

Kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena u komercijalnim uzorcima eteričnog ulja plinskom kromatografijom

Kranjčec, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:220848>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-20**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

I

MEDICINSKI FAKULTET

Katarina Kranjčec

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE LIMONENA U
KOMERCIJALNIM UZORCIMA ETERIČNOG ULJA PLINSKOM
KROMATOGRAFIJOM**

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Katarina Kranjčec

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE LIMONENA U
KOMERCIJALNIM UZORCIMA ETERIČNOG ULJA PLINSKOM
KROMATOGRAFIJOM**

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

Split, listopad 2018.

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij
FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Instrumente metode analize u farmaciji
Tema rada je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 2. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Franko Burčul

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE LIMONENA U KOMERCIJALNIM UZORCIMA ETERIČNOG ULJA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Katarina Kranjčec, broj indeksa: 95

Sažetak:

Cilj istraživanja: Razvoj i vrednovanje metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena u komercijalnim eteričnim uljima mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna plinskom kromatografijom, s ciljem smanjenja trajanja analize radi uštede vremena i plinova.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni uzorci Pranarom eteričnih ulja, koja su otopljena u pentanu i metanolu, te standardne otopine limonena otopljenog u metanolu s rasponom masenih koncentracija od 10 do 5×10^{-3} mg/mL. Brzina porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona se mijenjala, dok su ostali radni uvjeti održavani konstantnim. Za analizu je korišten *split/splitless* injektor, zagrijan na 250 °C, sa *split* omjerom 100:1, dok je kao pokretna faza korišten helij s brzinom protoka 1,000 mL/min. U istraživanju je korištena kapilarna kolona s tekućom, nepolarnom nepokretnom fazom. Za sagorijevanje analita u plamenoionizacijskom detektoru korišteni su zrak i vodik, dok je dušik korišten kao "*makeup*" plin.

Rezultati: Na dobivenim kromatogramima vidi se kako unatoč korištenju različite brzine porasta temperature peći, dolazi do dobrog odjeljivanja komponenti uzorka. Svim komponentama je potrebno oko 15 min za eluiranje s kolone, stoga je kao optimalna metoda odabrana metoda s dvije različite brzine porasta temperature peći. Kao što je i očekivano, povećanjem brzine porasta temperature peći, vrijeme zadržavanja limonena se skratilo, ali je ponovljivo korištenjem iste metode. Nema značajne razlike u rezultatima uporabom metanola kao otapala, u usporedbi s pentanom, stoga je kao otapalo izbora odabran metanol radi lakšeg rukovanja.

Zaključci: Primjenom veće brzine porasta temperature peći vrijeme analize se značajno smanjuje - s 90 minuta prvom metodom na 23 minute i 51 sekundu zadnjom metodom. Bez obzira na brzinu, zadržana je kvaliteta rezultata, odnosno dobro odjeljivanje komponenti te ponovljivo vrijeme zadržavanja limonena. Primjenom optimizirane metode smanjuju se i troškovi analize zbog manje potrošnje plinova.

Ključne riječi: limonen, brza plinska kromatografija, vrijeme zadržavanja, brzina porasta temperature peći

Rad sadrži: 53 stranice, 34 slike, 7 tablica, 19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član-mentor

Datum obrane: 26. listopada 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Instrumental methods of Analysis in Pharmacy
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 2.
Mentor: Franko Burčul, PhD, assistant prof.
Technical assistance: Franko Burčul, PhD, assistant prof.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF LIMONENE IN COMMERCIAL SAMPLES OF ESSENTIAL OIL USING GAS CHROMATOGRAPHY

Katarina Kranjčec, index number: 95

Summary:

Objectives: Development and validation of the method for qualitative and quantitative determination of limonene in tangerine, grapefruit, sweet orange and lemon commercial essential oils, using gas chromatography, with the aim of reducing the analysis duration in order to save time and gasses.

Material and Methods: Samples of Pranarom essential oils were used in the research, dissolved in pentane and methanol, and standard solution of limonene dissolved in methanol with mass concentrations ranging from 10 to 5×10^{-3} mg/mL. Column oven temperature rate was altered, while other operating conditions were kept constant. A split/splitless injector, heated to 250 °C and with a 100:1 split ratio, was used for the analysis, with helium at constant flow rate of 1,000 mL/min as mobile phase. A capillary column with liquid, non-polar stationary phase was used. Oxygen and hydrogen were used as a fuel in the flame ionization detector, whereas nitrogen was used as makeup gas.

Results: The obtained chromatograms show a good separation of sample components despite the variety of oven program rates applied. All the components take about 15 minutes to elute from the column, which is why the method involving two different oven program rates was selected as optimal. As expected, an increase in the oven temperature rate resulted in reduced retention time of limonene, but was reproducible by using the same method. It was demonstrated that there is no significant difference in results obtained by the use of methanol as solvent as opposed to the use of pentane, which is why methanol, due to the fact it is easier to handle, was selected as the solvent of choice.

Conclusions: An increase in the oven program rates was shown to lead to a significant reduction of the duration of analysis - from 90 minutes in the first method down to 23 minutes and 51 seconds in the last. Regardless of the program rate, the quality of the results was kept, *i.e.* good separation of components and reproducible limonene retention time. Due to reduced gas consumption, the application of the optimal method results in a decrease of analysis costs.

Key words: limonene, fast gas chromatography, retention time, oven temperature increase

Thesis contains: 53 pages, 34 figures, 7 tables, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Olivera Politeo, PhD, associate prof. - chair person
2. Lea Kukoč Modun – PhD, assistant prof. - member
3. Franko Burčul - PhD- full prof. - supervisor

Defence date: October 26, 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 and Library of School of Medicine, Šoltanska 1.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Eterična ulja.....	2
1.1.1. Eterična ulja roda <i>Citrus</i>	2
1.1.2. Limonen.....	2
1.2. Kromatografija.....	3
1.2.1. Podjela kromatografije.....	3
1.2.2. Kromatogram.....	5
1.3. Plinska kromatografija.....	7
1.3.1. Injektori za GC.....	8
1.3.2. Kolone za GC.....	11
1.3.3. Detektori za GC.....	14
2. Cilj istraživanja.....	17
3. Materijali i metode.....	19
3.1. Priprema uzoraka.....	20
3.2. Priprema standardnih otopina limonena.....	21
3.3. Instrumenti.....	22
3.4. Radni uvjeti GC-a.....	23
3.4.1. Plinovi.....	23
3.4.2. Injektor.....	23
3.4.3. Kolona.....	24
3.4.4. Detektor.....	25
3.5. Ostali instrumenti.....	25
4. Rezultati.....	26
4.1. Metoda 1.....	27
4.2. Metoda 2.....	29
4.3. Metoda 3.....	30
4.4. Metoda 4.....	31
4.5. Vrednovanje metode 4.....	36
4.5.1. Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje.....	36
4.5.2. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	37
5. Rasprava.....	38
6. Zaključci.....	43
7. Popis citirane literature.....	45

8. Sažetak.....	48
9. Summary.....	50
10. Životopis.....	52

Zahvala

Posebno se zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na uloženom trudu i vremenu pri izradi mog diplomskog rada, za pružanje nesebične pomoći te se zahvaljujem na strpljenju koje je uvijek imao za sve moje upite.

Također, zahvaljujem se svome dečku i svim prijateljima koji su mi bili najveća podrška tijekom izrade ovog diplomskog rada, kao i tijekom cijelog mog studiranja, a posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je sve ovo omogućila.

1. Uvod

1.1. Eterična ulja

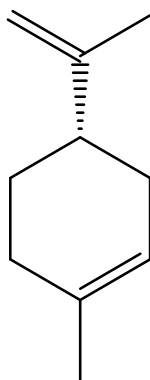
Eterična ulja (lat. *aetherolea*) su smjese jače ili slabije hlapljivih, lipofilnih sastavnica izoliranih iz biljaka ili biljnih dijelova. To su tekućine niske viskoznosti te intenzivnog, najčešće ugodnog mirisa, koji ovisi o njihovom kemijskom sastavu. Eterična ulja mogu se dobivati različitim tehnikama, kao što su destilacija, ekstrakcija i tiještenje. Svježe izolirana eterična ulja su najčešće bezbojne ili blijedožućkaste tekućine. Dobro se miješaju sa svim lipofilnim otapalima, dok je njihova topljivost u vodi vrlo mala (1:200). Za identifikaciju i ispitivanje stupnja čistoće eteričnih ulja novije farmakopeje propisuju tankoslojnu i plinsku kromatografiju. Prednost plinske kromatografije je mogućnost identifikacije svih komponenti (i onih u tragovima), određivanja sadržaja i stupnja čistoće u jednoj analizi, dok je nedostatak cijena analize (1).

1.1.1. Eterična ulja roda *Citrus*

Eterična ulja roda *Citrus* dobivaju se destilacijom iz cvjetova i listova te tiještenjem kore plodova, a lokalizirana su u intercelularnim prostorima ili kanalima te nastaju lizigeno (grč. *lysis* - otapati), odnosno, nastaju oblikovanjem takozvane lizigene šupljine. Ishodište lizigene šupljine predstavlja stanica koja ima gušći sadržaj, čijom podjelom najprije nastaje tkivo bez šupljine, u kojem postupno dolazi do otapanja staničnih membrana, što dovodi do stvaranja spremnice za ekskret (1).

1.1.2. Limonen

Limonen spada u cikličke monoterpene te glavna je komponenta eteričnih ulja dobivenih iz raznih agruma, kao što su limun (*Citrus limon* L.), slatka naranča (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), grejp (*Citrus x paradisi* Macfad.) i drugi (1,2).



Slika 1.1. Struktura *R*-(+)-limonena

Bistra je i bezbojna tekućina na sobnoj temperaturi, ugodnog je mirisa te zbog toga ima značajnu industrijsku primjenu. Dobro je topljiv u organskim otapalima, a može se izolirati destilacijom ili ekstrakcijom. Na zraku brzo oksidira do perilne kiseline, dihidroperilne kiseline, uroterpenola i limonen-1,2-diola (2). Njegovi oksidacijski produkti mogu biti potencijalni kožni iritansi izazivajući kontaktni dermatitis (3).

1.2. Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja, te uz odgovarajući detektor, kvantifikacije i naknadne identifikacije komponenti (4). Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja komponenti smjese na temelju različite raspodjele komponenata između faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) (5).

1.2.1. Podjela kromatografije

Postoji nekoliko podjela kromatografskih metoda. S obzirom na način ostvarivanja kontakta između nepokretne i pokretne faze, razlikujemo kolonsku i plošnu kromatografiju. Kod kolonske kromatografije nepokretna faza se nalazi unutar kolone, a može biti krutina ili tekućina vezana za inertni nosač, najčešće SiO_2 , dok se uzorak kojeg želimo analizirati stavlja na početak kolone te prolazi kroz kolonu nošen pokretnom fazom. Uzorak može biti u tekućem ili čvrstom stanju, no ako je u čvrstom stanju mora biti topljiv u pokretnoj fazi. Komponente uzorka putuju različitim brzinama zbog različitog zadržavanja na nepokretnoj fazi što čini osnovu kromatografskog odjeljivanja. Primjeri kolonske kromatografije su tekućinska i plinska kromatografija. U plošnu kromatografiju spadaju papirna kromatografija i tankoslojna kromatografija, pri čemu nepokretnu fazu predstavlja kromatografski papir, odnosno celuloza iz papira, ili sloj sorbensa nanesen na čvrsti nosač, koji može biti metalna, staklena ili plastična pločica (5).

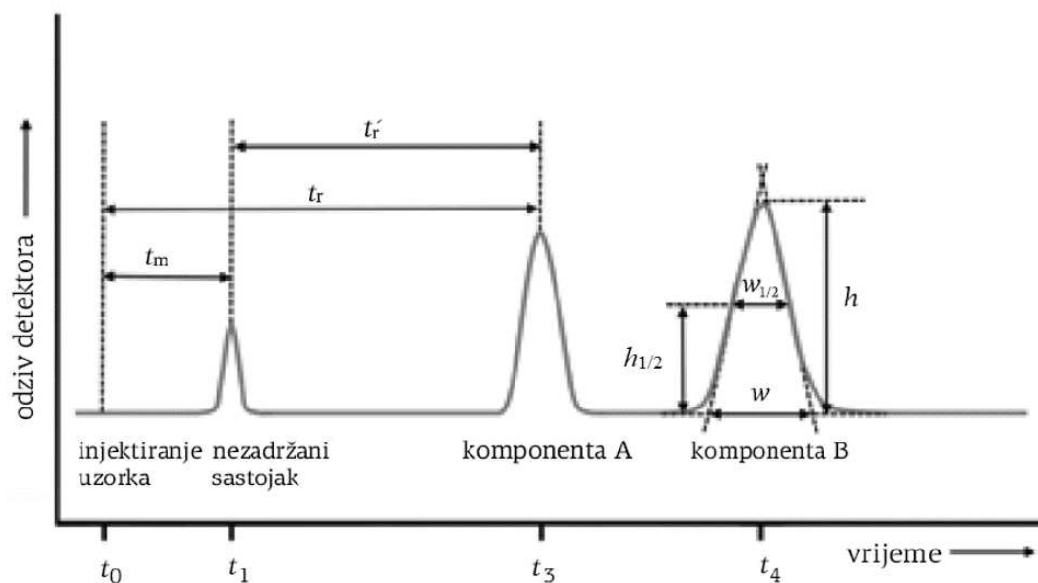
S obzirom na agregatno stanje pokretne faze, razlikujemo plinsku, tekućinsku te fluidnu kromatografiju. Pokretna faza plinske kromatografije je inertan plin (plin nosilac), najčešće vodik, dušik ili helij, a kod tekućinske kromatografije to je tekućina niske viskoznosti, dok je kod fluidne kromatografije pokretna faza superkritični fluid (fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka) (5).

Prema prirodi ravnoteže između nepokretne i pokretne faze postoje razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, afinitetna kromatografija, kromatografija

isključenjem te kromatografija ionskom izmjenom. Mehanizam odjeljivanja se kod razdjelne kromatografije temelji na razlici u topljivosti pojedinih komponenti uzorka u nepokretnoj i pokretnoj fazi. Kod adsorpcijske kromatografije ravnoteža se uspostavlja između tekućine ili plina kao pokretne faze i površine čvrste nepokretne faze, gdje se komponente izravno adsorbiraju na površinu pa zbog ovisnosti o jačini adsorpcije komponente putuju različitim brzinama. Afinitetna kromatografija se temelji na postojanju funkcionalnih skupina koje se nalaze na površini čvrste faze za koje se specifično veže tražena komponenta iz uzorka te ju to čini najselektivnijom vrstom kromatografije. Kromatografija isključenjem se temelji na odjeljivanju komponenti prema razlici u njihovim dimenzijama, odnosno molekulskoj masi i volumenu. Nepokretna faza je u ovom slučaju materijal s porama definiranih dimenzija koji se naziva i molekulsko sito, a najčešće je u pitanju porozan gel kroz koji prolazi tekuća ili plinovita pokretna faza. Kod kromatografije ionskom izmjenom nepokretnu fazu predstavlja izmjenjivačka smola na kojoj su vezane električki nabijene funkcionalne skupine koje vežu suprotno nabijene čestice iz uzorka (5).

