

# Odjeljivanje smjese vanilinske i klorogenske kiseline te kvalitativno i kvantitativno određivanje uporabom UHPLC-DAD-HESI/MS/MS

---

**Markota, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:792528>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-17**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Marija Markota**

**ODJELJIVANJE SMJESE VANILINSKE I KLOOROGENSKE KISELINE TE  
KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE UPORABOM  
UHPLC-DAD-HESI/MS/MS**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2019./2020.**

**Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul**

**Split, listopad 2020.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Marija Markota**

**ODJELJIVANJE SMJESE VANILINSKE I KLOROGENSKE KISELINE TE  
KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE UPORABOM  
UHPLC-DAD-HESI/MS/MS**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2019./2020.**

**Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul**

**Split, listopad 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Instrumente metode analize u farmaciji  
**Tema rada** je prihvaćena na 64. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 26. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** Doc. dr. sc. Franko Burčul  
**Pomoć pri izradi:** Nenad Ambruš, mag. ing. bioproc.

### ODJELJIVANJE SMJESE VANILINSKE I KLOGROGENSKE KISELINE TE KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE UPORABOM UHPLC-DAD-HESI/MS/MS

Marija Markota, broj indeksa: 157

#### Sažetak:

**Cilj istraživanja:** Razvoj i optimizacija te validacija metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja klorogenske i vanilinske kiseline pomoću tekućinske kromatografije ultravioke djelotvornost vezane s masenim spektrometrom s trostrukim kvadripolom.

**Materijali i metode:** U istraživanju je korišten radni standard, smjesa klorogenske i vanilinske kiseline, od kojeg su pripravljene otopine u rasponu od 0,1 mg L<sup>-1</sup> do 20 mg L<sup>-1</sup>, te su iste korištene za optimizaciju parametara masenog spektrometra, tekućinske kromatografije te validaciju metode.

**Rezultati:** Kao otapalo izbora za smjesu vanilinske i klorogenske kiseline izabrana je smjesa vode i metanola u omjeru 50:50. Maseni spektrometar je optimiziran na napon na kapilari od 3500 V za klorogensku, a 3600 V za vanilinsku kiselinu, RF od 69 V za klorogensku kiselinu i 62 V za vanilinsku kiselinu, temperatura plina za formiranje finog spreja od 450 °C, i temperatura kapilare za prijenos iona od 350 °C. Korištena je nepokretna faza s C18 punilom kolone, te smjesa 0,5% octene kiseline u vodi, acetonitrila i metanola u omjerima 96:2:2 (0,0 min), 60:20:20 (7,5min), 96:2:2 (8,0 min) i 96:2:2 (8,0 10,4 min), kao pokretna faza te predstavljaju optimalne kromatografske parametre. Na temelju analize MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture iona produkata i pretpostavljeni mehanizam njihove fragmentacije. Ispitani parametri validacije koji uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu kvantifikacije i detekcije te robusnost dali su zadovoljavajuće vrijednosti.

**Zaključci:** Tekućinska kromatografija ultravioke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom je prikladna metoda za odjeljivanje smjese vanilinske i klorogenske kiseline te kvalitativno i kvantitativno određivanje klorogenske i vanilinske kiseline. Razvijena metoda je validirana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje smjese klorogenske i vanilinske kiseline.

**Ključne riječi:** klorogenska kiselina, vanilinska kiselina, tekućinska kromatografija, vrednovanje, spektrometrija masa s trostrukim kvadripolom

**Rad sadrži:** 60 stranica, 18 slika, 8 tablica, 1 prilog i 58 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. Lea Kukoč-Modun       | - predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević | - član        |
| 3. Doc. dr. sc. Franko Burčul         | - član-mentor |

**Datum obrane:** 30. listopada 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Instrumental methods of Analysis in Pharmacy  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 64 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 26.  
**Mentor:** Assistant professor Franko Burčul, PhD,  
**Technical assistance:** Nenad Ambruš, mag. ing. bioproc.

### SEPARATION OF A MIXTURE OF VANILLIC AND CHLOROGENIC ACID AND QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION USING UHPLC-DAD-HESI/MS/MS

Marija Markota, index number: 157

#### Summary:

**Objectives:** Development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of chlorogenic and vanillic acid using ultrahigh efficiency liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer.

