

Određivanje limonena u eteričnim uljima grejpa, mandarine i celera

Zelić, Petra

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:167:957705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE LIMONENA U ETERIČNIM ULJIMA GREJPA,
MANDARINE I CELERA**

ZAVRŠNI RAD

PETRA ZELIĆ

Matični broj: 433

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJA

**ODREĐIVANJE LIMONENA U ETERIČNIM ULJIMA GREJPA,
MANDARINE I CELERA**

ZAVRŠNI RAD

PETRA ZELIĆ

Matični broj: 433

Split, rujan 2022.

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

**DETERMINATION OF LIMONENE IN GRAPEFRUIT,
MANDARINE AND CELERY ESSENTIAL OILS**

BACHELOR THESIS

PETRA ZELIĆ

Parent number: 433

Split, September 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Prediplomski 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 LIMONENA U ETERIČNIM ULJIMA GREJPA, MANDARINE I CELERA

Petra Zelić, 433

Sažetak: Limonen je predstavnik monoterpenskih ugljikovodika sadržan u eteričnim uljima mnogih citrusa kao njihova glavna okosnica. Zbog izrazitih biokemijskih svojstava, limonen je jaki antioksidans, sastojak je kozmetičkih pripravaka te ostalih sredstava kao što su insekticidi, fungicidi i sl.

Ovim radom razvijena je metoda pogodna za određivanje, kako kvalitativno, tako i kvantitativno monoterpena limonena uz korištenje plinske kromatografije uz kvadrupolni analizator masa te su potom određene koncentracije sastojka limonena unutar eteričnih ulja celera, mandarine i grejpa, sve to uz korištenje iste metode.

Identificirani su i okarakterizirani specifični prijelazi korištenjem MRM načina snimanja standarda limonena.

Pritom je konstruirana krivulja umjeravanja na temelju najpogodnijih specifičnih reakcija prijelaza određenih na temelju optimizacije energije sraza s dušikom za svaki izabrani prijelaz. Koncentracijski raspon korišten za konstruiranje krivulje umjeravanja iznosi 50-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Analizom realnog uzorka, konkretno eteričnog ulja celera, mandarine i grejpa, određene su koncentracije analita, limonena unutar tih „smjesa“.

Ključne riječi: limonen, analiza, fragment, krivulja umjeravanja, realni uzorak

Rad sadrži: 55 stranice, 17 slika, 6 tablica, 19 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|-------------------------------|---------------|
| 1. | doc.dr.sc. Mužek Mario Nikola | – predsjednik |
| 2. | doc.dr.sc. Miće Jakić | – 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: Franko Burčul, PhD, assistant prof.

DETERMINATION OF LIMONENE IN GRAPEFRUIT, MANDARINE AND CELERY ESSENTIAL OILS

Petra Zelić, 433

Abstract: Limonene is a representative of monoterpene hydrocarbon contained in the essential oils of many citrus fruits as their main component. Due to its distinct biochemical properties, limonene is a strong antioxidant, an ingredient in cosmetics and other product such as insecticides, fungicides, etc.

In this thesis a method was developed for qualitative and quantitative determination of monoterpene limonene using gas chromatography with a quadrupole mass analyzer. The concentrations of limonene in the essential oils of celery, grapefruit and mandarine were all determined using the same method.

Specific transitions were identified and characterized using the MRM scanning mode of the limonene standard. A calibration curve was constructed on the basis of the most suitable specific reactions/transitions which were chosen based on the optimisation of the collision energy with nitrogen for each chosen transition. The concentration range used to construct the calibration curve was 50-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

By analysing a real sample, specifically essential oil of celery, mandarin and grapefruit, the concentrations of limonene were determined.

Keywords: limonene, analysis, fragment, calibration curve, real sample

Thesis contains: 55 pages, 17 figures, 6 tables, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: September 26th, 2022.

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

Diplomski 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.

Zahvaljujem mentoru doc.dr.sc Franku Burčulu na uloženom vremenu, blagom i srdačnom pristupu i nadasve stručnom vodstvu tijekom izrade mog završnog rada.

Zahvaljujem mom pokojnom ocu na bezrezervnoj vjeri i neograničenoj ljubavi u kojima sam odrasla i koji su me definirali kao osobu, mojoj majci, mirnoj luci koja smiruje kad treba, a uvijek brine i svojoj Mari.

Zahvaljujem mojim voljenim sestrama i rodicama, zetovima i nećacima, najglasnijoj navijačkoj skupini.

Veliko hvala mojoj Ana – Mariji na strpljenju, podršci tijekom najtežih dana i vjeri u svoju mene.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada je razviti metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena korištenjem spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom.

Razvoj i optimizacija ove analitičke metode uključuje:

- Snimanje spektra masa limonena te usporedba 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
- 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 realnog uzorka

SAŽETAK

Limonen je predstavnik monoterpenkih ugljikovodika sadržan u eteričnim uljima mnogih citrusa kao njihova glavna okosnica. Zbog izrazitih biokemijskih svojstava, limonen je jaki antioksidans, sastojak je kozmetičkih pripravaka te ostalih sredstava kao što su insekticidi, fungicidi i sl.

Ovim radom razvijena je metoda pogodna za određivanje, kako kvalitativno, tako i kvantitativno monoterpena limonena uz korištenje plinske kromatografije uz kvadrupolni analizator masa te su potom određene koncentracije sastojka limonena unutar eteričnih ulja celera, mandarine i grejpa, sve to uz korištenje iste metode.

Identificirani su i okarakterizirani specifični prijelazi korištenjem MRM načina snimanja standarda limonena.

Pritom je konstruirana krivulja umjeravanja na temelju najpogodnijih specifičnih reakcija prijelaza određenih na temelju optimizacije energije sraza s dušikom za svaki izabrani prijelaz. Koncentracijski raspon korišten za konstruiranje krivulje umjeravanja iznosi 50-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Analizom realnog uzorka, konkretno eteričnog ulja celera, mandarine i grejpa, određene su koncentracije analita, limonena unutar tih „smjesa“.

Ključne riječi: limonen, analiza, fragment, krivulja umjeravanja, realni uzorak

SUMMARY

Limonene is a representative of monoterpene hydrocarbon contained in the essential oils of many citrus fruits as their main component. Due to its distinct biochemical properties, limonene is a strong antioxidant, an ingredient in cosmetics and other product such as insecticides, fungicides, etc.

In this thesis a method was developed for qualitative and quantitative determination of monoterpene limonene using gas chromatography with a quadrupole mass analyzer. The concentrations of limonene in the essential oils of celery, grapefruit and mandarine were all determined using the same method.

Specific transitions were identified and characterized using the MRM scanning mode of the limonene standard.

A calibration curve was constructed on the basis of the most suitable specific reactions/transitions which were chosen based on the optimisation of the collision energy with nitrogen for each chosen transition. The concentration range used to construct the calibration curve was 50-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

By analysing a real sample, specifically essential oil of celery, mandarin and grapefruit, the concentrations of limonene were determined.

Keywords: limonene, analysis, fragment, calibration curve, real sample

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Limonen.....	2
1.1.1. Eterično ulje celera (<i>Apium graveolens</i> L.).....	5
1.1.2. Eterično ulje grejpa (<i>Citrus x paradisi</i> Macfad).....	6
1.1.3. Eterično ulje mandarine (<i>Citrus reticulata</i> Blanco).....	7
1.2. Kromatografija.....	8
1.2.1. Podjela kromatografije.....	9
1.2.2. Kromatografski parametri.....	10
1.2.3. Plinska kromatografija.....	13
1.3. Spektrometrija masa.....	16
1.3.1. Kvadrupolni analizator masa.....	18
1.3.2. Izvor iona.....	19
1.3.3. Tandemska spektrometrija masa.....	20
1.4. Vrednovanje analitičke metode.....	21
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. Korištene kemikalije i oprema.....	23
2.2. Analiza <i>R</i> -(+)-limonena.....	24
2.3. Analiza eteričnih ulja.....	27
2.4. Snimanje fragmenata nastalih kolizijom s dušikom.....	27
2.5. Specifične reakcije prijelaza.....	27
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE.....	29
3.1.1. Spektri masa <i>R</i> -(+)-limonena.....	29

3.1.2.	Optimizacija energije sraza s dušikom.....	30
3.1.3.	Krivulja umjeravanja.....	33
3.2.	VREDNOVANJE METODE.....	35
3.2.1.	Preciznost.....	35
3.2.2.	Točnost.....	36
3.2.3.	Granica dokazivanja i granica određivanja.....	37
3.2.4.	Linearnost.....	38
3.2.5.	Specifičnost.....	38
3.2.6.	Analiza realnog uzorka.....	39
	ZAKLJUČAK.....	40
	LITERATURA.....	41

UVOD

Limonen je jedan od najčešćih komponenti eteričnih ulja aromatskog bilja. Pojavljuje se u obliku dva enantiomera: (*R*)- i (*S*)-limonen. (*R*)-limonen ima prepoznatljiv miris naranče, a može ga se pronaći u citrusima, dok (*S*)-limonen ima miris bora te ga se može naći u bilju poput kima i kopra. Posjeduje ulogu prekursora u biosintezi drugih monocikličnih monoterpena poput karveola, 1,8-cineola i α -terpineola.^[1,2]

Provode se mnogobrojna istraživanja vezana za limonen zbog njegove česte primjene u kozmetici, industriji parfema te prehrambenoj industriji. Limonen pokazuje mnogobrojne korisne medicinske učinke. Ima dobra antimikrobna svojstva, djeluje kao antioksidans, analgetik te ima protuupalni učinak. Primjenom čistog limonena ili eteričnog ulja obogaćenog njime, inhibira se rast kemijski iniciranog raka dojke kod glodavaca zatim raka kože, pluća i predželudca. Limonen u bilju također pokazuje antifungalna svojstva, privlači oprašivače te sudjeluje u obrani biljke od biljojeda. Koristi se kao zamjena toksičnih i kancerogenih sirovina poput benzena i toluena u sintezi proizvoda prirodnog porijekla.^[2]

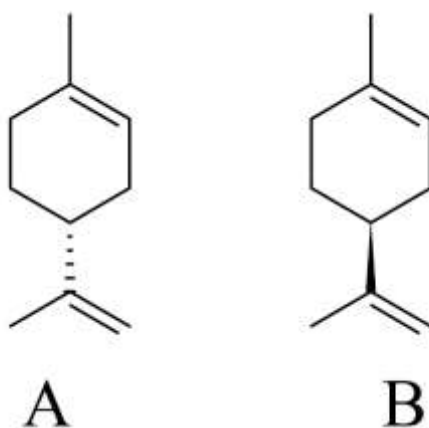
Kromatografija je metoda za odvajanje komponenti smjese s obzirom na njihov afinitet prema stacionarnoj fazi. Kao najpogodniji detektor pokazao se maseni spektrometar zbog svoje velike brzine skupljanja podataka te velike osjetljivosti. Plinska kromatografija u kombinaciji sa kvadrupolnim analizatorom masa je jedna od najboljih analitičkih alata za identifikaciju komponenti iz smjese.^[14,15]

U ovom radu provodilo se kvantitativno i kvalitativno određivanje limonena spregnutom tehnikom GC-MS/MS iz triju eteričnih ulja bogatim limonenom: eterično ulje celera (*Apium graveolens* L.), mandarine (*Citrus reticulata* Blanco) i grejpa (*Citrus x paradisi* Macfad).