1.2.2. Kromatogram

Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora ili neke druge funkcije koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu. Kromatografska krivulja (pik ili vršak) predstavlja odziv detektora pri eluiranju jedne komponente uzorka. Idealna kromatografska krivulja ima oblik Gaussove krivulje, jer ne eluira sav uzorak u određenom vremenu, već tada eluira glavnina uzorka, a dio uzorka eluira neposredno prije i poslije tog vremena (4). Kromatogram može poslužiti za kvalitativnu, kao i kvantitativnu analizu. Za identifikaciju analizirane komponente pomaže položaj pika na vremenskoj osi, dok površina ispod pika služi za kvantifikaciju (5).



Slika 1.2. Primjer kromatograma za uzorak s dvije komponente (A i B). Na slici je zadržano vrijeme označeno kao t_m , ukupno vrijeme zadržavanja kao t_r , prilagođeno vrijeme zadržavanja kao t_r' , visina kromatografske krivulje kao h , polovina visine kromatografske krivulje kao $h_{1/2}$, širina kromatografske krivulje u osnovici kao w , širina kromatografske krivulje u polovini visine kao $w_{1/2}$.

Vrijeme koje je potrebno komponenti koja se ne zadržava (pokretna faza) za prolazak kroz kolonu, naziva se zadržano vrijeme te se označava s t_m . Vrijeme potrebno od injektiranja uzorka do vremena maksimalnog odziva detektora za određenu komponentu, naziva se ukupno vrijeme zadržavanja, a označava se kao t_r . Prilagođeno vrijeme zadržavanja (t_r') predstavlja razliku između ukupnog vremena zadržavanja te zadržanog vremena, a računa se prema sljedećoj formuli:

$$t'_r = t_r - t_m.$$

Također, prilagođeno vrijeme zadržavanja ukazuje na vrijeme u kojem je određena komponenta bila vezana za nepokretnu fazu (5).

Faktor zadržavanja je parametar koji opisuje brzinu gibanja određene komponente kroz kolonu, a idealan faktor zadržavanja je između 1 i 5, kako elucija ne bi bila niti prebrza niti prespora. Faktor zadržavanja, za komponentu A, označuje se kao k'_A , a može se izračunati iz eksperimentalnih podataka prema sljedećoj formuli (5):

$$k'_A = \frac{t'_r}{t_m}$$

Faktor odjeljivanja pokazuje koliko dobro će određena kolona odjeliti dva različita analita. Može se izračunati iz eksperimentalnih podataka prema sljedećoj formuli (5):

$$\alpha = \frac{t'_r(B)}{t'_r(A)}$$

gdje je α faktor odjeljivanja kolone za dva analita A i B, $t'_r(B)$ prilagođeno vrijeme zadržavanja snažnije zadržavanog analita B, dok je $t'_r(A)$ prilagođeno vrijeme zadržavanja slabije zadržavanog analita A.

Visina i broj teorijskih tavana su dvije srodne veličine koje ukazuju na djelotvornost odvajanja u kromatografskoj koloni. Što je veći broj teorijskih tavana, a njihova visina manja, to je veća djelotvornost kolone, a povezuje ih sljedeća formula (5):

$$N = \frac{L}{H}$$

gdje je N broj teorijskih tavana, L duljina kolone, najčešće izražena u cm te H visina tavana. Visina teorijskog tavana se može izračunati prema sljedećoj formuli (5):

$$H = \frac{L \times w^2}{16 \times t_r^2}$$

Broj teorijskih tavana može se izračunati prema sljedećim formulama (5):

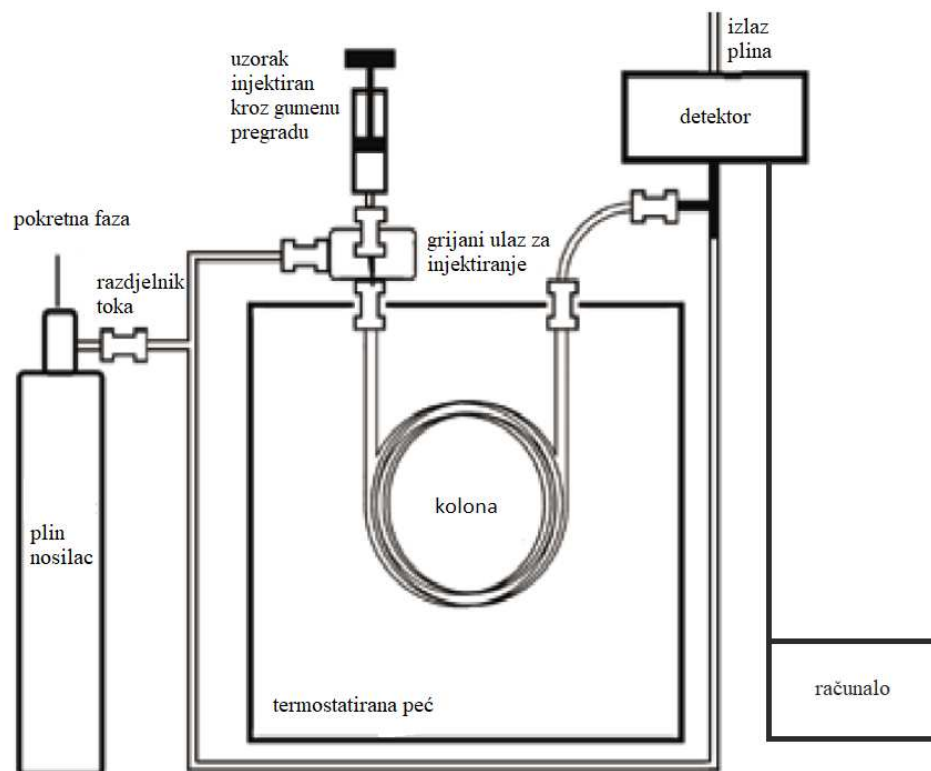
$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{w_{1/2}}\right)^2$$

1.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je široko primjenjivana tehnika u raznim područjima, kao što su kemija, biokemija, forenzika, toksikologija, farmacija i druga. Krenula se razvijati početkom 1950-ih godina. Plinska kromatografija je neizmjenjivo važna za odjeljivanje komponenti složenih smjesa prije analize, primjerice, masenom spektrometrijom (MS) ili infracrvenom spektroskopijom (6). Uzorak mora biti u plinovitom stanju pri temperaturi ispod 350 °C - 400 °C te mora biti stabilan pri temperaturi razdvajanja, stoga su hlapljivi spojevi najpogodniji za analizu, iako oni čine samo mali dio svih organskih spojeva (7). Međutim, u pitanju su spojevi koji imaju veliku važnost zbog svoje primjene u prehrambenim proizvodima, kozmetici, lijekovima te naftnoj industriji (6).

Pokretnu fazu plinske kromatografije čini inertan plin, takozvani plin nosilac, najčešće dušik, vodik ili helij, koji prolazi kroz staklenu ili metalnu kolonu te raznosi uzorak. Nepokretna faza može biti tekuća ili čvrsta, dok uzorak za analizu može biti u plinovitom ili tekućem agregatnom stanju te se injektira špricom kroz gumenu pregradu. Međutim, ako je uzorak u tekućem agregatnom stanju, onda se u grijanom ulazu za injektiranje prevodi u plinovito stanje. Pokretna faza, zajedno s uzorkom, prolazi kroz kolonu određenom brzinom protoka prema detektoru koji je spojen na računalo gdje se prikazuju rezultati mjerenja (6).



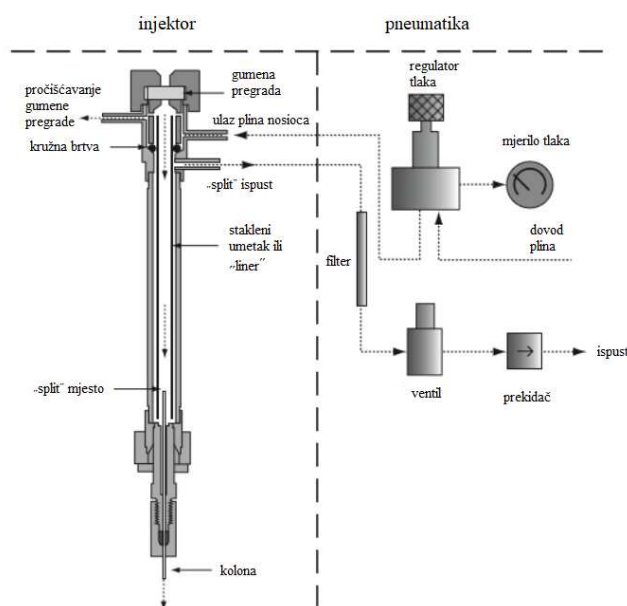
Slika 1.3. Shematski prikaz plinske kromatografije (5).

1.3.1. Injektori za GC

Injektor služi za unošenje uzorka na početak kolone. Kod injektiranja uzorka, važno je spriječiti raspršivanje zone uzorka, kako bi se dobili oštri i definirani signali (pikovi) koji se bilježe na detektoru (8). Također, važna je i reproducibilnost rezultata, što se postiže minimalnim promjenama tlaka te protoka. Stoga isporuka uzorka u kolonu mora biti kontrolirana, reproducibilna i brza (9).

Tekući uzorci

U *split/splitless* injektor uzorak se uvodi pomoću šprice u grijanu komoru kroz gumenu pregradu (engl. *septum*), koja sprječava izlaz uzorka i plina nosioca iz grijane komore. Takvi injektori se koriste za tekuće uzorke te su jedni od najstarijih i najčešće korištenih injektora za kapilarne kolone, a mogu se koristiti na dva načina, ovisno o koncentraciji analita u uzorku. Ako se analit u uzorku nalazi u relativno visokim koncentracijama (više od 100 $\mu\text{g/mL}$), onda se preporuča *split* način rada (djelomično unošenje uzorka), dok se kod uzoraka u kojim je analit u tragovima preporuča *splitless* način rada (potpuno unošenje uzorka). U oba slučaja injektor se zagrijava na zadanu temperaturu (temperatura 50 °C viša od temperature vrelišta najslabije hlapljive komponente uzorka) koja mora biti dovoljna za isparavanje, kako otapala, tako i analita (uzorka). Uobičajeno se injektira oko 1 μL uzorka (8).

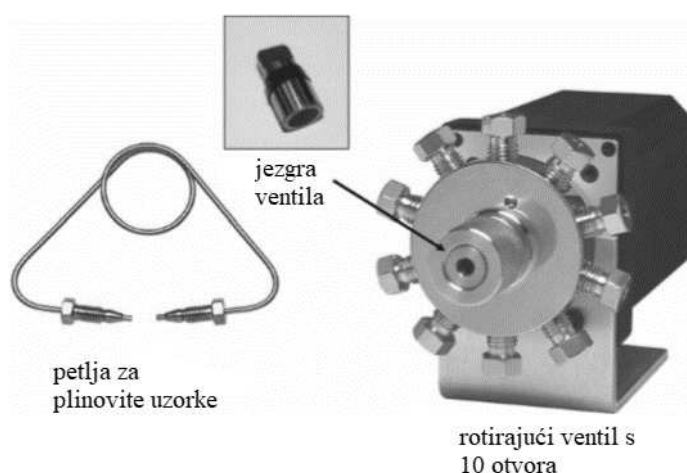


Slika 1.4. Shematski prikaz poprečnog presjeka *split/splitless* injektora (8).

Kod *split* načina rada, injektirani uzorak isparava u struju plina nosioca te se mali dio smjese (uobičajeno između 0,5 % i 5 %) usmjerava na početak kolone, pa dolazi do djelomičnog unošenja uzorka, dok se ostatak uzorka ispušta. Uobičajeni *split* omjeri kreću se od 10:1 do 400:1. Kod *splitless* metode, uzorak se injektira kada je *split* ispust zatvoren te se u potpunosti prenosi na početak kolone. Nakon određenog vremena (vrijeme čišćenja), koje traje otprilike jednu minutu (određuje se eksperimentalno) *split* ispust se otvara pa dolazi do otpuštanja ostatka otapala i malog dijela uzorka (8).

Plinoviti uzorci

Uzorak koji je u plinovitom stanju, može se uvesti u injektor plinski nepropusnom špricom ili se može uvesti u struju plina nosioca kroz rotirajući ventil za unošenje plinovitog uzorka koji je prikazan na slici 1.5. (9). Uobičajeno se injektira oko 1 mL plinovitog uzorka. (7)



Slika 1.5. Prikaz rotirajućeg ventila za unošenje plinovitog uzorka s 10 otvora i petlje za plinovite uzorke. Jezgra ventila nalazi se u unutrašnjosti te se rotira kako bi promijenila smjer protoka u ventilu. Na lijevoj strani je prikazana petlja za plinovite uzorke, koja se može ugraditi na ventil, a omogućuje prijenos poznate količine plina na kolonu (8).

Ventil za unošenje plinovitog uzorka uobičajeno je postavljen na vrh instrumenta u svom vlastitom termostatom prostoru, u kojem se posebno kontrolira temperatura. Najčešće se koriste ventili s 4-10 otvora. Često se koristi s petljom za plinovite uzorke za uvođenje uzorka na početak kolone, a najčešće se koriste petlje od 0,5 mL, 1 mL i 2 mL (8).

Automatski uzorkivač

Automatski uzorkivači postaju sve više zastupljeni kao dio uređaja za plinsku kromatografiju. Omogućavaju zadano injektiranje točno određenog volumena u zadanoj brzini injektiranja, što čini mjerenje preciznijim i bržim u usporedbi s ručnim injektiranjem. Sve navedeno omogućuje izvrsnu reproducibilnost injektiranja. Također, prednost automatskih uzorkivača je mogućnost programiranja te samostalnog rada, bez obveze ručnog injektiranja u određeno vrijeme (8).