**Material and methods:** In this study a working standard prepared as a mixture of chlorogenic and vanillic acid was used to prepare solutions ranging from 0.1 mg L<sup>-1</sup> to 20 mg L<sup>-1</sup>. These solutions were used for optimization of mass spectrometer and liquid chromatography parameters as well as for method validation.

**Results:** Mixture of water and methanol (50:50) was chosen as the solvent for dissolution of the vanillic and chlorogenic acid mixture. Mass spectrometer was optimized for capillary voltage of 3500 V for chlorogenic and 3600 V for vanillic acid, RF of 69 V for chlorogenic acid and 62 V for vanillic acid, vaporizer temperature of 450 °C, and ion transfer tube temperature of 350 °C. Stationary phase with C18 column filling and a mixture of 0.5% acetic acid in water, acetonitrile and methanol in the ratios 96:2:2 (0,0 min), 60:20:20 (7,5 min), 96:2:2 (8,0 min) and 96:2:2 (8,0 10,4 min), was used as the mobile phase represent optimal chromatographic parameters. Based on the analysis of MS and MS/MS spectra, the structures product ions and the possible mechanism of their fragmentation were given. Examined validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, and robustness yielded satisfactory values.

**Conclusions:** Ultra-high performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer is a suitable method for the separation of a mixture of vanillic and chlorogenic acid and qualitative and quantitative determination. The developed method was validated to ensure its suitability for the determination of chlorogenic and vanillic acid mixture.

**Key words:** chlorogenic acid, vanillic acid, liquid chromatography, validation, triple quadrupole mass spectrometry

**Thesis contains:** 60 pages, 18 figures, 8 tables, 1 supplement and 58 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |                                                   |                |
|---------------------------------------------------|----------------|
| 1. Assistant professor Lea Kukoč-Modun, PhD       | - chair person |
| 2. Assistant professor Ivana Škugor Rončević, PhD | - member       |
| 3. Assistant professor Franko Burčul, PhD         | - supervisor   |

**Defence date:** October 30, 2020

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## Sadržaj

1 Uvod.....	1
1.1. Klorogenska kiselina .....	2
1.2. Vanilinska kiselina .....	3
1.3. Kromatografija .....	4
1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	5
1.3.2. Kromatografski parametri .....	7
1.3.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....	9
1.4. Spektrometrija masa.....	10
1.4.1. Princip rada spektrometra masa .....	11
1.4.2. Analizatori masa.....	12
1.5. Validacija analitičke metode .....	14
2 Cilj istraživanja .....	16
3 Materijali i metode .....	18
3.1. Korištene kemikalije i oprema .....	19
3.2. Odabir otapala .....	20
3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu .....	20
3.3.1. Priprema otopina klorogenske i vanilinske kiseline.....	20
4 Rezultati .....	21
4.1. Identifikacija klorogenske i vanilinske kiseline uporabom UHPLC-DAD-HESI- MS/MS – rješavanje masenog spektra/fragmentacija .....	22
4.2. Optimizacija parametara masenog spektrometra .....	25
4.3. Optimizacija UHPLC metode .....	27
4.3.1. Odabir nepokretne faze .....	27
4.3.2. Odabir modifikatora .....	27

4.3.3. Odabir otapala u mobilnoj fazi.....	29
4.3.4. Parametri UHPLC metode .....	29
4.4. Validacija metode.....	30
4.4.1. Specifičnost .....	30
4.4.2. Linearnost.....	30
4.4.3. Granice kvantifikacije i dokazivanja.....	33
4.4.4. Točnost i iskorištenje .....	34
4.4.5. Preciznost .....	34
4.4.6. Robusnost .....	35
5 Rasprava .....	36
5.1. Optimizacija parametara metode.....	37
5.2. Validacija metode.....	42
6 Zaključci.....	43
7 Prilozi .....	45
7.1. Korištena oprema .....	46
8 Literaturni izvori .....	49
9 Sažetak .....	55
10 Summary .....	57
11 Životopis.....	59

*Neizmjerne hvala mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na uloženom vremenu, trudu i angažmanu pri izradi ovog rada.*