OPĆI DIO

1.1.Limonen

Limonen je jedan od najučestalijih komponenti eteričnih ulja aromatskog bilja. Spada u monoterpena te ga se pronalazi u obliku dva enantiomera: (*R*)-limonen/(-)-limonen/D-limonen te (*S*)-limonen/(+)-limonen/L-limonen. Oba enantiomera imaju specifičnu i lako prepoznatljivu aromu.^[1,2]



Slika 1.1. Enantiomeri limonena: A) (*R*)-limonen i B) (*S*)-limonen

Većina 1-*p*-metenskih monoterpena, poput karveola, karvona, α -terpineola, pulogena su derivati limonena. D-limonen je glavna komponenta eteričnih ulja kora *Citrus* vrsta. Također se nalazi u velikim količinama kod nekih *Lippia* i *Artemisia* vrsti. L-limonen se uglavnom pronalazi u eteričnim uljima *Pinus* i *Mentha* vrsta.^[2]

Široko se primjenjuje kao aroma prilikom proizvodnje raznih proizvoda poput parfema, napitaka, deterdženata i sapuna. Koristi se za sintezu raznih prirodnih proizvoda, a kao primjer vrijedi spomenuti *p*-cimen. Zbog široke primjene limonena u industriji i kućanstvu, te njegovom afinitetu ka oksidaciji u prisutnosti ozona, provode se

mnogobrojna istraživanja limonena s ciljem utvrđivanja njegovih biokemijskih i farmakoloških svojstava.^[2]

Nastaje biosintezom iz geranil pirofosfata koja se odvija pomoću stabilnog kationskog intermedijera. Djelovanjem enzima citokroma P450 dolazi do hidroksilacije limonena na C-3 položaju, čime nastaje (-)-*trans*-izopiperitenol, ili na C-6 položaju, dajući (-)-*trans*-karveol. Nastali karveol se dehidrogenira dajući monoterpenoidni karvon. Ova transformacija pruža moguće objašnjenje zašto se karveol pronalazi u tako malim količinama u eteričnim uljima. Monoterpenoidni derivati limonena, poput karveola i 1,8-cineola, su glavne komponente eteričnih ulja vrsta *Mentha* i *Eucalyptus*. Limonen se u kiselom okruženju te u prisutnosti kisika djelomično oksidira čime nastaje α -terpineol i karvon.^[2]

Povećanom potražnjom za „prirodnim“ mirisima i zaslađivačima raste i potreba za proučavanjem i usavršavanjem biotehnološke proizvodnje aromatskih molekula monoterpena poput limonena. Fokus istraživanja je korištenje mikroorganizama za biotransformaciju limonena i drugih monoterpena u njihove oksidirane derivate. Korištenjem *P. gladoioli* bakterija dobiven je jedan od prvih derivata limonena, α -terpineol. α -terpineol je široko rasprostranjen u prirodi te se često koristi u parfemskoj industriji.^[2]

Sirovine koje se koriste za dobivanje prirodnih produkata znaju predstavljati problem jer su često toksične i kancerogene. Tako se primjerice, pri proizvodnji *p*-cimena koriste velike količine benzena sa metilnim i izopropilnim halidima uz katalizatore AlCl₃ ili toluen sa izopropilnim alkoholom. Štetni utjecaji posljedično uzrokuju restrikciju upotrebe navedenih kemikalija, te se pokušava pronaći ekološki prihvatljivija alternativa. Limonen se pokazao kao sigurna i netoksična sirovina za sintezu *p*-cimena. Predstavlja prikladnu zamjenu za spojeve poput benzena i toluena jer u svojoj strukturi sadrži šesteročlani prsten koji se može lako aromatizirati.^[2]

Limonen je od velike važnosti biljkama zbog svojih antifungalnih svojstva te sposobnosti privlačenja oprašivača, ali i predstavlja dio obrambenog mehanizma protiv biljojeda. Zajedno sa drugim monoterpenima smatra se važnim alelopatom kod suhih i toplih klima. Eterična ulja bilja bogatih monoterpenima ulaze u tlo otežavajući razvoj

drugih organizama, tj. usporavaju ili u potpunosti obustavljaju rast drugog bilja u njihovoj blizini.^[2]

Dabbah *et al.* su otkrili kako čisti limonen kao i eterična ulja raznog bilja bogata limonenom imaju dobra antimikrobna svojstva. Pri koncentraciji od 1000 µg/L limonen inhibira rast *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas* vrsti.^[2]

Spojevi poput limonena s izoprenskom strukturom posjeduju antioksidacijska svojstva. Limonen sadrži dvije izoprenske strukturne jedinice, odnosno ima dvije dvostruke veze koje su podložne oksidaciji. Keinan *et al.* su otkrili kako limonen vrlo lako zasiti plućnu membranu štiteći tako plućne stanice od oksidacije.^[2]

Limonen je niskomolekularni lipofilni spoj koji lako zasićuje stanične membrane te djeluje protuupalno. Proučavanjem enantiomera limonena otkriveno je da je (S)-(-)-limonen znatno reaktivniji od L-(+)-limonena. Poznavanje reaktivnosti enantiomera je važno za postizanje željenog farmakološkog djelovanja eteričnih ulja.^[2]

Proučavanjem eteričnog ulja *Dracocephalum kotschyi* koje sadrži 14 % limonena (druga najzastupljenija komponenta nakon verbenona s 21,4 %) dokazano je njegovo analgetičko djelovanje. Korištenjem eteričnog ulja na životinjskim modelima u dozama od 12,5 mg kg⁻¹, 25 mg kg⁻¹, 50 mg kg⁻¹ i 75 mg kg⁻¹ rezultiralo je smanjenjem odgovora na bol za 13,9 %, 43,1 %, 68,7 % i 39,8 %. ED₅₀ vrijednost eteričnog ulja iznosila je 61,61 mg kg⁻¹.^[2]

Provede se mnogobrojna istraživanja vezana za limonen zbog njegovih kemopreventivnih svojstva protiv raznih tipova raka. Primjenom čistog limonena ili ulja narančine kore koja sadrži preko 90 % D-limonena, sprječava se razvoj kemijski iniciranog raka dojke kod glodavaca, raka kože, pluća i predželudca. Limonen, kao i mnogi drugi monoterpeni, sprječava rast stanica tumora obustavljanjem G₁ podfaze staničnog ciklusa, nakon čega slijedi apoptoza, rediferencijacija te regresija tumora pri čemu je parenhim tumora zamijenjen stromom.^[2]

Eterična ulja su moguća alternativa za klasične pesticide pri prezervaciji uskladištenih produkata jer sadrže veliki broj bioaktivnih kemikalija te su kompleksne prirode.

Limonen je ciklički monoterpen insekticidnih svojstava. Pokazao se kao jedan od najučinkovitijih komponenti akaricida prilikom suzbijanja grinja.^[2]

Mature *et al.* testirali su alergenska svojstva oksidirane smjese enantiomera limonena na 2411 pacijenata s dermatitisom. Do alergijske reakcije je došlo kod 2,6 % ispitanika na jedan ili oba oksidirana enantiomera. Kako je limonen jedan od često korištenih mirisa te je podložan oksidaciji, Europska komisija je stoga dodala oksidirani limonen na popis alergena koji se ispituju kod osoba na koje se sumnja da imaju alergiju prema nekom mirisu.^[2]

Odabrana su tri eterična ulja za analizu limonena sadržanog u istima: eterično ulje celera (*Apium graveolens* L.), grejpa (*Citrus x paradisi* Macfad) te mandarine (*Citrus reticulata* Blanco).

1.1.1. Eterično ulje celera (*Apium graveolens* L.)

Celer (Apium graveolens L.)

Celer (*Apium graveolens* L.) spada u porodicu štitarki (*Apiaceae*). Često je korišten u tradicionalnoj medicini jer sadrži spojeve poput limonena, selinena, vitamina C i A, flavonoida te glikozida. Pomaže u sprječavanju kardiovaskularnih bolesti, bolesti jetre, poteškoća urinarnog traka, gihta i reumatskih poremećaja. Regulira krvni tlak, glukozu te lipide u krvi. Posjeduje antifungalna i protupalna svojstva.^[3]

Sjemenke celera koriste se pri tretiranju bronhitisa, astme, kroničnih poremećaja kože te astenopije. Koriijen celera djeluje kao diuretik te se primjenjuje za olakšavanje grčeva želuca. Sadrži polifenolne spojeve koji imaju antioksidacijsko djelovanje. Polifenoli imaju većinom slična kemijska svojstva, odnosno razni polifenolni spojevi mogu neutralizirati slobodne radikale.^[3]

Eterično ulje celera

Eterično ulje celera koristi se u proizvodnji sapuna, kozmetičkoj i parfemskoj industriji. Prvenstveno se proizvodi u Kini, Mađarskoj, SAD-u, Nizozemskoj te Indiji. Njegova glavna komponenta je limonen sa udjelom oko 70%, što je u istoj kategoriji sa uljem kore citrusa. Osim limonena sadrži znatne količine β -selinena i ftalida koji znatno utječu na miris ulja kao i na njegovo djelovanje.^[4]

Primjenjuje se u oralnoj terapiji za pročišćavanje bubrega i jetre. Oralna terapija jetre provodi se tijekom proljeća i jeseni. Također se koristi za uklanjanje staračkih pjega, tzv. hiperpigmentacije nanošenjem na kožu u obliku kreme ili mješavine ulja.^[5]

1.1.2. Eterično ulje grejpa (*Citrus x paradisi Macfad*)

Grejp (Citrus x paradisi Macfad)

Grejp (*Citrus x paradisi Macfad*) je suptropsko citrusno drvo poznato po svom relativno velikom, kiselom, gorkom te ponešto slatkom plodu. Hibrid je slatke naranče (*Citrus sinensis*) i pomela (*Citrus maxima*) te podrijetlom sa Barbadosa.^[6]

Grejp te sok grejpa u kombinaciji sa raznim lijekovima djeluju štetno. To je posljedica prisutnih prirodnih furanokumarina poput 6',7'-dihidroksibergamotina te bergamotina u kori i mesu grejpa. Prisutni furanokumarini inhibiraju enzim imena CYP3A4 kao i ostatak enzima skupine citokroma P450 odgovornih za metabolizam 90 % lijekova. Inhibiranjem CYP3A4 enzima u nekim slučajevima dolazi do nakupljanja lijeka u krvi, dok u drugima dolazi do smanjenja učinkovitog djelovanja lijeka. Grejp također može spriječiti apsorpciju određenih lijekova u crijevima. U tom slučaju ne dolazi dovoljno lijeka u krv te lijek gubi terapijski učinak. Lijekovi koji imaju neželjenu reakciju u prisutnosti grejpa, imaju oznaku na pakiranju da se ne konzumiraju uz grejp.^[6]

Eterično ulje grejpa

Dobiva se hladnim prešanjem kore grejpa. Zbog svojeg medicinskog učinka, već se tisućama godina koristi pri izradi masti i krema za kožu, kao i u svrhu aromaterapije. Eterično ulje grejpa ima sposobnost smanjenja krvnog tlaka, djeluje antimikrobno, antikancerogeno, protuvirusno te povećava otpornost kože.^[7]

Aromaterapiju eteričnim uljem grejpa preporučuju liječnici diljem svijeta za snižavanje stresa i visokog krvnog tlaka. Kod osoba s visokim krvnim tlakom dolazi do trenutnog efekta udisanjem para ugrijanog eteričnog ulja grejpa.^[7]

Glavne komponente eteričnog ulja grejpa su limonen, β -mircen i C-10 aldehidi. Prisutni limonen daje ulju antibakterijsko djelovanje, te se stoga eterično ulje grejpa može koristiti prilikom čišćenja površina. Ulje je također bogato antioksidansima koji pomažu u borbi protiv raka i kardiovaskularnih bolesti. Eterično ulje grejpa djeluje toksično ako se uzima oralno te u velikim dozama može rezultirati smrću.^[7,8]

1.1.3. Eterično ulje mandarine (*Citrus reticulata* Blanco)

Mandarina (Citrus reticulata Blanco)

Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) spada u porodicu *Rutaceae* zajedno sa svojim podvrstama i hibridima. Kao i drugi citrusi podrijetlom je iz suptropskih i tropskih zona Azije, specifično Kine i Vijetnama. Oko 22 %-25 % ukupnog uzgoja citrusa u svijetu otpada upravo na mandarine.^[9]

Izvrstan je izvor vitamina C i A, vlakana, esencijalnih minerala poput kalcija, kalija, magnezija i fosfora. Njezin specifičan okus potječe od prisutnih šećera, kiselina, karotenoida, polifenola, limonoida i vitamina. Vlakna, vitamini te spojevi poput flavonoida daju mandarini njezina ljekovita svojstva. Jestivi dijelovi mandarine bogati su antioksidansima poput karotenoida, vitamina C te fenolnih spojeva. Od neophodne su važnosti za pravilno funkcioniranje tijela te pomažu u sprječavanju raznih kroničnih bolesti.^[9]

Djeluje kao laksativ, afrodizijak, antiemetik te tonik. Kora mandarine pomaže u regulaciji vlage kože, omekšava tvrdu i suhu kožu te se koristi za čišćenje masne kože. Meso i kora mandarine imaju antikancerogeno, neurofarmakološko, antimikrobno, antioksidacijsko djelovanje, štite jetru te suzbijaju kardiovaskularne poremećaje.^[9]