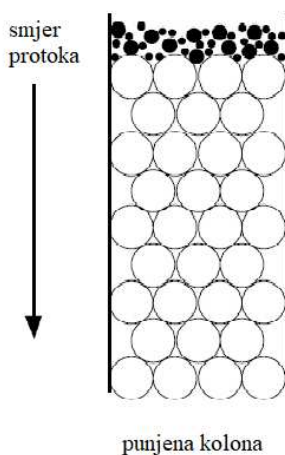
Slika 1.6. Slika korištenog automatskog uzorkivača

1.3.2. Kolone za GC

Kod plinske kromatografije, razdvajanje komponenti u uzorku se odvija unutar zagrijane kolone koja sadrži nepokretnu fazu. Ovisno o afinitetu pojedinih komponenti za nepokretnu fazu, neke komponente eluiraju s kolone brže, a neke sporije (10). Kromatografske kolone se nalaze u peći kojoj se može programirati temperatura (9). Temperatura peći, u kojoj se nalazi kolona, obično se povećava za 4 °C - 20 °C po minuti kako bi se otpustile jače zadržane komponente sa nepokretne faze. Kolone možemo podijeliti na punjene i kapilarne (10).

Punjene kolone

Punjene kolone (engl. *packed columns*) izrađuju se od bakra, aluminijskog čelika ili stakla te se pune malim česticama inertne čvrste tvari (inertni nosač), najčešće diatomne zemlje ili staklenim kuglicama. Na inertni nosač se nanosi tanki sloj tekuće nepokretne faze (razdjelna kromatografija), odnosno polimer s visokim vrelištem (10). Odabrana nepokretna faza mora biti kemijski stabilna na temperaturi mjerenja te selektivna za komponente uzorka (7). Ovakve kolone se koriste kod uzoraka koji su na sobnoj temperaturi u tekućem ili čvrstom stanju. Također, kolone mogu biti punjene malim česticama čvrstog polimera (adsorpcijska kromatografija) ili takozvanim molekulskim sitom (kromatografija isključenjem), koji predstavljaju nepokretnu fazu. Molekulsko sito je materijal s porama koje su definiranih dimenzija te se često koristi aluminijev silikat. Navedene kolone namijenjene su plinovitim i lako hlapljivim uzorcima (10).



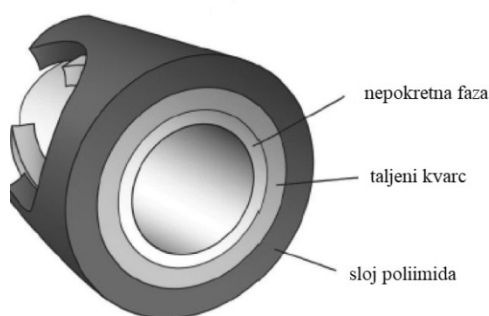
Slika 1.7. Shematski prikaz punjene kolone

Punjene kolone obično imaju unutarnji promjer od 2 mm do 4 mm, a dugačke su od 1 do 3 m (11). Zbog prirode punjene kolone, potreban je visok potisni tlak kako bi plin nosilac uspješno prolazio kroz kolonu (10). Prednost punjenih kolona je veći kapacitet uzorka (7).

Kapilarne kolone

Kapilarne kolone (engl. *capillary/open-tubular columns*) otvorene su cijevi unutarnjeg promjera od 0,1 mm do 0,53 mm, a duljine od 5 m do 60 m. Debljina filma tekuće nepokretne faze je obično 0,1 μm do 5 μm (11). Postoji više vrsta kapilarnih kolona, ovisno o izvedbi nepokretne faze (10).

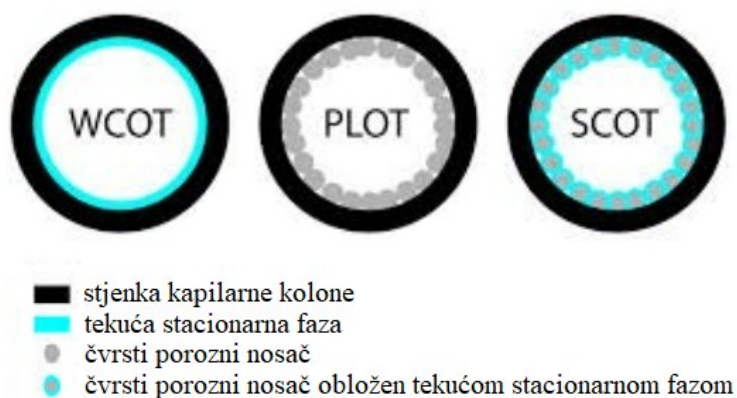
Prve izrađene kapilarne kolone bile su kapilarne kolone s obloženom stjenkom (engl. *wall-coated open-tubular columns*, WCOT). U početku su se izrađivale od stakla te zbog svoje krhkosti nisu bile široko korištene. Nakon toga, izrađene su kolone od taljenog kvarca (engl. *fused silica columns*), koje sadrže silicijev(IV) oksid visoke čistoće obložen slojem poliimida (slika 1.8.), kako bi se povećala mehanička izdržljivost i elastičnost kolone (10). Taljeni kvarc, odnosno silicijev(IV) oksid, dobiva se spaljivanjem silicijeva(IV) klorida u prisutnosti kisika (9). Unutarnja površina WCOT kolone obložena je tankim slojem tekuće nepokretne faze, koja također mora imati visoko vrelište te kemijsku stabilnost na visokim temperaturama (10).



Slika 1.8. Prikaz WCOT kolone od taljenog kvarca. Vanjska površina obložena je slojem poliimida, a unutarnja nepokretnom fazom.

Druga vrsta kapilarnih kolona su kapilarne kolone s poroznim slojem (engl. *porous-layer open-tubular columns*, PLOT). Nepokretnu fazu predstavlja čvrsti porozni sloj polimera, čime se povećava kontaktna površina s analitom, a nalazi se na unutrašnjoj stijenci kolone. Kapilarne kolone s obloženim nosačima (engl. *support-coated open-tubular columns*, SCOT),

slične su prethodno navedenim kolonama, a njihova razlika je u agregatnom stanju nepokretne faze. Kod SCOT kolona, na unutrašnju stranu stjenke nanesen je čvrsti inertni nosač u obliku sitnih čestica, najčešće, dijatomejske zemlje. Na čvrsti nosač nanesena je tekuća nepokretna faza, čime je također povećana kontaktna površina, u usporedbi s WCOT kolonama. Na slici 1.9. nalazi se shematski prikaz svih navedenih kapilarnih kolona (10).



Slika 1.9. Shematski prikaz WCOT, PLOT i SCOT koloni

Tablica 1.1. Usporedba punjene i kapilarne kolone.

	Punjena kolona	Kapilarna kolona
Unutarnji promjer (mm)	2 - 4	0,1 - 0,53
Duljina (m)	1 – 3	5 - 60
Razlučivanje	slabije	bolje
Osjetljivost	mala	velika
Kapacitet uzorka	velik	mali
Protok pokretne faze	veći	manji

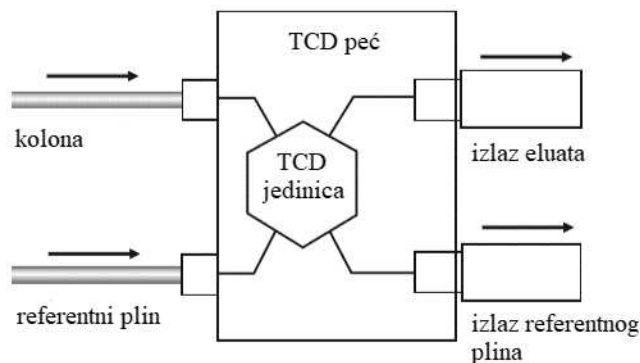
1.3.3. Detektori za GC

Kada eluat prođe kroz kolonu, na kraju kolone prolazi kroz detektor, koji tada signalizira izlazak određene komponente iz uzorka te se signal prenosi do računala. Glavni kriterij odabira detektora su osjetljivost i selektivnost. Osjetljivost detektora predstavlja najnižu koncentraciju analita koju može detektirati, dok se selektivnost odnosi na razliku između odziva detektora kod različitih analita u istoj koncentraciji. Uz to, odabir detektora se temelji i na njegovom linearnom radnom području (7).

Detektore možemo podijeliti na kvantitativne te kvantitativne i kvalitativne (5). Kvantitativni detektori temeljem fizikalnih ili kemijskih promjena otkrivaju prisutnost eluirane komponente uzorka i njihovu količinu, a radi se o detektoru toplinske vodljivosti (engl. *thermal conductivity detector*, TCD), plamenoionizacijskom detektoru (engl. *flame ionization detector*, FID) te detektoru apsorpcije elektrona (engl. *electron capture detector*, ECD). Kod ovih detektora, moguća je neizravna identifikacija komponenti uzorka iz specifičnog vremena zadržavanja kod uzoraka s prethodno definiranim sastavom (9). Prednost kvalitativnih detektora je mogućnost direktne identifikacije komponenti uzorka te dobra selektivnost. Predstavници ove vrste detektora su maseni spektrometar (engl. *mass spectrometer*, MS) i infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transformtion infrared spectrophotometer*), a tehnika mjerenja im se temelji na principu spektroskopije (7,11).

Detektor toplinske vodljivosti

Rad detektora toplinske vodljivosti temelji se na promjeni toplinske vodljivosti plina nositelja, koja nastaje uslijed prisutnosti analita (5).

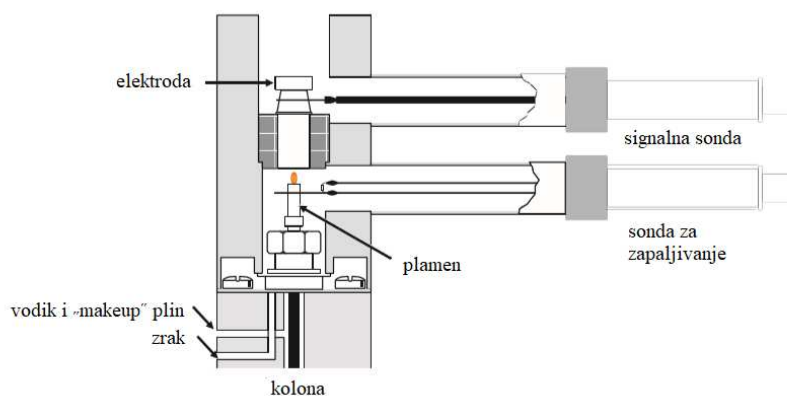


Slika 1.10. Shematski prikaz TCD detektora (10)

Detektor toplinske vodljivosti (slika 1.10.) sastoji se od TCD jedinice koja ima dva ulaza plina nositelja. Jedan ulaz namijenjen je plinu koji eluira s kolone i sadrži uzorak, a drugi referentnom plinu, odnosno čistom plinu nositelju. Unutar TCD jedinice nalazi se most okružen s 4 niti (otpornika). Na jednoj strani, eluat s kolone prolazi preko dvije niti, a s druge, referentne strane, preko niti prolazi čisti plin nositelj. Kada s obje strane prolazi čisti plin nositelj, odnosno u trenutku odsutnosti analita, otpor s obje strane je jednak te nema signala. Međutim, u trenutku prisutnosti analita dolazi do promjene otpora niti te temperature detektora, zbog razlike u brzini provođenja topline. Tada dolazi do odziva signala koji je proporcionalan razlici toplinske vodljivosti te koncentraciji analita. Prednost TCD detektora leži u širokom spektru uzoraka koji se mogu analizirati, kao i činjenici da uzorci nakon analize ostanu očuvani (nedestruktivna tehnika) pa se analit može proslijediti u drugi detektor, što omogućava prikupljanje više informacija o uzorku (10).

Plamenoionizacijski detektor

Plamenoionizacijski detektor jedan je od najčešće korištenih detektora, a temelji se na detekciji C-H veze. FID detektor zahtjeva prisutnost zraka i vodika u omjeru 10:1 (optimalno). Princip rada ovog detektora je sagorijevanje analita u struji navedenih plinova pri čemu nastaju ionski međuspojivi i elektroni koji daju električni signal te se on detektira pomoću sabirne elektrode. Jedak kraj plamenika predstavlja polarizacijsku elektrodu, dok sabirna elektroda okružuje plamen, a između njih struje elektroni (10). Prednosti FID detektora su velika osjetljivost ($\sim 10^{-13}$ g/mL), široko područje linearnog odziva (6 - 7 redova veličine) te jednostavno rukovanje (5), dok njegov nedostatak predstavlja uništavanje uzorka - destruktivna tehnika (10).



Slika 1.11. Shematski prikaz poprečnog presjeka FID detektora (10)

Detektor apsorpcije elektrona

Detektor apsorpcije elektrona najbolji je za elektrofilne analite, za koje ima vrlo nisku granicu dokazivanja. U ECD detektoru nalazi se radioaktivna folija, najčešće od ^{63}Ni , koji predstavlja izvor β -čestica, odnosno radioaktivni spoj koji emitira elektrone, a služi za ionizaciju eluata. Kada kroz detektor prolazi čisti plin nositelj, između elektroda se javlja stalna struja zbog ionizacije. Međutim, kod prisutnosti elektrofilnog analita nastala struja se smanjuje, jer analiti „hvataju“ elektrone te se nastali anioni kreću sporije od elektrona. Nedostatak ECD detektora je usko područje linearnog odziva ($10^3 - 10^4$) i ograničena vrsta uzoraka koja je pogodna za detekciju (10).

2. Cilj istraživanja

- Razvoj i optimizacija metode određivanja limonena u komercijalnim eteričnim uljima mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna plinskom kromatografijom.
- Skratiti vrijeme analize, bez izostanka kvalitete rezultata, radi uštede vremena i resursa.
- Optimizacija odabranog parametra metode – brzine porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona.
- Usporediti pentan i metanol kao otapala za korištene uzorke.
- Nakon optimizacije metode, potvrditi identitet analita standardom limonena.
- Određivanje linearnog dinamičkog područja, jednadžbe regresijskog pravca, koeficijenta linearne regresije te računanje granice dokazivanja i granice određivanja.

3. Materijali i metode

U istraživanju je korištena tehnika plinske kromatografije za analizu eteričnih ulja, kao najprikladnija i općeprihvaćena tehnika za odjeljivanje sastojaka eteričnih ulja (12).

3.1. Priprema uzoraka

Tijekom istraživanja promijenjeno je otapalo za pripremu uzoraka. Početno je korišten pentan, a kasnije, zbog lakšeg rukovanja i preciznije pripreme standardnih otopina, metanol. Za analizu su korištena Pranarom eterična ulja, navedena u tablici 3.1., otopljena u pentanu te metanolu.