*Veliko hvala mag. ing. bioproc. Nenadu Ambrušu na pomoći i svim savjetima pri razvijanju metode.*

*Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na beskrajnoj ljubavi i podršci.*





## 1.1. Klorogenska kiselina

Klorogenska kiselina (engl. *chlorogenic acid*, *CGA*) je spoj koji pripada skupini estera a nastao je spajanjem kava kiseline i L-kviniinske kiseline.<sup>1</sup> Izraz "klorogenske kiseline" označava skupinu polifenolnih estera nastalih pridruživanjem jedne od hidroksicimetnih kiselina (kava kiselina, ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina) kviniinskoj kiselini.<sup>2</sup> Ime im je nastalo od grčkih riječi "svijetlozelena" i "nastati" zato što se njihovom oksidacijom pojavljuje zelena boja.<sup>3</sup> Najčešća je upravo 5-*O*-kafeoilkviniinska kiselina.<sup>4</sup>

Međutim, kada je riječ o kemijskom nazivu ove kiseline, znanstvenici još uvijek nisu složni. Prema preporukama IUPAC-a, do 1976. godine redoslijed numeriranja atoma na prstenu kviniinske kiseline je upućivao na ime 3-*O*-kafeoilkviniinska kiselina, a te je godine promijenjen u 5-*O*-kafeoilkviniinska kiselina. Ovisno o mjestu vezanja kava kiseline na kviniinsku kiselinu, nastaju izomeri klorogenske kiseline; kriptoklorogenska kiselina i neoklorogenska kiselina.<sup>3</sup> Prekursor u biosintezi klorogenske kiseline je 4-kumaroil-CoA, nastao od cimetine kiseline, a sama klorogenska kiselina je metabolit u biosintezi lignina.<sup>1,5</sup> Identificirana je u prirodi u mnogim biljnim vrstama, a neke od njih su: bambus (*Phyllostachys edulis*(Carrière) J.Houz.), obični vrijesak (*Calluna vulgaris*(L.) Hull) i hibiskus (*Hibiscus sabdariffa* L.).<sup>6-8</sup>

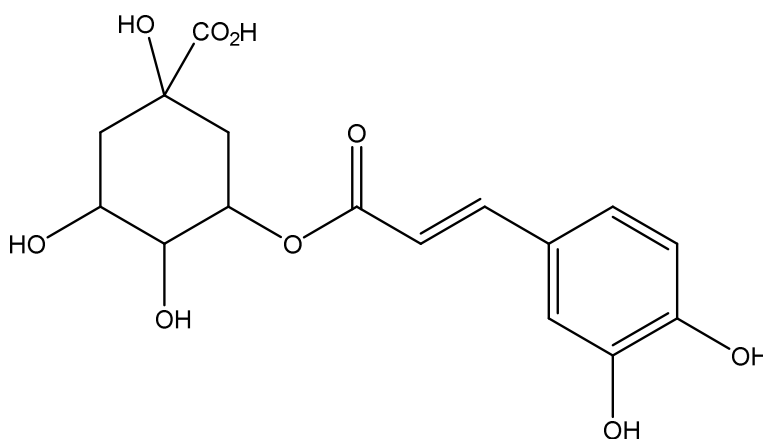
Budući da su kava u zrnu i komercijalni proizvodi od kave temeljni izvori klorogenske kiseline u ljudskoj prehrani, dnevni unos kod osoba koje konzumiraju kavu je 0,5 - 1 g, a kod onih koji ju ne konzumiraju iznosi otprilike do 100 mg. Namirnice u kojima se također može pronaći klorogenska kiselina su: jabuka, kruška, bobičasto voće, artičoka i patlidžan.<sup>9,10</sup>

Klorogenska kiselina je otkrivena i u narančama, breskvama, suhim šljivama i krumpiru.<sup>11-14</sup> Biološka aktivnost klorogenske kiseline pokazana je kroz antimikrobnu, antivirusnu, hepatoprotektivnu, protuupalnu, antipiretičku, kardioprotektivnu, neuroprototektivnu, neurostimulatornu, antihipertenzivnu, antioksidativnu djelotvornost te kao tvar za smanjenje pretilosti.<sup>15,16</sup>

