kojim se širi nošena morskim strujama nije poznat. Gusta naselja ove alge vjerojatno utječu na zavičajne alge te se stoga smatra invazivnom. U Hrvatskoj je pronađena na području Dubrovnika, Splita i Mljeta, u Sobri i uz otočić Glavat u Nacionalnom parku Mljet.¹⁰

Ova vrsta crvene alge bila je dobro poznata za područje Dubrovnika i Mljeta. U Dubrovniku je iznimno gusta, dok je na Mljetu zabilježena u obliku pojedinačnih talusa. Tijekom 2014. godine zabilježena je na području Splita u obliku pojedinačnih talusa.

Korisna uporaba alge *A. taxiformis*:

Morske makroalge su posebno važne namirnice u prehrani stanovništva obalnih dijelova Azije, poput Kine, Koreje i Japana, gdje su ujedno i specifično nacionalno jelo. Također, u mnogim drugim zemljama poput Havaja, Kalifornije, Irske, Islanda, Francuske koriste se u ishrani kao svježje, osušene ili kao sastojak u gotovoj hrani, dok se u našim krajevima alge uglavnom koriste kao hrana makrobiotičara. Na Havajima *Asparagopsis taxiformis* se koristi kao dodatak ribi, kokoši ili svinjetini, osobito sirova riba se miješa s isjeckanom *A. taxiformis* (smjesa se naziva palu ili po-ke).¹¹

Ekstrakti *A. taxiformis* posjeduju antifungalnu aktivnost na *Aspergillus* vrste.¹²

Općenito, smatra se da alge sadrže mnoštvo bioaktivnih spojeva koji imaju antioksidacijsko, antivirusno, antibakterijsko i antikarcinogeno djelovanje. Djeluju na imunološki sustav tako što aktiviraju limfocite i omogućuju njihov prelazak iz krvnih žila u tjelesna tkiva u kojima uništavaju viruse i bakterije. Potrošnja dijetetskih vlakana iz alga smanjuje rizik od raka debelog crijeva, smanjuje se razina kolesterola, a samim time i opasnost od dijabetesa i pretilosti. Također, smanjuju opasnost od tumora zbog visokog sadržaja antioksidansa, te poboljšavaju probavu i čišćenje od toksina. Morske alge imaju ljekovito djelovanje protiv tuberkuloze,

artritisa, gripe i prehlade, infekcije parazitima, a mogu djelovati i kao afrodizijak. To im omogućuje široku primjenu u alternativnoj medicini.

Na Dalekom Istoku smatra se da alge posebno podržavaju endokrini i živčani sustav što pridonosi zdravlju kose, kože i većoj otpornosti na stres.

Ekstrakti algi u kozmetičkim proizvodima dobivaju sve veći značaj u tretiranju kožnih problema, poput starenja, boranja i poremećaja pigmentacije. Pošto su alge dobar izvor omega-3 i omega-6 masnih kiselina pomažu smanjiti stvaranje bora, a osim toga pomažu u prevenciji suhoće kože i borbi protiv ekcema i akni.

U prirodi alge imaju veliku ulogu u kontroliranju koncentracije metala u slatkim vodama i morima.¹³

2.2 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI (HS-SPME) I IZRAVNA STATIČKA ANALIZA VRŠNIH PARA (HS) KORISTEĆI AUTOMATSKI SUSTAV

Alge se usitne i svaki uzorak (2 g) se stavi u bočicu (20 mL) i hermetički zatvori čepom na navoj koji sadrži PTFE / silikonsku septu.

Za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) korišten je automatizirani PAL RSI SPME držač s dva različita tipa vlakana s ovojnica prekrivenim DVB / CAR / PDMS (Divinilbenzen / Karboksen / Polidimetilsiloksan) i Polidimetilsiloksan / Divinilbenzen - PDMS/DVB), Supelco,SAD. Automatizirani PAL RSI eksperimentalni postupak sadržavao je sljedeće korake: kondicioniranje SPME vlakana prema uputama Supelco Co., miješanje uzorka (brzina miješanja: 250 okr / min; vrijeme miješanja: 5 sec.; vrijeme isključenja miješalice: 2 sec) i ravnoteža tijekom 30 min na 60 ° C, ekstrakcija isparljivih tvari 40 minuta bez miješanja i uvođenje SPME vlakna u GC injektor za desorpciju spojeva (7 min).