Eterično ulje mandarine

Eterično ulje mandarine ima specifičan osvježavajući miris i okus citrusa te se stoga koristi kao prirodni zaslađivač za napitke, hranu, medicinske pripravke, parfeme i kozmetičke proizvode. Sadrži razne lako isparljive komponente poput aldehida, limonena, ketona, estera, terpena, alkohola, β -mircena, 3-karena te α -pinena koji mu daju prepoznatljiv miris i okus.^[9]

Primjenjuje se kod osoba koje imaju problema sa tjeskobom, nesanicom, depresijom. Pomaže kod osjećaja mučnine te djeluje umirujuće na probavni sustav. Iznimno je nježno i blago te je stoga prikladno za tretiranje štucavice i hiperaktivnosti u djece.^[10,11]

Radi svog ugodno mirisa te antiseptičkog djelovanja, eterično ulje mandarine se često pronalazi u kućanstvu u sastavu sredstava za čišćenje. Eterično ulje mandarine učinkovito suzbija *E. coli*, *K. pneumoniae* te *Salmonella enterica*.^[12,13]

1.2. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda pomoću koje se odvajaju komponente smjese s obzirom na njihovu raspodjelu između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze.^[14]

Kako su iznimno rijetke metode kemijske analize koje su specifične za samo određenu kemijsku vrstu, potrebno je provoditi separaciju željene komponente iz smjese (često najvažniji korak tokom analize). Do sredine prošlog stoljeća separacija se vršila klasičnim analitičkim metodama kao što su destilacija, ekstrakcija i precipitacija. Danas se preferira korištenje kromatografije i elektroforeze, pogotovo ako se radi o kompleksnim uzorcima s velikim brojem komponenti.^[15]

Kromatografiju je otkrio ruski botaničar Mihail Cvet početkom 20. stoljeća. Eluiranjem je uspio izdvojiti razne biljne pigmente poput klorofila i ksantofila. U kolonu koja je bila napunjena granulama kalcijevog karbonata (stacionarna faza) dovodio je otopinu koja je sadržavala biljne pigmente (mobilna faza). Pigmenti su se raspodijelili između mobilne i stacionarne faze stvarajući obojene vrpce unutar kolone, po čemu je ova metoda dobila svoje ime (grč. *chroma* – boja i grč. *graphein* – pisati).^[14,15]

Prilikom provođenja kromatografije komponente od interesa su otopljene u mobilnoj fazi (plin, kapljevina ili superkritični fluid). Mobilna faza se propušta kroz stacionarnu fazu koja je fiksirana unutar kolone ili se pak nalazi na čvrstoj podlozi. Komponente mobilne faze pokazuju različitu raspodjelu između stacionarne i mobilne faze ovisno o tome koliko im stacionarna faza otežava kretanje sa ostatkom mobilne faze. Što je kretanje određene komponente kroz stacionarnu fazu sporije, to se ona duže zadržava unutar kolone. Kako postoji razlika u brzini kretanja komponenti smjese kroz stacionarnu fazu, dolazi do njihovog razdvajanja te nastaju vrpce koje se mogu analizirati kvalitativno i kvantitativno.^[15]

1.2.1. Podjela kromatografije

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na dva načina:

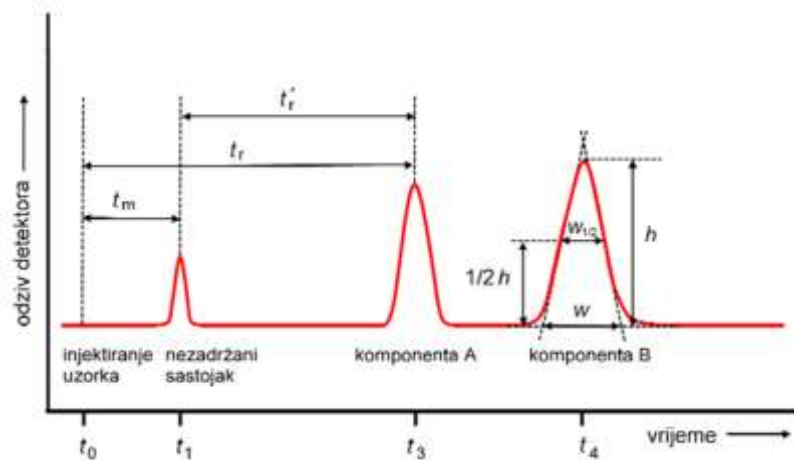
- s obzirom na koji način mobilna i stacionarna faza dolaze u kontakt:
 - kromatografija na koloni – pokretačka sila mobilne faze je tlak
 - plošna kromatografija – mobilna faza se kreće djelovanjem gravitacije ili kapilarnosti
- s obzirom na tip mobilne i stacionarne faze te ravnoteže između njih:
 - plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC)
 - tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC)
 - fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC).^[15]

Tablica 1.1. Klasifikacija kromatografskih tehnika^[15]

Općenita klasifikacija	Specifična tehnika	Stacionarna faza	Priroda ravnoteže
Plinska kromatografija (GC)	a. plinsko-tekućinska	Tekućina je adsorbirana ili vezana za krutu površinu	Raspodjela između plina i tekućine
	b. plinsko-krutinska	Krutina	Adsorpcija
Tekućinska kromatografija (LC)	a. tekućinsko-tekućinska	Tekućina adsorbirana ili vezana za krutu površinu	Interakcija sa ili bez raspodjele između fiksiranih tekućina
	b. tekućinsko-krutinska ili adsorpcijska	Ionska izmjenjivačka smola	Adsorpcija
	c. ionska izmjena	Tekućina smještena u međuprostor polimerne krutine	Ionska izmjena
	d. isključivanja po veličini	Tekućina koja specifično veže određenu skupinu spojeva vezana za površinu krutine	Raspodjela/prosijavanje
	e. afinitetna		Raspodjela između površinske i mobilne tekućine
Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (SFC)		Organske vrste vezane za krutu površinu	Raspodjela između superkritičnog fluida i vezane površine

1.2.2. Kromatografski parametri

Kromatogram je grafički prikaz podataka dobivenih detektorom koji je smješten na izlazu iz kolone. Predstavlja promjenu koncentracije u vremenu ili pak promjenu koncentracije po volumenu dodane mobilne faze. Do razdvojenih profila pojedinih komponenti dolazi ako se afiniteti komponenata uzorka prema stacionarnoj fazi dovoljno razlikuju. Pomoću njega se može provoditi kvalitativna i kvantitativna analiza. Pozicija dobivenih pikova kromatograma se koristi pri identifikaciji komponenti uzorka, dok područje ispod pikova predstavlja količinu pojedine komponente. Na Slici 1.2. prikazan je kromatogram za uzorak koji sadrži dvije komponente (A i B). Komponenta A ima veći afinitet prema stacionarnoj fazi od komponente B, te stoga izlazi iz kolone nakon komponente B, tj. kasnije pokazuje odziv na detektoru.^[14,15]



Slika 1.2. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima^[14]

Prvi pik koji nastaje u t_1 predstavlja nezadržani sastojak unutar kolone. Obično mobilna faza sama po sebi sadržava nezadržani sastojak. Ako ne sadrži onda mu se dodaje nezadržani sastojak kako bi se olakšala identifikacija pikova komponenti od interesa (A i B). Zadržano vrijeme, t_m je vrijeme koje nezadržani sastojak provede u koloni. Ono govori o brzini prolaska mobilne faze kroz kolonu, odnosno o vremenu tijekom kojeg komponente A i B provedu unutar mobilne faze. Važan je parametar za identifikaciju pikova analita. Ukupno vrijeme zadržavanja, t_r je vrijeme koje promatrana komponenta (komponenta A) provede u koloni od trenutka injektiranja uzorka do njezinog dolaska do detektora. Prilagođeno vrijeme zadržavanja, t'_r je vrijeme tijekom kojeg promatrana komponenta (komponenta A) ostvaruje interakciju sa stacionarnom fazom: $t'_r = t_r - t_m$.^[14,15]

Za optimizaciju kromatografije važan je faktor zadržavanja, k' . On predstavlja omjer prilagođenog vremena zadržavanja, t'_r i zadržanog vremena, t_m promatrane komponente:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (1)$$

U idealnom slučaju, kromatografija se provodi pri uvjetima u kojima su faktori zadržavanja u rasponu 1 – 10. Ako mu je vrijednost manja od 1, tada promatrana komponenta izlazi iz kolone odmah nakon nezadržanog sastojka, odnosno ukupno

vrijeme zadržavanja komponente, t_r je gotovo jednako zadržanom vremenu nezadržanog sastojka, t_m . Kada je faktor zadržavanja veći od 20, vrijeme provođenja kromatografije postane predugo.^[15]

Faktor odjeljivanja, α je omjer faktora zadržavanja promatranih komponenti (A i B):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t'_{r(B)}}{t'_{r(A)}} \quad (2)$$

Predstavlja omjer vremena zadržavanja promatranih komponenti. U brojnik se stavlja veća vrijednost, tako da faktor odjeljivanja uvijek ima vrijednost veću od 1. U slučaju da ima vrijednost 1 komponente bi se kretale istom brzinom te ne bi došlo do razdvajanja komponenti.^[15]

Efektivnost kromatografske kolone ovisi stupnju proširenja vrpce do kojih dolazi tijekom kretanja komponente kroz kolonu. Do proširenja vrpce dolazi jer se smanjenjuje koncentracija prisutne komponente zbog čega se teže detektira. Zato se za opisivanje djelotvornosti kromatografske kolone koristi teorijska visina, H i broj tavana, N . Njihova relacija prikazana je jednadžbom:

$$N = \frac{L}{H} \quad (3)$$

L predstavlja dužinu kolone ispunjen stacionarnom fazom. Djelotvornost kromatografske kolone se povećava to što je manja teorijska visina tavana. Kod korištenja različitih kolona, te stacionarnih i mobilnih faza, česte su razlike u djelotvornosti kromatografske kolone reda $10^2 - 10^5$. Povlačenjem tangenta s lijeve i desne strane pika dobiva se trokut sa x-osi. Širina pika, odnosno stranica trokuta w se također može koristiti za određivanje djelotvornosti kromatografske kolone:

$$N = 16 \frac{t_r^2}{w^2} \quad (4)$$

Za precizniju aproksimaciju djelotvornosti koristi se polovina w , tj. $w_{1/2}$, tj. širina polovice pika:

$$N = 5.54 \frac{t_r^2}{w_{1/2}^2} \quad (5)$$

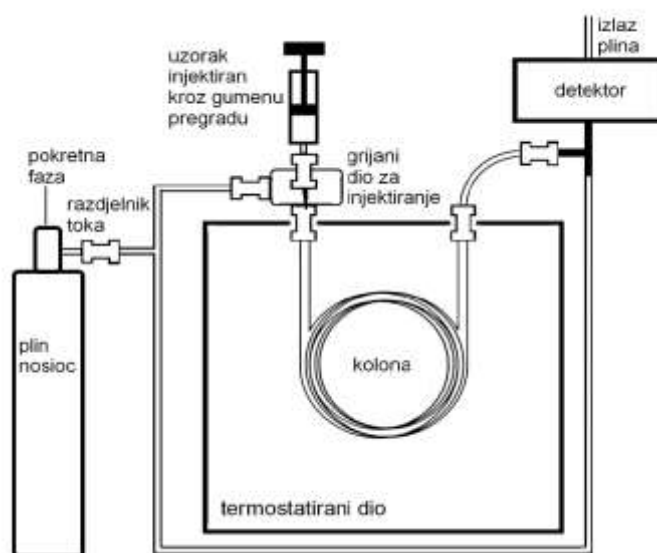
Jednadžbe (4) i (5) daju aproksimaciju djelotvornosti kromatografske kolone jer promatraju pikove kao standardnu Gaussovu raspodjelu.^[15]

Razlučivanje, R_s je mjera udaljenosti dviju vrpca ovisno o njihovoj širini. Ono predstavlja kvantitativnu mjeru mogućnosti kolone da uspješno odvoji prisutne analite.^[15]:

$$R_s = \frac{2[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B} \quad (6)$$