Fenolima iz namirnica je dokazano antioksidativno djelovanje u *in vitro* uvjetimainhibicijom oksidacije molekula LDL-a.<sup>17</sup> Uzevši u obzir činjenicu da metabolički produkti uobičajeno pokazuju smanjenu antioksidativnu aktivnost od polaznih spojeva i činjenicu da se klorogenska kiselina intenzivno metabolizira što su dokazali Olthof i sur.,

postavlja se pitanje količine antioksidativne djelotvornosti metaboličkih produkata klorogenske kiseline u živom organizmu.<sup>18,17</sup>

Pretpostavku da je klorogenska kiselina alergen kod ljudi iznijeli su Freedman i sur. u svojem istraživanju, dok su Layton i sur., pozivajući se na navedeno istraživanje, proveli studiju u kojoj su pokazali da čista klorogenska kiselina nije alergen već to postaje kontaminacijom nedifuzibilnih alergeni zagađivača.<sup>11,19</sup>



**Slika 1.1.** Klorogenska kiselina

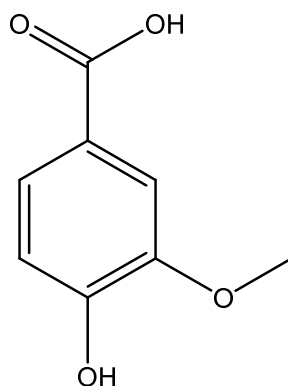
## 1.2. Vanilinska kiselina

Vanilinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina) pripada fenolnim kiselinama i derivat je dihidroksibenzojeve kiseline. Oksidirana je forma vanilina (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid) i sudjeluje kao međuprodukt u proizvodnji vanilina iz ferulinske kiseline.<sup>20-23</sup>

Pronađena je u visokim koncentracijama u zrnu vanilije (*Vanilla sp.*) i u ginsengu (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels), biljci koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini.<sup>24</sup> Nalazi se i u ulju dobivenom iz ploda acai palme (*Euterpe oleracea* Mart.) i u arganovom ulju (*Argania spinosa* (L.) Skeels).<sup>20,25</sup> Također je prisutna u vinu, octu, zelenom čaju, raznim vrstama voća, npr. jagodama.<sup>26-28</sup> Pronađena je u tragovima kao metabolit razgradnje adrenalina i noradrenalina u mokraći. Vanilinska kiselina nastaje u prirodi iz lignina pod utjecajem gljiva.<sup>26</sup> Osim što ima antimikrobna svojstva kao i vanilin, inhibira i rast kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) i anaerobne gram negativne bakterije (*Zymomonas mobilis*). Uz

to, u *in vitro* uvjetima je dokazana inhibicija rasta anaerobne gram negativne bakterije (*Proteus mirabilis*) u mokraći i bubrežnim kamencima stvorenih klicom.<sup>29,30</sup>

Vanilinska kiselina pokazuje farmakološko djelovanje poput inhibicije aktivnost zmijskog otrova, karcinogeneze, apoptoze i upale. Popularnost zahvaljuje ugodnom kremastom mirisu koji se često koristi u mirisima i odobren je kao dodatak hrani (FAO/WHO Stručni odbor za aditive u hrani, JECFA br. 959).<sup>24</sup>



**Slika 1.2.** Vanilinska kiselina

### 1.3. Kromatografija

Otac kromatografije je ruski botaničar rođen u Italiji, M. S. Cvet.<sup>31</sup> Kromatografija je definirana kao fizikalna metoda odjeljivanja komponenata smjese koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenata između dviju faza, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne).<sup>32</sup>

S obzirom da komponente putuju samo kada se nalaze u pokretnoj fazi, zbog različitih afiniteta prema pokretnoj, odnosno nepokretnoj fazi, dolazi do različitih relativnih brzina gibanja kroz kolonu. Može se reći da je to danas jedna od najučinkovitijih analitičkih tehnika za odjeljivanje pojedinih sastavnica složenih smjesa.<sup>31</sup>