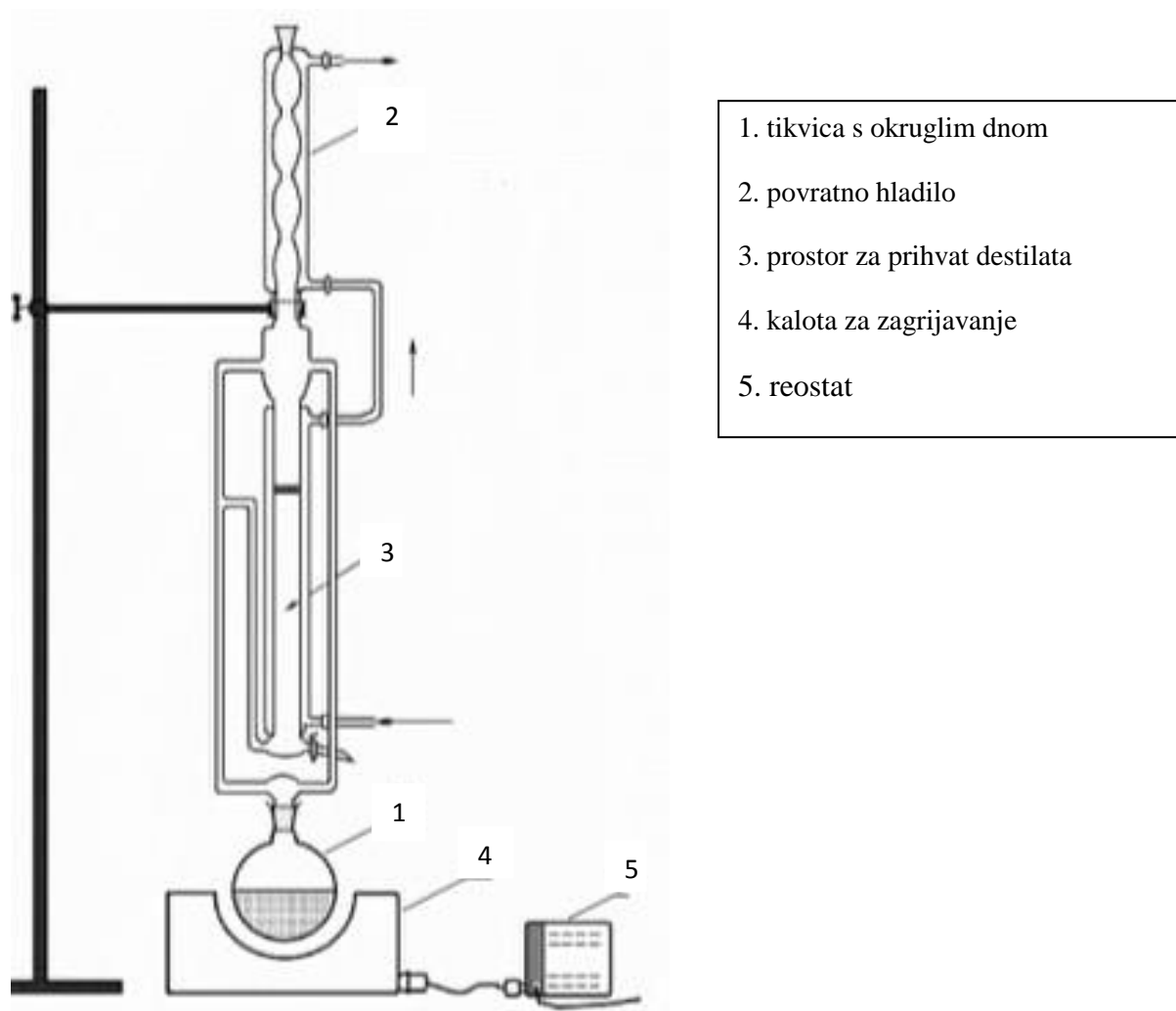


Slika 8. Vlakna s ovojnica DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno) ²¹

Kod statičke analize vršnih para koristi se automatska igla kojom se uzorkuju vršne pare iznad uzorka i izravno injektiraju u GC injektor, a uvjeti rada PAL RSI sustava su bili jednaki kao i kod HS-SPME (osim ekstrakcije od 40 minuta kod HS-SPME).

2.3 HIDRODESTILACIJA (HD)

Hidrodestilacija je provedena u modificiranoj aparaturi prema Clevenger-u. Masa od otprilike 50 g mokre alge postavljena je u tikvicu od 250 mL te je dodano 100 mL destilirane vode. U središnjoj cijevi modificirane aparature prema Clevenger-u postavljen je trap organskog otapala (1 mL smjese pentana i dietil-etera (1: 2 v/v) p.a. čistoće, čiji je proizvođač Kemika, Zagreb. Hidrodestilacija je provedena u trajanju od 2 h. Nakon završetka hidrodestilacije, organski trap s otopljenim eteričnim uljem je prebačen pipetom u staklenu bočicu od 5 mL te je otapalo upareno laganom strujom dušika do volumena 0,05 mL. Injekcijom je izvršeno ručno injektiranje u GC injektor (5 μ L).



Slika 9. Shematizacija modificirane aparature prema Clevenger-u.⁸



Slika 10. Modificirana aparatura prema Clevenger-u.

2.4 ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Analiza isparljivih spojeva uzorka izvršena je plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa (GC-MS). Korišten je vezani sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od spektrometra masa 5977E, računala te plinskog kromatografa 8890A.



Slika 11. Vezani sustav plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su provedene na koloni sa nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS) gdje je stacionarna faza 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan.

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C min⁻¹,
- „solvent delay“: 3 min (vrijeme u kojem izlazi otapalo, a „solvent delay“ se koristio samo u slučaju kada su analizirani ekstrakti s otapalom),

- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin⁻¹.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja poznatih tvari prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju. Identifikacija je provedena i usporedbom spektara masa analiziranih spojeva sa spektrima masa iz literature ili komercijalne biblioteke spektara masa (*Wiley 09 i NIST 17*).

Za svaki uzorak analiziran vezanim sustavom GC-MS dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima (udio površine pika u ukupnoj površini)
- vrijeme zadržavanja svake komponente
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente (sličnost je izražena u postocima).

3 REZULTATI

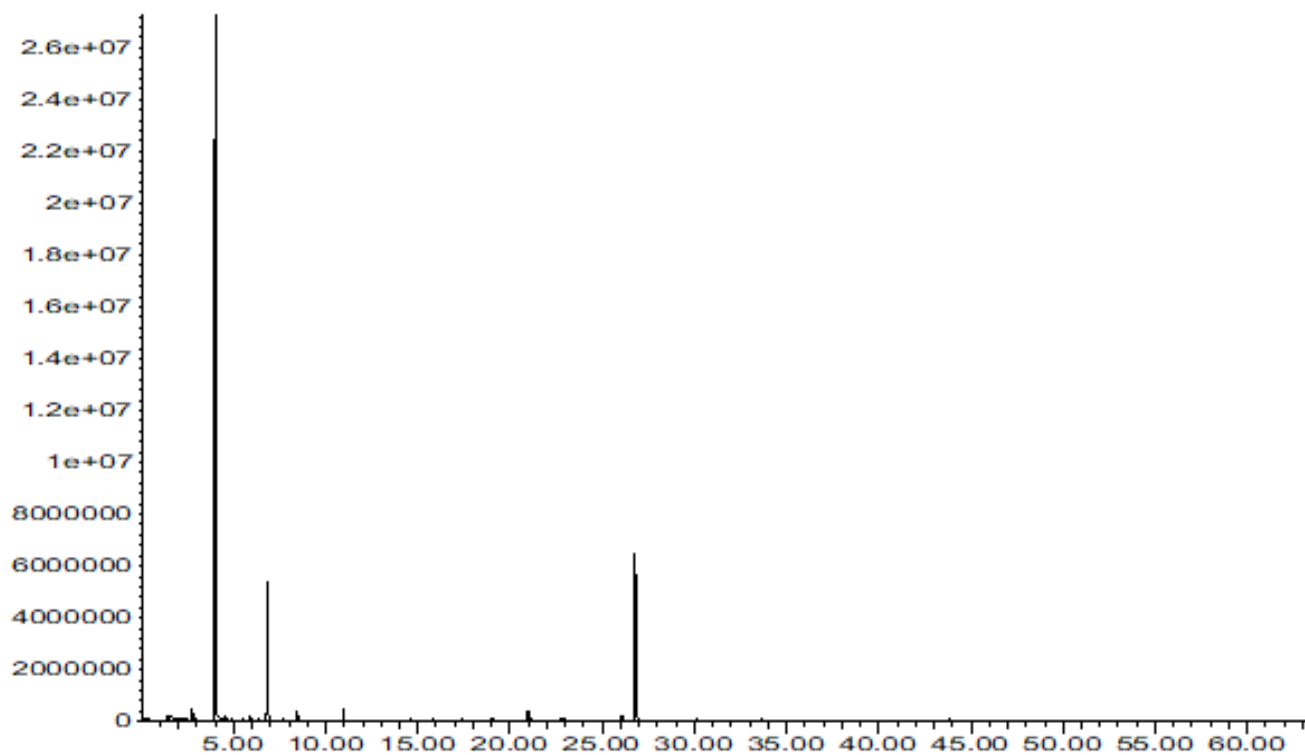
Rezultati su prikazani tablično i u obliku odabranih kromatograma ukupne ionske struje i spektara masa.