1.2.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je instrumentna tehnika kod koje se komponente plinovitog uzorka raspodjele između mobilne plinovite faze i tekuće ili krute stacionarne faze. Kod plinske kromatografije uzorak se upari i injektira u kromatografsku kolonu. Kao mobilna faza koristi se inertni plin, većinom helij, ali i drugi plinovi poput argona, dušika i vodika. Postoje dva tipa plinske kromatografije: plinsko-tekućinska kromatografija (engl. *gas-liquid chromatography*, GLC) te plinsko-krutinska kromatografija (engl. *gas-solid chromatography*, GSC). Kod GSC koristi se kruta stacionarna faza u kojoj dolazi do fizičke adsorpcije analita. GLC je češće korištena metoda.^[14,15]



Slika 1.3. Shematski prikaz plinskog kromatografa^[14]

Injektori

Kako bi se postigla velika djelotvornost kromatografske kolone, uzorak mora biti prikladne veličine te se nalaziti u plinovitom stanju. Presporo injektiranje ili preveliki uzorci uzrokuju proširenje vrpci, a time slabu rezoluciju rezultata. Zato se koriste kalibrirane mikrošprice za injekciju kapljevutih uzoraka u termostatirani dio za injektiranje (obično 50°C više od temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente uzorka). Kapilarne kolone koriste vrlo male volumene uzorka (1 mL – 10 mL plinovitog uzorka, 0,1 µL – 1,0 µL tekućeg uzorka). Tekući uzorak se injektira djelomično (engl. *split*) ili potpuno (engl. *splitless*) u termostatirani dio za injektiranje. ^[15]

Kako bi se postigla veća brzina, laka kontrola procesa te dobra ponovljivost, danas plinski kromatografi sadrže automatske uzorkivače (engl. *autosampler*) prikazane na Slici 1.4. Šprica automatskog uzorkivača uzima uzorak kroz gumenu pregradu bočice s uzorkom te ga potom injektira kroz gumenu pregradu kromatografa. Ponovljivost sustava s automatskim uzorkivačem je jako dobra sa relativnim standardnim odstupanjem od 0.3%. ^[15]



Slika 1.4. Automatski uzorkivač^[15]

Kolone

Postoje dva osnovna tipa kolona kod plinske kromatografije:

- punjene kolone (engl. *packed columns*)
- kapilarne kolone (engl. *open-tubular columns*)

Danas se većinom koriste kapilarne kolone jer pokazuju veću djelotvornost kromatografske kolone. Kromatografske kolone imaju dužinu oko 2 do 60 m ili još veću. Izrađene su od nehrđajućeg čelika, stakla, teflona, silicija. Kako bi se mogle umetnuti u termostatirani dio kromatografa, namotane su u svitke s promjerom oko 10 – 30 cm.^[15]

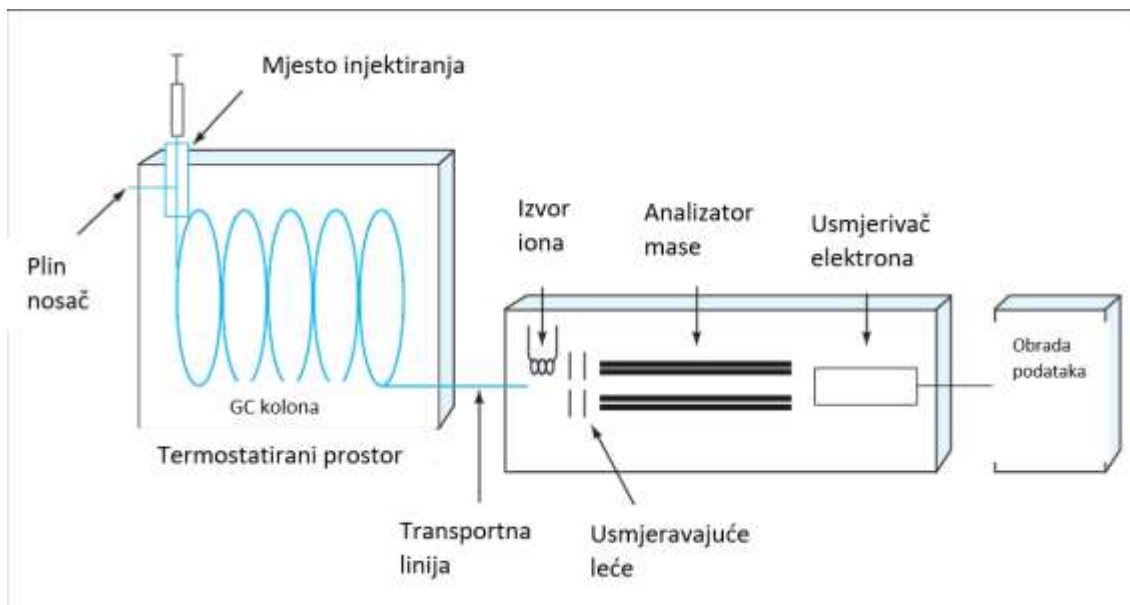
Jedna od važnih varijabli kod plinske kromatografije je temperatura na koju je termostatirana kolona smještena na termostatiranom dijelu. Optimalna temperatura kolone ovisi o vrelištu uzorka te željenom stupnju razdvajanja. U većini slučajeva temperatura je jednaka ili malo ispod prosječne temperature vrelišta uzorka, što rezultira mjerenjem koje može trajati 2 min – 30 min. Kod uzoraka sa širokim rasponom vrelišta koristi se temperaturni program (engl. *temperature programme*), pri kojem temperatura raste kontinuirano ili u koracima tijekom provođenja procesa. Općenito, optimalno odvajanje je vezano uz minimalnu temperaturu. No, pri nižim temperaturama vrijeme mjerenja se povećava, a time i vrijeme provođenja analize.^[15]

Detektori

Detekcija prisutne komponente u uzorku vrši se pomoću detektora. Kao detektori plinske kromatografije koriste se često spektroskopski instrumenti poput masenog i infracrvenog spektrometra. Kod takvih sustava moguća je izravna identifikacija prisutnih komponenti u uzorku.^[15]

Idealan detektor je onaj koji pokazuje dobru osjetljivost (obično oko 10^{-8} – 10^{-15} g komponente s^{-1}), je stabilan, dobro ponovljiv, pokazuje linearni odaziv kod više redova veličina, primjenjivo u širokom temperaturnom području (od sobne temperature do 400°C), ima kratko vrijeme odziva koje je neovisno o protoku mobilne faze, treba biti jednostavan za korištenje te teško uništiv.^[15]

Jedan od najboljih detektora za plinsku kromatografiju je spektrometar masa (engl. mass spectrometer). Spregnuta tehnika plinske kromatografije s masenim spektrometrom poznata je kao GC/MS.^[15]



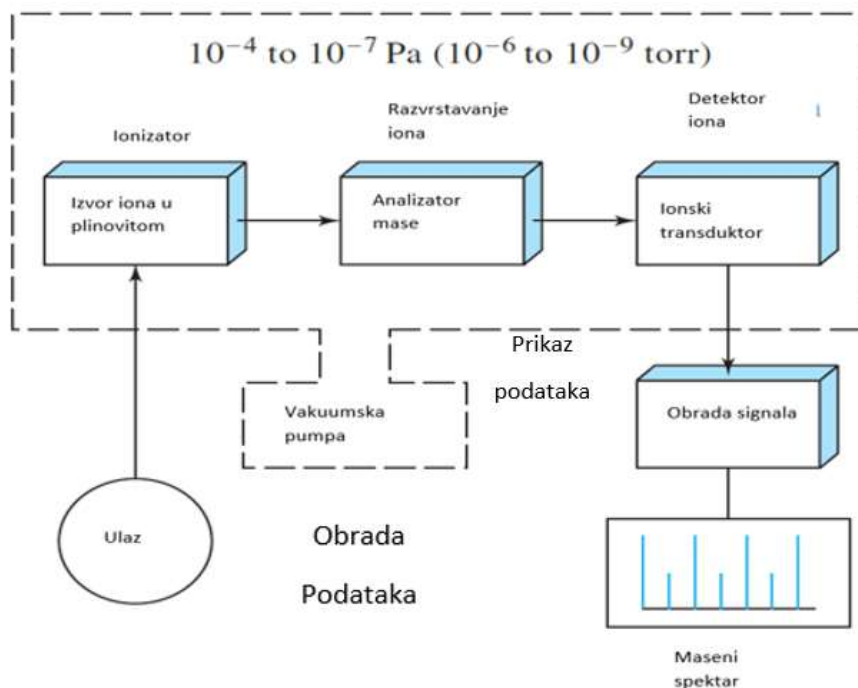
Slika 1.5. Shematski prikaz GC/MS sustava^[15]

1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika s najširoom primjenom jer se njome može odrediti elementni sastav uzorka, struktura anorganskih, organskih i bioloških molekula, kvalitativna i kvantitativna kompozicija kompleksnih smjesa, struktura i kompozicija čvrstih površina te udjeli izotopa pojedinih atoma u smjesi.^[15]

Spektrometar masa je instrument u kojem nastaju ioni te se potom razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z). Na Slici 1.6. prikazana je shema rada spektrometra masa. Na ulazu se uvodi mikro količina uzorka u ionizator gdje je bombardiran elektronima, fotonima, ionima ili molekulama čime nastaju plinoviti ioni uzorka.

Ionizacija može biti popraćena dovođenjem toplinske ili električne energije. Dobiveni ioni uzorka se potom ubrzavaju i ulaze u analizator mase. U njemu dolazi do razdvajanja iona na temelju m/z .^[15]



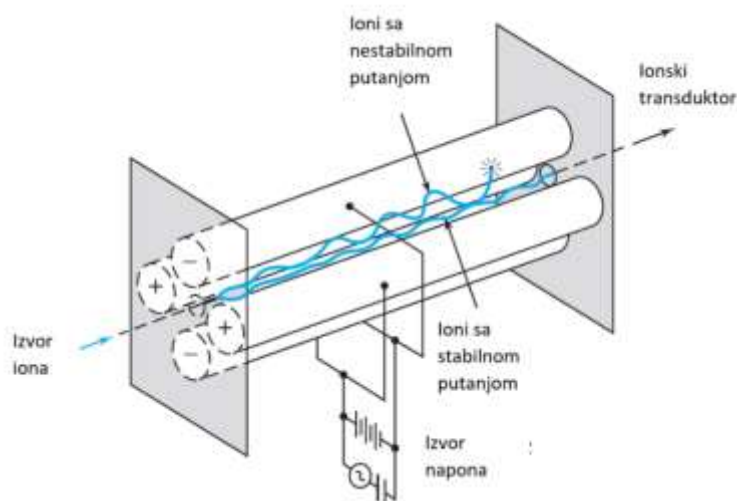
Slika 1.6. Shematski prikaz spektrometra masa^[15]

Kao i optički spektrometar, spektrometar masa sadrži transduktor koji konvertira zraku iona u električni signal koji se može potom dalje obrađivati na računaru. Za razliku od optičkog spektrometra, spektrometar masa zahtjeva niski tlak u sustavu. Niski tlak sprječava sudaranje iona uzorka sa česticama atmosfere.^[15]

1.3.1. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa (engl. *quadrupole mass analyzer*) je najčešće korišteni spektrometar masa kod spektroskopije masa prikazan na Slici 1.7. Ovaj analizator je kompaktniji, povoljniji, brži (cijeli spektar masa se može dobiti u manje od 100 ms) i veće izdržljivosti naspram većine drugih analizatora masa.^[15]

Slika 1.7. Shema kvadrupolnog analizatora mase^[15]



Kvadrupolni analizator sastoji se od četiri paralelno smještene cilindrične elektrode. Nasuprotne elektrode se povezuju tako da se jedne vežu na pozitivni izvor izmjeničnog napona, a druge na negativni. Ioni se ubrzavaju i ulaze u analizator pod utjecajem razlike potencijala od 5 do 10 V. Tako ubrzani ioni sudaraju se sa elektrodama i neutraliziraju. Samo ioni određenih vrijednosti m/z dosegnu ionski transduktor. Dakle, kvadrupolni analizator mase se ponaša poput filtra masa kroz kojeg mogu proći samo određene čestice, odnosno čestice određenih vrijednosti m/z .^[15]

1.3.2. Izvor iona

Mogućnost primjene spektrometra masa određena je ionizacijom analita. Izgled spektra masa određene grupe spojeva ovisi o načinu formiranja iona analita. U Tablici 1.2. navedeni su ionski izvori koji se koriste u spektrometriji masa.^[15]

