

Određivanje eukaliptola (1,8-cineola) u eteričnim uljima mirte, kajeputa i niauli

Boras, Dorja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:961037>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE EUKALIPTOLA (1,8-CINEOLA) U ETERIČNIM
ULJIMA MIRTE, KAJEPUTA I NIAULI**

ZAVRŠNI RAD

DORJA BORAS

Matični broj: 431

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

**ODREĐIVANJE EUKALIPTOLA (1,8-CINEOLA) U ETERIČNIM
ULJIMA MIRTE, KAJEPUTA I NIAULI**

ZAVRŠNI RAD

DORJA BORAS

Matični broj: 431

Split, rujan 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

DETERMINATION OF EUCALYPTOL (1,8-CINEOLE) IN
MYRTLE, CAJEPUT AND NIAOULI ESSENTIAL OILS
BACHELOR THESIS

DORJA BORAS

Parent number: 431

Split, September 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

ODREĐIVANJE EUKALIPTOLA (1,8-CINEOLA) U ETERIČNIM ULJIMA MIRTE, KAJEPUTA I NIAULI

Dorja Boras, 431

Sažetak: 1,8-Cineol monoterpen je sadržan u brojnim eteričnim uljima. Zbog svoje ugodne arome i okusa, koristi se u raznim mirisima i kozmetici. Antioksidacijska i protuupalna svojstva čine ga važnim sastojkom u farmaceutskim proizvodima. U ovom radu razvijena je metoda za određivanje 1,8-cineola. Za kvantitativno i kvalitativno određivanje 1,8-cineola korištena je tehnika plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa. Korištenjem iste tehnike određene su koncentracije 1,8-cineola u eteričnim uljima kajeputa, mirte i niauli. Praćenjem MRM načina snimanja za različite signale 1,8-cineola određene su specifične reakcije prijelaza pomoću spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom. Tako je spektrometrija masa optimizirana određivanjem energija sruza s dušikom za svaki izabrani prijelaz. Za izradu krivulja umjeravanja korišten je raspon koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Zadovoljeni su ispitani parametri vrednovanja metode (točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, granice određivanja i dokazivanja). Analizom realnog uzorka eteričnih ulja primjenom navedene metode uspješno su im određene koncentracije.

Ključne riječi: 1,8-cineol, plinska kromatografija, trostruki kvadrupol, vrednovanje, eterično ulje

Rad sadrži: 35 stranica, 15 slika, 14 tablica, 17 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|------------------------------------|---------------|
| 1. doc. dr. sc. Miće Jakić | – predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek | – član |
| 3. doc. dr. sc. Franko Burčul | – član-mentor |

Datum obrane: 26. rujna 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate study in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

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

Mentor: PhD Franko Burčul, assistant professor

DETERMINATION OF EUCALYPTOL (1,8-CINEOLE) IN MYRTLE, CAJEPUT AND NIAOULI ESSENTIAL OILS

Dorja Boras, 431

Abstract: 1,8-Cineole monoterpene is contained in numerous essential oils. Due to its pleasant aroma and taste, it is used in various fragrances and cosmetics. Its antioxidant and anti-inflammatory properties make it an essential ingredient in pharmaceutical products. In this work, a method was developed for the quantitative and qualitative determination of 1,8-cineole using gas chromatography with tandem mass. The same technique was employed for determination of the concentrations of 1,8-cineole in the essential oils of cajeput, myrtle and niauli were determined. Triple quadrupole mass spectrometer was used for monitoring different 1,8-cineole signals in MRM mode for specific transition reactions. Thus, the mass spectrometry was optimized by determining the collision energies with nitrogen for each selected transition. The concentration range of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used to create calibration curves. The tested parameters of the evaluation of the method (accuracy, precision, specificity, linearity, limits of determination and proof) were satisfactory. By analyzing real samples of essential oils using the mentioned method, their concentrations were successfully determined.

Keywords: 1,8-cineole, gas chromatography, triple quadrupole, evaluation, essential oil

Thesis contains: 35 pages, 15 pictures, 14 tables, 17 literature references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---------------------------|---------------|
| 1. PhD Miće Jakić | – chairperson |
| 2. PhD Mario Nikola Mužek | – member |
| 3. PhD Franko Burčul | – supervisor |

Defence date: 26th September 2022.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula u razdoblju od svibnja do rujna 2022. godine.

Posebno se zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Franku Burčulu na uloženom vremenu i angažmanu tijekom izrade mog završnog rada.

Veliko hvala kolegicama Petri i Jani na beskrajnoj podršci tijekom školovanja, ne bih mogla bez vas.

Htjela bih zahvaliti i samoj sebi na vjeru u sebe i ustrajnosti u najtežim trenucima.

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada je izraditi krivulju umjeravanja za spoj 1,8-cineol te kvantitativno i kvalitativno odrediti 1,8-cineol u eteričnim uljima kajeputa, mirte i niauli.

Razvoj i optimizacija ove analitičke metode uključuje:

- Snimanje spektara masa 1,8-cineola i usporedbu s bazom podataka
- Odabir početnih iona s najvećim odzivom prema detektoru i snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza s dušikom pri četiri različite energije sraza
- Praćenje specifičnih reakcija prijelaza pri trideset različitih energija sraza i odabir optimalne vrijednosti energije sraza
- Istovremeno praćenje više specifičnih reakcija prijelaza pri optimiziranim energijama sraza
- Odabir optimalnog načina pripreme radnih otopina standarda i najprikladnijeg područja koncentracija otopina
- Izradu krivulja umjeravanja.

Vrednovanje ove analitičke metode uključuje:

- Ispitivanje točnosti, preciznosti, specifičnosti, linearnosti
- Određivanje linearnog dinamičkog područja, jednadžbe regresijskog pravca, koeficijenta determinacije te računanje granice dokazivanja i granice određivanja
- Analizu realnih uzoraka eteričnih ulja kajeputa, mirte i niauli.

SAŽETAK

1,8-Cineol monoterpen je sadržan u brojnim eteričnim uljima. Zbog svoje ugodne arome i okusa, koristi se u raznim mirisima i kozmetici. Antioksidacijska i protuupalna svojstva čine ga važnim sastojkom u farmaceutskim proizvodima. U ovom radu razvijena je metoda za određivanje 1,8-cineola.

Za kvantitativno i kvalitativno određivanje 1,8-cineola korištena je tehnika plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa. Korištenjem iste tehnike određene su koncentracije 1,8-cineola u eteričnim uljima kajeputa, mirte i niauli.

Praćenjem MRM načina snimanja za različite signale 1,8-cineola određene su specifične reakcije prijelaza pomoću spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom. Tako je spektrometrija masa optimizirana određivanjem energija sruza s dušikom za svaki izabrani prijelaz. Za izradu krivulja umjeravanja korišten je raspon koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Zadovoljeni su ispitani parametri vrednovanja metode (točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, granice određivanja i dokazivanja). Analizom realnog uzorka eteričnih ulja primjenom navedene metode uspješno su im određene koncentracije.

Ključne riječi: 1,8-cineol, plinska kromatografija, trostruki kvadrupol, vrednovanje, eterično ulje

SUMMARY

1,8-Cineole monoterpene is contained in numerous essential oils. Due to its pleasant aroma and taste, it is used in various fragrances and cosmetics. Its antioxidant and anti-inflammatory properties make it an essential ingredient in pharmaceutical products. In this work, a method was developed for the quantitative and qualitative determination of 1,8-cineole using gas chromatography with tandem mass spectrometry. The same technique was employed for determination of the concentrations of 1,8-cineole in the essential oils of cajeput, myrtle and niauli were determined.

Triple quadrupole mass spectrometer was used for monitoring different 1,8-cineole signals in MRM mode for specific transition reactions. Thus, the mass spectrometry was optimized by determining the collision energies with nitrogen for each selected transition. The concentration range of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used to create calibration curves.

The tested parameters of the evaluation of the method (accuracy, precision, specificity, linearity, limits of determination and proof) were satisfactory. By analyzing real samples of essential oils using the mentioned method, their concentrations were successfully determined.

Key words: 1,8-cineole, gas chromatography, triple quadrupole, evaluation, essential oil

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. 1,8-cineol	2
1.1.1. Niaouli (Melaleuca quinquenervia)	3
1.1.2. Kajeput ("Melaleuca cajuputi")	3
1.1.3. Mirta (Myrtus communis L.).....	4
1.2. Kromatografija	5
1.2.1. Podjela kromatografije.....	5
1.2.2. Kromatografski parametri.....	6
1.2.3. Plinska kromatografija	8
1.3. Spektrometrija masa	12
1.3.1. Izvor iona	12
1.3.2. Kvadrupolni analizator masa.....	13
1.3.3. Tandemska spektrometrija masa	14
1.4. Vrednovanje analitičke metode.....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO	16
2.1. Korištene kemikalije i oprema	16
2.2. Identifikacija 1,8 – cineola	17
2.3. Analiza smjese 1,8 - cineola	19
2.4. Snimanje fragmenata nakon sraza iona s dušikom i određivanje specifičnih reakcija	19
2.5. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja	20
2.6. Analiza eteričnih ulja.....	20
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE	22
3.1.1. Spektar masa 1,8-cineola.....	22
3.1.2. Optimizacija energije sraza s dušikom.....	23
3.1.3. Odabir područja koncentracija otopina i izrada krivulje umjeravanja	27
3.2. VREDNOVANJE METODE	29
3.2.1. Točnost	29
3.2.2. Preciznost.....	29
3.2.3. Specifičnost.....	30
3.2.4. Linearnost	30
3.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja	31

3.2.6. Analiza realnog uzorka.....	32
ZAKLJUČAK.....	32
LITERATURA.....	34

UVOD

1,8-Cineol ili eukaliptol je monoterpen s velikom primjenom u kemijskoj industriji. Jedan je od glavnih komponenti eteričnih ulja kajeputa, mirte i niaulia, a čini i 90 % ulja eukaliptusa. Koristi se u brojnim kozmetičkim preparatima zbog svoje blago pikantne arome.^[1]

1,8-Cineol obično se koristi kao sredstvo za poboljšanje okusa u prehrambenoj industriji. Pokazuje nekoliko farmakoloških aktivnosti koje mogu pružiti terapijske učinke u respiratornim stanjima tako što djeluju protuupalno i antibakterijski. Utvrđeno je protuupalno djelovanje kočenjem tvorbe protuupalnih citokina. Koristan je u liječenju upala sinusa i debelog crijeva.^[1]

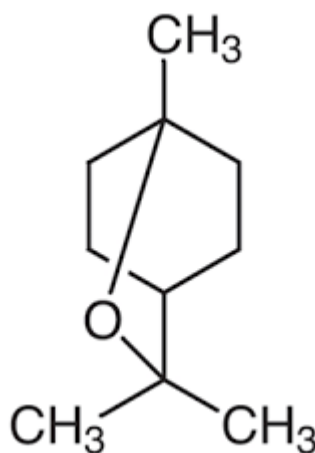
Kromatografija je metoda odvajanja sastojaka smjese s obzirom na afinitet ka stacionarnoj fazi. Plinska kromatografija kombinirana s kvadrupolnim analizatorom masa predstavlja najoptimalniju analitičku tehniku pri identifikaciji spojeva.