Kromatografske tehnike se mogu podijeliti na više načina. Uspoređujući ostvarivanje kontakta između mobilne i stacionarne faze, razlikujemo kolonsku i plošnu kromatografiju.<sup>32</sup>

Na osnovu agregatnog stanja mobilne faze, kromatografija se dijeli na: tekućinsku kromatografiju, plinsku kromatografiju i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.<sup>33</sup>

Kada se govori o prirodi ravnoteže između mobilne i stacionarne faze, kromatografiju dijelimo na: adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku i kromatografiju isključenjem.<sup>32</sup>

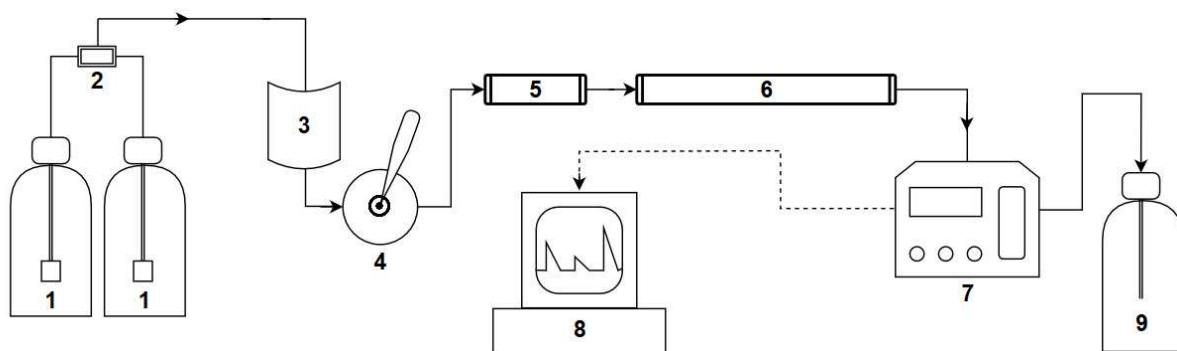
- **Razdjelna kromatografija** je najčešće korištena tehnika tekućinske kromatografije, a zasniva se na uspostavljanju ravnoteže između dviju tekućina ili između tekućine i plina. Na temelju polarnosti nepokretne faze, razdjelna kromatografija se dijeli na kromatografiju obratnih faza gdje je nepokretna faza nepolarna, a pokretna polarna, i kromatografija normalnih faza gdje je nepokretna faza polarna a pokretna faza nepolarna.
- **Adsorpcijska kromatografija** je tehnika kod koje se sastojci raspodjeljuju između tekućine ili plina u pokretnoj fazi i čvrste nepokretne faze na način da se sastojci sa većim afinitetom prema nepokretnoj fazi više vežu za nju i tako dolazi do odjeljivanja.
- **Afinitetna kromatografija** odjeljuje komponente smjese zbog specifičnih interakcija molekula s kemijskim vezanim ligandom na površini nepokretne faze.
- **Kromatografija isključenjem** je utemeljena na odjeljivanju zasnovanom na razlikama u molekulskim masama i obujmu. Nepokretna faza je materijal s porama određenih dimenzija (molekulska sito) koje propušta samo odgovarajuće sastojke.
- **Kromatografija ionskom izmjenom** služi za odjeljivanje nabijenih čestica u smjesi (aniona ili kationa) između tekuće pokretne faze i nepokretne faze koju čini čvrsti polimerni ionski izmjenjivač (najčešće ionska smola).<sup>32,33</sup>

### 1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je nastala krajem 1960ih i 1970ih, a karakteriziraju ju vrlo sitne čestice nepokretne faze i korištenje visokih tlakova koji naposljetku dovode do bržeg i učinkovitijeg odjeljivanja komponenata u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju.<sup>32,33</sup>

Ovaj automatizirani sustav koristi se za analizu uzoraka i pročišćavanje u mnogim područjima, a neka od njih su farmaceutska, biotehnološka, ekološka, polimerna i prehrambena industrija.<sup>34,35</sup>

Osnovni konstrukcijski dijelovi u HPLC kromatografu su prikazani na slici 1.3.