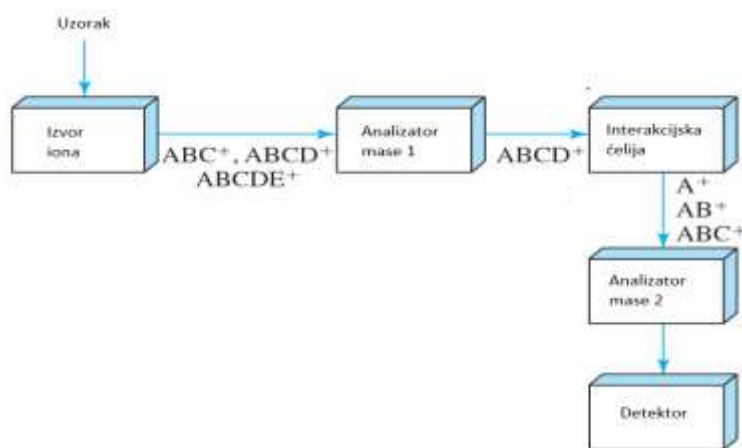
Tablica 1.2. Ionski izvori za spektrometriju masa ^[15]

Osnovna podjela	Tip ionizacije	Način ionizacije
Plinovita faza	Ionizacija elektronima (EI) Kemijska ionizacija (CI) Ionizacija poljem (FI)	Ubrzani elektroni Reakcija s plinovitim ionima Visokonaponska elektroda
Desorpcija	Desorpcija polja (FD) Elektoraspršivanjem (ESI) Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) Desorpcija plazmom (PD) Bombardiranjem brzim atomima (FAB) Sekundarnim ionima (SIMS) Termoraspršivanjem (TS)	Visokonaponska elektroda Električno polje Laserski snop Fisijski fragmenti ²⁵² Cf Snop atoma Snop iona Visoka temperatura
Desorpcija okoline	Desporpcija elektoraspršenja (DESI) Direktna analiza u vremenu ((DART)	Nabijene kapljice Uzbuđeni atomi ili molekule

Kod primjene izvora u plinovitoj fazi uzorak se najprije mora upariti, pa se potom ionizira. Kod desorpcijskih izvora kruti ili tekući izvor se konvertira direktno u plinovite ione. Prednost kod korištenja desorpcijskih izvora je činjenica da su prikladni za termički nestabilne uzorke. Desorpcija okoline omogućava desorpcijsku ionizaciju s minimalnim prvotnim tretiranjem uzorka. Komercijalni spektrometri masa sadrže dodatke koji omogućavaju izmjenično korištenje pojedinih ionskih izvora.^[15]

1.3.3. Tandemska spektrometrija masa

Spektrometrija masa u tandemu (engl. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) podrazumijeva više povezanih analizatora masa. Ovim načinom je moguće dobiti spektre masa samo određenih fragmentiranih iona. Ioni iz ionizatora ulaze u prvi analizator mase, dolazi do raspodjele s obzirom na vrijednosti m/z . Samo ioni određene vrijednosti m/z izlaze iz prvog analizatora te ulaze u interakcijsku/kolizijsku ćeliju. U interakcijskoj ćeliji dolazi do spontane disocijacije iona, reakcije iona s kolizijskim plinom ili raspada iona na fragmente utjecajem laserskog snopa. Novonastali se ioni potom analiziraju u sljedećem analizatoru i detektiraju ionskim detektorom.^[15]



Slika 1.8. Shematski prikaz tandemske spektrometrije masa^[15]

Trostruki kvadrupol

Trostruki kvadrupol je primjer spektrometrije masa u tandemu gdje se dva zasebna analizatora mase koriste na dvama različitim mjestima u prostoru. Kod ovakve izvedbe kao izvor iona koriste se npr. CI ili FAB izvori. Nastali ioni se ubrzavaju i ulaze u prvi kvadrupol (Q), koji ima funkciju običnog masenog filtra. Ioni određene vrijednosti m/z koji uspiju izaći iz prvog analizatora ulaze u sljedeći kvadrupol (q). U njemu dolazi do disocijacije prisutnih iona djelovanjem kolizije s neutralnim plinom. Zatim ioni ulaze u

treći kvadrupol (Q) gdje se provodi analiza mase iona formiranih u prethodnom kvadrupolu (q).^[15]

1.4. Vrednovanje analitičke metode

Vrednovanje analitičke metode se provodi s ciljem određivanja da li je promatrana metoda prikladna za provođenje željenog procesa. Promatra se njezina ponovljivost, osjetljivost, stabilnost analita, lakoća provođenja analize, vrijeme trajanja i troškovi procesa, da li je potrebno provođenje standardizacije ili ne i sl.^[16,17]

Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) kao osnovne parametre vrednovanja analitičke metode navodi: preciznost (ponovljivost, obnovljivost, srednja preciznost), točnost, specifičnost, granica detekcije, kvantitativna granica, raspon te linearnost.^[16]

Preciznost procesa govori o stupnju raspršenosti, odnosno o stupnju preklapanja podataka dvaju ili više mjerenja provedenih na potpuno identičan način. Preciznost je moguće promatrati na tri načina:

- **Srednja preciznost** govori o uvjetima unutar laboratorija (za pojedine dane, razlike između korištenih analiza, itd.)
- **Ponovljivost** predstavlja preciznost mjerenja pri konstantnim uvjetima u malim vremenskim intervalima
- **Obnovljivost** daje uvid o preciznosti između laboratorija.^[16]

Specifičnost je sposobnost određivanja određenog analita u prisutnosti drugih komponenti (npr. onečišćenje, matrica).^[16]

Točnost govori o podudaranju podataka s pravom ili očekivanom vrijednosti. Može se prikazati kao apsolutna i relativna pogreška.^[14]

Granica dokazivanja (GD) analitičke analize predstavlja najmanju koncentraciju analita pri kojoj se može dokazati prisutnost analita bez njegove kvantifikacije.^[16]

Linearnost govori o sposobnosti metode da unutar određenih granica daje rezultate koji su direktno proporcionalni količini (koncentraciji) analita u uzorku.^[16]

Granica određivanja (GO) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa određenom preciznosti i točnosti.^[16]

Raspon predstavlja interval između najmanje i najviše koncentracije analita u uzorku za koju određena metoda pokazuje prikladnu razinu točnosti, preciznosti te linearnosti.^[16]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištene kemikalije i oprema

Tablica 2.1. Korištene kemikalije

Naziv	Kemijska formula glavne komponente	Relativna molekulska masa	CAS broj	Proizvođač	Čistoća
Eterično ulje mandarine	Limonen $C_{10}H_{16}$	136,24 g mol ⁻¹	/	Pranarom International	100%
Eterično ulje grejpa			/	Pranarom International	100%
Eterično ulje celera			/	Pranarom International	100%
<i>R</i> -(+)-limonen			5989-27-5	Fluka	≥ 99%
n-heksan	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	86,18 g mol ⁻¹	110-54-3	BDH Prolabo UK	≥ 97%



Slika 2.1. Kemikalije korištene za pripremu standardnih otopina

Popis korištene opreme:

- analitička vaga: AT261 DR (Mettler Toledo, SAD)
- plinski kromatograf: 8890 GC System (Agilent Technologies, SAD)
- kolona: HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm (Agilent Technologies, SAD)
- automatski uzorkivač: 7693A Autosampler (Agilent Technologies, SAD)
- mehaničke pipete: Tacta (Sartorius, Njemačka)
- spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom 7000D GC/TQ (Agilent Technologies, SAD).

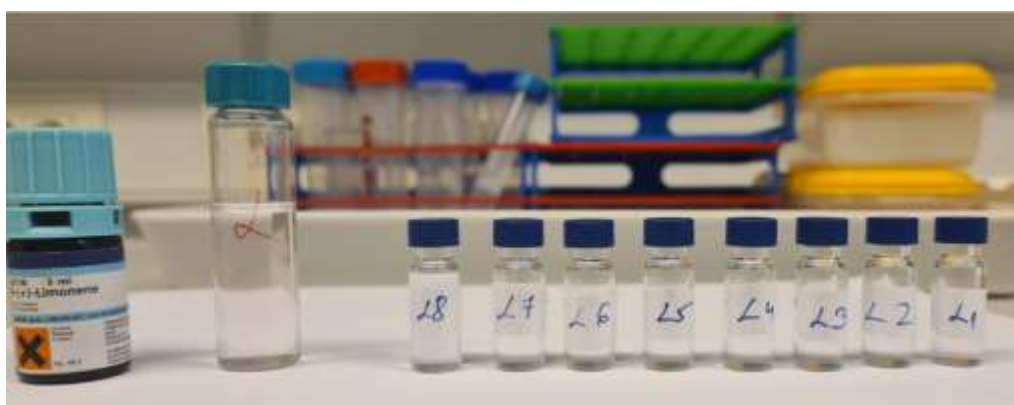


Slika 2.2. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom i automatskim uzorkivačem 8890 GC-7000D GC/TQ (Agilent Technologies, SAD)

2.2. Analiza *R*-(+)-limonena

Pripremljeno je osam uzoraka miješanjem *R*-(+)-limonena sa *n*-heksanom u različitim omjerima, kako bi se dobili uzorci koncentracija 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100 i

50, sve $\mu\text{g mL}^{-1}$. Potom su uzorci injektirani pomoću automatskog uzorkivača u plinski kromatograf spregnut s tandemskim spektrometrom masa (GC-MS/MS). Dolazi do razdvajanja komponenti u plinovitom stanju interakcijom sa stacionarnom fazom kolone. Izlaskom iz kolone analit ulazi u trostruki kvadrupol. U prvome dolazi do selekcije iona s obzirom na omjer njihove mase i naboja, m/z . Sljedeća dva kvadrupola propuštaju izdvojene ione određene vrijednosti m/z sve do detektora. Primijenjena je modificirana R. P. Adamsova metoda koja se često koristi za analizu eteričnih ulja.^[18]



Slika 2.3. Prikaz pripremljenih uzoraka miješanjem *R*-(+)-limonena sa *n*-heksanom u različitim omjerima

Radni uvjeti plinskog kromatografa:

- plin nosioc: helij
- temperatura injekcijskog bloka (engl. *inlet*): 250°C
- protok plina nosioca: 1 mL min⁻¹
- omjer raspodjele (engl. *split mode*): 50:1
- brzina povećanja temperature: 35 °C min⁻¹
- konačna temperatura peći: 246 °C (izotermno zadržavanje 1:3 min)
- volumen injektiranog uzorka: 1 µL
- početna temperatura peći: 60°C (izotermno zadržavanje 2:3 min)
- temperatura „transfer line“: 280°C
- trajanje mjerenja: 12 min.

Radni uvjeti spektrometra masa:

- odgoda snimanja (engl. *solvent delay*): 3 min, s ciljem izbjegavanja preopterećenja ionskog izvora prilikom ionizacije velike količine otapala koje eluira s kolone u tom vremenu
- raspon m/z : 40 – 450
- temperatura kvadrupola: 150°C
- temperatura ionskog izvora: 230°C
- ionizacijski potencijal: 70 eV.

Za svih osam uzoraka snimljen je kromatogram i zabilježen najveći signal. Dobiveni maseni spektri uspoređeni su sa spektrima masa iz baze podataka: Wiley (engl. *The Wiley Registry of Mass Spectral Data*) i NIST (engl. *National Institute of Standards and Tehnology*), čime je potvrđena prisutnost limonena te su izabrani početni ioni za daljnju analizu.

2.3. Analiza eteričnih ulja

Pripremljeni su uzorci eteričnih ulja mandarine, celera te grejpa otapanjem 1,75 μg eteričnog ulja u 1 mL heksana. Tako pripremljeni uzorci injektirani su u GC-MS/MS te analizirani. Uzorak eteričnog ulja celera je dodatno razrijeđen zbog velike koncentracije limonena, te ponovno analiziran pomoću GC-MS/MS.

Radni uvjeti plinskog kromatografa i masenog spektrometra su jednaki onima iz Poglavlja 2.2.

2.4. Snimanje fragmenata nastalih kolizijom s dušikom

Za svaki uzorak, tj. za svaki snimljeni spektar masa odabrana su dva do tri signala. Ti signali predstavljaju fragmente s najvećim odzivom, tj. početne ione. Tako izdvojeni ioni određene vrijednosti m/z ulaze u interakcijsku ćeliju gdje dolazi do njihove disocijacije tokom kolizije sa inertnim dušikom. Dobiveni fragmenti se analiziraju u posljednjem kvadrupolnom analizatoru masa.^[15]

Spomenuti fragmenti snimaju se pri različitim energijama sraza. Iz dobivenih spektra masa pri različitim energijama sraza s dušikom pronađene su specifične reakcije prijelaza (fragmentacije).