U ovom radu je opisan razvoj metode kojom je omogućeno kvantitativno i kvalitativno određivanje 1,8-cineola spregnutom tehnikom GC-MS/MS iz tri eterična ulja : kajeputa, mirte i niauli.

1. OPĆI DIO

1.1. 1,8-cineol

1,8-cineol (C₁₀H₁₆O) je primarni monoterpen koji se ponajviše nalazi u eteričnom ulju eukaliptusa, a prisutan je i u eteričnim uljima drugih rodova. Ima veliku primjenu u kemijskoj industriji zbog svoje niske toksičnosti, velikog temperaturnog raspona u tekućem stanju (274,63 K - 449,5K) te umjerenog tlaka para koji umanjuje atmosfersko zračenje. 1,8-Cineol se koristi i kao komponenta goriva jer djeluje kao alternativa otapalima koji oštećuju ozon.^[1,2,3]



Slika 1.1. Opća struktura 1,8-cineola

1,8-cineol djeluje protuupalno i antimikrobno, a mala reaktivnost i nematocidna svojstva ga čine dobrim poljoprivrednim bioagensom s potencijalno velikim primjenama. Koristi se kao sredstvo za poboljšanje okusa, te u pastama za zube, sapunima i kremama koje se apsorbiraju u kožu. Poznato je da usporava leukemiju *in vitro*, dok antioksidacijska aktivnost omogućava 1,8-cineolu obnavljanje razina glutationa te smanjuje aktivnost mijeloperoksidaze (biokemijski pokazatelj infiltracije neutrofila u upaljenim tkivima). Zbog vrijednih svojstava i lake dostupnosti, cineol uživa veliku primjenu u industriji.^[1,2]

1.1.1. Niauli (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake)

Niauli (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake) je malo do srednje veliko drvo visine do 10 m, smečkasto-sive kore s otvorenom krošnjom i klasovima krem-bijelih, žutih ili zelenih cvjetova. Spada u porodicu Myrtaceae, a raste na području istočne Australije, provinciji Papua u Indoneziji, Madagaskaru, Papua Nova Gvinjea te se također javlja u Floridi, Sjedinjene Američke Države. Prije nekoliko stoljeća su se bebe umatale u koru drva niauli jer se vjerovalo da daje snagu i zaštitu u zajednicama u kojima ovakva drveća rastu. Najbolje uspijeva na vlažnom tlu visokih nadmorskih visina, ali može dominirati područjima koja su pogođena požarima jer su i sami otporni na vatru. Proizvodi dosta eteričnog ulja a time predstavlja rizik za vrste koje rastu blizu njega budući da koncentracija njegovog ulja pojačava plamen i otežava gašenje. Drvo niauli tako koristi organske komponente uginulih stabala jer mu omogućavaju bolje klijanje.^[4]

Listovi su naizmjenično raspoređeni, plosnati jajolikog oblika te se beru i suše nekoliko sati bez doticaja sunca prije nego što se podvrgnu destilaciji. Destilacijom listova vodenom parom, proizvodi se eterično ulje. Ekstrahiranjem se dobiva 6 mL - 10 mL eteričnog ulja iz 1 kg biljnog materijala koje se kasnije može koristiti i u primjeni biogoriva.^[5]

Eterično ulje niaulija potiče staničnu regeneraciju kako bi se smanjila pojava ožiljaka od akni i sličnih nesavršenosti, također regenerira ten. Koristi se za dubinsko čišćenje kože uklanjajući toksine, slobodne radikale i ostala onečišćenja. Pomaže pročistiti dišne puteve i olakšava disanje. Dobre karakteristike ovog eteričnog ulja posljedica su njegova kemijskog sastava s visokim udjelom 1,8-cineola, α -pineola i viridiflorola.^[5,6]

1.1.2. Kajeput (*Melaleuca cajuputi* Powell)

Kajeput (*Melaleuca cajuputi* Powell) je zimzeleno drvo visine 35 m - 45 m. Dijeli se na tri podvrste: *cajuputi*, *cumingiana* te *platyphylla*. Uglavnom uspijeva u močvarnim ili dobro plavljenim područjima, no može se pronaći i u suhim ili kamenitim tlima. Preferira tropsku klimu tako da je najviše rasprostranjen u Vijetnamu, Indoneziji, Tajlandu, Singapuru, jugozapadnoj Papua Nova Gvineja te sjevernoj Australiji.^[8]

Deblo je spužvasto na dodir s bjelkastom, sivom ili smečkastom papirnatom korom. Listovi su naizmjenično raspoređeni, eliptičnog izduženog oblika s jasnim uzdužnim žilama. Sposobni su preživjeti potpuna potapanja na duži period zbog aerenhimskih stanica u stabljici i lišću koje stvaraju velike unutarstanične zračne prostore kako bi poboljšali prozračnost korijena te upijanje i izmjenu plinova iz vode. Cvjetovi rastu u gustim bijelim ili zelenkastim klasovima a njihovo vrijeme cvatnje ovisi o podvrsti i području staništa. Deblo se koristi za izradu kanua te ostalog pomoćnog i građevinskog materijala.^[6,8]

Važan je izvor eteričnog ulja kajeputa koji se dobiva destilacijom listova. Pomoću miješalice se samleje svježe lišće u fini prah koje se natapa u destiliranoj vodi. Takvi uzorci se koriste za hidrodestilaciju te se dobivena ulja čuvaju u tamnim bocama. Ulje je prozirno, aromatičnog mirisa te izaziva osjećaj hladnoće u ustima kada se koristi u ublažavanju zubobolje. Kvaliteta eteričnog ulja kajeputa ponajviše ovisi o sadržaju 1,8-cineola koji mora biti u rasponu 65 % - 75 %, ali ovisi i ostalim čimbenicima kao što su starost stabla i lišća ili sezona žetve. Ulje kajeputa se trenutno najviše proizvodi na području jugoistočne Azije. Djeluje kao blagi antiseptik pogotovo kod ublažavanja poteškoća s disanjem, liječenja prehlade, kašlja i glavobolje. Također je koristan u liječenju akni, infekcija i ožiljaka te općenito promiče zdrav izgled kože.^[6,9,10]

1.1.3. Mirta (*Myrtus communis* L.)

Mirta (*Myrtus communis* L.) je niže stablo visine do 5 m gustih grana. Rasprostranjena je u južnoj Europi na području Mediterana te najbolje uspijeva na sunčanim i toplim staništima u blizini svijetlih šuma i makije. Može se prilagoditi i glinenim i pjeskovitim tlima. Crvena kora Mirte s vremenom postaje siva te se ljušti u dugim ljuskama. Listovi su jajastog oblika, tamnozeleni na licu, a svijetlozeleni na naličju. Cvjetovi su zvjezdolikog oblika s pet latica, obično bijele boje. Sadrži brojne prašnike te je ugodnog mirisa. Općenito je medonosna biljka pa je primamljiva pčelama. Plod čini plava boba promjera 5 mm – 7 mm koja dozrijeva u studenom.^[11]

Drevne civilizacije koristile su lišće mirte u medicinske i kulinarske svrhe, a cvjetovi su bili simboli ljubavi. Općenito listovi mirte mogu poslužiti kao zamjena lovoru. Osušeni

plodovi, cvjetovi i listovi koriste se kao aroma hrani, a drvo aromatizira meso dodatkom u roštilj.^[11]

Eterično ulje mirte dobiva se destilacijom njenih listova vodenom parom. Aktivne sastavnice ovog eteričnog ulja su 1,8–cineol, mirtenil acetat, α -pinen, limonen, α -terpineol i drugi. Pomaže u suzbijanju neugodnih tjelesnih mirisa, potiče rad štitnjače i jajnika te podržava rad prostate. Zbog sadržaja 1,8–cineola, eterično ulje mirte koristi se i z tretiranje dišnih tegoba jer potiče izbacivanje sluzi.^[11,12]

1.2. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja komponenata smjese koja se temelji na različitoj raspodjeli komponenti između pokretne i nepokretne faze. Kromatografija danas predstavlja glavnu analitičku tehniku odjeljivanja te ujedno služi za identifikaciju i kvantitativno određivanje različitih komponenti u složenim smjesama. Pokretna (mobilna) i nepokretna (stacionarna) faza mogu biti tekućine, plinovi ili čvrsta tvar. Ako je uzorak čvrsta tvar, mora biti topljiv u mobilnoj fazi. Prilikom provođenja kromatografske analize, uzorak otopljen u mobilnoj fazi prolazi kroz kolonu te se njegovi sastojci raspodjeljuju između dviju faza. Različite brzine kretanja sastojaka kroz stacionarnu fazu omogućuju njihovo razdvajanje a pri tome se dobivaju koncentracijski profil vrpce sastojaka u različitim vremenima ispiranja s kolone.^[13,14]

Početak 20. stoljeća ruski botaničar Mihail Cvet izumio je kromatografiju. Odjeljivao je otopine biljnih pigmenta klorofila i ksantofila kroz staklenu kolonu napunjenom sitnozrnatim kalcijevim (II) karbonatom, a za pokretnu fazu je koristio eter. Pigmenti su se razdvojili u različito obojane vrpce po čemu je kromatografija i dobila ime (*graphien* = ispisati; *chroma* = boja). Kromatografija se nakon toga počela više razvijati tek nakon nekoliko desetljeća.^[13,14]

1.2.1. Podjela kromatografije

Obično se kromatografske tehnike dijele s obzirom na način kontakta između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze gdje razlikujemo plošnu i kolonsku

kromatografiju. Kod plošne kromatografije stacionarna faza je nanjena na papir ili na čvrsti nosač, dok u kolonskoj kromatografiji stacionarnu fazu čini uska kolona. Odabrana mobilna faza utjecajem gravitacijske sile prolazi kroz stacionarne faze.^[13]