**Slika 1.3.** Shematski prikaz komponenti HPLC uređaja: spremnici pokretne faze (otapala) s filterom (1); otplinjač (2); crpka (3); injektor uzorka (4); pretkolona (5); kolona (6); detektor (7); računalo za obradu podataka (8); otpadni spremnik (9).<sup>38</sup>

Otapala koja čine pokretnu fazu su u staklenim spremnicima i trebaju biti visoke čistoće.<sup>36,37</sup> Da bi se otklonile potencijalne nečistoće ili plinovi, otapala prvo prolaze kroz mikroporozni filter i otplinjač.<sup>38</sup>

Crpke upravljaju protokom pokretne faze kroz sustav.<sup>37</sup> Moduliranjem vrijednosti protoka može se utjecati na rezultate kromatografske analize.<sup>38</sup>

U slučaju da se tijekom analize koristi mobilna faza stalnog sastava radi se o izokratnoj pokretnoj fazi, a ako se sastav otapala tijekom mjerenja mijenja radi se o gradijentnoj pokretnoj fazi. Pri korištenju gradijentne pokretne faze postiže se brže i učinkovitije odjeljivanje.<sup>36</sup>

Uzorak se u tok pokretne faze unosi primjenom injektora. Najčešće se koriste automatski injektori koji umanjuju vjerojatnost pogreške tijekom ručnog apliciranja uzorka.<sup>38,33</sup> Injektirani uzorak putuje pokretnom fazom do kolone gdje se događa odjeljivanje sastojaka na temelju različitog afiniteta prema nepokretnoj fazi.<sup>38</sup>

Kolona se može nazvati srcem kromatografa.<sup>37</sup> Poželjno je prije kolone smjestiti kratku pretkolonu koja sadrži jednaku nepokretnu fazu kao i glavna kolona, a u svrhu sprječavanja kontaminacije i produljivanja životnog vijeka glavne kolone.<sup>33</sup>

Kolona je uglavnom metalna cijev u kojoj je smještena nepokretna faza, a dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjer, kao i promjer čestica punila mogu biti raznovrsni.<sup>39</sup> Najčešća je upotreba kolona s vrlo sitnim česticama koje umanjuju potrošnju pokretne faze. Nakon odvajanja i elucije sastojaka na koloni, oni putuju do detektora koji prikupljene informacije pretvara u računalu prepoznatljiv signal. Uz prigodni računalni program, stvara se vjerodostojan grafički zapis koji se zove kromatogram. Kromatogram predstavlja ovisnost

koncentracije o vremenu ili volumenu elucije. Otapalo sa uzorkom nakon prolaska kroz detektor dolazi do otpadnog spremnika, slika 1.3.<sup>38</sup>

Za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti postoji više vrsta detektora pa se izbor odgovarajućeg detektora zasniva na karakteristikama analita/uzorka koji se analizira.<sup>40</sup> Osobine koje čine detektor pogodnim: jednako je osjetljiv na sve eluirane vrhove ili bilježi samo one od interesa, otporan je na promjene temperature ili sastava pokretne faze, mjeri male količine spoja, ne uzrokuje širenje nastalih zona, brzo reagira, jednostavan je za korištenje, robustan i niske cijene.<sup>41</sup>

Detektori koji se najčešće koriste kod HPLC-a su spektrofotometrijski, odnosno detektori s nizom fotoosjetljivih dioda (engl. *diode array detector*, DAD), fluorescencijski detektor (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (engl. *electrochemical detector*, ED), detektor indeksa loma (engl. *refractive indeks detector*, RID) i detektori raspršenja svjetlosti na uparenom uzorku (eng. *evaporative light-scattering detector*, ELSD).<sup>39</sup>

### 1.3.2. Kromatografski parametri

Prilagođavanje određenih elemenata kromatografske metode dovodi do poboljšanja uspješnosti i optimizacije metode. U njih se ubrajaju: temperatura kolone, pH-vrijednost pokretne faze, volumen injektiranja, tlak pri kojem se odvija mjerenje i čestice punila kolone. Njihovom promjenom može doći do velikih varijacija u rezultatu analize.<sup>38</sup>