Tablica 1. Isparljivi spojevi *A. taxiformis* izolirani metodom HS-SPME (mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi).

Redni broj	Spoj	Rt	HS-SPME (DVB/CAR/PDMS)	HS-SPME (PDMS/DVB)
1.	jodmetan	1,579	0,52	0,32
2.	heksanal	2,754	-	0,08
3.	dibromklorometan	2,773	0,59	0,68
4.	dibrommetan	2,918	0,09	0,09
5.	1-brompentan	3,149	0,07	0,12
6.	tribrommetan	4,008	53,57	69,79
7.	benzaldehyd	5,549	0,16	0,35
8.	tribrometen	5,864	0,08	0,18
9.	dibromojodometan	6,827	11,78	14,22
10.	1-bromheptan	7,695	0,15	0,19
11.	(<i>E</i>)-okt-2-enal	8,324	0,08	-
12.	tetrabrommetan	8,461	0,96	1,25
13.	(<i>E,E</i>)-okta-2,4-dienal	10,167	0,03	0,09
14.	bromdijodmetan	10,948	1,44	1,54
15.	1-bromoktan	11,385	0,13	0,19

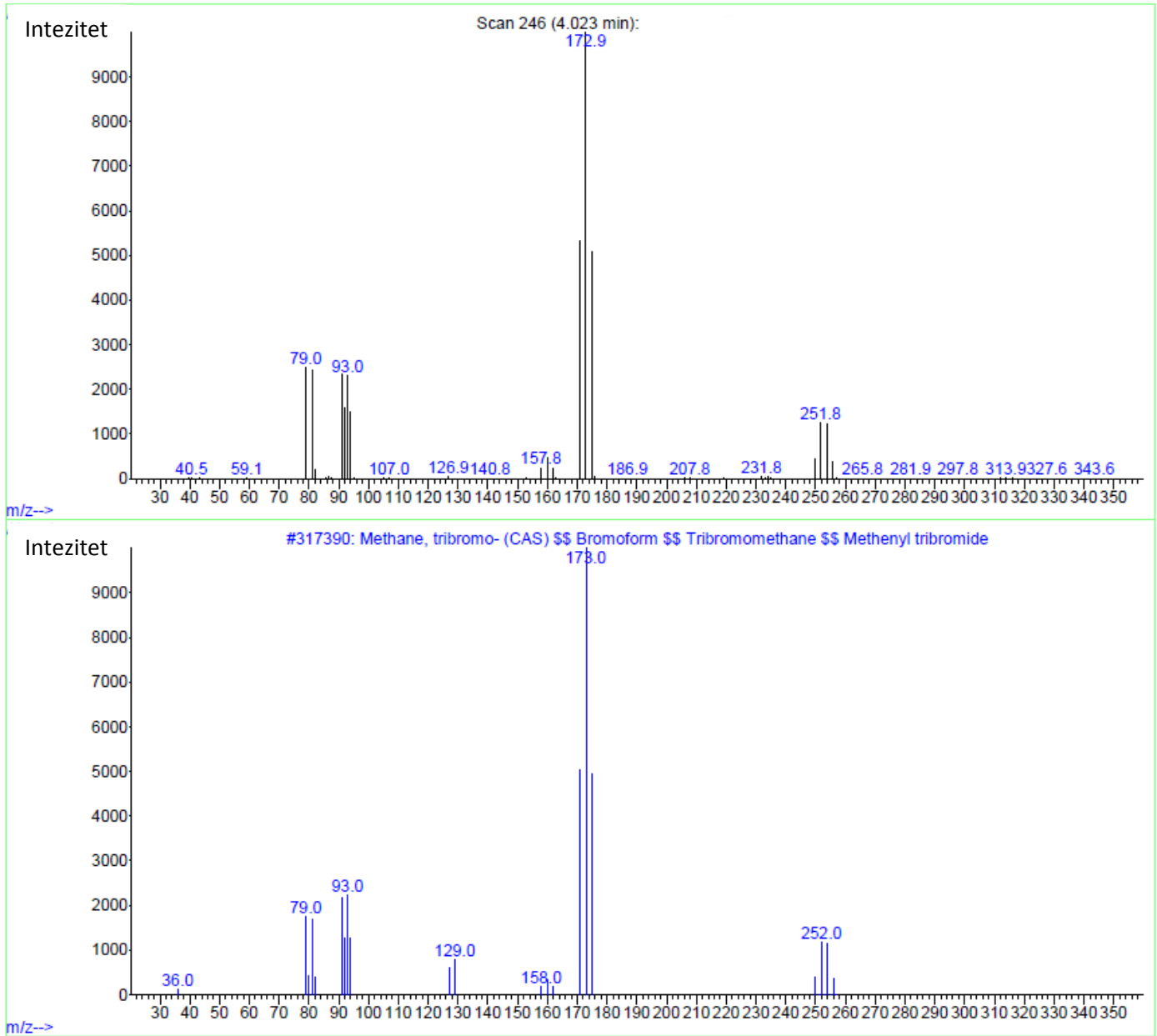
16.	(E)-non-2-enal	12,085	0,07	-
17.	1,3-dibrompropan-2-on	14,568	0,26	-
18.	jodoktan	15,109	0,10	0,07
19.	(E)-dek-2-enal	16,260	0,13	0,07
20.	bromdekan	19,886	-	0,07
21.	butoksietoksietil-acetat	20,708	0,19	0,20
22.	1,1,3,3-tetrabromaceton	22,421	0,16	0,19
23.	α -jonon	23,114	-	0,08
24.	tridekanal	26,474	-	0,18
25.	metil-3,3-dibromprop-2-enoat	26,772	20,14	5,54
26.	1,3,5-tribrom-2-metoksibenzen	30,324	0,17	0,17
27.	heptadekan	33,614	0,21	0,27
<i>Ukupno identificirano</i>			<i>91,08%</i>	<i>81,7%</i>

Intezitet



Vrijeme

Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje spojeva vršnih para *A. taxiformis* dobivenih metodom HS-SPME/GC-MS (vlakno DVB/CAR/PDMS).



Slika 13. Spektar masa tribrommetana (scan na 4.023 min i spektar masa iz računalne banke podataka *NIST 17*).

Tablica 2. Isparljivi spojevi *A. taxiformis* izolirani metodom HS (izravna statička analiza vršnih para).