S obzirom na agregatno stanje mobilne faze, razlikuje se plinska, tekućinska i fluidna kromatografija pri superkrićnim uvjetima. Mobilna faza kod plinske kromatografije je inertni plin, kod tekućinske kromatografije tekućina male viskoznosti, a kod fluidne kromatografije pri superkrićnim uvjetima gusti plin (fluid) iznad svoje krićne temperature i tlaka.^[13]

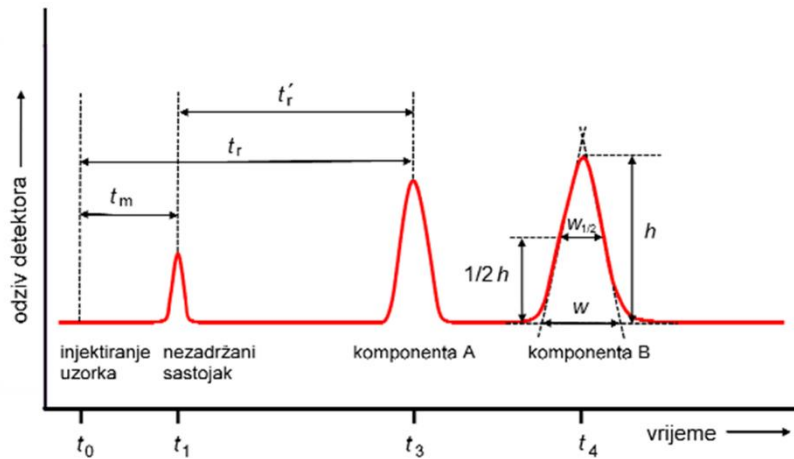
Kromatografske metode se još mogu podijeliti s obzirom na prirodu ravnoteže između stacionarne i mobilne faze. U adsorpcijskoj kromatografiji ravnoteža se uspostavlja između tekućine ili plina kao mobilnih faza i čvrste stacionarne faze pri čemu se adsorpcija analita odvija na površini čvrstog adsorbensa. Kod afinitetne kromatografije se odvijaju specifićne interakcije analita s različitim funkcijskim skupinama vezanim na površinu čvrste faze. Pri razdjelnoj kromatografiji ravnoteža se uspostavlja između dviju tekućina ili između plina i tekućine. Zadatak joj je zadržati polarne komponente, kako bi se nepolarne komponente uzorka eluirale s kolone. Kod kromatografije iskljućenjem nepokretna faza djeluje kao molekulska sito pri čemu se sastojci odjeljuju temeljem razlika u veličini i obliku analita, dok su kod kromatografije ionskom izmjenom na stacionarnoj fazi vezane elektrićki nabijene skupine kako bi vezali analit suprotnog naboja.^[13]

1.2.2. Kromatografski parametri

Kromatogram predstavlja grafićki odziv detektora postavljenog na izlazu kolone u ovisnosti o koncentraciji analita u uzorku. Koncentracija analita se opisuje kao funkcija vremena ili volumena dodane mobilne faze. Komponente uzorka će se razdvojiti ukoliko postoji dovoljna razlika u sklonosti vezanja komponenti na stacionarnu fazu. Tako jedna po jedna u određenom vremenu ili volumenu dolaze do detektora koji pokazuje brz odziv na njihovo eluiranje s kolone. Kromatogram omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Odijeljeni sastojak se može identificirati prema položaju pika na vremenskoj osi, dok površina ispod pika predstavlja kolićinu eluiranog sastojka. Slika 1.2. prikazuje kromatogram za uzorak koji sadrži dvije komponente. Sastojak B ima manji afinitet

prema stacionarnoj fazi u odnosu na sastojak A što znači da brže prolazi kroz kolonu i prije dolazi do detektora.^[13,14]

Zadržano vrijeme t_m predstavlja vrijeme kojim nezadržana komponenta prolazi kroz kolonu. Ukupno vrijeme zadržavanja t_r je vrijeme od injektiranja uzorka do maksimalnog odziva detektora. Nakon dolaska nezadržanog sastojka na detektor, vrijeme potrebno odabranoj komponenti da pristigne na detektor naziva se prilagođenim vremenom zadržavanja t_r' : $t_r' = t_r - t_m$. Na kromatogramu je prikazana i visina kromatografske krivulje koja se označava s h te širina kromatografske krivulje w . Važno je spomenuti i širinu kromatografske krivulje na polovici visine krivulje $w_{1/2}$ koja se očitava kao razmak između tangenti na polovici visine $h_{1/2}$.^[14]



Slika 1.2. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima^[13]

Faktor zadržavanja k' definira se kao omjer vremena koje komponenta provede u stacionarnoj fazi prema vremenu koje provede u mobilnoj fazi:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m}$$

Zapravo opisuje brzinu gibanja analita u koloni te su mu idealne vrijednosti u rasponu 1 - 5. Ako je vrijednost faktora zadržavanja manja od 1, komponenta se prebrzo eluirala s kolone. Kada su te vrijednosti dosta visoke, komponenta je više zadržana u koloni.^[14]

Faktor odjeljivanja predstavlja omjer faktora zadržavanja odijeljenih komponenti:

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

Vrijednost faktora odjeljivanja mora uvijek biti veća od 1 pa se zato u brojniku stavlja faktor zadržavanja duže zadržavane komponente.^[14]

Razlučivanje je kvantitativna mjera odjeljivanja koja daje informaciju o sposobnosti kolone da razdvoji signale dviju komponenata uzorka:

$$R_s = \frac{2 \times \{t_r(A) - t_r(B)\}}{w_A + w_B}$$

Najniža vrijednost R_s kojom bi se postiglo uspješno odjeljivanje mora biti 1,5. što je veći R_s to je bolje odjeljivanje.^[13]

Svako uspostavljanje ravnoteže komponente između mobilne i stacionarne faze se naziva teorijskim tavanima iako stvarni tavani ne postoje u kromatografskoj koloni. Tako se djelotvornost kolone može opisati visinom H i brojem teorijskih tavana N :

$$N = L/H,$$

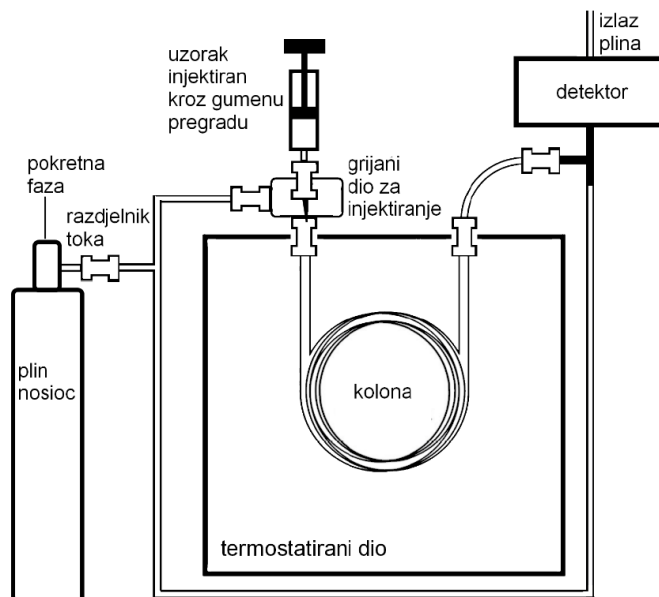
gdje je L duljina nepokretne faze u koloni.

Broj teorijskih tavana te njegova visina se mogu opisati pomoću podataka očitanih iz kromatograma^[13]:

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

1.2.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je instrumentna tehnika koja omogućava odvajanje komponenti plinskog uzorka. Stacionarnu fazu čini nehlapljiva tekućina nanescena na kruti nosač, dok je mobilna faza kemijski inertan plin (helij, argon, dušik, ugljikov dioksid). Plinska mobilna faza se vrlo brzo kreće kroz kromatografsku kolonu što čini analizu vrlo kratkom. Dva su tipa plinske kromatografije: adsorpcijska, kod koje je stacionarna faza čvrsta tvar te razdjelna kojoj je stacionarna faza nehlapljiva tekućina.^[14]

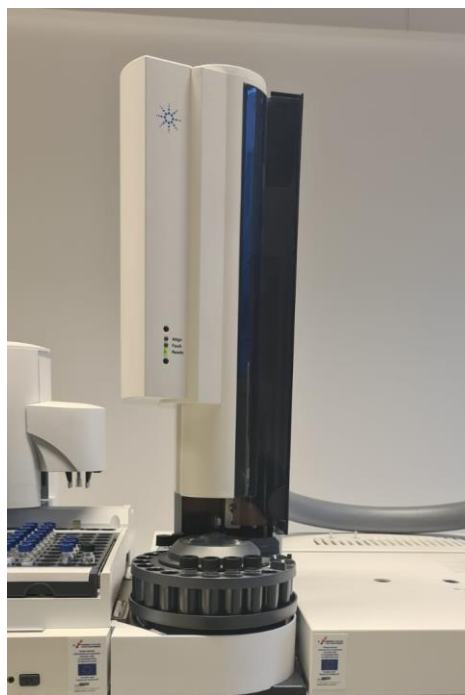


Slika 1.3. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Uređaj za plinsku kromatografiju sastoji se od spremnika za plin nosioc, razdjelnika toka, injektora uzorka, kolone koja se nalazi u termostiranom prostoru te izlaza za plin.