Tablica 3.1. Prikaz podataka Pranarom eteričnih ulja korištenih za pripremu uzoraka

Eterično ulje	Latinski naziv biljke	Način dobivanja	Deklarirani kemotip
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	tiještenje usplođa ploda	limonen γ -terpinen
Grejp	<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	tiještenje usplođa ploda	limonen
Naranča (slatka)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	tiještenje usplođa ploda	limonen
Limun	<i>Citrus limon</i> L.	tiještenje usplođa ploda	limonen



Slika 3.1. Slika korištenih Pranarom eteričnih ulja te pripremljenih standardnih otopina limonena

3.2. Priprema standardnih otopina limonena

Kao standard je korišten *R*-(+)-limonen ($\geq 99,0\%$, 62118, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) od kojeg je pripravljena početna otopina masene koncentracije 10 mg/mL dodavanjem 42,5 mg navedenog standarda i 4,25 mL metanola, iz koje su daljnjim razrjeđivanjem dobivene standardne otopine različitih koncentracija (tablica 3.2.a i 3.2.b) za izradu krivulje umjeravanja.

Tablica 3.2.a. Prikaz pripreme standardnih otopina limonena masenih koncentracija od 10 mg/mL do 1 mg/mL.

Masena koncentracija (mg/mL)	Volumen γ_1 (mL)	Volumen metanola (mL)	Ukupni volumen (mL)
10	1,000 γ_1	0,000	1
7,5	0,750 γ_1	0,250	1
5	0,500 γ_1	0,500	1
3	0,300 γ_1	0,700	1
1	0,100 γ_1	0,900	1

$$\gamma_1 (\text{limonen}) = 10 \text{ mg/mL}$$

Tablica 3.2.b. Prikaz pripreme standardnih otopina limonena masenih koncentracija od 1 mg/mL do 1×10^{-3} mg/mL.

Masena koncentracija (mg/mL)	Volumen $\gamma_{2,3,4}$ (mL)	Volumen metanola (mL)	Ukupni volumen (mL)
1	1,000 γ_2	0,000	1
5×10^{-1}	0,500 γ_2	0,500	1
5×10^{-2}	0,100 γ_3	0,900	1
5×10^{-3}	0,100 γ_4	0,900	1

$$\gamma_2 (\text{limonen}) = 1 \text{ mg/mL}; \gamma_3 (\text{limonen}) = 5 \times 10^{-1} \text{ mg/mL}; \gamma_4 (\text{limonen}) = 5 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$$

3.3. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- plinski kromatograf: Agilent Technologies 7890A
- detektor: FID detektor
- injektor: *split/splitless* injektor
- uzorkivač: automatski uzorkivač Agilent Technologies 7683B
- kolona: Agilent HP-5 19091J-413
- generator vodika: Precision Hydrogen 200 cc, Peak Scientific
- računalo



Slika 3.2. Sustav instrumenata korištenog tijekom istraživanja. Desno na slici se nalazi plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem, lijevo se nalaze generator vodika i računalo, redom.

3.4. Radni uvjeti GC-a

Tijekom istraživanja mijenjana je brzina porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona, kako bi se skratilo vrijeme analize, bez izostanka kvalitete rezultata. Brzina porasta temperature peći važan je parametar koji određuje trajanje analize pa je odabran kao glavni promjenjivi parametar ovog istraživanja, dok su se ostali radni uvjeti održavali konstantnim.

3.4.1. Plinovi

Kao pokretna faza korišten je helij (čistoće 5,0 – 99,999 %, Messer, Omiš). Za sagorijevanje analita u FID detektoru korišteni su zrak (sintetski zrak, Messer, Omiš) i vodik (generator vodika), dok je dušik (čistoće 5,0 – 99,999 %, Messer, Omiš) korišten kao takozvani „*makeup*“ plin, koji služi za ujednačavanje i stabilizaciju bazne linije. U sljedećoj tablici prikazane su brzine protoka plinova:

Tablica 3.3. Prikaz brzina protoka korištenih plinova u analizi.

Plin	Brzina protoka (mL/min)
helij	1,0
zrak	400,0
vodik	30,0
dušik	25,0

3.4.2. Injektor

U istraživanju je korišten automatski uzorkivač s volumenom šprice od 10 μL , a uzorci su se injektirali u volumenu od 1 μL . Prije injektiranja uzorka, šprica se automatski, prema zadanom programu (tablica 3.4.), ispiru u čistom otapalu i uzorku koje ispušta u bočicu namijenjenu za otpad. Zatim se šprica kondicionira u uzorku (šprica uzima maksimalnu količinu uzorka), kako bi se potisnuli mjehurići zraka i radi zasićenja stjenki šprice uzorkom. Nakon injektiranja uzorka, šprica se ispiru u čistom otapalu koje ispušta u bočicu za otpad, kako bi se očistila od zaostalog uzorka.

Tablica 3.4. Tablični prikaz programiranog ispiranja šprice korištenog u metodi.

	Prije injektiranja	Poslije injektiranja	Volumen (μL)
Ispiranje otapalom	3	5	8
Ispiranje uzorkom	3	/	5
Kondicioniranje	3	/	/

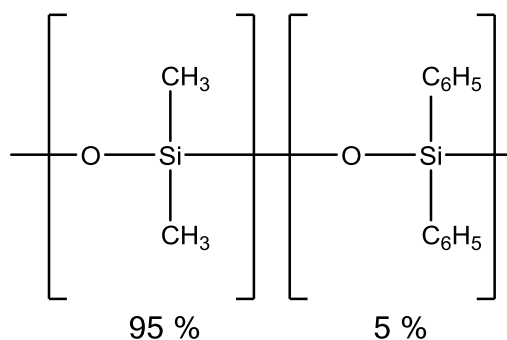
Uzorci su injektirani u *split* načinu rada u omjeru 100:1, a ukupni protok kroz grijani ulaz iznosi 104 mL/min. Za čišćenje gumene pregrade (*septum*) korišten je protok od 3 mL/min. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C.

3.4.3. Kolona

Za istraživanje je korištena Agilent HP-5 19091J-413 kapilarna kolona (slika 3.3.) duljine 30 metara, unutarnjeg promjera 0,32 mm te debljine nepokretne faze 0,25 μm. Nepokretna faza je nepolarna, a sastavljena je od mješavine fenilpolisiloksana i metilpolisiloksana u omjeru 5 : 95 (slika 3.4.). Temperaturni raspon rada ove kolne je od -60 °C do 325 °C (13).



Slika 3.3. Slika korištene kapilarne kolone Agilent HP-5 19091J-413



Slika 3.4. Prikaz kemijske strukture nepokretne faze HP-5 kolone

3.4.4. Detektor

U istraživanju je korišten FID detektor koji je zagrijan na temperaturu od 300 °C. Signal je očitavan frekvencijom od 50 Hz.

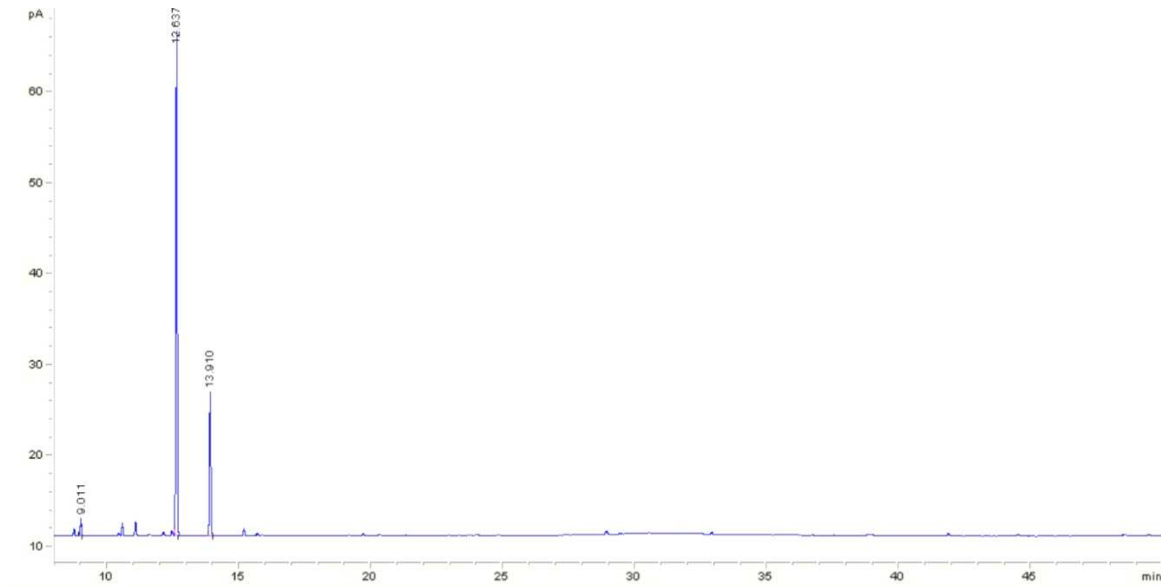
3.5. Ostali instrumenti

- automatska pipeta 100 - 1000 μL (Capp, Nordhausen, Njemačka)
- automatska elektronska pipeta: 10 - 100 μL (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- nastavci za automatske pipete (engl. *tips*): 0,5 - 200 i 100 - 1000 μL
- bočice (engl. *vial*) za uzorke (0 - 2 i 0 - 10 mL)

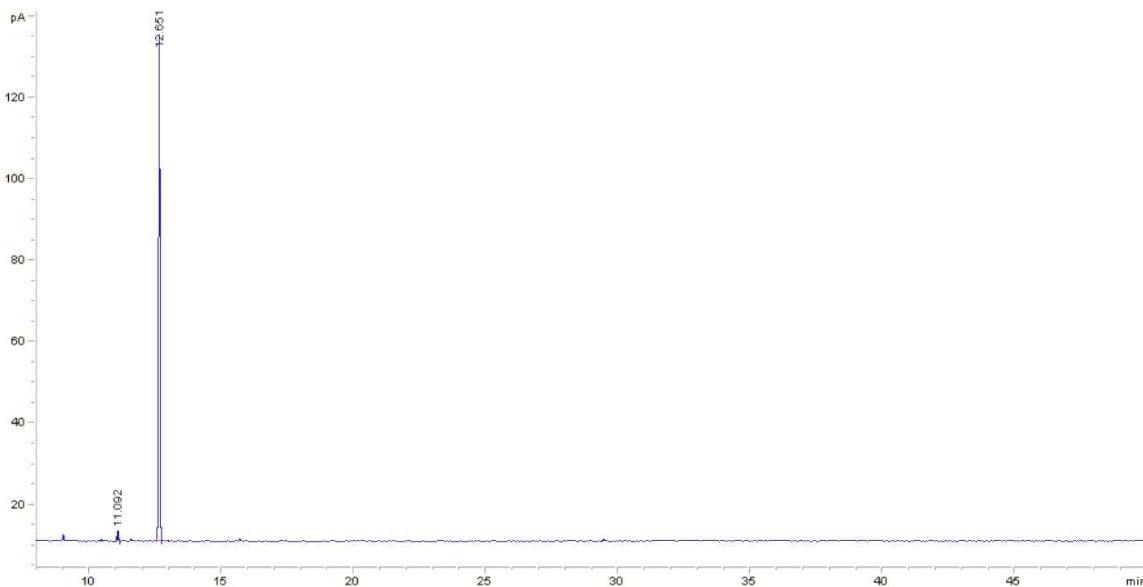
4. Rezultati

4.1. Metoda 1

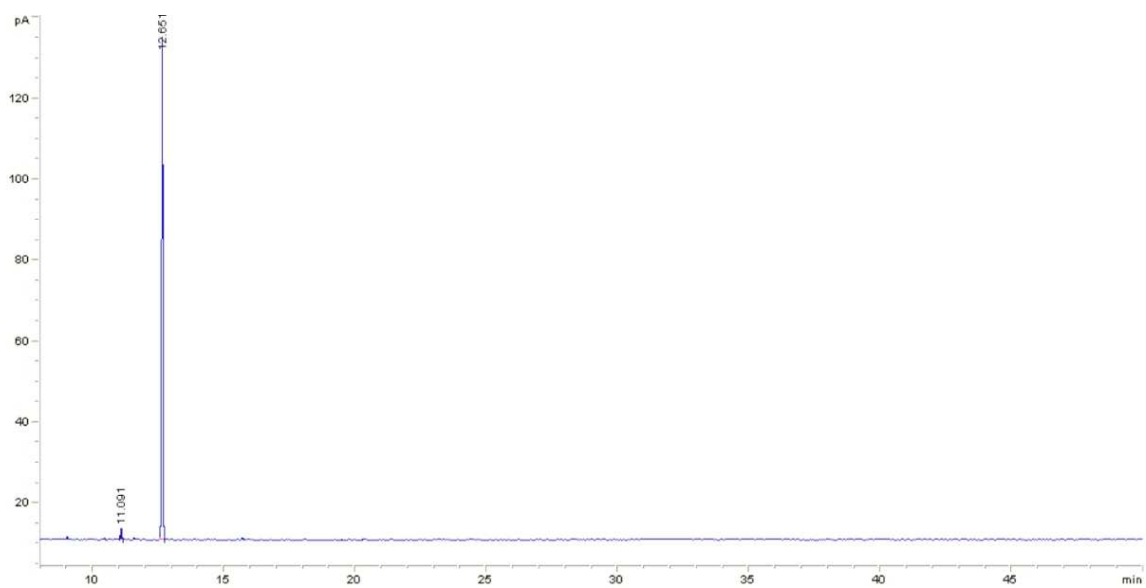
Kod metode 1 analiza započinje temperaturom peći od 60 °C koja se održava 3 min, a nakon toga raste do 246 °C brzinom 3 °C/min. Zatim se 25 min održava temperatura od 246 °C. Analiza uzoraka metodom 1 traje 90 minuta, a analizirani su uzorci eteričnih ulja mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna otopljeni u pentanu.