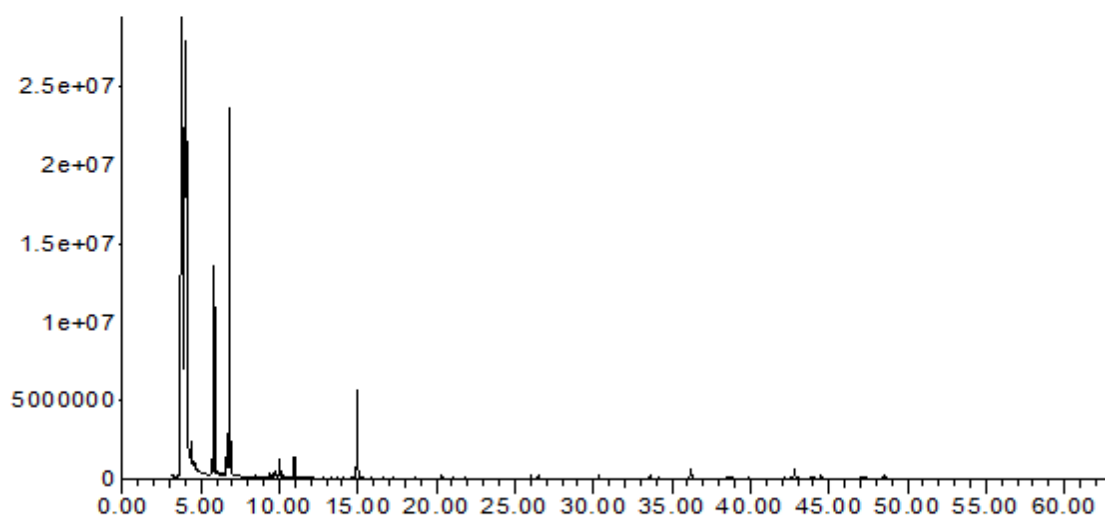
Redni broj	Spoj	Rt	HS
1.	dibromklorometan	2,773	0,57
2.	tribrommetan	4,008	64,46
3.	dibromjodometan	6,827	15,30
4.	tetrabrommetan	8,461	1,21
5.	bromodijodmetan	10,948	0,67
6.	metil-3,3-dibromprop-2-enoat	26,772	0,22
Ukupno identificirano			82,43%

Tablica 3. Isparljivi spojevi *A. taxiformis* izolirani metodom HD (hidrodestilacija).

Redni broj	Spoj	Rt	HD
1.	tribrommetan	4,008	76,58
2.	tribrometen	5,864	0,02
3.	dibromojodmetan	6,827	13,39
4.	tetrabrommetan	8,461	0,07
5.	(<i>E,E</i>)-okta-2,4-dienal	10,167	0,13
6.	bromdijodmetan	10,948	0,75
7.	α -jonon	23,114	0,04
8.	β -jonon	25,495	0,02
9.	pentadekan	26,049	0,13
10.	tridekanal	26,474	0,11
11.	1,3,5-tribrom-2-metoksibenzen	30,324	0,17
12.	heptadekan	33,614	0,14
13.	tetradekanska kiselina	36,242	0,45
14.	neofitadien	37,481	0,04

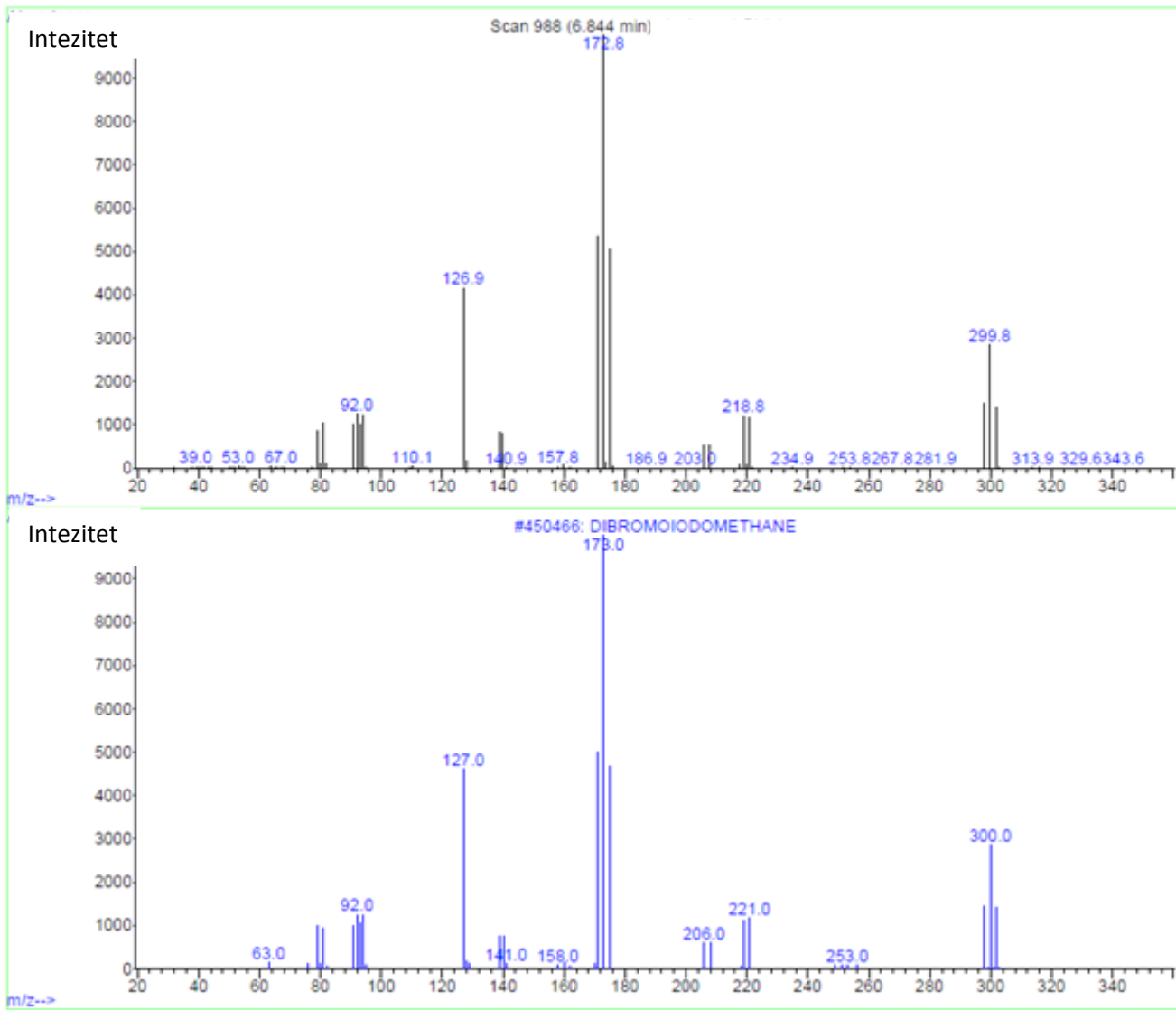
15.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on [heksahidrofarnezil aceton]	38,693	0,09
16.	(Z)-heksadek-9-enska kiselina [palmitolinolenska kiselina]	42,114	0,05
17.	heksadekanska kiselina	42,822	0,40
18.	dibutil-1,2-benzendikarboksilat [dibutil-ftalat]	42,539	0,03
19.	(2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametil- heksadek-2-en-1-ol [(E)-fitol]	44,016	0,10
<i>Ukupno identificirano</i>			<i>92,71%</i>

Intezitet



Vrijeme

Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje isparljivih spojeva *A. taxiformis* dobivenih metodom HD/GC-MS.