2.5. Specifične reakcije prijelaza

Kod MRM/SIM (engl. *Multiple/Selected reaction monitoring*) praćenja, prvi i treći kvadrupolni analizatori masa služe za analizu/propuštanje samo određenog iona, tj. fragmenta. Iz dobivenog spektra masa limonena, odabran je fragment s najvećim odzivom. Do izdvajanja tog željenog fragmenta od ostalih dolazi u prvom kvadrupolu. Spomenuti potom ulazi u interakcijsku ćeliju gdje dolazi do njihove daljnje fragmentacije tijekom sudara sa neutralnim molekulama dušika. Novodobiveni fragmenti ulaze zatim u posljednji (treći) kvadrupol koji propušta samo određeni fragment do detektora.^[18]

Praćenje specifičnih reakcija prijelaza pri različitim energijama sraza sa dušikom se provodi s ciljem pronalaska optimalne energije sraza za pojedinu reakciju nastajanja specifičnog fragmenata pri kojoj je odziv detektora najveći.

Uvidom u maseni spektar fragmenta svakog uzorka, određen je najveći odziv koji predstavlja kvantitativni prijelaz te dva potvrdna, odnosno kvalitativna prijelaza.^[18]

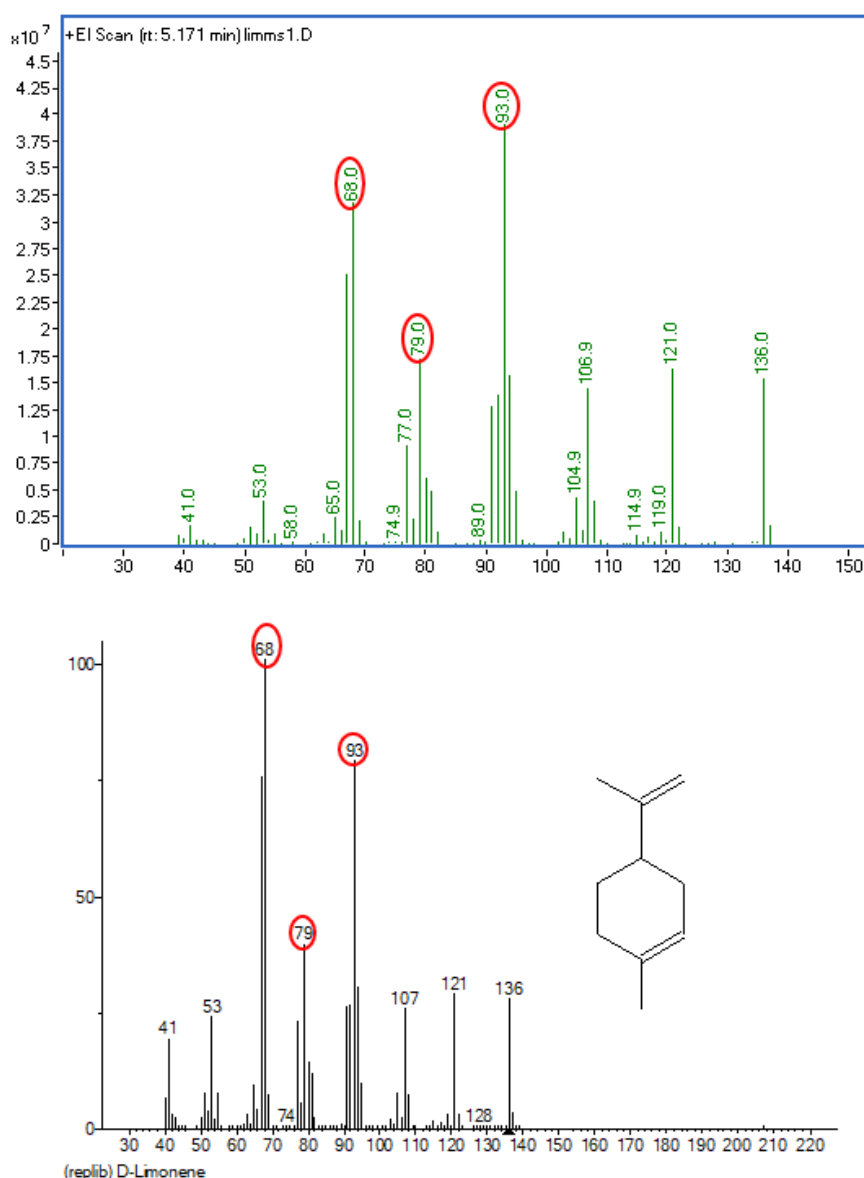
Tokom MRM snimanja uzoraka limonena praćene su tri specifične reakcije prijelaza (fragmenti 79, 93 i 68). Vrijeme zadržavanja iznosi, $t_r = 5,54$ min.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE

3.1.1. Spektri masa limonena

Dobiveni spektri masa limonena uspoređeni su sa spektrom mase iz baze podataka. Na Slici 3.1. prikazano je podudaranje eksperimentalnih i masenog spektra iz baze podataka, čime je potvrđeno da je odabrani uzorak uistinu limonen.



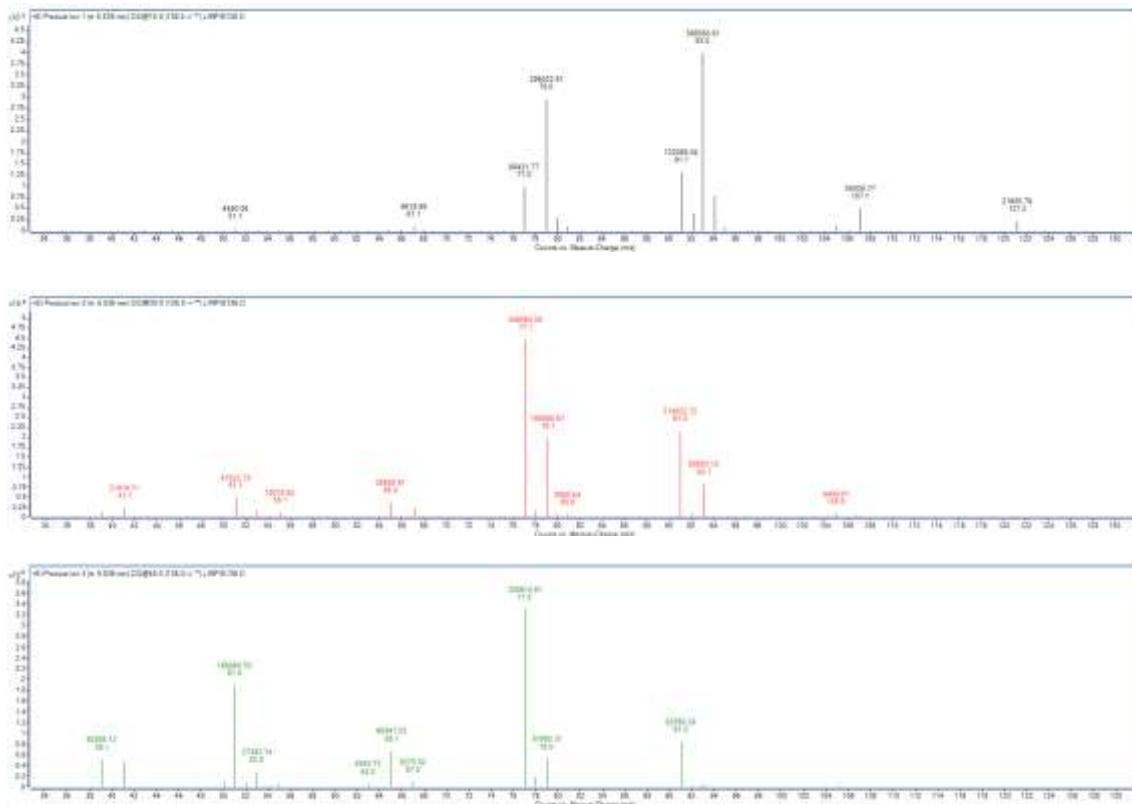
Slika 3.1. Usporedba eksperimentalnog spektra masa (gore) i spektra masa iz NIST baze podataka (dolje) za limonen

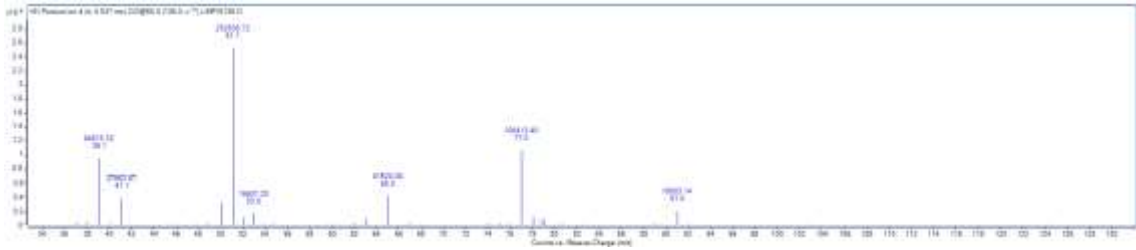
Za daljnju analizu odabrana su molekularni ion $m/z = 136$ te dva karakteristična fragmenta: $m/z = 68$; 93 .

3.1.2. Optimizacija energije sraza s dušikom

Kao što je već spomenuto u Poglavlju 3.1.1., iz spektra masa limonena prikazanog na Slici 3.1. odabrana su dva fragmenta, odnosno iona ($m/z = 68$ i $m/z = 93$) za optimizaciju masene spektrometrije korištenjem različitih energija sraza te određivanje kvalitativnih i kvantitativnih prijelaza.

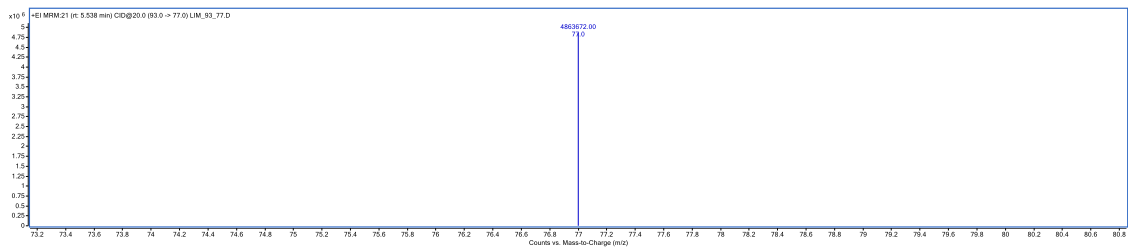
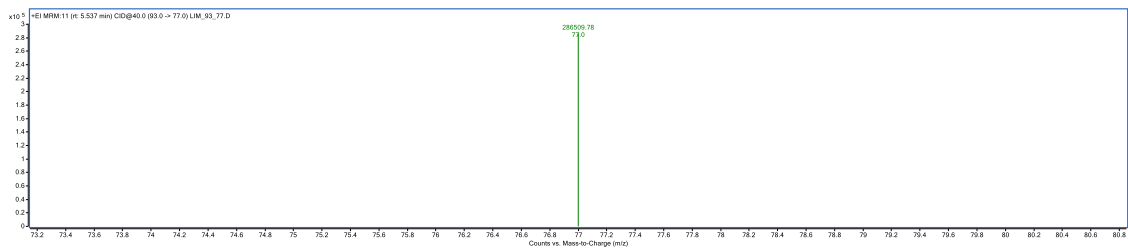
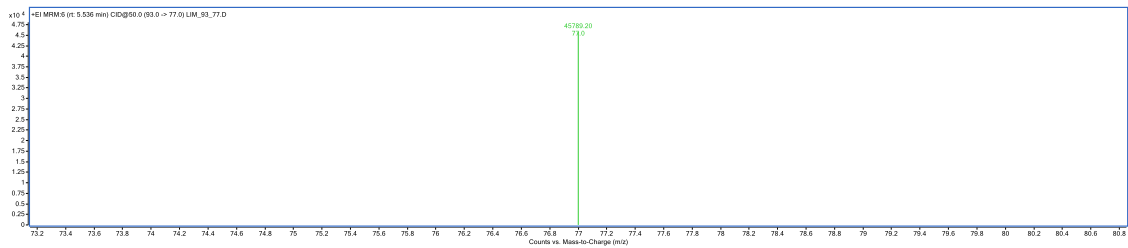
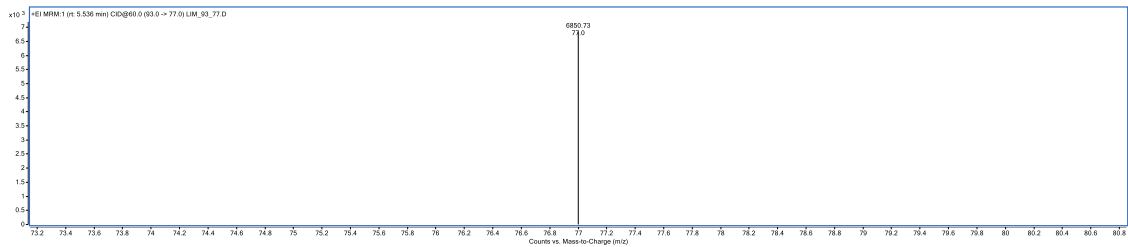
Za svaki odabrani fragment snimljen je spektar masa pri različitim energijama sraza s neutralnim inertnim molekulama dušika. Svaka specifična reakcija praćena je pri 30 različitih energija, čime je snimljeno 30 spektara masa po prijelazu. Proces je proveden na identičan način za svaki fragment. Iz dobivenih spektra odabrani su prijelazi koju su pokazali najveći odziv prema detektoru (Slike 3.3, 3.4. i 3.5.).