INJEKTORI

Uzorak je potrebno u malim količinama (1 mL – 10 mL plinovitog uzorka, 0,1 μL – 1,0 μL tekućeg uzorka) brzo injektirati u kolonu kako bi se osigurala bolja rezolucija rezultata. Sva područja za injektiranje griju se na više temperature kako bi omogućili plinovito stanje uzorka te spriječili kondenzaciju dolaskom na detektor. Kako bi se lakše kontrolirao proces te postigla veća brzina i dobra ponovljivost, danas se koriste automatski uzorkivači (engl. *autosampler*). Ovakvi uzorkivači ispiru špricu nekoliko puta u otapalu da bi zatim uzeo zrak, potom otapalo, ponovno zrak i na kraju uzorak i još zraka kako bi spriječio gubitak hlapljivih komponenti, ali i kako bi lakše izbacili uzorak.^[14]



Slika 1.4. Injektor

Kalibrirane šprice injektora uzimaju uzorak te ga injektiraju kroz gumenu pregradu u kolonu. Tekući uzorak se može injektirati djelomično kod ili potpuno. Kod djelomičnog injektiranja (engl. *Split mode*) uzima se samo manja količina uzorka jer se tako postiže bolje razlučivanje. Potpuno injektiranje (engl. *Splitless mode*) vrši se samo ako se analit u uzorku nalazi u tragovima pa se time analizira cijeli uzorak.^[14]

KOLONE

U termostatiranoj peći nalazi se kromatografska kolona savijena u svitke na kojoj se odvija odjeljivanje komponenti uzorka. Potrebno je osigurati optimalnu temperaturu kolone kako bi uzorak ostao u plinovitom stanju. To se postiže postavljanjem temperature na jednaku ili malo ispod prosječne temperature vrelišta uzorka, pa je raspon trajanja procesa 2 minuta – 30 minuta. Dvije općenite vrste kolona koje se koriste su punjene i kapilarne kolone.^[14]

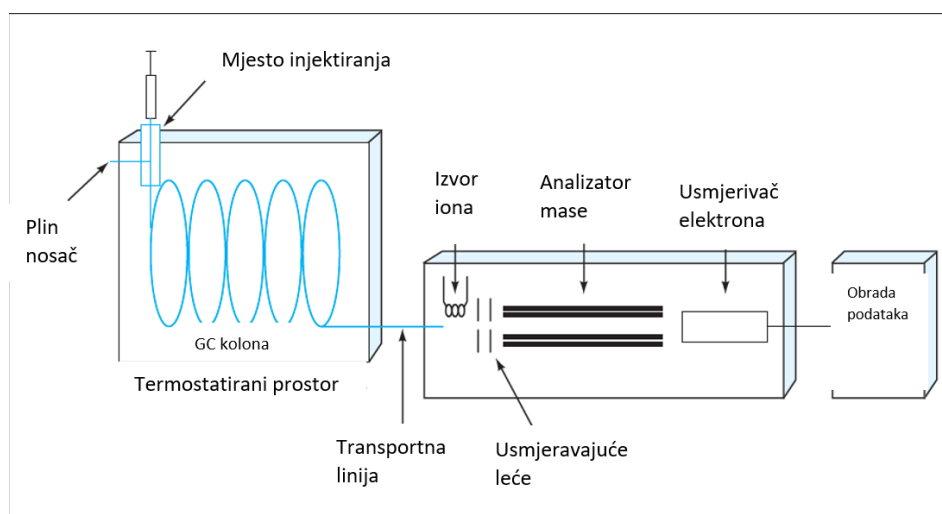
Kapilarne kolone napravljene su od posebno pročišćenog kvarca s minimalnim količinama metalnih oksida, a vanjske stijenke su im obložene slojem poliamida. Najčešće korištene kolone imaju mali unutarnji promjer (320 μ – 250 μ m) te se mogu praviti u većim dužinama (15 m – 30 m) pa se zbog svoje fleksibilnosti mogu savijati u

zavojnice. Kako su ovo vrlo uske kolone, nedostatak im je nemogućnost korištenja većih količina uzorka.^[14]

Punjene kolone sadrže inertni nosač na koji je nanescena nepokretna faza u tankome sloju. Izrađuju se od čelika, bakra ili aluminija te imaju veće unutarnje promjere (2 mm - 4 mm), duljine kolona su obično 2 m - 3 m. da bi čvrsti nosač bio optimalan, potrebno ga je namočiti otapalom kako bi se ravnoteža uspostavljala na granici tekućeg i plinovitog.^[14]

DETEKTORI

Detektori vrše identifikaciju eluiranih komponenti s kolone. Dobiveni signal se šalje na računalo koje ga obrađuje i prikazuje kromatogram. Detektor se zagrijava na nešto više temperature od same kolone kako bi se spriječila kondenzacija komponenti. Najčešće korišteni detektori kod plinske kromatografije su spektrometar masa i infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom jer omogućavaju izravnu identifikaciju komponente uzorka.^[14]



Slika 1.5. Shematski prikaz detektora

Dobar detektor mora imati jednolik odziv za sve kemijske spojeve, pokazivati dobru osjetljivost, primjenjiv u širokom temperaturnom području, brz i stabilan.^[14]

1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa tehnika je kojom se razbijaju molekule na fragmentne ione koji se razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z). Koristi se za identifikaciju i kvantitativno određivanje jedne ili više komponenti u uzorku.^[14]

Spektrometar masa sastoji se od izvora iona, analizatora masa i detektora. U spektrometru masa uzorak se ionizira a zatim se ioni odvajaju prema njihovom omjeru masa i naboja (m/z). Kroz cijeli proces potrebno je održavati nizak tlak kako bi se omogućilo ionima da dođu do detektora bez sudara s drugim plinovitim molekulama. Injektor uvodi mikro količine uzorka u izvor iona gdje se komponente uzorka pretvaraju u plinovite molekulske ione bombardiranjem elektronima, fotonima ili ionima gubeći jedan elektron iz molekule, a ionizacija se još može postići primjenom toplinske ili električne energije. Dobiveni molekulski ioni se cijepaju u plinovite pozitivno ili negativno nabijene ione (fragmentni ioni) koji se ubrzavaju u analizatoru masa. Ionski snop prolaskom kroz pukotinu u analizatoru dolazi do promjenjivog magnetskog polja. Putanje iona se savijaju i tako se razdvajaju ovisno o m/z . Razdvojeni ioni putuju do detektora gdje se pretvaraju u mjerljiv signal.^[14,15,16]

Spektar masa je dvodimenzionalni prikaz intenziteta signala u odnosu na omjer naboja i mase koji daje informacije o strukturnim karakteristikama analiziranih spojeva. Položaj vrha (engl. *peak*) odražava m/z iona koji je stvoren iz analita te je njegova visina povezana s intenzitetom koji predstavlja količinu tog iona. Najintenzivniji signal se predstavlja osnovni signal čiji je signal dogovorno normaliziran kao 100 % relativnog intenziteta. Signal molekuskog iona je signal pri najvećoj m/z vrijednosti, koja predstavlja relativnu molekulsku masu spoja.^[15]

1.3.1. Izvor iona

Ionski izvori ioniziraju plinovite molekule analita stvarajući nabijene čestice. Analizator masa ne može djelovati na neutralne čestice jer na njihova gibanja ne utječu ni električno ni magnetsko polje. S obzirom da je sustav pod vakuumom, neutralne čestice vakuum pumpa izvlači van.

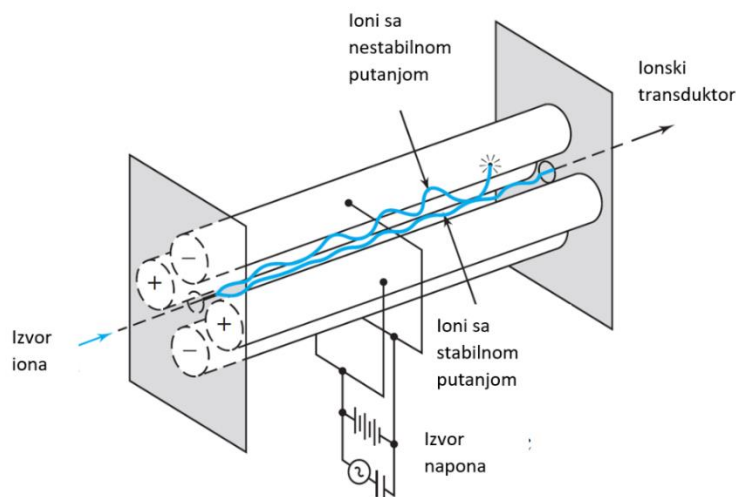
Kod elektronske ionizacije, uzorak se bombardira snopom elektrona visoke energije (70 eV). Najprije je potrebno uzorak upariti da bi se mogao ionizirati. Elektronska ionizacija je kao i kemijska ionizacija te ionizacija poljem, ograničena na termički stabilne i dovoljno hlapljive spojeve. Također, za uzorke u kapljevitoj ili čvrstoj fazi mogu se koristiti razni ionski izvori prikazani u tablici.^[16]

Tablica 1. Tipovi ionizacije

Faza uzorka	Tip ionizacije
Kapljevito	Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI) Fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (APPI) Ionizacija termoraspršenjem (TSP)
Čvrsto	Laserska ionizacija/desorpcija (LDI) Matricom potpomognute ionizacije uz desorpcijsku laserskim raspršenjem (MALDI) Ionizacija sekundarnim ionima (SIMS) Desorpcija plazmom (PD)

1.3.2. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator je uređaj koji koristi stabilnost putanja iona u promjenjivom električnom polju za odvajanje iona prema njihovim omjerima mase i naboja. Sastoji se od međusobno paralelne četiri šipke cilindričnog oblika.^[15]



Slika 1.6. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa

Šipke služe kao elektrode tako da je jedan par nasuprotnih šipki pozitivan a drugi nasuprotni par negativan. Ioni se ubrzavaju u prostoru između šipki potencijalnom razlikom 5 V - 10 V kako bi se dobio maseni spektar. Omjer m/z se održava konstantnim dok je moguće mijenjati izmjenične i istosmjerne napone na šipkama. Tako jedino ioni s određenim m/z vrijednostima mogu prolaziti kroz šipke do detektora.^[14] Kvadrupolni analizator masa je brz, kompaktniji, relativno niskih cijena te nude visok prijenos iona.^[16]

1.3.3. Tandemska spektrometrija masa

Tandemska spektrometrija masa je tehnika koja povezuje najmanje dvije faze analize mase tj., koristi najmanje dva kvadrupolna analizatora. Kod tandemske spektrometrije masa u prostoru najčešće se prvi analizator koristi za izolaciju iona prekursora koji se odvajaju prema svojim m/z vrijednostima. Iz prvog analizatora izlaze samo ioni određene m/z vrijednosti koji se disociraju ili se raspadaju na fragmentne ione u središnjem dijelu instrumenta. Dobiveni ioni se zatim analiziraju u sljedećem analizatoru te odlaze na detektor. Tandemska spektrometrija masa u vremenu u jednom analizatoru istovremeno može vršiti odabir iona, disocijaciju i analizu.^[15]

Trostruki kvadrupol

Primjer tandemske spektrometrije masa u prostoru je trostruki kvadrupol. Serijski su povezana tri kvadrupola gdje su prvi i treći kvadrupol standardni analizatori masa. U centralnom kvadrupolu se prisutni ioni disociraju primjenom različitih napona prilikom sudara s neutralnim plinom te prolaze prema zadnjem kvadrupolu. Trostrukim kvadrupolom mogu se pratiti specifične reakcije. Odabire se ion prekursor određene m/z vrijednosti u prvom kvadrupolu kako bi se u trećem kvadrupolu odabrao traženi ion produkt koji može imati drugačiju m/z vrijednost.^[15]