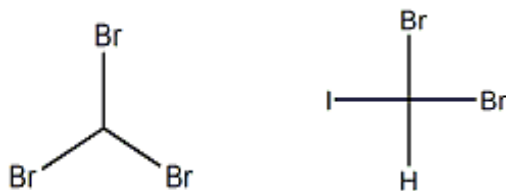
Slika 15. Spektar masa dibromjodmetana (scan na 6.844 min i spektar masa iz računalne banke podataka *NIST 17*).

4 RASPRAVA

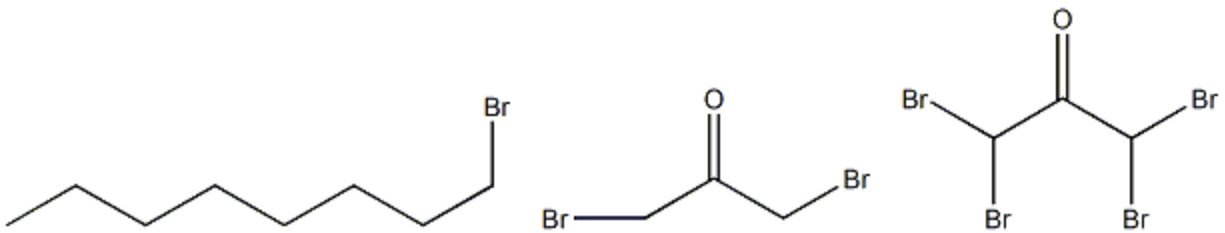
Tijekom 2014. godine *A. taxiformis* je zabilježena kao invazivna crvena alga na području Splita u obliku pojedinačnih talusa. Do sada nije istražena na ovom području te je cilj rada provesti detaljnu organsku analizu isparljivih organskih spojeva *A. taxiformis*. Za istraživanje su odabrane tri komplementarne metode: mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME), ekstrakcija vršnih para (engl. *headspace extraction*, HS) te hidrodestilacija (engl. *hydrodistillation*, HD).

4.1 VRŠNE PARE *Asparagopsis taxiformis*

Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) primijenjena je uz upotrebu dva vlakna različite polarnosti (Divinilbenzen/Karboksen / Polidimetilsiloksan - DVB/CAR/PDMS i Polidimetilsiloksan / Divinilbenzen - PDMS/DVB) te je prvi put korištena za istraživanje isparljivih spojeva *A. taxiformis*. Korišten je automatski sustav za HS-SPME. Rezultati HS-SPME/GC-MS analize ukazuju na tribrommetan kao predominantan spoj vršnih para (53,57%; 69,79%). Drugi po zastupljenosti je dibromjodmetan (11,78%; 14,22%). Ostali identificirani halogenalkani u manjim postotcima su: jodmetan, dibromklormetan, dibrommetan, 1-brompentan, tribrometan, 1-bromheptan, tetrabrommetan, bromdijodmetan, 1-bromoktan, 1,3-dibrompropan-2-on, 1-jodoktan, 1-bromdekan, 1,1,3,3-tetrabromaceton i metil-3,3-dibromprop-2-enoat. Pronađen je i jedan aromatski halogenirani spoj 1,3,5-tribrom-2-metoksibenzen u manjem postotku.

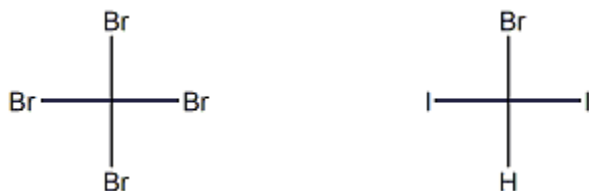


Slika 16. Strukturna formula glavnih spojeva vršnih para, bromoform i dibromjodometan.



Slika 17. Strukturna formula halogenalkana zastupljenih u manjim postotcima u vršnim parama, 1-bromoktan, 1,3- dibromopropan-2-on i 1,1,3,3- tetrabromacetone.

Analiza vršnih para provedena je i izravnim injektiranjem vršnih para u GC-injektor (statička analiza vršnih para) koristeći automatski sustav. Tribrommetan je predominantan spoj vršnih para (64,46%), a drugi po zastupljenosti je dibromjodmetan (15,30%). Pronađeno je i nekoliko drugih halogeniranih spojeva u malim postotcima: dibromklormetan, tetrabrommetan, bromdijodmetan i metil-3,3-dibrom-prop-2-enoat.¹⁴



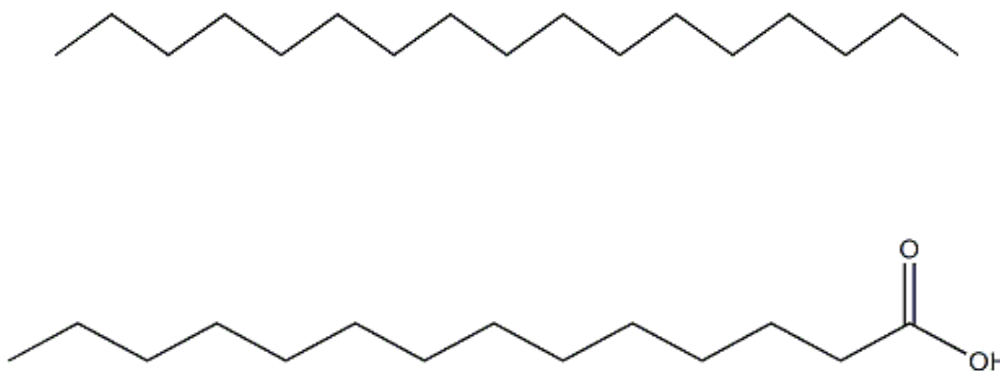
Slika 18. Strukturna formula ostalih halogeniranih spojeva, tetrabrommetan i bromdijodmetan.