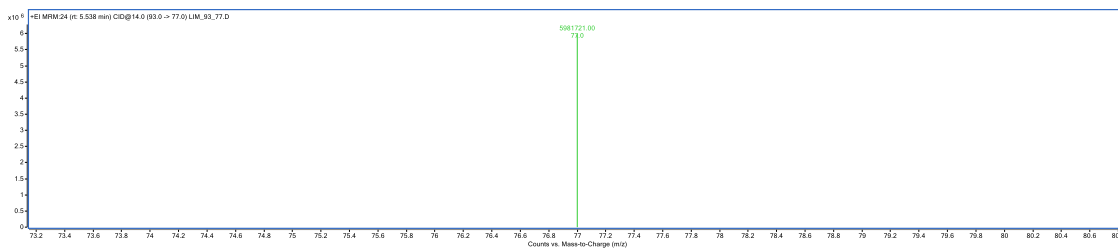




Slika 3.2. Snimljeni spektri mase molekularnog iona $m/z = 136$ nakon sraza s dušikom pri 15 eV, 30 eV, 45 eV, 60 eV

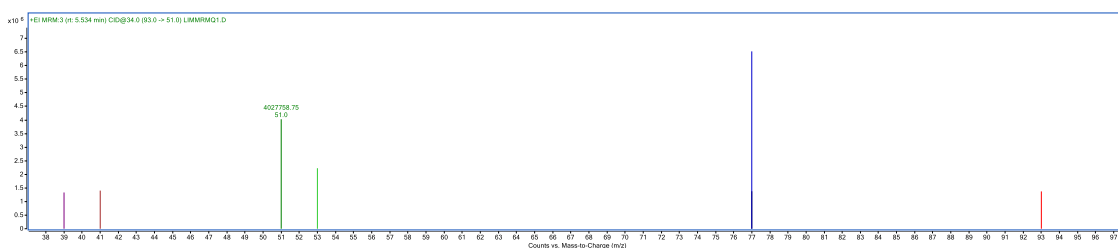
Iz Slike 3.2. odabrani produkti disocijacije molekularnog iona $m/z = 136$, pri korištenim energijama sraza s dušikom, su fragmenti $m/z = 77$, $m/z = 93$ te $m/z = 68$. Dobivene su tri specifične reakcije prijelaza: $136 \rightarrow 93$; $136 \rightarrow 77$; $136 \rightarrow 68$.





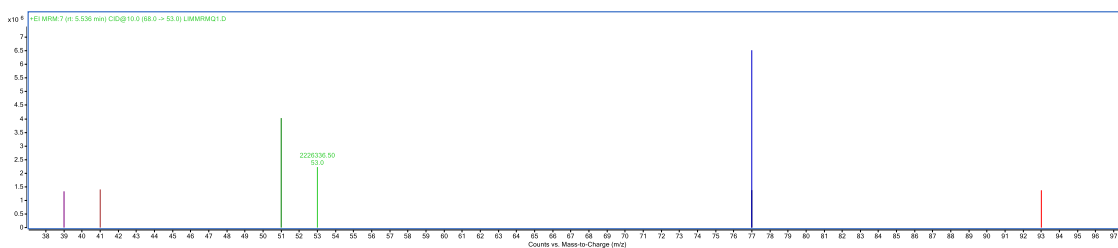
Slika 3.3. Specifična reakcija prijelaza $93 \rightarrow 77$ pri eV, 50 eV, 40 eV, 20 eV, 14 eV

Na Slici 3.3. prikazana je specifična reakcija prijelaza $m/z = 93$ u $m/z = 77$ pri energijama sruza od 60 eV, 50 eV, 40 eV, 20 eV te 14 eV. Najveći odziv zapažen je pri 14 eV. Dakle, optimalna energija sruza za prijelaz $93 \rightarrow 77$ je 14 eV.



Slika 3.4. Specifična reakcija prijelaza $93 \rightarrow 51$ pri 34 eV.

Na Slici 3.4. prikazana je specifična reakcija prijelaza $93 \rightarrow 51$ pri energiji sruza s dušikom od 34 eV. Odabran je ovaj specifičan spektar masa jer je pri energiji od 34 eV prijelaz $93 \rightarrow 53$ dao najveći odziv prema detektoru.



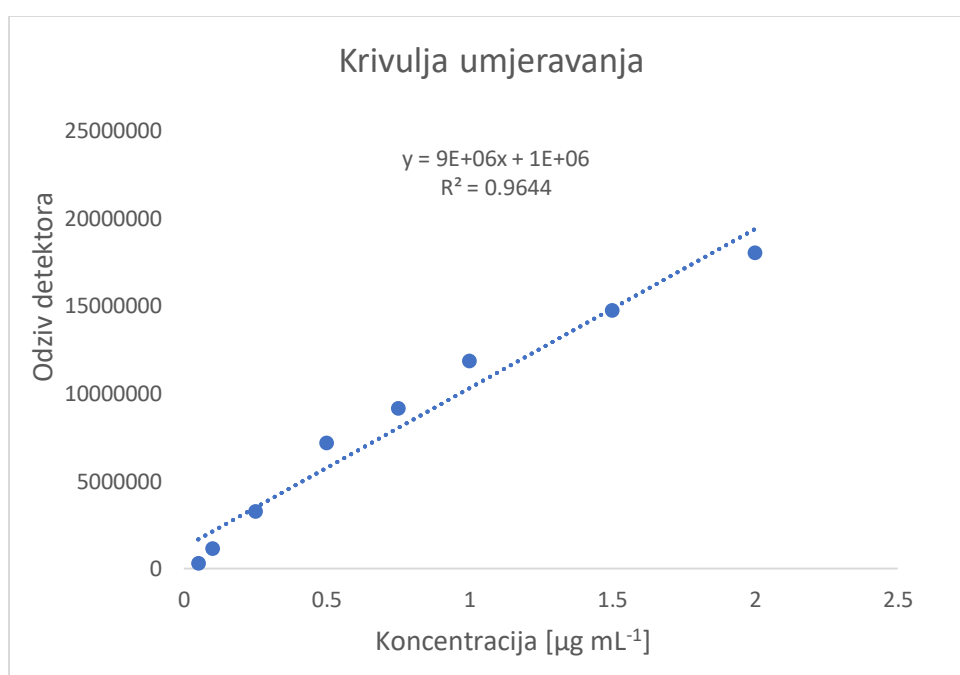
Slika 3.5. Specifična reakcija prijelaza $68 \rightarrow 53$ pri 10 eV

Na Slici 3.5. prikazan je prijelaz $68 \rightarrow 53$ pri 10 eV jer pri toj energiji ova specifična reakcija prijelaza daje najveći odziv prema detektoru.

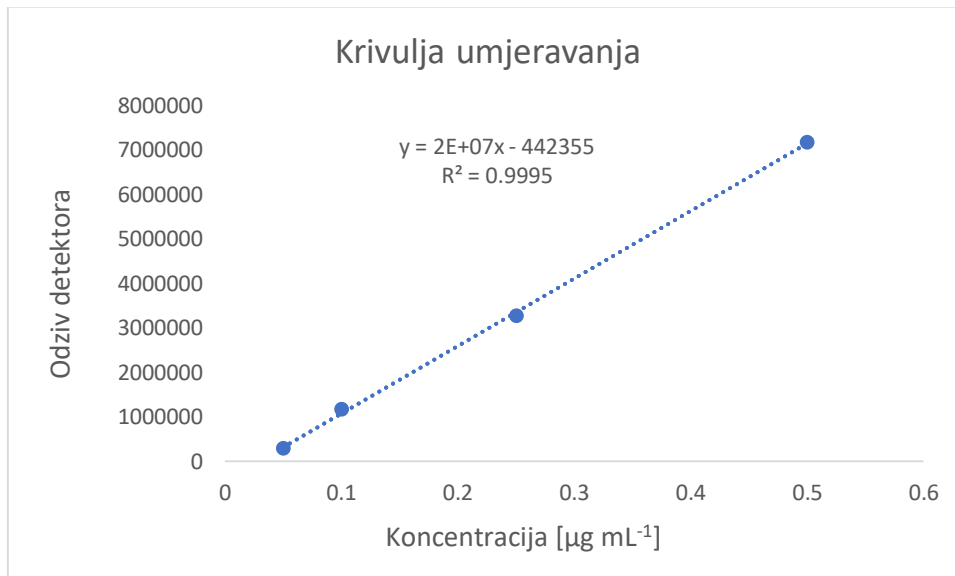
Najveći odziv prema detektoru ima specifična reakcija prijelaza $93 \rightarrow 77$ pri 14 eV, te je stoga ona uzeta za kvantitativni prijelaz. Kao kvalitativni prijelazi uzete su prijelazi $93 \rightarrow 51$ pri 34 eV i $68 \rightarrow 53$ pri 10 eV.

3.1.3. Krivulja umjeravanja

Za izradu krivulja umjeravanja pripremljeno je osam uzorka koncentracija od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Iz Slike 3.6. vidljivo je da dolazi do velikih odstupanja od linearnosti pri koncentracijama $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno dolazi do pojave heteroskedastičnosti. Potrebno je eksperimentalne podatke razdvojiti u dvije krivulje umjeravanja koje će dati zadovoljavajuću homoskedastičnost, tj. standardno odstupanje (Slike 3.7. i 3.8.).^[19]

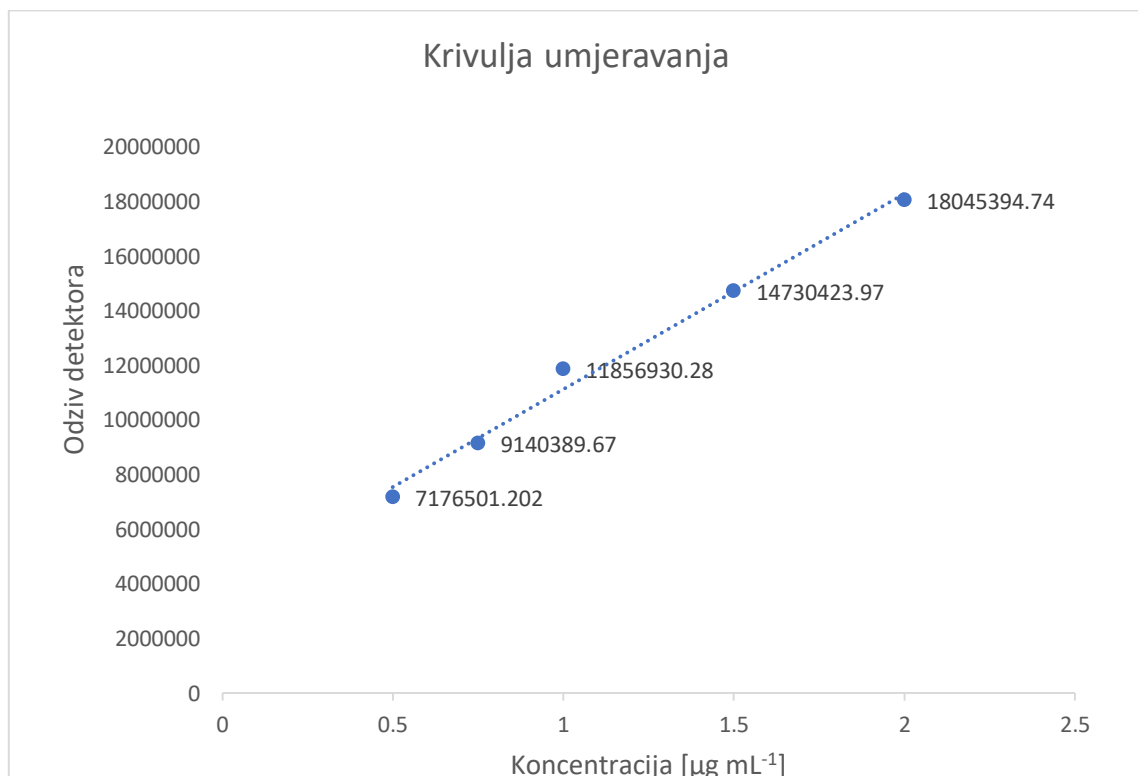


Slika 3.6. Krivulja umjeravanja limonena za $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 3.7. Krivulja umjeravanja limonena za $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $500 \mu\text{g mL}^{-1}$