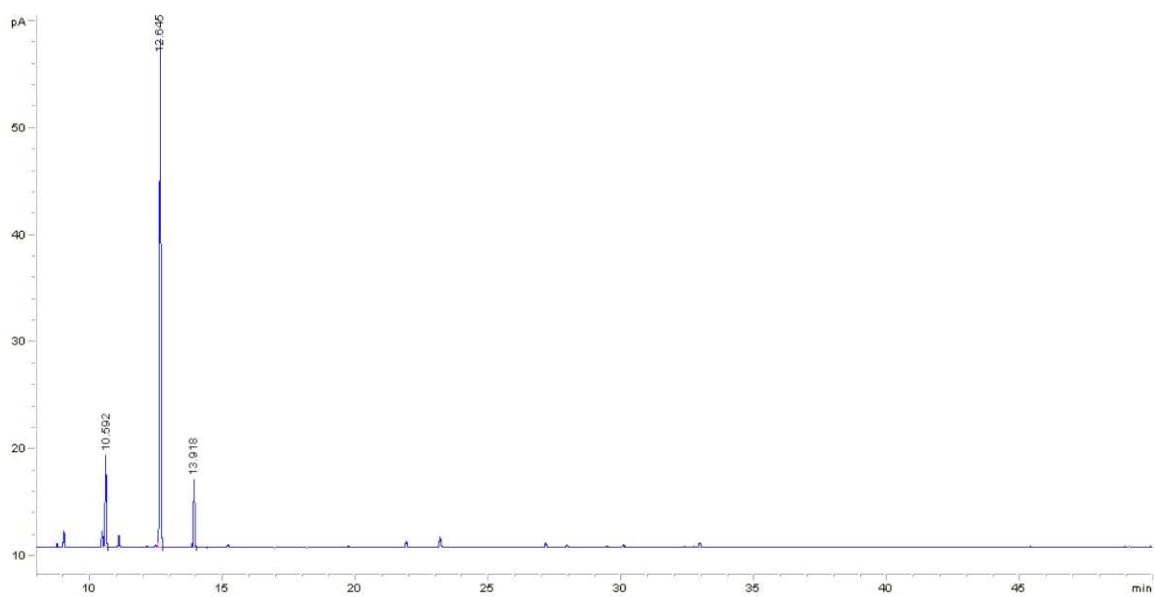
Slika 4.1. Kromatogram eteričnog ulja mandarine (pentan, metoda 1)



Slika 4.2. Kromatogram eteričnog ulja grejpa (pentan, metoda 1)



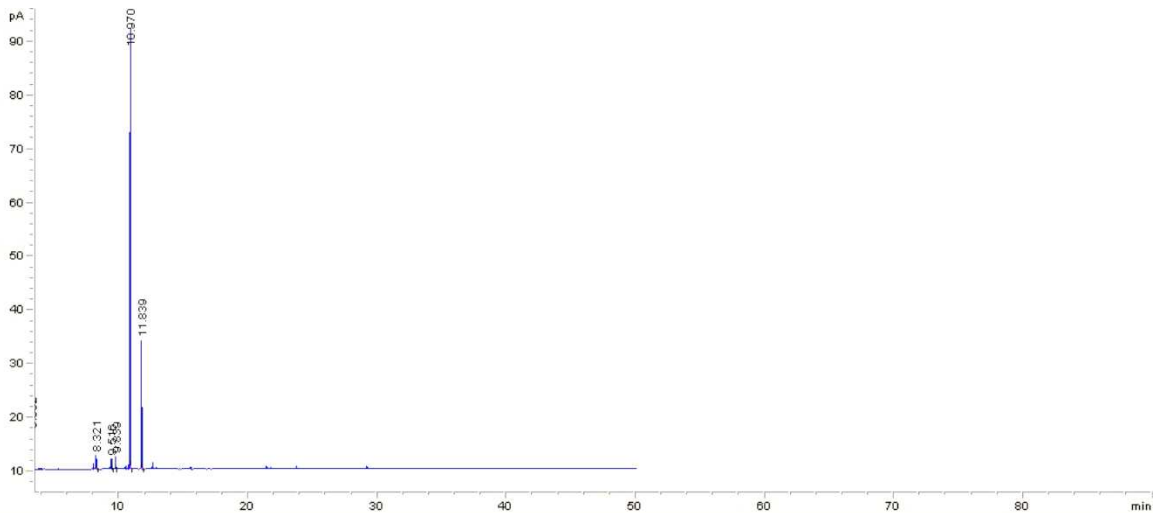
Slika 4.3. Kromatogram eteričnog ulja slatke naranče (pentan, metoda 1)



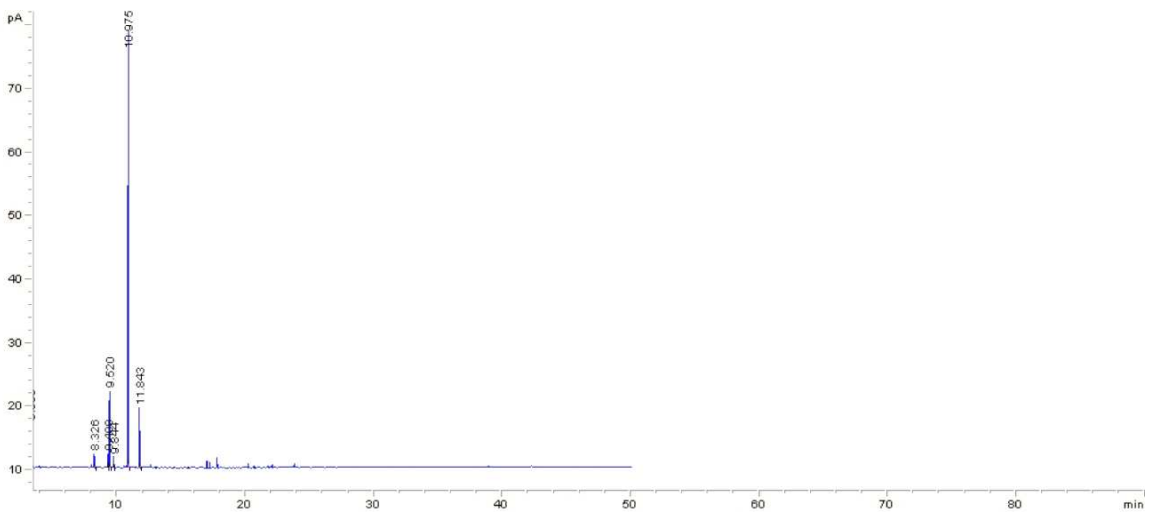
Slika 4.4. Kromatogram eteričnog ulja limuna (pentan, metoda 1)

4.2. Metoda 2

Kod metode 2 analiza započinje temperaturom peći od 60 °C koja se održava 3 min, a nakon toga raste do 246 °C brzinom 5 °C/min. Zatim se 10 min održava temperatura od 246 °C. Analiza uzoraka metodom 2 traje 50 minuta i 12 sekundi, a analizirani su uzorci eteričnih ulja mandarine i limuna otopljeni u pentanu.



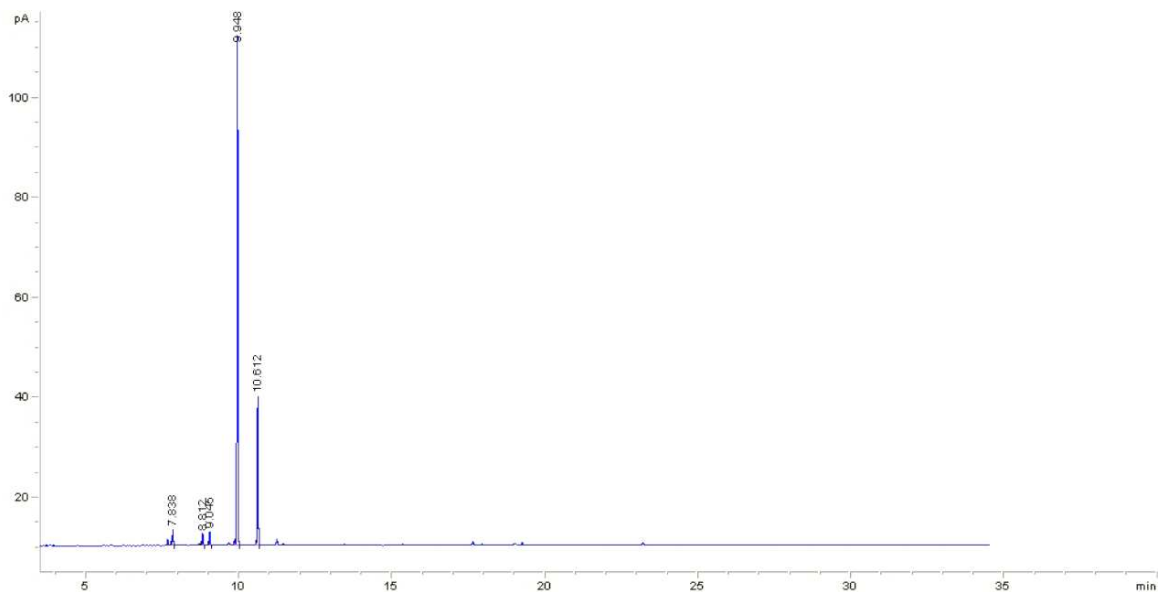
Slika 4.5. Kromatogram eteričnog ulja mandarine (pentan, metoda 2)



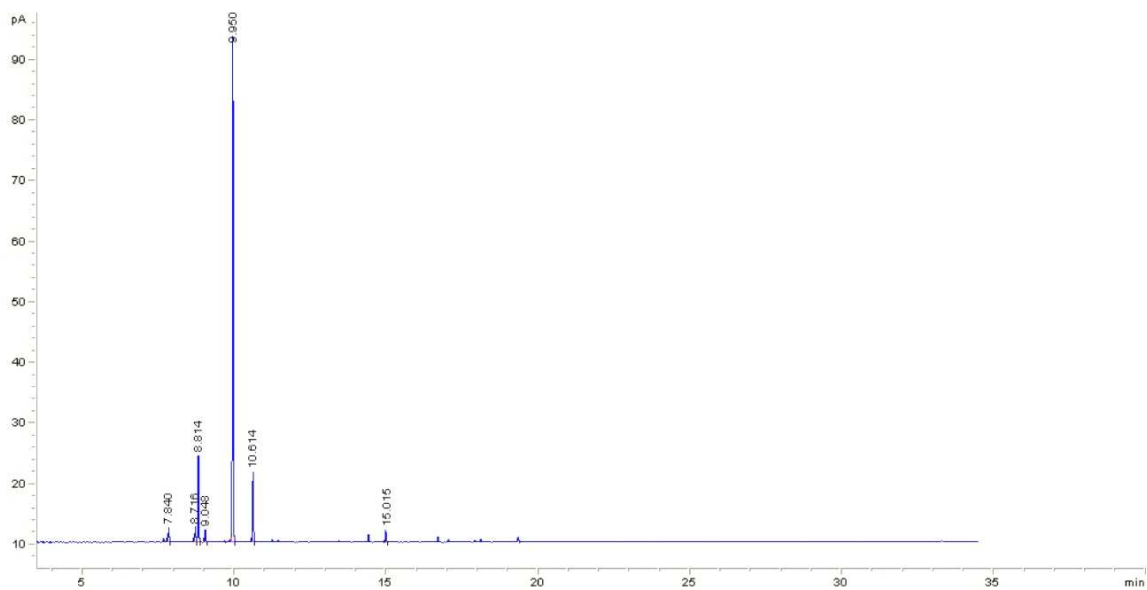
Slika 4.6. Kromatogram eteričnog ulja limuna (pentan, metoda 2)

4.3. Metoda 3

Kod metode 3 analiza započinje temperaturom peći od 60 °C koja se održava 3 min, a nakon toga raste do 246 °C brzinom 7 °C/min. Zatim se 5 min održava temperatura od 246 °C. Analiza uzoraka metodom 3 traje 34 minute i 34 sekunde, a analizirani su uzorci eteričnih ulja mandarine i limuna otopljeni u pentanu.



Slika 4.7. Kromatogram eteričnog ulja mandarine (pentan, metoda 3)



Slika 4.8. Kromatogram eteričnog ulja limuna (pentan, metoda 3)

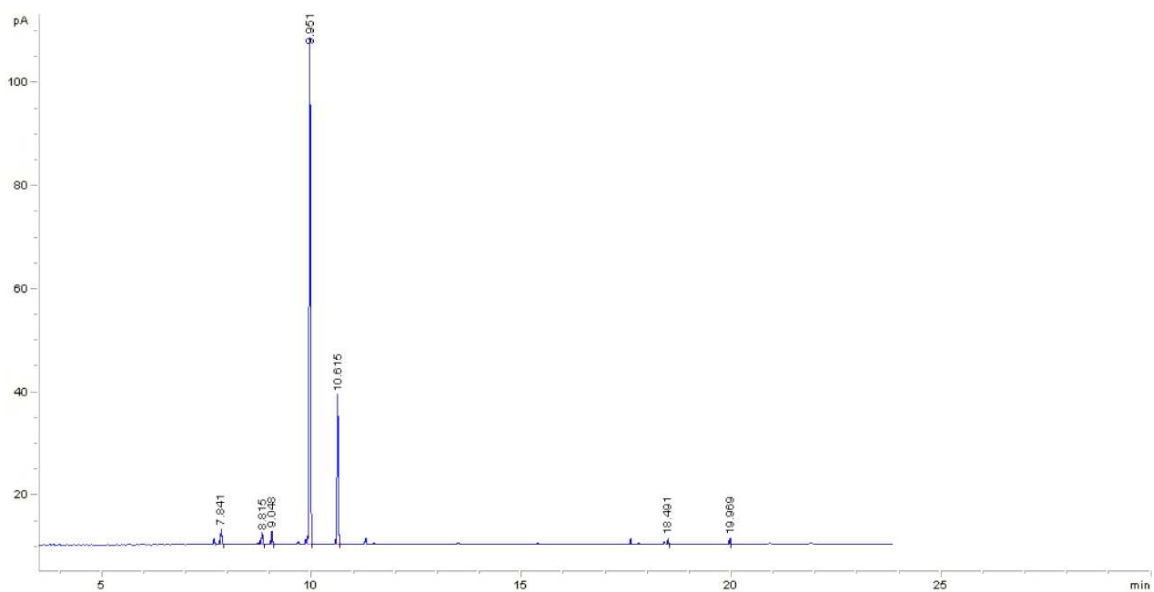
4.4. Metoda 4

Kod metode 4 analiza započinje temperaturom peći od 60 °C koja se održava 3 min, a nakon toga raste do 150 °C brzinom 7 °C/min. Zatim se temperatura zadržava na 150 °C 1 min pa podiže od 150 °C do 250 °C brzinom od 50 °C/min. Nakon toga, temperatura se održava 5 min na 250 °C. Analiza uzoraka metodom 4 traje 23 minute i 51 sekundu, a analizirani su uzorci eteričnih ulja mandarine, grejpa, naranče i limuna otopljeni u pentanu, a zatim su analizirana navedena eterična ulja otopljena u metanolu.