Isparljivi haloalkani nastaju iz morskih algi. Osobito crvena alga *A. taxiformis* je poznata po produkciji haloalkana, uglavnom bromiranih i jodiranih metana i acetona.² „Purge and trap“ tehnikom određeni su isparljivi haloalkani iz *A. taxiformis* i *A. armata* s različitih geografskih lokacija. Bromoform (CHBr_3), dibrommetan (CH_2Br_2), 1,2-dibrometilen ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Br}_2$), dibromklormetan (CHBr_2Cl) i tribrometilen (C_2HBr_3) su identificirani iz navedenih algi. $\text{C}_2\text{H}_2\text{Br}_2$ i C_2HBr_3 prethodno nisu bili identificirani kao prirodni spojevi.⁴

Značajne kvalitativne i kvantitativne razlike su uočene između izolata. Usporedba s provedenim HS-SPME/GC-MS rezultatima ukazuje na mnoge kvalitativne sličnosti.

4.2 ETERIČNO ULJE *Asparagopsis taxiformis*

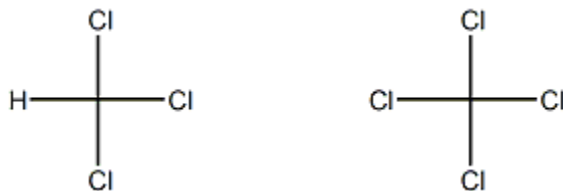
Eterično ulje *A. taxiformis* dobiveno hidrodestilacijom sadržavalo je tribrommetan kao glavni spoj (76,58%) uz dibromjodmetan (13,39%). Identificirano je nekoliko drugih halogeniranih alkana sa manjom zastupljenosti (tribrometen, tetrabrometan i bromdijodmetan) te 1,3,5-tribrom-2-metoksibenzen. U eteričnom ulju u manjim postocima prisutni su slijedeći alifatski spojevi: (*E,E*)-okta-2,4-dienal, pentadekan, tridekanal, heptadekan, tetradekanska kiselina, (*Z*)-heksadec-9-enska kiselina, heksadekanska kiselina, dibutil-ftalat, (*E*)-fitol i neofitadien. Također su pronađena i dva norizoprenoida: α -jonon i β -jonon.



Slika 19. Strukturna formula spojeva izoliranih hidrodestilacijom, heptadekan i tetradekanska kiselina.

Godine 1975. otkriven je bromoform u eteričnom ulju *A. taxiformis* sa Havaja, a kasnije i haloform s jodom dibromjodmetan.¹⁶ Detaljna analiza eteričnog ulja *A. taxiformis* s Havaja utvrdila je prisustvo uglavnom bromiranih i jodiranih alkana sa manjim postocima drugih halogeniranih etana, etanola, formaldehida, acetaldehida, acetona, propan-2-ola, 2-acetoksipropana, propena, epoksipropana, akroleina i beutenona.¹⁵ Međutim, eterično ulje u spomenutom istraživanju dobiveno je sušenjem svježe alge u vakuumu i sakupljanjem u kondenzatoru hlađenim suhim ledom te se rezultati samo djelomično mogu usporediti s eteričnim uljem dobivenim hidrodestilacijom. Nadalje, etanolnom ekstrakcijom *A. taxiformis* i *A. armata*

praćenom ekstrakcijom pentanom izolirana je serija halometana, među njima MeI, CHCl₃ i CCl₄², ali također rezultati su samo djelomično usporedivi s hidrodestilacijom.

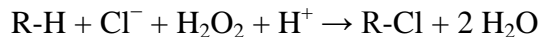


Slika 20. Strukturna formula halogenalkana u eteričnom ulju, triklormetan i tetraklormetan.

4.3 BIOGENEZA HALOGENALKANA

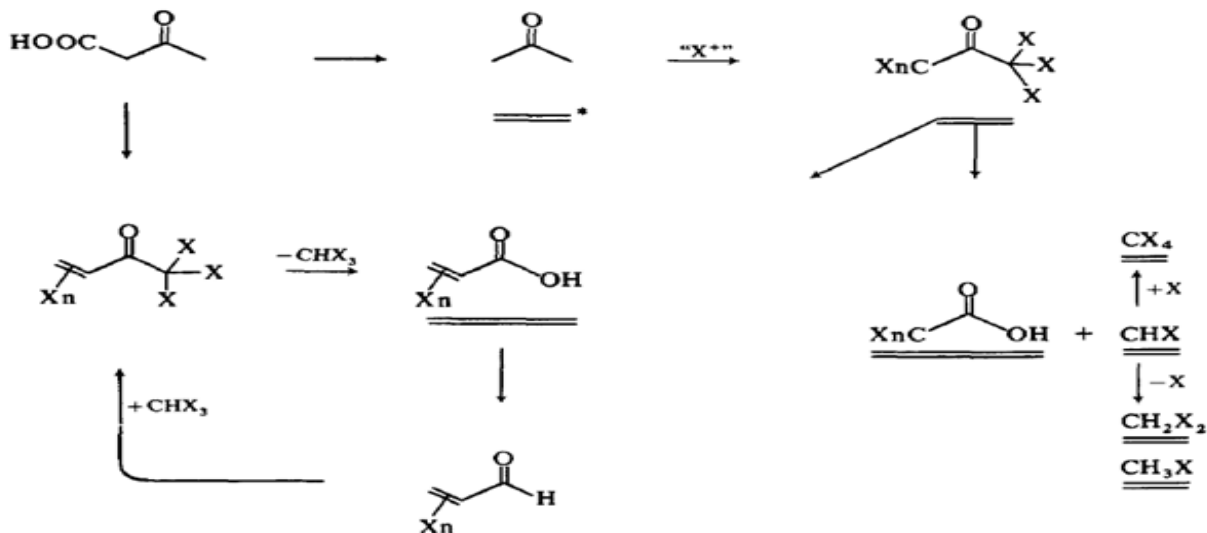
Na temelju rezultata istraživanja dvije vrste *Asparagopsis* i uzimajući u obzir rezultate *A. taxiformis* može se zaključiti da biološke haloform reakcije stvaraju izvanstanične haloforme (halogenalkane) vjerojatno kao posljedica prilagodbe okolini iz specijaliziranih vezikularnih stanica smještenih na površini uz prisustvo halogenid iona iz morske okoline.¹⁶

Postoje mnogi mogući putevi biosinteze haloforma. Aceton ili njegov ishodni spoj acetoacetat izgleda podliježe reakciji halogeniranja koja je analogna kloroperoksidazi.¹⁷ Kloroperoksidaze su jedni od rijetkih enzima koji mogu katalizirati oksidativno kloriranje substrata koristeći H₂O₂ i Cl⁻ prema reakciji:



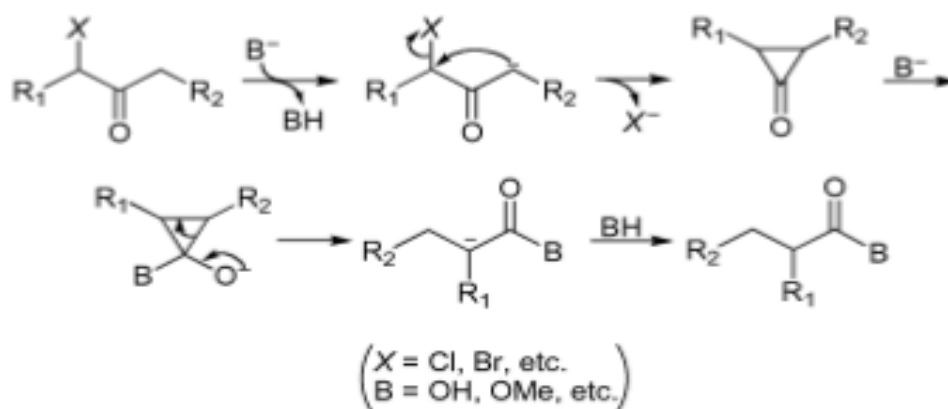
Vezivanje halogen atoma je katalizirano kloroperoksidazom na supstratima koji sadrže aktiviranu C-H vezu.