Kromatogram je grafički zapis kromatografskog mjerenja koji se sastoji od pikova (vrhova), tj. krivulja porasta koncentracije određenog sastojka uzorka u vremenu ili volumenu mobilne faze. Može služiti za kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Da bi se analit identificirao važan je položaj pika na vremenskoj osi, a količina (udjel) pojedinog analita u uzorku se saznaje računanjem površine ispod pika, odnosno mjerenjem visine pika.<sup>32</sup> Teži se što većoj učinkovitosti i osjetljivosti metode, a tome pridonose što uži pikovi.<sup>38</sup>

Na slici 1.4. prikazan je standardan kromatogram. Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (engl. *retention time*,  $t_r$ ) jest vrijeme koje proteče od injektiranja analita do dolaska na detektor. Nezadržano ili mrtvo vrijeme (engl. *void time*,  $t_m$ ) jest ono vrijeme koje je potrebno pokretnoj fazi da dođe do detektora. Retencijsko vrijeme korigirano za nezadržano vrijeme se

naziva prilagođenim retencijskim vremenom (engl. *adjusted retention time*,  $t_r'$ ) i računa se prema izrazu 1.1.<sup>33</sup>

$$t_r' = t_r - t_m \quad (1.1)$$

Važan faktor za optimizaciju kromatografske metode jest faktor zadržavanja (engl. *capacity factor* ili *retention factor*,  $k'$ ).<sup>32,38</sup> On daje informaciju o omjeru vremena zadržavanja komponente uzorka u stacionarnoj fazi prema vremenu zadržavanja u mobilnoj fazi i izračunava se prema izrazu 1.2. Vrijednost ( $k'$ ) je proporcionalna zadržavanju analita na koloni. Ukoliko je  $k' < 1$ , elucija je prebrza; a ako je  $k' > 20$ , vrijeme zadržavanja je predugo. Sukladno tomu, željeni faktor zadržavanja je između 1 i 5 jer se u tom intervalu postiže najbolji omjer povoljnog odjeljivanja i vremena analize.<sup>32</sup>

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m} \quad (1.2)$$

Da bi se postiglo kvalitetno razdvajanje analita iz uzorka potrebno je da isti imaju dovoljno različite brzine prolaska kroz kolonu. To je kvantitativno izraženo faktorom odjeljivanja ili faktorom selektivnosti (engl. *separation* ili *selectivity factor*,  $\alpha$ ). Faktor odjeljivanja jest omjer faktora zadržavanja duže zadržavanog analita i faktora zadržavanja analita koji manje vremena provodi u nepokretnoj fazi.<sup>38,33</sup> Faktor odjeljivanja uvijek ima vrijednost veću od 1<sup>38</sup>:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (1.3)$$

Iznimnu važnost u procjeni djelotvornosti kolone ima stupanj širenja pikova. Ta pojava je odgovorna za kromatografske vrhove u obliku Gaussove krivulje. Stupanj povećanja širine pika na osnovici bazne linije kromatografa (engl. *peak width*,  $w$ ) je preporcionalan vremenu analize pa će kod dužih analiza biti i širenje pikova izraženije. Djelotvornost kolone je kvantitativno izražena brojem teorijskih tavana (engl. *plate number*,  $N$ ), a računa se prema izrazu 1.4. Broj tavana predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze i teži se da bude što veći.<sup>38,33</sup>