1.4. Vrednovanje analitičke metode

Cilj vrednovanja analitičke metode je pokazati da je prikladna za namijenjenu svrhu. Procjena kvalitete rezultata je bitan dio svake analize jer nepouzdana rezultati su bezvrijedni. Najvažniji parametri vrednovanja prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji su točnost, preciznost (ponovljivost, srednja preciznost, obnovljivost), specifičnost, linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja te raspon.^[17]

Preciznost postupka izražava slaganje između niza mjerenja istog homogenog uzorka po potpuno istom propisanom mjerenju. Izražava se kao standardna devijacija ili koeficijent varijacije niza mjerenja. Preciznost je moguće promatrati na sljedeće načine:

Ponovljivost izražava preciznost pod istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu.^[17]

Srednja preciznost izražava varijacije unutar laboratorija.^[17]

Obnovljivost izražava preciznost između laboratorija.^[17]

Specifičnost je sposobnost nedvosmislene procjene analita u prisutnosti komponenti koje su očekivano prisutne (nečistoće, intermedijeri i sl.).^[17]

Točnost izražava blizinu slaganja dobivenih vrijednosti s prihvaćenim referentnim podacima.^[17]

Granica određivanja analitičkog postupka je najniža količina analita u uzorku koja se može detektirati.^[17]

Granica dokazivanja predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom točnošću i preciznošću. Koristi se za određivanje nečistoća ili proizvoda razgradnje.^[17]

Linearnost je sposobnost analitičke metode da unutar zadanog raspona daje rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.^[17]

Raspon daje interval između najniže i najviše koncentracije analita za koju zadana metoda pokazuje prikladnu razinu linearnosti, točnosti i preciznosti.^[17]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištene kemikalije i oprema

Tablica 2. Korištene kemikalije

Naziv	Sažeta strukturna formula	Relativna molekulska masa	CAS broj	Proizvođač	Čistoća
n-heksan	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	86,18	110-54-3	BDH Prolabo UK	≥97 %
Eukaliptol (1,8-cineol) puriss p.a.	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	470-82-6	Fluka	>99 %
Eterično ulje kajeputa			/	Aromara	100 %
Eterično ulje mirte			/	Dea Flores	100 %
Eterično ulje niauli			/	Pranarom International	100 %



Slika 2.1. Korištene kemikalije

Popis korištene opreme:

- Analitička vaga: AT261 DR (Mettler Toledo, SAD)
- Mehaničke pipete: Tacta (Sartorius, Njemačka)
- Automatski uzorkivač: 7693A Autosampler (Agilent Technologies, SAD)
- Plinski kromatograf 8890 GC System (Agilent Technologies, SAD)
- Kolona: HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 mikro m (Agilent Technologies, SAD)
- Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom 7000D GC/TQ (Agilent Technologies, SAD)



Slika 2.2. Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa

2.2. Identifikacija 1,8-cineola

Pripremljeni su uzorci za analizu otapanjem 1 μ L 1,8-cineola u 1 mL heksana. Uzorak je injektiran automatskim uzorkivačem u plinski kromatograf s trostrukim kvadrupolom kao analizatorom masa. Ovdje će se najprije u prvom kvadrupolu snimiti svi fragmentni ioni, a preostala dva kvadrupola će samo propustiti ione do detektora. Za ovu analizu primijenjena je metoda R. P. Adamsa. Istovremeno se snima i spektar masa.

Tablica 3. Radni uvjeti kromatografa

Plin nosioc	Helij
Protok plina nosioca	1 mL min ⁻¹
Temperatura injekcijskog bloka	250°C
Volumen injektiranog uzorka	1 mL
Omjer raspodjele	50:1
Početna temperatura peći	60°C, izotermno zadržana 2 min
Brzina povećanja temperature	3°C min ⁻¹
Konačna temperatura peći	246°C, izotermno zadržana 25 min
Temperatura „transfer line“	280 °C
Trajanje mjerenja	12 min

Tablica 4. Radni uvjeti spektrometra masa

Ionizacijski potencijal	70 eV
Temperatura ionskog izvora	230 °C
Temperatura kvadrupola	150 °C
Raspon <i>m/z</i>	40 - 450
Odgoda snimanja	3 min

Dobiven je kromatogram s vremenom zadržavanja 1,8-cineola od 5,56 min.

Ekperimentalno dobiveni spektri masa uspoređeni su sa spektrima masa u dostupnim bazama podataka : NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology*) te Wiley (engl. *The Wiley Registry of Mass Spectral Data*) kako bi se potvrdilo da se radi i 1,8-cineolu. Na taj način se mogu odabrati početni ioni koji će se koristiti u daljnjoj analizi.

2.3. Analiza smjese 1,8-cineola

Pripremljeni uzorak ponovno je analiziran na GC-MS/MS-u. Radni uvjeti plinskog kromatografa i analizatora su nepromijenjeni.

Tablica 5. Temperaturni program plinskog kromatografa

Početna temperatura peći	60 °C
Izotermno zadržavanje 1	3 min
Brzina povećanja temperature	35 °C/min
Konačna temperatura peći	246 °C
Izotermno zadržavanje 2	3 min

Odabrano je nekoliko signala s najvećim odzivom prema detektoru s obzirom na eksperimentalno dobiveni spektar masa.

2.4. Snimanje fragmenata nakon sraza iona s dušikom i određivanje specifičnih reakcija

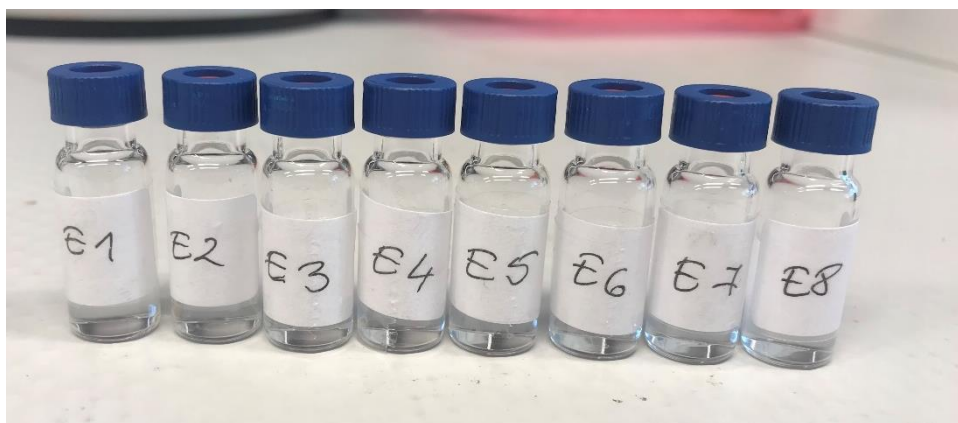
Odabrani signali iz poglavlja 2.3. predstavljaju početne ione koji će se nakon prolaska kroz prvi kvadrupol, disocirati u kolizijskoj ćeliji pod utjecajem neutralnih molekula plina dušika. Treći kvadrupol snima sve ione produkte. Cijeli postupak vrši se MRM/SIM praćenjem (engl. *Multiple/Selected reaction monitoring*). Nastali fragmentni ioni snimani su pri različitim energijama sraza s dušikom (15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV) kako bi se mogle odrediti specifične reakcije prijelaza.

Fragmentiranje iona odvija se pri 30 različitih energija sraza s dušikom počevši od 2 eV do 60 eV a svaki sljedeći raste za 2 eV. Na ovaj se način optimiziraju energije sraza s dušikom kako bi se pronašla ona energija pri kojoj je najveći odziv na detektoru. Uspoređivanjem spektara masa izdvojenih specifičnih reakcija pri optimalnim energijama, određuje se prijelaz koji ima najveći odziv prema detektoru. Takav prijelaz se naziva kvantitativni prijelaz, dok ostali predstavljaju potvrdni ili kvalitativni prijelaz.

2.5. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja

Za pripremu radnih otopina standarda, kao otapalo koristila se hlapljiva otopina *n*-heksana. Potrebno je pripremiti otopine standarda koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

U odmjernu tikvicu od 10,0 mL, već postavljenoj na analitičkoj vagi, dodaje se volumen standarda procijenjen prema njegovoj gustoći. Zatim se u istu tikvicu dodaje *n*-heksan do oznake. Na taj način se računa potrebna masena koncentracija. Za zadano područje koncentracija izračunate su točne masene koncentracije na temelju izvagane mase standarda. Izvršeno je jedno ponavljanje svih koncentracija otopine standarda te jedno zasebno ponavljanje pri koncentraciji $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 2.3. Priprema koncentracija 1,8-cineola za analizu

Početna smjesa je pripremljena pri $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a zatim je redom razrijeđena na $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ izravno u bočice na ukupni volumen od 1,0 mL. Izrađene su dvije krivulje tako da je prva krivulja sadržavala koncentracije od $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je druga sadržavala koncentracije $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6. Analiza eteričnih ulja

Eterično ulje mirte pripremljeno je korištenjem $1,75 \mu\text{g}$ eteričnog ulja i 1 mL heksana, dok je takva smjesa eteričnog ulja niaulia i kajeputa morala biti razrijeđena jer je