Mnoštvo identificiranih haloaceton izomera ukazuje na pojavu enzimskog halogeniranja s bromom, klorom i jodom (s navedenim slijedom značaja ili uključivanja halogena u strukturu). Derivati 1,1,1-trihalogenacetona kemijski ili enzimski reagiraju s bazom i stvaraju halogenirane ugljikovodike i odgovarajuće karboksilne kiseline.

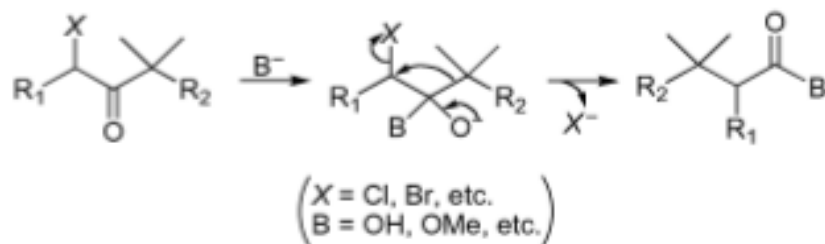


Slika 21. Mogući biosintetski putevi nastanka halogeniranih metabolita vrste *Asparagopsis*.²

Međutim, halogenirani butenoni nisu jedini izvori halogenakrilnih kiselina, već i bazne pregradnje haloacetona (Favorskii reakcija) mogu dati halogenakrilne kiseline. Favorskii reakcija je bazno inducirana pregradnja α -haloacetona u odgovarajuće derivate karboksilne kiseline s jednakim brojem ugljikovih atoma u strukturi. Najvjerojatnija su dva mehanizma reakcije: a) Favorskii reakcija preko ciklopropanskog mehanizma i b) Favorskii reakcija slična pregradnji benzilne kiseline (difenilglikolna kiselina).¹⁸

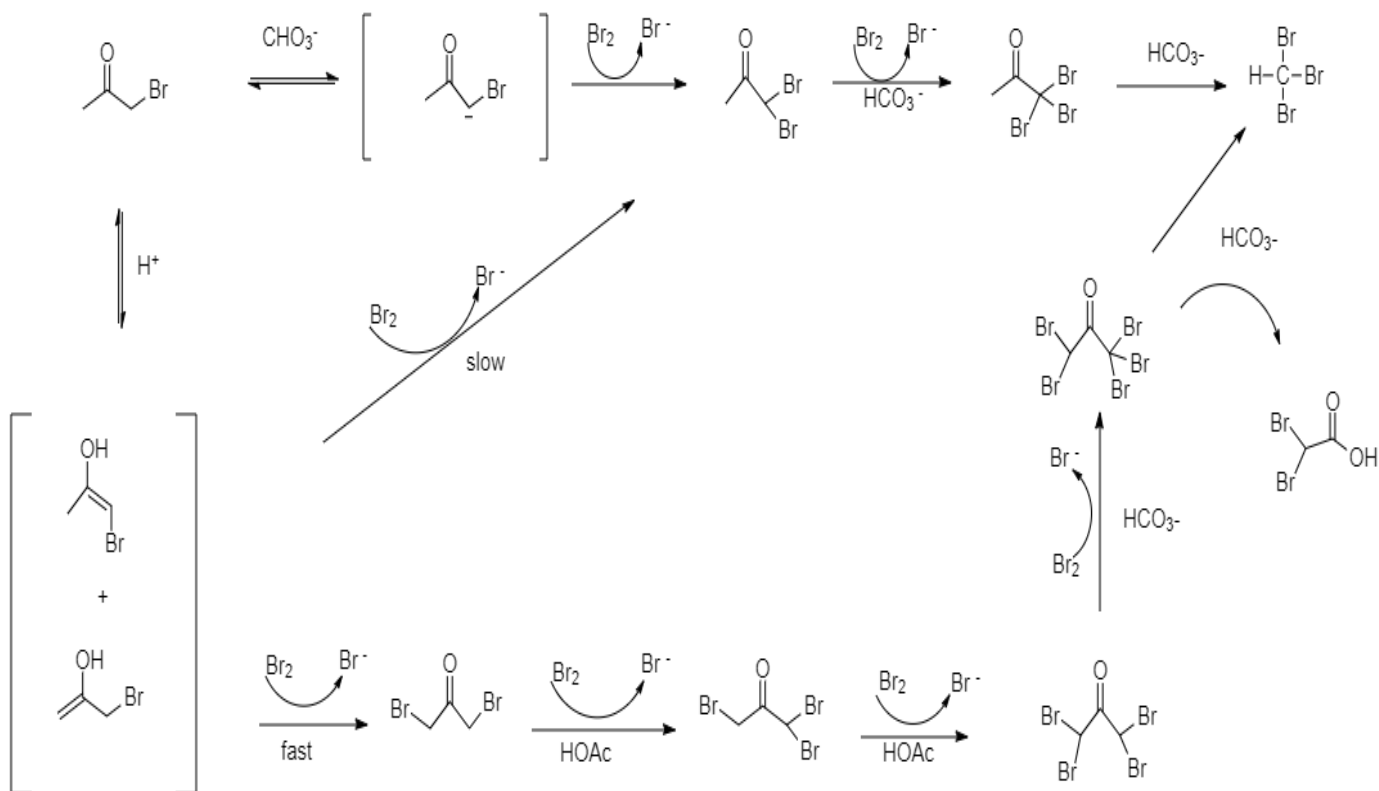


Slika 22. Shema Favorskii pregradnje preko ciklopropanskog prstena (formiranje karbaniona deprotoniranjem α -vodika praćeno nukleofilnom supstitucijom uz nastanak ciklopropana koji dalje s bazom reagira uz otvaranje prstena i nastanak produkta).²



Slika 23. Shema Favorskii pregradnje slična je pregradnji benzilne kiseline (adicija alkoksida na karbonilnu skupinu praćena s 1,2-pomakom alkilne skupine).²