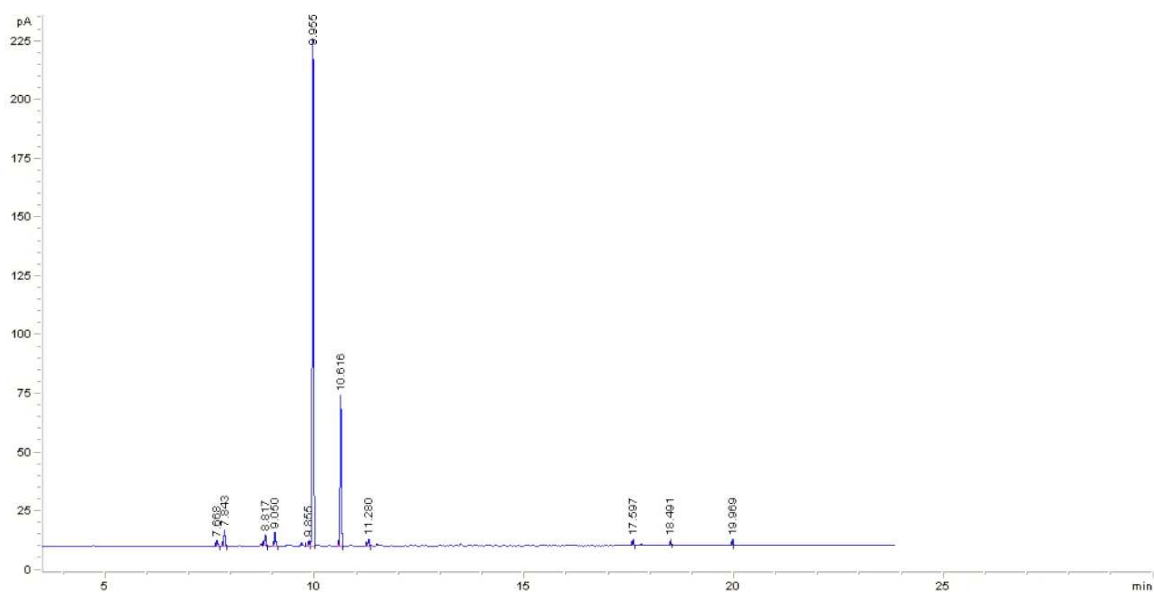
Tablica 4.1. Prikaz temperaturnog programa peći korištenog u metodi 4.

Početna vrijednost temperature (°C)	Završna vrijednost temperature (°C)	Brzina porasta temperature (°C/min)	Vrijeme trajanja
60	60	/	3 min
60	150	7	12 min i 51 s
150	150	/	1 min
150	250	50	2 min
250	250	/	5 min
			Ukupno: 23 min i 51 s

Uzorci mandarine otopljeni u pentanu i metanolu

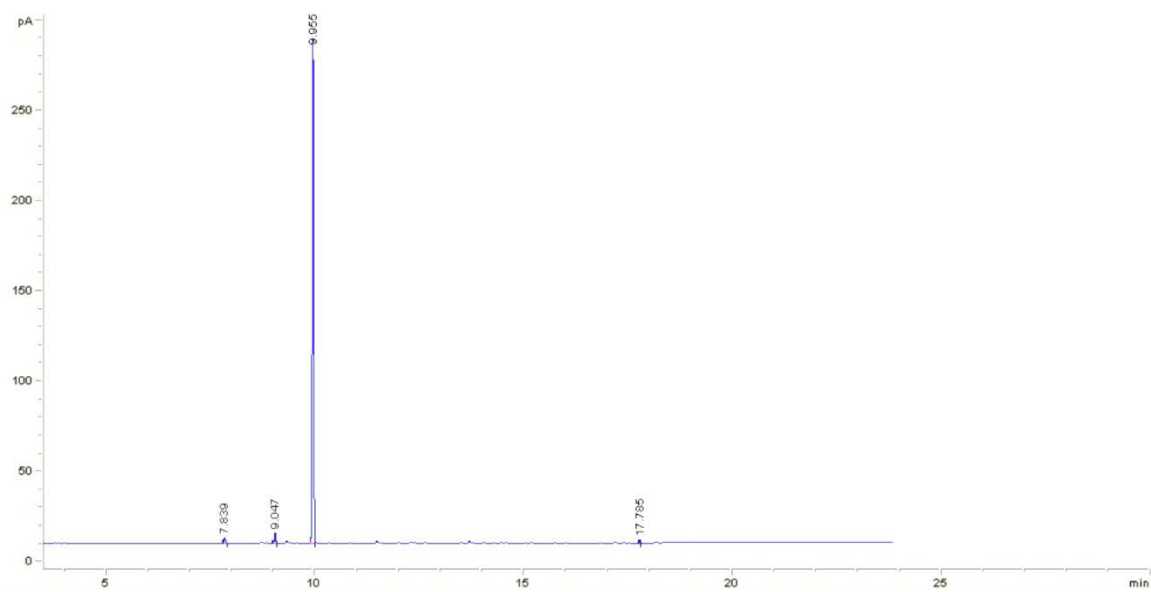


Slika 4.9. Kromatogram eteričnog ulja mandarine (pentan, metoda 4)

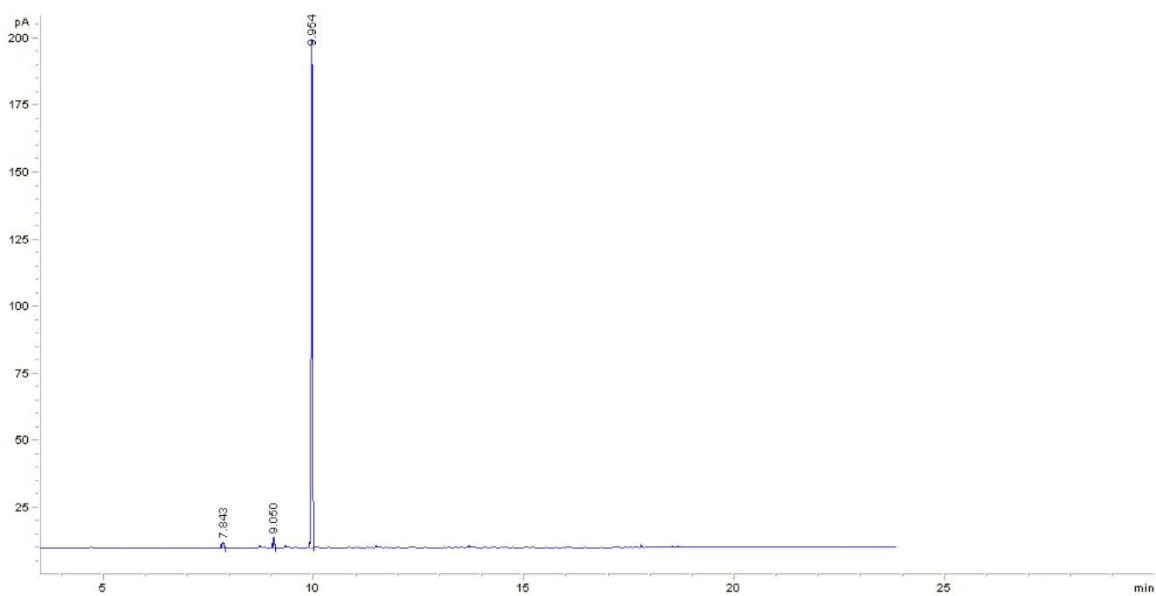


Slika 4.10. Kromatogram eteričnog ulja mandarine (metanol, metoda 4)

Uzorci grejpa otopljeni u pentanu i metanolu

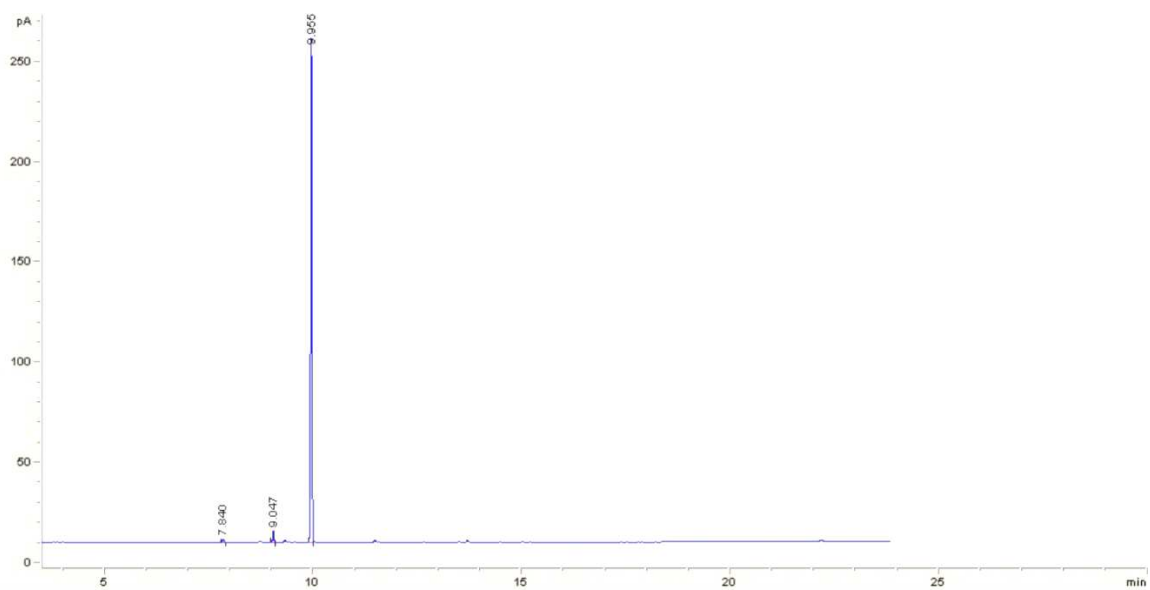


Slika 4.11. Kromatogram eteričnog ulja grejpa (pentan, metoda 4)

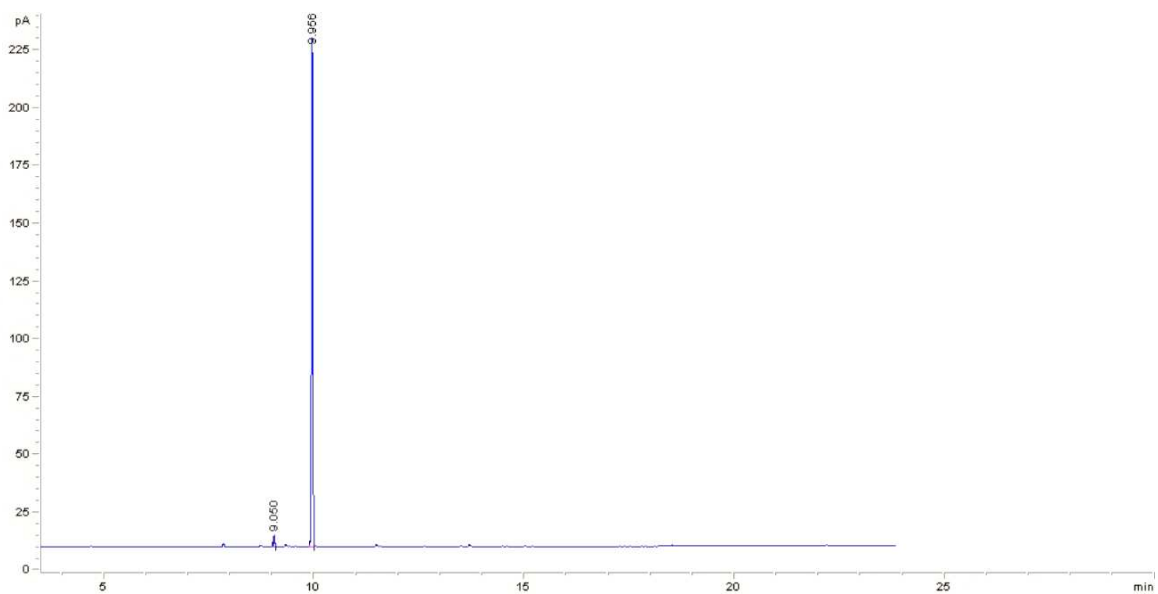


Slika 4.12. Kromatogram eteričnog ulja grejpa (metanol, metoda 4)

Uzorci slatke naranče otopljeni u pentanu i metanolu

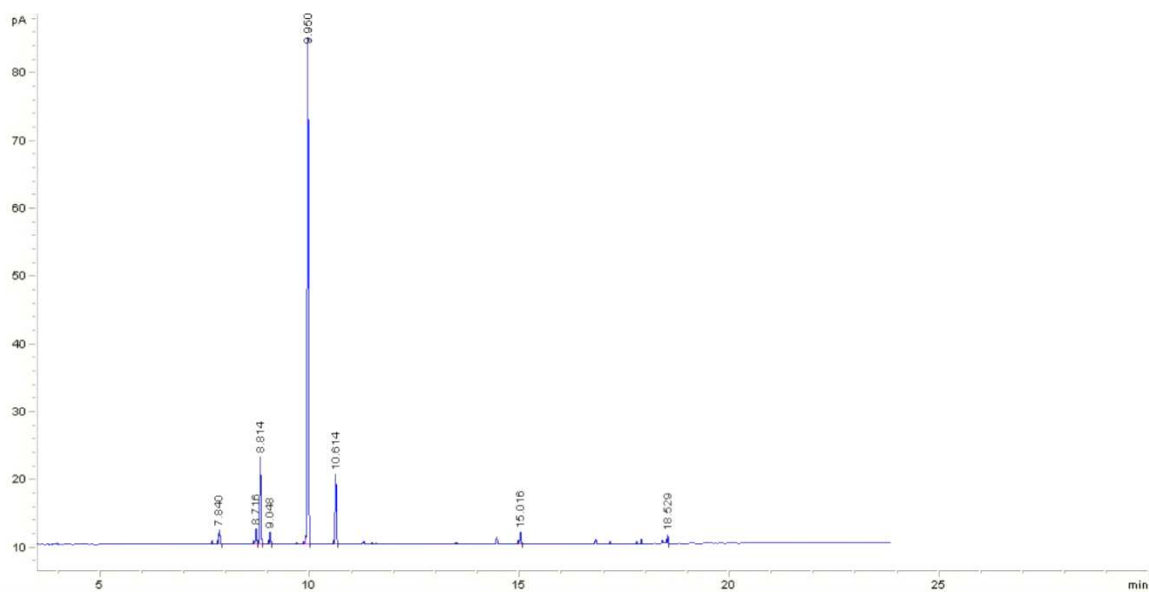


Slika 4.13. Kromatogram eteričnog ulja slatke naranče (pentan, metoda 4)