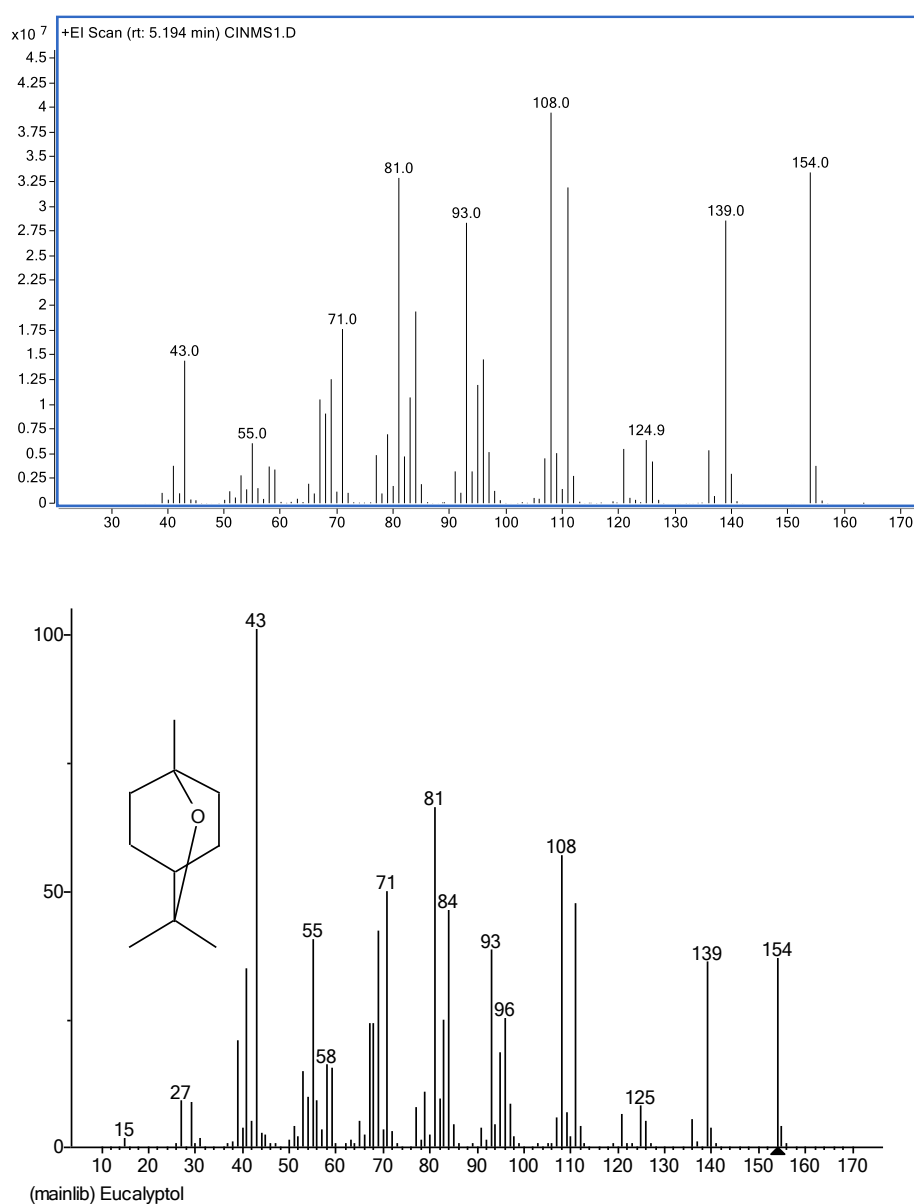
sadržavala preveliku koncentraciju 1,8-cineola. Smjese eteričnih ulja analizirane su na GC-MS/MS postupkom prikazanim u poglavlju 2.4. s jednakim uvjetima rada (poglavlje 2.2.) i temperaturnim programom peći.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE

3.1.1. Spektar masa 1,8 – cineola

1,8-Cineol je identificiran usporedbom snimljenih spektara masa sa spektrima masa iz baza podataka. Podudaranje eksperimentalnih i teorijskih spektara pokazuju sljedeće slike.



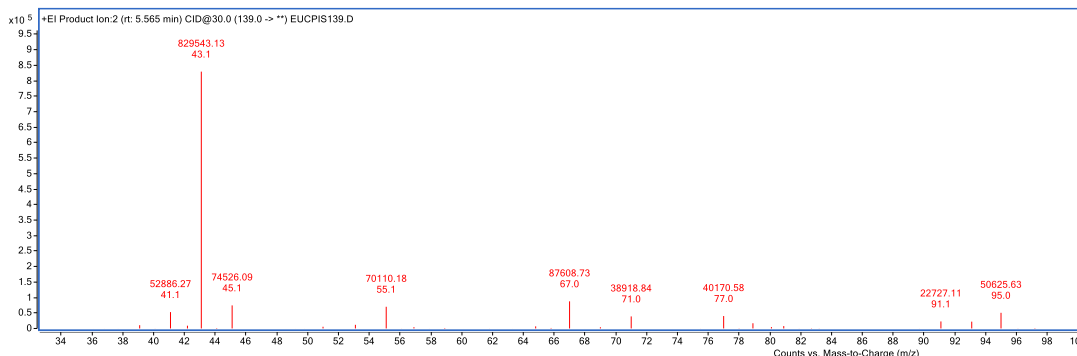
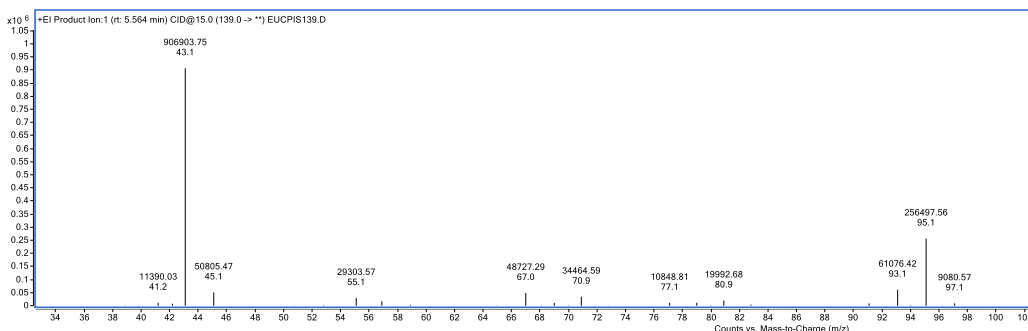
Slika 3.1. Usporedba eksperimentalno snimljenog spektra masa (gore) i spektra masa iz NIST baze podataka (dolje) za 1,8-cineol

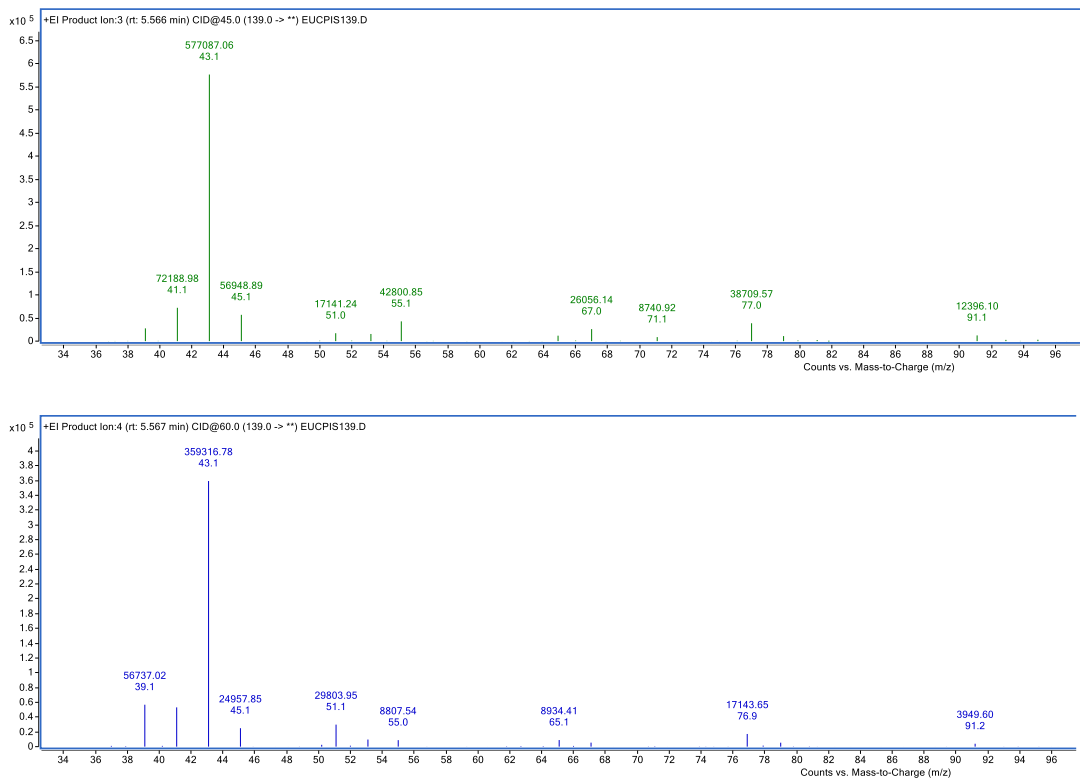
Uvidom u spektar masa, signal molekulskog iona pri $m/z = 154$ predstavlja osnovni signal ovog spoja. Za daljnju analizu izabrani su karakteristični fragmentni ioni:

- $m/z = 154$
- $m/z = 139$
- $m/z = 108$
- $m/z = 81$

3.1.2. Optimizacija energije sraza s dušikom

Na primjeru vrijednosti $m/z = 139$ i $m/z = 108$ standarda eukaliptola opisan je postupak optimizacije energije sraza s dušikom te određivanje kvantitativnog i kvalitativnog prijelaza. Za odabrane fragmentne ione (prikazani u poglavlju 3.1.1.) snimljeni su spektri nakon kolizije s dušikom pri četiri različite energije (15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV).





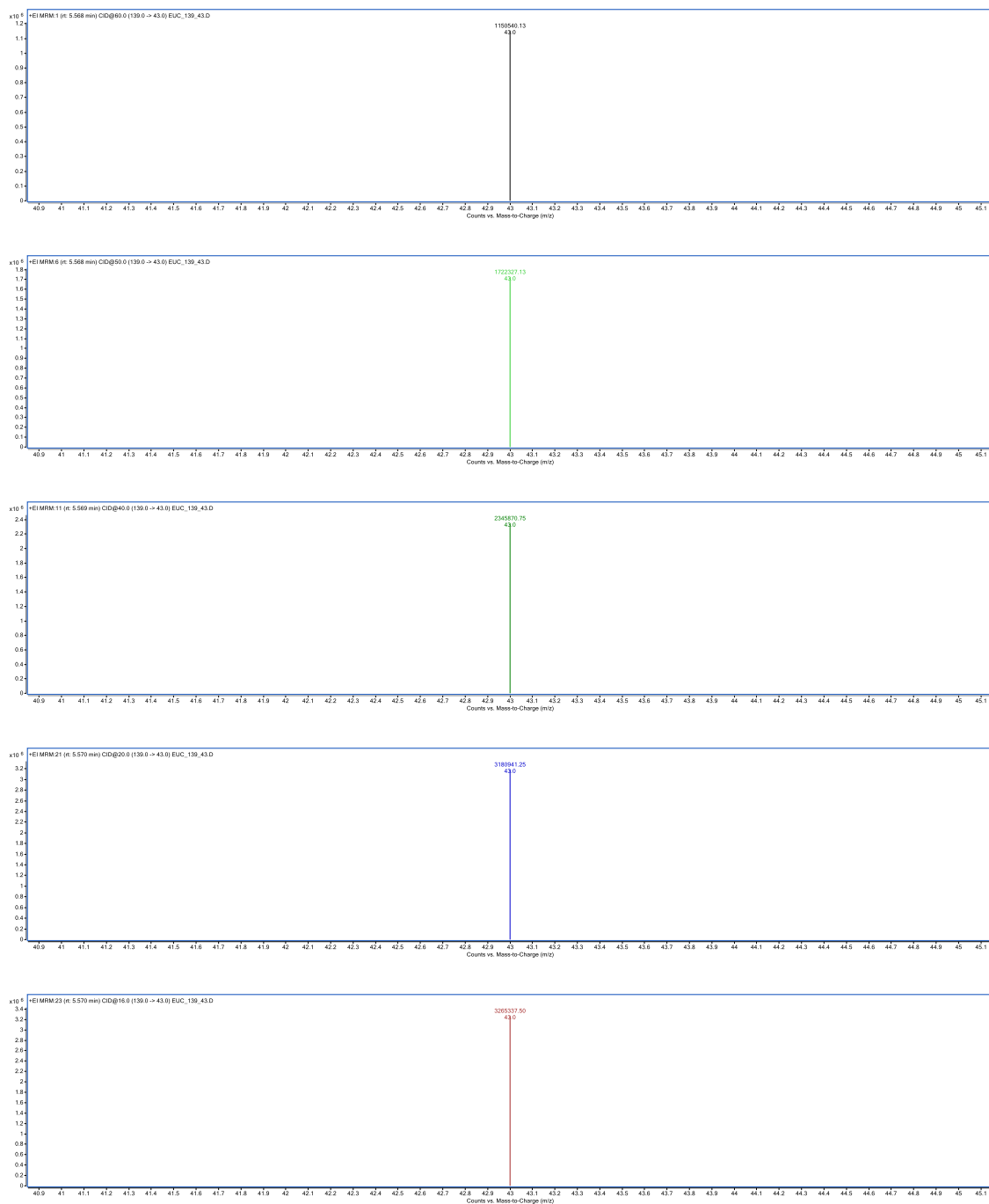
Slika 3.2. Snimanje fragmenata odabranog iona $m/z = 139$ pri energijama dušika 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV.