Dakle, haloformi nastaju iz 1,1,1-trihaloacetona. Podrška predloženom biosintetskom putu je dobivena studijom neenzimskog halogeniranja halogeniranih acetona (Slika 23.). Spojevi $\text{CH}_3\text{COCHBr}_2$ i $\text{CH}_3\text{COCHBr}_3$ odmah nastaju kada se $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{Br}$ tretira sa Br^- u vodenoj otopini natrijeva bikarbonata (Slika 22.). Na pH 8, spoj $\text{CH}_3\text{COCHBr}_3$ se degradira u CHBr_3 , dok se spojevi $\text{BrCH}_2\text{COCH}_2\text{Br}$, $\text{BrCH}_2\text{COCHBr}_2$ i $\text{Br}_2\text{CHCOCHBr}_2$ ne stvaraju. Kada se bromiranje izvodi u kiselom mediju $\text{BrCH}_2\text{COCH}_2\text{Br}$, $\text{BrCH}_2\text{COCHBr}_2$ i $\text{Br}_2\text{CHCOCHBr}_2$ su jedini produkti, a daljnje bromiranje $\text{Br}_2\text{CHCOCHBr}_2$ se ne događa (međutim lako se događa u vodenoj otopini NaHCO_3 uz nastanak pentabromacetona koji se razgrađuje u CHBr_3 i dibromoctenu kiselinu). Iako pantabromacetone nije pronađen u *A. taxiformis* sa Havaja, dibromoctena kiselina je bila prisutna u vodenom ekstraktu suhe alge.¹⁵



Slika 24. Shema neenzimskog halogeniranja halogeniranih acetona.¹⁵

4.4 ULOGA HALOGENIRANIH SPOJEVA U MORSKIM ALGAMA

Organohalogeni spojevi u morskim algama imaju važnu ulogu u preživljavanju, a sposobnost organizama da sintetiziraju ove spojeve za kemijsku obranu i sakupljanje hrane je evoluirala kroz prirodnu selekciju. Poznato je da morske alge pohranjuju organohalogene spojeve u vezikularnim stanicama za lako izlučivanje i za odvrćanje predatora.¹⁹

5 ZAKLJUČAK

Alge se smatraju dobrim izvorom prehrambenih vlakana zbog prisutnosti neprobavljivih polisaharida u stanici alge. Također, alge su hranjive tvari koje sadrže ugljikohidrate, aminokiseline, masne kiseline, vlakna, vitamine i minerale. Morske alge proizvode niz strukturno različitih spojeva koji pokazuju različita farmakološka svojstva uključujući antivirusna, antibakterijska, antihelmitska, protuupalna ili pak antitumorska svojstva. Isparljivi haloalkani nastaju iz morskih algi. Crvene alge su glavni izvor monoterpena s citotoksičnim djelovanjem, a crvena alga *A. taxiformis* je poznata po produkciji haloalkana, uglavnom bromiranih i jodiranih metana i acetona.

U ovom radu uspješno su primjenjene 3 metode izolacije isparljivih spojeva *A. taxiformis*. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi pokazala se kao odgovarajuća metoda za istraživanje niskomolekulskih i visokoisparljivih spojeva. Pri tome je HS-SPME metodom izolirano 27 spojeva, a metodom statičke analize vršnih spojeva svega 6 spojeva te se za istraživanje vršnih para ove alge može preporučiti metoda HS-SPME. Hidrodestilacija je primjerena metoda za izoliranje isparljivih i manje isparljivih spojeva, a ukupno je identificirano 19 spojeva (7 manje isparljivih spojeva nije bilo identificirano metodom HS-SPME), a glavni spojevi su bili jednaki kao kod analize vršnih para.

Glavni halogenirani ugljikovodici bili su tribrommetan i dibromjodmetan. Na temelju dobivenih rezultata, ali i usporedbom sa literaturnim podacima za *A. taxiformis* može se zaključiti da biološke haloform reakcije stvaraju izvanstanične haloforme (halogenalkane) vjerojatno kao posljedicu prilagodbe okolini iz specijaliziranih vezikularnih stanica smještenih na površini uz prisustvo halogenid iona iz morske okoline.

6 LITERATURA

1. Ana-Marija Cikoš, S. Jokić, D. Šubarić, Igor Jerković, *Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae*, Marine Drugs, 2018., **16**: 348
2. Omm MConnell, W. Fenical, *Halogen chemistry of the Red algae Asparagopsis*, Phytochemistry, 1977, **16**: 367-374
3. Ana-Marija Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, Igor Jerković, *Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis and Bioactivity*, Marine Drugs, 2019, **17**, 537.
4. A. Marshall Rhoda, David B. Harper, W. Colin McRoberts, Matthew J. Dring., *Volatile bromocarbons produced by Falkenbergia stages of Asparagopsis spp. (Rhodophyta)*, Limnol.Oceanogr., 1999, **44**, 1348-1352
5. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2009.
6. I. Jerković, *Kemija aroma*, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.
7. Lea Kukoč-Modun, Nj. Radić, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, 2016., Zagreb
8. I. Blažević, *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae / doktorska disertacija*. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
9. Collins and Harvey, *An estimate of the iodine yielding seaweed Asparagopsis taxiformis (delile)*, Marine biological research station
10. Mosor Prvan i Zrinka Jakl, *Priručnik za zaštitu mora i prepoznavanje živog svijeta Jadrana*, Split, svibanj 2016.
11. A. Isabella, *The uses of seaweed as food in Hawaii*, Springer on behalf of NY botanical garden press stable, 1978., **4**, 409-412
12. G. Genovese, S. Leitner, S.A Minicante., C. Lass-Florl, *The mediterranean red algae Asparagopsis taxiformis antifungal activity against Aspergillus species*, Mycoses. 2013., **56**,516-519
13. L. Sigg, *Metal transfer mechanisms in lakes, role of settling particles*, 1985., 283-310

14. S.L. Manley, M.N. Dastoor, *Methyl halide (CH₃X) production from the glant kelp*, *Limnol.Oceanogr.*, 1987., **32**, 709-715
15. J. Burreson, R.E. Moore, P.P. Roller, *Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta)*, *J.Agric.food chem.*,1976., **24**, 856-861
16. B.J. Burreson, R.E. Moore, *Haloforms in the essential oil of the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta)*, *Tetrahedron letters*, 1975., **7**, 473-476
17. D.R. Morris, L.P. Hager, *Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein*, 1966., **241**, 1763-1768
18. Zerong Wang, *Comprehensive organic name reactions and reagents*, 2010., 1026-1031
19. G.W. Gribble, *Natural organohalogenes many more than you think*; *Journal of chemical education*, 1994., **71**, 907-911
20. M. Mandarić, *Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetici*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2016.
21. Marijanović Z. *Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda*. Doktorski rad. Prehrambenotehnološki fakultet Osijek. Osijek. 2014; 34-5.