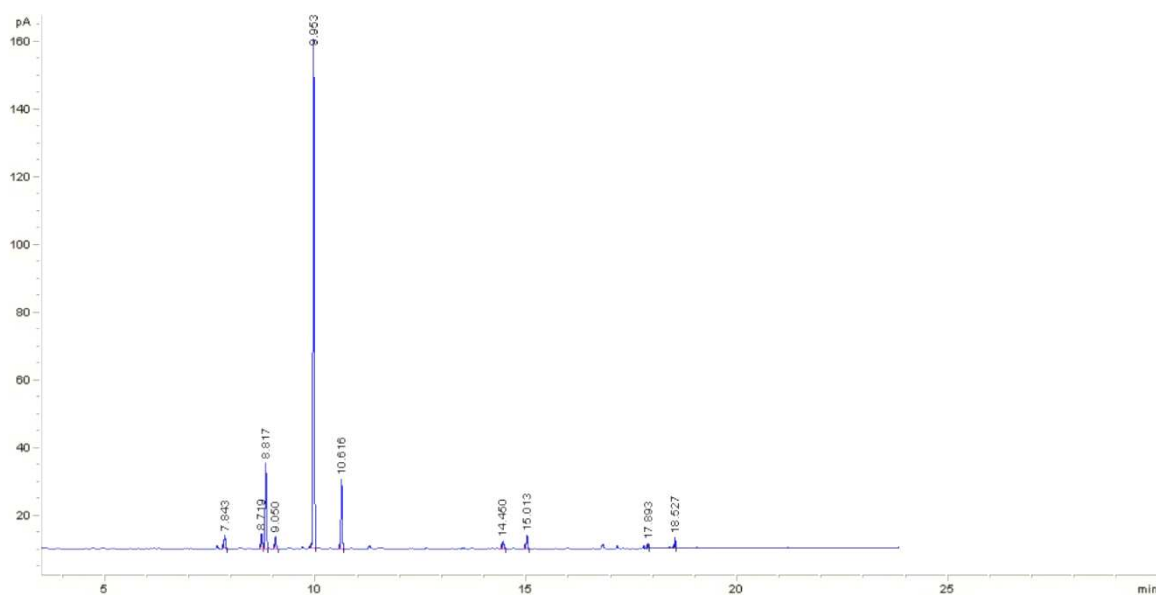


Slika 4.14. Kromatogram eteričnog ulja slatke naranče (metanol, metoda 4)

Uzorci limuna otopljeni u pentanu i metanolu



Slika 4.15. Kromatogram eteričnog ulja limuna (pentan, metoda 4)



Slika 4.16. Kromatogram eteričnog ulja limuna (metanol, metoda 4)

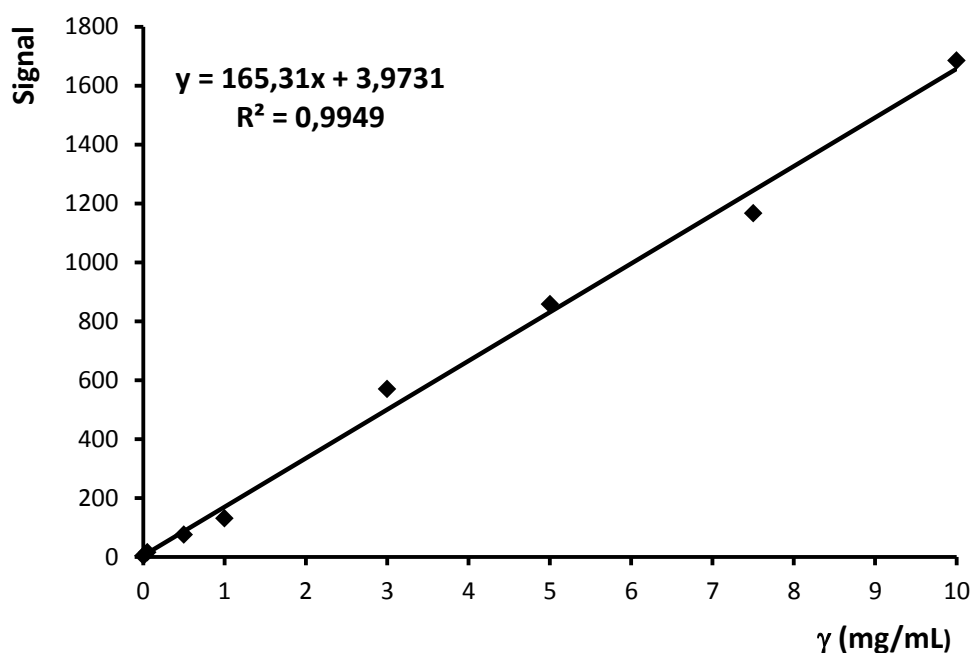
4.5. Vrednovanje metode 4

S ciljem vrednovanja metode, određeno je linearno dinamičko područje, granica dokazivanja te granica određivanja.

4.5.1. Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje (LDP) predstavlja područje različitih koncentracija određenog analita u kojem signal linearno raste porastom koncentracije analita. Omeđeno je granicom određivanja i gornjom granicom LDP-a (14). Grafički se prikazuje kao pravac ovisnosti površine ispod odgovarajućeg pika o masenoj koncentraciji limonena.

Iz dobivenih rezultata, uočeno je područje linearnog odziva signala koje obuhvaća masene koncentracije limonena od 5×10^{-3} mg/mL do 10 mg/mL. Krivulja umjeravanja za određivanje limonena prikazana je na slici 4.17.



Slika 4.17. Krivulja umjeravanja za određivanje limonena. Na slici su prikazane izmjerene površine ispod kromatografskih pikova za masene koncentracije limonena 10 mg/mL, 7,5 mg/mL, 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1 mg/mL, 5×10^{-1} mg/mL, 5×10^{-2} mg/mL, 5×10^{-3} mg/mL.

U dobivenoj jednadžbi pravca $y = 165,31x + 3,9731$, y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masenu koncentraciju limonena. Pripadajući koeficijent linearne regresije (R^2) iznosi 0,9949.

4.5.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) ključni su parametri određene metode kod ispitivanja uzoraka pri niskim koncentracijama analita (15). LOD je najniža koncentracija analita čije se prisustvo može dokazati primijenjenom metodom, dok LOQ predstavlja najnižu koncentraciju analita koja se može odrediti (14).

Prema odabranom načinu računanja iz krivulje umjeravanja te standardne devijacije bazne linije, LOD se tada računa prema sljedećoj formuli:

$$LOD = \frac{3 \times S_a}{b}$$

gdje je S_a standardna devijacija bazne linije, a b nagib krivulje umjeravanja (16). Standardna devijacija bazne linije iznosi 0,025632, a nagib krivulje umjeravanja 165,31 te uvrštavanjem podataka u prethodnu formulu granica dokazivanja iznosi $4,7 \times 10^{-4}$ mg/mL.

LOQ se računa prema formuli (16):

$$LOQ = \frac{10 \times S_a}{b}$$

pa uvrštavanjem podataka u navedenu formulu granica određivanja iznosi $1,6 \times 10^{-3}$ mg/mL, koja ujedno predstavlja i donju granicu LDP-a.

5. Rasprava

Cilj diplomskog rada je razvoj metode određivanja limonena u komercijalnim eteričnim uljima mandarine, grejpa, naranče i limuna plinskom kromatografijom, koja će skratiti vrijeme analize, bez izostanka kvalitete rezultata. Također, uz uštedu vremena, metoda treba doprinositi uštedi plinova.

Metode se često programiraju s malom brzinom porasta temperature peći, što značajno utječe na vrijeme analize, a često to nije potrebno jer se većom brzinom porasta temperature također mogu dobiti kvalitetni rezultati, odnosno dobro odjeljivanje i brža analiza (10). U literaturi se često spominje pojam brze plinske kromatografije (17), koja se osim programiranjem bržeg porasta temperature peći, može postići i odabirom kapilarne kolone (umjesto punjene), pogotovo ako je manje duljine te sadrži tanji film nepokretne faze (18). Osim toga, može se povećati i protok pokretne faze (19). Međutim, povećan protok pokretne faze znatno bi povećao troškove analize, stoga je kao promjenjivi parametar odabrana brzina porasta temperature peći, dok su ostali parametri metode ostali nepromijenjeni. Uz to, za analizu je korištena prikladna kapilarna kolona, koja također doprinosi bržoj analizi.

Kod svih metoda početna temperatura peći u kojoj se nalazi kolona iznosi 60 °C te se navedena temperatura zadržava 3 min kako bi došlo do fokusiranja otapala, odnosno kako bi otapalo eluiralo s kolone bez ometanja odjeljivanja ostalih komponenti uzorka. Uzorci eteričnih ulja u svim metodama (1-4) su pripremljeni otapanjem u pentanu, dok se pomoću metode 4, analiziraju dodatno i uzorci otopljeni u metanolu.

Cilj metode 1 je utvrditi kako izgleda kromatogram eteričnih ulja mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna, odnosno uvidjeti koliko je vrijeme zadržavanja komponenti od interesa te koliko zapravo treba vremena da sve komponente uzorka eluiraju s kolone. Stoga je metoda 1 programirana na najmanju brzinu porasta temperature od 3 °C/min kojom temperatura u peći raste do 246 °C. Nakon toga se temperatura zadržava 25 min na 246 °C kako bi se eluirale eventualne nečistoće iz uzorka ili drugih izvora, kao što je gumena pregrada. Analiza metodom 1 traje 90 min, a iz slika 4.1., 4.2., 4.3. i 4.4. vidi se kako je značajno manje vremena potrebno za eluiranje analita, otprilike 10 - 20 min. Također, na navedenim slikama se može primijetiti kako oko 12,6 min (slika 4.1. – 12,637 min, slika 4.2. – 12,651 min, slika 4.3. – 12,651 min, slika 4.4. – 12,645 min) eluira analit koji evidentno ima najviši udio u sastavu korištenih eteričnih ulja. Sukladno deklaraciji korištenih eteričnih ulja, može se zaključiti, odnosno pretpostaviti da je riječ o limonenu sa srednjom vrijednosti vremena zadržavanja od 12,646 min. Također, ovom metodom postignuto je zadovoljavajuće odjeljivanje komponenti.

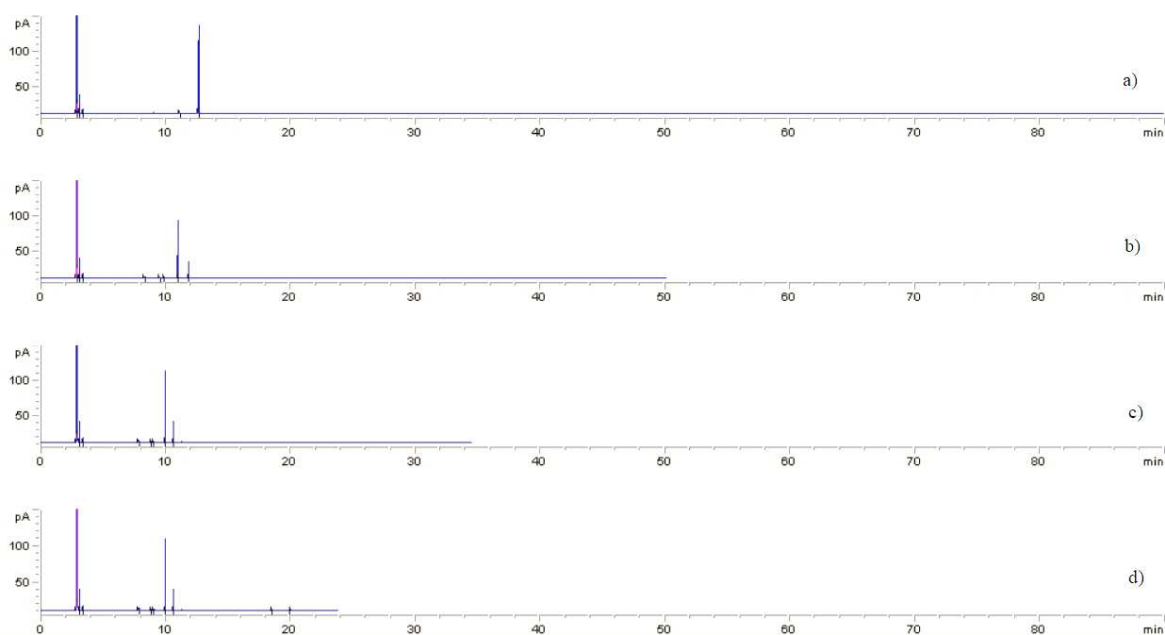
Kod metode 2, u usporedbi s metodom 1, povećana je brzina porasta temperature peći na 5 °C/min kako bi se utvrdilo ima li odstupanja u rezultatima kod promjene brzine porasta temperature. Također, vrijeme zadržavanja na konačnoj temperaturi od 246 °C skraćeno je s 25 min na 10 min, jer kod prve analize nisu uočeni naknadni pikovi nastali od nečistoća (takozvani *ghost peaks*) (10). Zbog pojednostavljenja, za analizu metodom 2 nasumice su odabrana 2 uzorka eteričnih ulja - mandarine i limuna. Na slikama 4.5. i 4.6. vidi se kako je ponovno potrebno otprilike 15-20 min za eluiranje analita. Srednje vrijeme zadržavanja limonena ovom metodom je, očekivano, nešto manje - 10,973 min (slika 4.5. – 10,970 min, slika 4.6. – 10,975 min). Također, ovom metodom postignuto je zadovoljavajuće odjeljivanje komponenti. Analiza metodom 2 traje 50 minuta i 12 sekundi pa se iz priloženog može zaključiti da je vrijeme analize značajno skraćeno uz očuvanje kvalitete rezultata.

Metodu 3, od metode 2, razlikuje veća brzina porasta temperature peći od 7 °C/min, dok je vrijeme zadržavanja na konačnoj temperaturi jednako. Također, analizirana su eterična ulja mandarine te limuna. Otprilike 15 min je potrebno za eluiranje analita, što se može vidjeti na slikama 4.7. i 4.8. Srednje vrijeme zadržavanja limonena metodom 3 iznosi 9,949 min (slika 4.7. – 9,948 min, slika 4.8. – 9,950 min), a odjeljivanje komponenti uzoraka je zadovoljavajuće. Analiza u ovom slučaju traje 34 minute i 34 sekunde te se ponovno može zaključiti da se povećanjem brzine porasta temperature vrijeme analize smanjilo, a kvaliteta rezultata očuvala.