Na Slici 3.7. prikazana je krivulja umjeravanja za limonen za koncentracijsko područje od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 3.8. Krivulja umjeravanja limonena za $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$

Na Slici 3.8. prikazana je krivulja umjeravanja za limonen za koncentracijsko područje od 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2. VREDNOVANJE METODE

3.2.1. Preciznost

Preciznost metode prikazana je preciznošću injektiranja (preciznost instrumenta).

Preciznost injektiranja

Preciznost injektiranja predstavlja mjeru preciznosti instrumenta. Vrednovanje preciznosti injektiranja provedeno je injektiranjem limonena koncentracije 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u instrument šest puta. Za svako injektiranje određena je koncentracija uzorka iz odziva prema detektoru te korištenjem krivulje umjeravanja. Iz dobivenih podataka određeno je relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*, RSD) za svih šest injektiranja (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Preciznosti injektiranja 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ limonena

Injektiranje	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
1	46,43
2	49,79
3	46,69
4	45,48
5	45,66
6	45,26
RSD (%)	3,29

3.2.2. Točnost

Točnost govori o podudaranju podataka izračunato dobivenih vrijednosti i očekivanih vrijednosti koncentracija, te je izražena kao iskoristivost (Tablica 3.2.). Zadovoljavajućom iskoristivosti se smatra 80 % – 120 %.^[16,19] Iz podataka u Tablici 3.2. vidljivo je da je raspon iskoristivosti zadovoljava raspon od 80% do 120 % u uzorcima svih koncentracija limonena (95,84 % – 110,35 %). Iskoristivost za koncentracije limonena od 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ određene su korištenjem podataka krivulje umjeravanja sa Slike 3.7., dok za područje od 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ je korištena krivulja umjeravanja prikazana na Slici 3.8.

Tablica 3.2. Iskoristivost limonena

Očekivana koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Računska koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Iskoristivost (%)
50	47,92	95,84
100	105,58	105,58
250	244,81	97,92
500	501,69	100,34
750	724,61	96,61
1000	11035,49	110,35
1500	1473,04	100,29
2000	1804,54	98,34

3.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja

Kako svaki instrument ima određenu minimalnu koncentraciju koju može odrediti, odnosno razlikovati od šuma, granica dokazivanja i granica određivanja su ključni parametri kada se provode ispitivanja uzorka vrlo niskih koncentracija. ICH je definirao kriterij odnosa signala i šuma koja za granicu određivanja iznosi 10, a za granicu dokazivanja 3.^[16]

Tablica 3.3. Odzivi detektora dobiveni uzastopnim injektiranjem 50 µg mL⁻¹ limonena

Injektiranje	Odziv	S/N
1	262794,71	6790,36
2	313735,91	9775,89
3	266631,831	4885,48
4	248253,08	6602,31
5	251083,15	5412,78
6	244993,72	3444,99

Za određivanje granica dokazivanja (GD, engl. *limit of detection*, LoD) i granica određivanja (GO, engl. *limit of quantification*, LoQ) korištena je najniža korištena koncentracija limonena od 50 µg mL⁻¹. Iz odziva detektora te vrijednosti S/N (omjer visine signala i šuma) dobivenih tokom šest uzastopnih injektiranja limonena (Tablica 3.3.) dobivene su sljedeće vrijednosti:

- $LoD = \frac{150}{3444,990492} = 0,0435 \mu\text{g mL}^{-1}$
- $LoQ = \frac{500}{3444,990492} = 0,1451 \mu\text{g mL}^{-1}$

Dobivene vrijednosti granice određivanja i granice dokazivanja su znatno niže od radnih koncentracija limonena. Izračunate vrijednosti nisu imale utjecaj na određivanje koncentracija eteričnih ulja koje su bile 0,28 µg mL⁻¹ za uzorak eterično ulje mandarine, 3,19 µg mL⁻¹ za uzorak eteričnog ulja celera te 0,88 µg mL⁻¹ za uzorak eteričnog ulja grejpa.

3.2.4. Linearnost

Linearnost metode se vrednuje koeficijentom determinacije (R^2) čije su vrijednosti za pojedine krivulje umjeravanja prikazane u Tablici 3.4. Iz vrijednosti koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9995$) vidljivo je da je postignuta veća linearnost kod prve krivulje umjeravanja (Slika 3.7.). Krivulja umjeravanja sa Slike 3.7. izrađena je korištenjem četiri različitih koncentracija limonena ($N = 4$) u rasponu od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Krivulja umjeravanja prikazana na Slici 3.8. pokazuje nešto manju linearnost ($R^2 = 0,9898$). Ona obuhvaća pet koncentracija limonena raspona ($R^2 = 0,9995$) $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tablica 3.4. Usporedba linearnosti krivulja umjeravanja

	N	Nagib, a	Odsječak, b	R^2
Limonen	4	15187	442355	0,9995
	5	7168,8	$4 \cdot 10^6$	0,9898

3.2.5. Specifičnost

Visoka specifičnost postignuta je korištenjem trostrukog kvadrupola kao analizatora mase. Praćene su tri specifične reakcije prijelaza limonena. Prethodno odabrani fragment u prvom kvadrupolu ulazi u interakcijsku ćeliju gdje dolazi do kolizije s dušikom pri različitim energijama sraza, čime nastaju novi fragmenti. Nastali fragmenti ulaze zatim u treći i posljednji kvadrupol koji je selektivan prema samo određenom ionskom produktu kojeg propušta do detektora.

Specifičnost je povećana praćenjem reakcija prijelaza pri eksperimentalno određenim optimalnim energijama sraza s neutralnim inertnim dušikom. Dakle, GC-MS/MS tehnika ima sposobnost razlikovanja reakcija prijelaza pri kojima nastaju isti

fragmenti na temelju razlika u optimalnoj energiji sraza s dušikom, odnosno energijama pri kojima pojedini prijelazi pokazuju najveći odziv prema detektoru.^[15,18]

3.2.6. Analiza realnog uzorka

Razvijena metoda je testirana na uzorcima eteričnih ulja mandarine, grejpa te celera pripremljenih na način spomenut u Poglavlju 2.3. Tako pripremljeni uzorci injektirani su automatskim uzorkivačem u GC-MS/MS i analizirani MRM načinom snimanja.

Korištenjem eksperimentalno dobivenih podataka i krivulja umjeravanja iz Poglavlja 3.1.3. određene su koncentracije pojedinih uzoraka. Rezultati su prikazani u Tablici 3.5.

Tablica 3.5. Prikaz rezultata određivanja limonena u eteričnim uljima mandarine, grejpa i celera

Eterično ulje	t_R [min]	Odziv detektora	Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
Mandarina	5,54	3809298,27	0,28
Grejp	5,54	10275316,71	0,88
Celer	5,54	15394662,85	3,19

Iz Tablice 3.5. vidljivo je kako svi uzorci eteričnih ulja imaju isto vrijeme zadržavanja, čime je potvrđeno da sadrže glavnu komponentu limonen.

ZAKLJUČAK

GC-MS/MS tehnika se pokazala kao izvrsna metoda za odjeljivanje te kvalitativnu i kvantitativnu analizu limonena.

Pomoću GC-MS/MS, preciznije rečeno, MRM načinom snimanja uspješno su određene specifične reakcije prijelaza kod odabranih fragmenata, odnosno početnih iona limonena. Kako bi se odredili dva kvalitativna te jedan kvantitativni prijelaz, tj. specifične reakcije prijelaza provedena je optimizacija energije sraza s dušikom. Prijelaz koji je pokazao najveći odziv prema detektoru predstavlja kvantitativni prijelaz, dok druga dva kvalitativna prijelaza su odabrana za potvrdu identifikacije.

Snimljeno je osam uzoraka limonena $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ te određen njihov odziv prema detektoru. Iz dobivenih podataka napravljene su dvije krivulje umjeravanja. Krivulja sa Slike 3.7. služi za određivanje koncentracija $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ dok je krivulja umjeravanja sa Slike 3.8. namijenjena za određivanje koncentracije limonena u području $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Razvijena metoda zadovoljila je sve određivane parametre vrednovanja metode, čime je potvrđena njezina prikladnost za određivanje koncentracija limonena. Obje krivulje umjeravanja prikazale su prihvatljivu linearnost koeficijentom determinacije (R^2). Specifičnost metode je osigurana korištenjem MSM načina snimanja. Točnost, odnosno iskoristivost metode pri svim analiziranim koncentracijama limonena se nalazila u prihvatljivom rasponu od 80 % – 120 %. Preciznost je određena preciznošću injektiranja $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ limonena te je dobiveno prihvatljivo relativno standardno odstupanje (RSD) od 3,29 %.

Razvijena metoda se pokazala prikladnom za određivanje koncentracija limonena u uzorcima eteričnih ulja grejpa, mandarine te celera.

LITERATURA

- [1] URL: https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/1/limonene.html?cid=home_motw (8.8.2022.)
- [2] P. E. Kazyoba, A. Viljoen, Limonene – a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance, Natural Product Communications, 2008
- [3] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871295/> (9.8.2022.)
- [4] URL: <https://www.edenbotanicals.com/celery-seed.html> (9.8.2022.)
- [5] URL: <https://www.terra-organica.hr/celer-apium-graveolens-etericno-ulje.html> (9.8.2022.)
- [6] URL: <https://www.gbif.org/species/113655253> (9.8.2022.)
- [7] URL: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-grapefruit-essential-oil#1> (9.8.2022.)
- [8] URL: <https://www.aromara.hr/shop/grejp-etericno-ulje-10-ml-10389#attr=> (9.8.2022.)
- [9] C. Musara, E. B. Aladejana, S.M. Mudyiwa, Review of the nutritional composition, medicinal, phytochemical and pharmacological properties of Citrus reticulata Blanco (Rutaceae), F1000 Research, 2020
- [10] URL: <https://www.aromara.hr/shop/mandarina-etericno-ulje-10-ml-10365?search=mandarina#attr=> (8.8.2022.)
- [11] URL: <https://www.terra-organica.hr/etericno-ulje-mandarine-crvene.html> (8.8.2022.)
- [12] URL: <https://www.purenature.co.nz/products/mandarin-cold-pressed-australian-essential-oil> (9.9.2022.)
- [13] Kateryna Kon, Mahendra Rai, Antibiotic Resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, Elsevier, 2016, str. 227-237
- [14] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 19-22.; 630-59

- [15] 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
- [16] ICH Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedure: Text and methodology Q2 (R1), 2005
- [17] A. Shrivastava, V. B. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, Chron. Young Sci. 2011, 2(1): 21-5. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345> (10.8.2022.)
- [18] URL: <https://www.chromatographyonline.com/view/flying-high-with-sensitivity-and-selectivity-gc-ms-to-gc-ms-ms> (17.9.2022.)
- [19] I. Leito, R. Rebane, H. Evard, K. Herodes, K. Kipper, LC-MS Method validation, University of Tartu, URL: https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/ (17.9.2022.)