Uvidom u spektre pri četiri različite energije pri $m/z = 139$, odabran je ion $m/z = 43$ te je tako dobiven specifični prijelaz $139 \rightarrow 43$.

Ostale odabrane specifične reakcije su:

- $154 \rightarrow 69$
- $154 \rightarrow 41$
- $108 \rightarrow 93$
- $108 \rightarrow 77$
- $108 \rightarrow 51$
- $81 \rightarrow 41$
- $81 \rightarrow 39$

Nadalje, navedeni prijelazi praćeni su pri 30 različitih energija sruza s dušikom kako bi se odabrale energije sruza pri kojoj je najveći odziv detektora za pojedini prijelaz. Na primjeru prijelaza $139 \rightarrow 43$ prikazani su MS/MS spektri zajedno s spektrom pri kojem je optimalna energija sruza s dušikom.



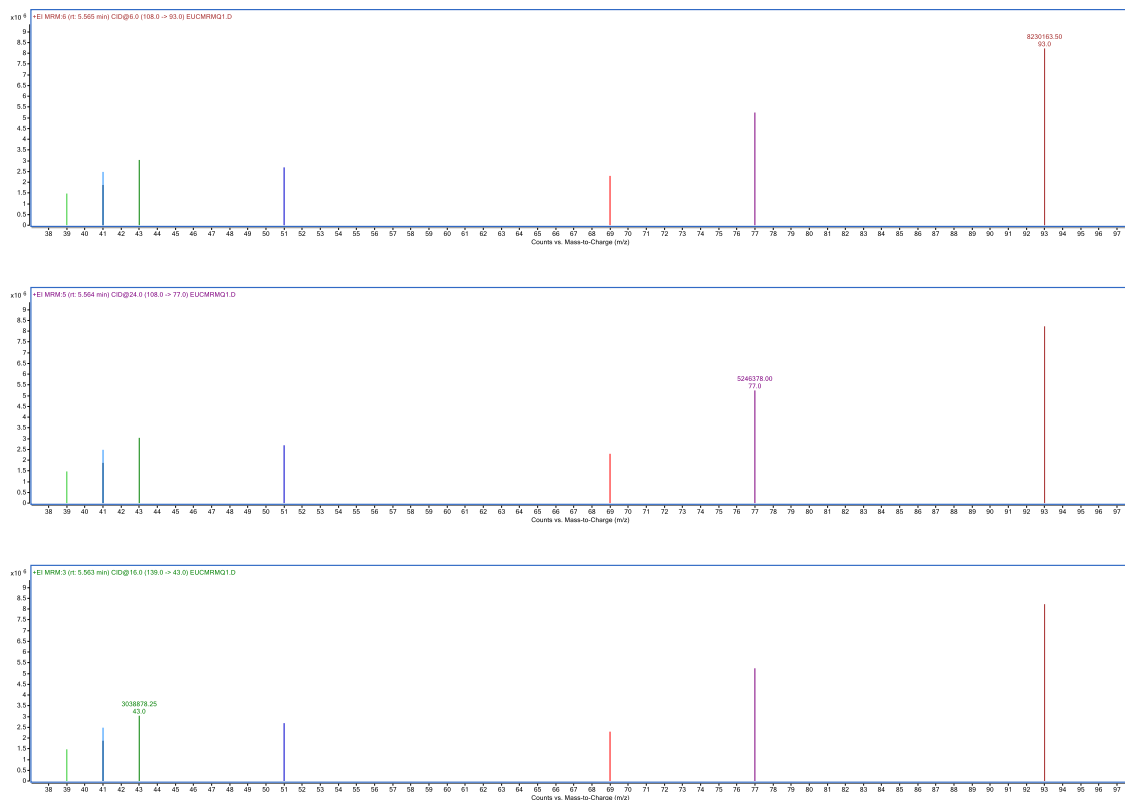
Slika 3.3. Prijelaz m/z 139 \rightarrow 43 prikazan pri 16 eV, 20 eV, 40 eV, 50 eV i 60 eV

Dobiveni specifični prijelazi s optimalnim energijama sruza s dušikom su:

- 154 \rightarrow 69 pri 20 eV
- 154 \rightarrow 41 pri 40 eV
- 139 \rightarrow 43 pri 16 eV
- 108 \rightarrow 93 pri 6 eV
- 108 \rightarrow 77 pri 24 eV

- 108 → 51 pri 42 eV
- 81 → 41 pri 18 eV
- 81 → 39 pri 36 eV

Osam specifičnih prijelaza pri različitim energijama sraza su ponovno snimljeni kako bi se međusobno usporedili i odabrali tri prijelaza s najvišim odzivom. Odabrani prijelazi koriste se za stvaranje baždarne krivulje.



Slika 3.4. Prikazani su spektri za prijelaze 108 → 93 pri 6 eV, 108 → 77 pri 24 eV, 139 → 43 pri 16 eV.

Tablica 6. Specifične reakcije prijelaza

Početni ion m/z	Specifična reakcija prijelaza	Optimizirana energija sraza	Vrsta prijelaza
108	108 → 93	6 eV	kvantitativni
	108 → 77	24 eV	kvalitativni
139	139 → 43	16 eV	kvalitativni

Ostali prijelazi su eliminirani zbog slabog odziva prema detektoru.

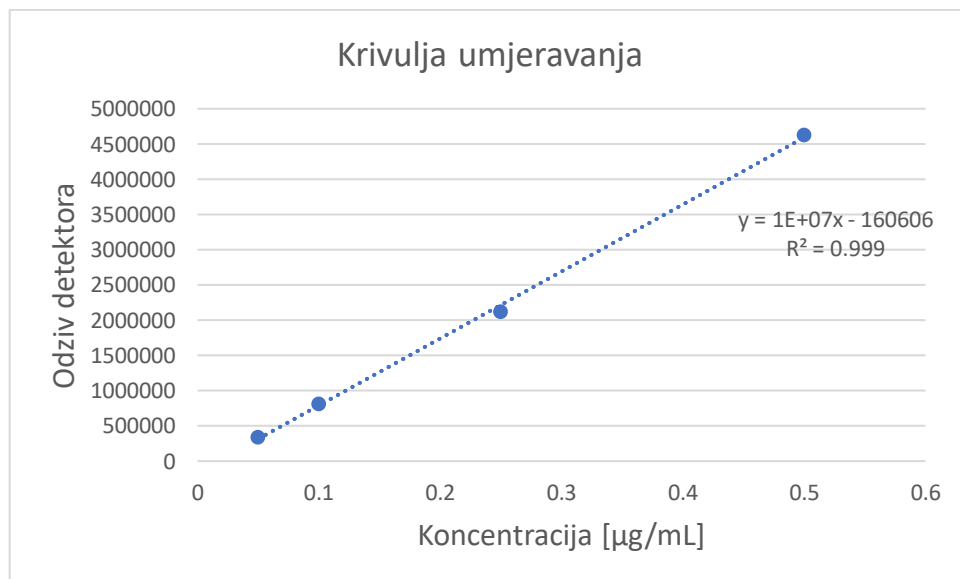
3.1.3. Odabir područja koncentracija otopina i izrada krivulje umjeravanja

Pripremane su otopine koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ klasičnim pipetiranjem za izradu krivulje umjeravanja. U zadanom rasponu izrađene su dvije krivulje.

Tablica 7. Koncentracije i odgovarajući odzivi za 1, 8-cineol (prva krivulja)

Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Odzivi detektora
50	341188,73
100	816888,87
250	2125255,3
500	4629795,5

Na temelju podataka u tablici napravljena je prva krivulja umjeravanja kao grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji.