Metodu 4 karakteriziraju dvije različite brzine porasta temperature peći. Pošto se brzina porasta temperature (7 °C/min) u metodi 3, proučavanjem dobivenih rezultata, čini optimalnom za odjeljivanje komponenti ulja, zadržana je i u metodi 4 tijekom vremena eluiranja analita. Iz prethodne metode, može se zaključiti da sve komponente ulja eluiraju s kolone nakon cca. 15 min. U tom vremenu temperatura peći u metodi 3 iznosi 144 °C. Stoga se u metodi 4, početna temperatura od 60 °C, također zadržava 3 min, a nakon toga temperatura prvotno raste brzinom od 7 °C/min do 150 °C te se na toj temperaturi zadržava 1 min (analiza u ovom trenutku traje ukupno 16 min i 51 s). Zatim se temperatura povećava brzinom od 50 °C/min do krajnje temperature od 250 °C, kako bi se dodatno skratilo vrijeme analize. Također, na kraju se temperatura od 250 °C zadržava 5 minuta. Cjelokupna temperaturna rampa korištena u metodi 4, kao i vrijeme trajanja pojedinog temperaturnog segmenta, prikazani su u tablici 4.1. Ukupno vrijeme analize metodom 4 iznosi 23 minute i 51 sekundu.

Metodom 4 analizirani su uzorci eteričnih ulja mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna. Najprije su analizirani uzorci otopljeni u pentanu, a potom u metanolu, kako bi se utvrdilo ima li razlike u rezultatima korištenjem metanola kao otapala. Razlog korištenja metanola je lakše rukovanje te preciznija priprava standardnih otopina s ciljem dobivanja točnijih rezultata mjerenja. Analizom uzoraka otopljenih u pentanu, srednja vrijednost vremena zadržavanja limonena metodom 4 iznosi 9,953 min (slika 4.9. – 9,951 min, slika 4.11. – 9,955 min, slika 4.13. – 9,955 min, slika 4.15. – 9,950 min). Kod uzoraka otopljenih u metanolu srednja vrijednost vremena zadržavanja limonena iznosi 9,955 min (slika 4.10. – 9,955 min, slika 4.12. – 9,954 min, slika 4.14. – 9,956 min, slika 4.16. – 9,953 min). Na pripadajućim kromatogramima navedenih uzoraka, jasno se vidi da kod primjene i pentana i metanola kao otapala dolazi do jasnog odjeljivanja pikova.

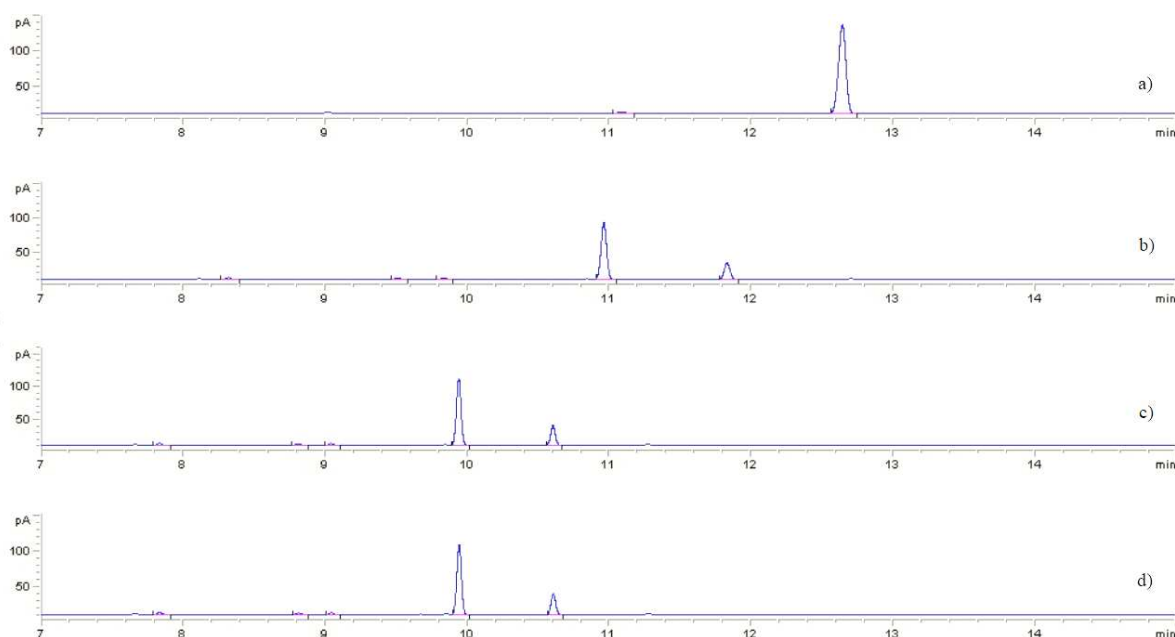
Iz priloženih rezultata, može se zaključiti da je metoda 4 optimalna metoda za određivanje limonena u korištenim eteričnim uljima plinskom kromatografijom. Primjenom navedene metode značajno se smanjuje vrijeme analize, što se može vidjeti na slici 5.1.



Slika 5.1. Prikaz različitog trajanja analize ovisno o korištenoj metodi na primjeru dobivenih kromatograma eteričnog ulja mandarine: a) metoda 1; b) metoda 2; c) metoda 3; d) metoda 4

Analizom standarda limonena utvrđeno je da se vrijeme zadržavanja standarda limonena i najvećeg pika dobivenih kromatograma poklapa, stoga možemo potvrditi da se radi o limonenu kao glavnoj sastavnici svih istraživanih eteričnih ulja.

Također, sukladno očekivanjima, vrijeme zadržavanja limonena se smanjilo povećanjem brzine porasta temperature, što se vidi na slici 5.2., ali nije utjecalo na kvalitetu rezultata.



Slika 5.2. Prikaz usporedbe vremena zadržavanja limonena mjereno različitim metodama na primjeru dobivenih kromatograma eteričnog ulja mandarine: a) metoda 1; b) metoda 2; c) metoda 3; d) metoda 4

Optimalna metoda vrednovana je određivanjem linearnog dinamičkog područja, granice dokazivanja te granice određivanja. Krivulja umjeravanja konstruirana je za koncentracije limonena od 5×10^{-3} mg/mL do 10 mg/mL korištenjem odabrane optimalne metode. Analizom rezultata uočen je linearni porast signala u području koncentracija od 10 mg/mL do 5×10^{-3} mg/mL s pripadajućom jednadžbom pravca $y = 165,31x + 3,9731$ te koeficijentom linearne regresije 0,9949. Pripadajuća granica dokazivanja iznosi $4,7 \times 10^{-4}$ mg/mL, a granica određivanja $1,6 \times 10^{-3}$ mg/mL.

6. Zaključci

1. Plinska kromatografija je primjenjiva metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena u komercijalnim eteričnim ulja mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna.

2. Vrijeme analize može se značajno skratiti primjenom brze plinske kromatografije, konkretno većom brzinom porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona.

3. Odabirom porasta temperature peći kao glavnog parametra za brzu plinsku kromatografiju (metoda 4) dolazi do smanjenja troškova analize u usporedbi s klasičnom metodom (metoda 1).

4. Vrijeme zadržavanja limonena se primjenom veće brzine porasta temperature peći smanjuje, ali je ponovljivo kod korištenja iste metode te ne dolazi do smanjenja kvalitete odjeljivanja.

5. Nema razlike u kvaliteti rezultata primjenom pentana ili metanola kao otapala, stoga je kao otapalo izbora korišten metanol radi lakšeg rukovanja i točnijih rezultata mjerenih koncentracija standarda limonena za izradu krivulje umjeravanja.

7. Popis citirane literature

1. Kuštrak D. Farmakognozija - fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing - tehnička knjiga; 2005. str. 219-253.
2. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440917> [citirano 12.8.2018.]
3. Matura M, Goossens A, Bordalo O, Garcia-Bravo B, Magnussona K, Wrangsj K, i sur. Oxidized citrus oil (R-limonene): a frequent skin sensitizer in Europe. *J Am Acad Dermatol.* 2002 Nov;47(5):709-714.
4. Chromatographic separation techniques. U: European Pharmacopoeia 5.0, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe. Strasbourg, France; 2005. 69 str.
5. Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 628-677.
6. Eiceman GA. Gas Chromatography: Introduction. U: Meyers RA. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation 15 Volume Set.* Wiley, New York; 2001. str. 11295-11297.
7. Cserháti T. *Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances.* Berlin: Springer; 2010. str. 3-4.
8. Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide.* Oxford: Academic Press; 2011. str. 16-36.
9. Larson P. Column Technology in Gas Chromatography. U: Meyers RA. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation 15 Volume Set.* Wiley, New York; 2001. str. 11302-11346.
10. Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide.* Oxford: Academic Press; 2011. str. 49-73.
11. Gas chromatography. U: European Pharmacopoeia 5.0, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe. Strasbourg, France; 2005. 42 str.
12. Marriott PJ, Shellie R, Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A.* 2001 Nov;936(1-2):2-3.
13. URL: https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf [citirano 2.10.2018.]
14. Radić Nj, Kukoč Modun L. Instrumentne metode analize u farmaciji. 2015. str. 13-14. [interna skripta].

15. Wenzl T, Haedrich J, Schaechterle A, Robouch P, Stroke J. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. European Union Reference Laboratory; 2016. 9 str.
16. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2011 Jan;2(1):21-25.
17. Korytár P, Janssen HG, Matisová E, Brinkman UAT. Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002 Sep;21(9-10):558–572.
18. Matisová E, Dömötörová M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. *J. Chromatogr. A*. 2003 Jun;1000(1-2):199–221.
19. Castello G, Moretti P, Vezzani S. Retention models for programmed gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2009 Mar;1216(10):1607-1623.

8. Sažetak

Cilj istraživanja: Razvoj i vrednovanje metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena u komercijalnim eteričnim uljima mandarine, grejpa, slatke naranče i limuna plinskom kromatografijom, s ciljem smanjenja trajanja analize radi uštede vremena i plinova.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni uzorci Pranarom eteričnih ulja, koja su otopljena u pentanu i metanolu, te standardne otopine limonena otopljenog u metanolu s rasponom masenih koncentracija od 10 do 5×10^{-3} mg/mL. Brzina porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona se mijenjala, dok su ostali radni uvjeti održavani konstantnim. Za analizu je korišten *split/splitless* injektor, zagrijan na 250 °C, sa *split* omjerom 100:1, dok je kao pokretna faza korišten helij s brzinom protoka 1,000 mL/min. U istraživanju je korištena kapilarna kolona s tekućom, nepolarnom nepokretnom fazom. Za sagorijevanje analita u plamenoionizacijskom detektoru korišteni su zrak i vodik, dok je dušik korišten kao „*makeup*“ plin.

Rezultati: Na dobivenim kromatogramima vidi se kako unatoč korištenju različite brzine porasta temperature peći, dolazi do dobrog odjeljivanja komponenti uzorka. Svim komponentama je potrebno oko 15 min za eluiranje s kolone, stoga je kao optimalna metoda odabrana metoda s dvije različite brzine porasta temperature peći. Kao što je i očekivano, povećanjem brzine porasta temperature peći, vrijeme zadržavanja limonena se skratilo, ali je ponovljivo korištenjem iste metode. Nema značajne razlike u rezultatima uporabom metanola kao otapala, u usporedbi s pentanom, stoga je kao otapalo izbora odabran metanol radi lakšeg rukovanja.

Zaključci: Primjenom veće brzine porasta temperature peći vrijeme analize se značajno smanjuje - s 90 minuta prvom metodom na 23 minute i 51 sekundu zadnjom metodom. Bez obzira na brzinu, zadržana je kvaliteta rezultata, odnosno dobro odjeljivanje komponenti te ponovljivo vrijeme zadržavanja limonena. Primjenom optimizirane metode smanjuju se i troškovi analize zbog manje potrošnje plinova.

Ključne riječi: limonen, brza plinska kromatografija, vrijeme zadržavanja, brzina porasta temperature peći

9. Summary

Diploma Thesis Title: Qualitative and quantitative determination of limonene in commercial samples of essential oil using gas chromatography

Objectives: Development and validation of the method for qualitative and quantitative determination of limonene in tangerine, grapefruit, sweet orange and lemon commercial essential oils, using gas chromatography, with the aim of reducing the analysis duration in order to save time and gasses.

Material and Methods: Samples of Pranarom essential oils were used in the research, dissolved in pentane and methanol, and standard solution of limonene dissolved in methanol with mass concentrations ranging from 10 to 5×10^{-3} mg/mL. Column oven temperature rate was altered, while other operating conditions were kept constant. A split/splitless injector, heated to 250 °C and with a 100:1 split ratio, was used for the analysis, with helium at constant flow rate of 1,000 mL/min as mobile phase. A capillary column with liquid, non-polar stationary phase was used. Oxygen and hydrogen were used as a fuel in the flame ionization detector, whereas nitrogen was used as makeup gas.

Results: The obtained chromatograms show a good separation of sample components despite the variety of oven program rates applied. All the components take about 15 minutes to elute from the column, which is why the method involving two different oven program rates was selected as optimal. As expected, an increase in the oven temperature rate resulted in reduced retention time of limonene, but was reproducible by using the same method. It was demonstrated that there is no significant difference in results obtained by the use of methanol as solvent as opposed to the use of pentane, which is why methanol, due to the fact it is easier to handle, was selected as the solvent of choice.

Conclusions: An increase in the oven program rates was shown to lead to a significant reduction of the duration of analysis - from 90 minutes in the first method down to 23 minutes and 51 seconds in the last. Regardless of the program rate, the quality of the results was kept, *i.e.* good separation of components and reproducible limonene retention time. Due to reduced gas consumption, the application of the optimal method results in a decrease of analysis costs.

Key words: limonene, fast gas chromatography, retention time, oven temperature increase

10. Životopis

Osobni podaci:

- Ime i prezime: Katarina Kranjčec
- Datum rođenja: 14.2.1995.
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Veliki Grđevac, Ulica kralja Zvonimira 13, 43270
- e-mail: katarinakranjcec@hotmail.com

Obrazovanje:

- 2001. – 2009. Osnovna škola Mate Lovraka, Veliki Grđevac
- 2009. – 2013. Prirodoslovno-matematička gimnazija Bjelovar
- 2009. – 2013. Glazbena škola Vatroslava Lisinskog, smjer - teorija glazbe, Bjelovar
- 2013. – 2018. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: Farmacija

Radno iskustvo:

- 27. veljače 2018. – 2. rujna 2018. Stručno osposobljavanje, Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Varoš (CCO)

Posebne vještine:

- Strani jezici: engleski – izvrsno
njemački - osnovno
- Rad na računalu: Microsoft Office paket
Eskulap 2000
- Vozačka dozvola: B kategorija