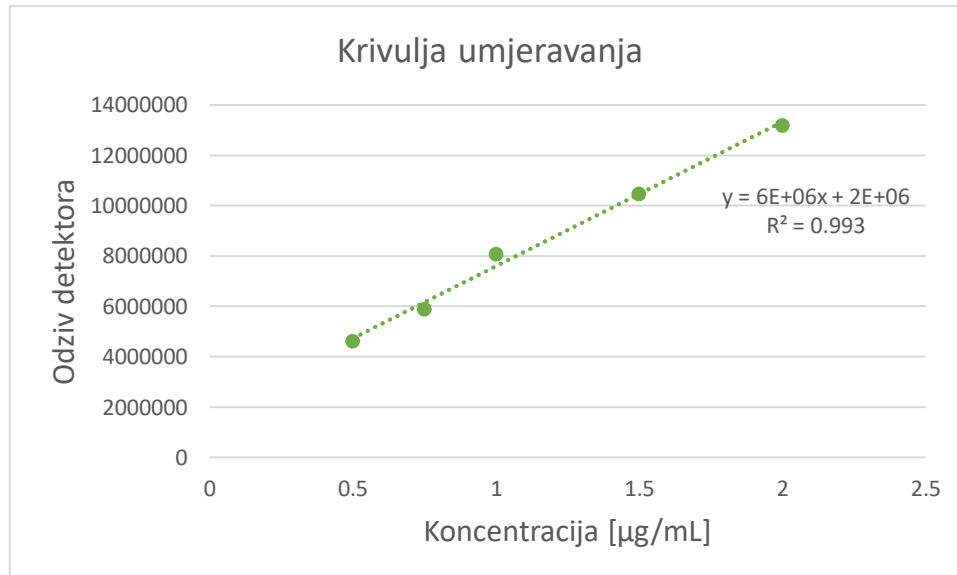


Slika 3.5. Prva krivulja umjeravanja za 1,8-cineol

Tablica 8. Koncentracije i odgovarajući odzivi za 1,8-cineol (druga krivulja)

Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Odziv detektora
500	4629795,524
750	5894012,799
1000	8084973,874
1500	10471700,88
2000	13212182,65

Na temelju podataka u tablici napravljena je druga krivulja umjeravanja kao grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji.



Slika 3.6. Druga krivulja umjeravanja za 1,8-cineol

3.2. VREDNOVANJE METODE

3.2.1. Točnost

Točnost treba utvrditi u određenom rasponu analitičkog postupka. Točnost se izražava kao postotak iskorištenja analizom poznate količine analita u uzorku ili kao razliku između srednje i prihvaćene prave vrijednosti zajedno s intervalima pouzdanosti. ^[17]

Tablica 9. Točnosti i iskoristivost kod prve krivulje umjeravanja

Očekivano [mg mL ⁻¹]	Računski [mg mL ⁻¹]	Iskoristivost (%)
0,050	0,05278	105,56
0,100	0,10283	102,83
0,250	0,24046	96,1843
0,500	0,50393	100,785

Tablica 10. Točnost i iskoristivost kod druge krivulje umjeravanja

Očekivano [mg mL ⁻¹]	Računski [mg mL ⁻¹]	Iskoristivost (%)
0,500	0,4824	96,478
0,750	0,7028	93,711
1,000	1,0849	108,49
1,500	1,501	100,07
2,000	1,9789	98,944

3.2.2. Preciznost

Preciznost metode prikazane je preciznošću injektiranja. Injektiranjem 1,8-cineola koncentracije 50 µg mL⁻¹ u instrument šest puta provedeno je vrednovanje preciznosti injektiranja. Za svako injektiranje određena je koncentracija uzorka iz odziva prema

detektoru korištenjem krivulje umjeravanja. Iz danih podataka računa se relativno standardno odstupanje.

Tablica 11. Preciznost injektiranja $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Injektiranje	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
1	0,061
2	0,055
3	0,054
4	0,052
5	0,054
6	0,048
RSD (%)	7,33

3.2.3. Specifičnost

Korištenjem tri kvadrupola u nizu postiže se velika specifičnost detekcijskog postupka na način da se prate tri specifične reakcije fragmentacije 1,8-cineola. Prolaskom odabranog fragmenta kroz prvi kvadrupol, u drugom dolazi do interakcije s dušikom različitim uvjetima odnosno energijama sraza. Time nastaju novi fragmenti koji zatim ulaze u treći kvadrupol kojeg odlikuje selektivnost prema određenom ionskom produktu. Spomenuti ionski produkt se zatim propušta do detektora. GC-MS/MS tehniku odlikuje specifičnost uvjetovana razlikom u optimalnoj energiji sraza s dušikom, odnosno energijama pri kojima pojedini prijelazi pokazuju najveći odziv prema detektoru.

3.2.4. Linearnost

Linearnost metode vrednovana je koficijentom determinacije vrijednosti za pojedine krivulje umjeravanja, prikazane u tablici. Za prve krivulje umjeravanja vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,999$) pokazuje veću linearnost. Krivulja je izrađena korištenjem četiriju različitih koncentracija 1,8-cineola ($N = 4$) u rasponu $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Druga krivulja umjeravanja prikazana na slici pokazuje neznatno manju

linearnost ($R^2 = 0,993$). Krivulja je izrađena korištenjem pet koncentracija ($N = 5$) u rasponu $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tablica 12. usporedba linearnosti krivulja umjeravanja

	N	Nagib, a	Odsječak, b	R^2
1,8-cineol	4	9506171,54	160606,50	0,999
	5	5734987,77	1863297,21	0,993

3.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica određivanja i granica dokazivanja mogu se odrediti na temelju odnosa s omjerom signal – šum (engl. *signal to noise ratio*, S/N). Prema ICH definiran je kriterij pri kojem je za granicu određivanja odnos signala i šuma iznosi 10, a za granicu dokazivanja je 3.

Tablica 13. Odziv detektora dobiven uzastopnim injektiranjem $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1,8-cineola

Injektiranje	Odziv	S/N
1	414023,98	1295,49
2	365753,75	2904,23
3	361729,49	1141,91
4	331176,91	1827,71
5	349404,65	15293,67
6	301446,02	12111,81

Granica određivanja i granica dokazivanja određene su iz odziva detektora i vrijednosti S/N (omjer signala i šuma) uzastopnim injektiranjem šest puta 1,8-cineola koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Granica određivanja iznosi $0,386 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok granica dokazivanja iznosi $0,116 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Iako su vrijednosti granice dokazivanja i granice određivanja niže od zadanih radnih koncentracija, nisu imale utjecaj na određivanje koncentracije eteričnih ulja.

3.2.6. Analiza realnog uzorka

Razvijena metoda testirana je na uzorcima eteričnih ulja niaulija, kajeputa i mirte pripremljenih na način opisan u poglavlju. Pripremljeni uzorci injektirani su u GC-MS/MS putem automatskog uzorkivača te su analizirani MRM načinom snimanja.

Koncentracije pojedinih eteričnih ulja određene su korištenjem eksperimentalno dobivenih podataka te krivulja umjeravanja prikazanih u poglavlju 3.1.3. Rezultati određivanja 1,8-cineola u navedenim eteričnim uljima prikazani su u tablici 14. Može se uočiti kako 1,8-cineol kod svih uzoraka eteričnih ulja izlazi na jednakom vremenu zadržavanja što također potvrđuje da ulja sadržavaju 1,8-cineol.

Tablica 14. prikaz rezultata određivanja 1,8-cineola u eteričnim uljima kajeputa, mirte i niauli

Eterično ulje	Vrijeme zadržavanja [min]	Odziv detektora	Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
Kajeput	5,56533	8510342,04	2,31807
Mirta	5,5679	8193732	1,10383
Niauli	5,56517	8527352,88	2,324

ZAKLJUČAK

Odabrana tehnika GC – MS/MS pokazala se kao prikladna tehnika za odjeljivanje i kvalitativno te kvantitativno određivanje 1,8-cineola. Ujedno korištenjem MRM načina snimanja uspješno su određene specifične reakcije prijelaza za odabrane fragmente 1,8-cineola. Provođenjem optimizacije energije sraza s dušikom na specifične reakcije prijelaza, određen je kvantitativni prijelaz te dva kvalitativna prijelaza.

Snimljeno je osam uzoraka 1,8-cineola u rasponu koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ kojima je određen odziv prema detektoru. Na temelju dobivenih podataka

konstruirane su dvije krivulje umjeravanja prikazane na slikama. Prva krivulja koristi za određivanje koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok druga krivulja služi za koncentracije $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Metoda korištena u ovom radu zadovoljila je parametre vrednovanja te time potvrdila uporabljivost za određivanje koncentracija 1,8-cineola. Preciznost metode određena je preciznošću injektiranja $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1,8-cineola čija vrijednost relativnog standardnog odstupanja iznosi 7,33 %. Točnost metode pokazuje da spada u prihvatljiv raspon 80% - 120%. MRM načinom snimanja osigurana je specifičnost metode, a obje krivulje povoljnim vrijednostima koeficijenta determinacije pokazuju vrlo dobru linearnost.

Razvijena metoda pokazala se prikladnom metodom za određivanje koncentracije 1,8-cineola u eteričnim uljima kajeputa, mirte i niaulia.

LITERATURA

- [1.] Z. -M. Cai, J. -Q. Peng, Y. Chen, L. Tao, Y. -Y. Zhang, L. -Y. Fu, Q. -D. Long, X. -C. Shen, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2020, 23, 938
<https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432>
- [2.] S. Aparicio, R. Alcade, M. J. Dávila, B. García, J. M. Leal, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 12
<https://doi.org/10.1021/jp067405b>
- [3.] F. D. A. Oliveira, L. N. Andrade, É. B. V. De Sousa, D. P. De Sousa, *Molecules* **2014**, 19, 5717
<https://doi.org/10.3390/molecules19055717>
- [4.] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol> (17.8.2022.)
- [5.] URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Melaleuca_quinquenervia (17.8.2022)
- [6.] J. J. Brophy, L. A. Craven, J. C. Doran, *Melaleucas: their botany, essential oils and uses*. ACIAR Monograph No. 156. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, **2013**, pp 415.
- [7.] URL: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/products/all-about-niaouli-essential-oil.html> (20.8.2022)
- [8.] H. T. Van, U. T. X. Phan, G. B. Tran, *Agric. Conspec. Sci.*, **2019**, 84 (4), 391

- [9.] J. H. Kim, K. H. Liu, Y. Yoon, Y. Sornnuwat, T. Kitirattrakarn, C. Anantachoke, *Acta Hortic.*, **2005**, 680, 65
doi:10.17660/actahortic.2005.680.8
- [10.] S. Idrus, M. S. Radiena, Sumarsana, H. Smith, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2020, 1463 012016
- [11.] URL: <https://www.plantea.com.hr/mirta> (10.9.2022.)
- [12.] URL: <https://www.aromara.hr/shop/mirta-etericno-ulje-10-ml-10356#attr=> (10.9.2022)
- [13.] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, **2016**, str. 19-22.; 630-59.
- [14.] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7. izdanje, Cengage Learning, Boston, **2016**, str. 253-273; 501-536; 695-745
- [15.] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2007**, str. 15-170.; 189-95.
- [16.] J. H. Gross, *Mass spectrometry: a textbook*, 3rd ed. Springer International Publishing AG, Cham, **2017**, str. 8-31.; 151-277.; 539-68.
- [17.] ICH Harmonised tripartite guideline, *Validation of analytical procedure: Text and methodology Q2 (R1)*, **2005**