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (1.4)$$



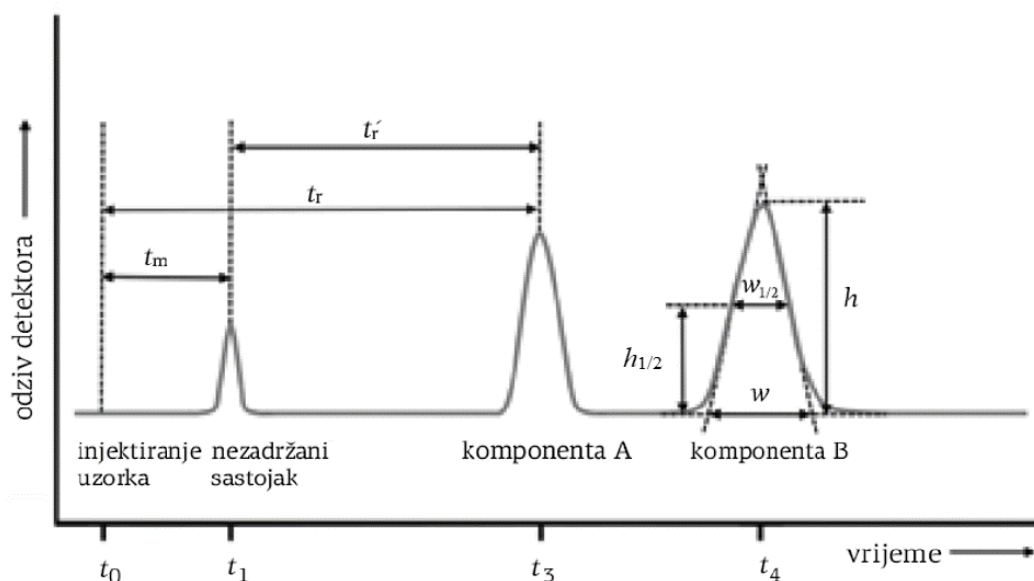
Visina teoretskog tavana (engl. *height equivalent of a theoretical plate, H*) je također vrijednost kojom se opisuje djelotvornost kromatografske kolone, a brojčana vrijednost se dobije kada se postave u omjer duljina kolone (engl. *length of the column, L*) i broj teoretskih tavana<sup>32,38</sup>:

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.5)$$

Razlučivanje (engl. *resolution, R<sub>S</sub>*) je vrijednost koja daje informaciju o sposobnosti kolone da razdvoji kromatografske pikove dvaju komponenti iz uzorka, a računa se prema izrazu 1.6.<sup>38,33</sup>

Pri većim vrijednostima *R<sub>S</sub>* odjeljivanje analita je bolje. Sukladno tomu, teži se da vrijednost razlučivanja bude veća od 1,5. Ako je cilj robusnija kvantifikacija i razdvajanje, vrijednost razlučivanja treba biti veća od 2.<sup>32,38</sup>

$$R_S = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} \quad (1.6)$$



Slika 1.4. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima<sup>32</sup>

### 1.3.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

2004. godine u upotrebu dolazi naprednija inačica HPLC-a s preinakama u dizajnu i performansama uređaja, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultrahigh*

*Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).<sup>42</sup> S obzirom na to da je djelotvornost kolone obrnuto proporcionalna kvadratu promjera čestica punila i kvadratu promjera kolone, UHPLC instrumenti sadrže kolone sitnijeg punjenja ( $< 2 \mu\text{m}$ ) i užeg promjera koji daju oštrije vrhove, vrijeme analize je kraće, te je potrebno manje otapala.<sup>35</sup>

Uz navedene prednosti, ovi uređaji imaju mogućnost održavanja tlaka crpke i do 1000 bara koji je neophodan za bolje razlučivanje pikova.<sup>42</sup> Boljem razdvajanju (i skraćivanju vremena analize) dodatno pridonosi povišenje temperature koje smanjuje viskoznost pokretne faze i povećava protok.<sup>35</sup> Otapala za pokretnu fazu trebaju biti vrlo visokog stupnja čistoće. Budući da su kapilare i kolone manjih dimenzija u usporedbi s onima na standardnom HPLC-u, otopine uzoraka treba posebno pripremati i pročišćavati korištenjem mikroporoznih filtera, da se ne bi začepile.<sup>42</sup>

Kromatografski zapis UHPLC analize sadrži uže pikove pa se može zaključiti da su granice dokazivanja pojedinog sastojka iz smjese u uzorku niže od onih kod standardne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.<sup>38</sup>

#### 1.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je instrumentna tehnika u analitičkoj kemiji koja se razvila početkom XX. stoljeća, omogućivši otkriće stabilnih izotopa kemijskih elemenata.<sup>43</sup> Djeluje na principu kreiranja karakterističnih iona u plinovitoj fazi, nakon čega se prikupljaju i analiziraju. Masena spektrometrija se koristi u farmaceutskoj industriji za analizu organskih molekula.<sup>38</sup>

Ova tehnika je definirana velikom osjetljivošću (moguće detektirati  $10^{-12}$  g analita), širokim rasponom linearnog odziva i visokom specifičnošću.<sup>33</sup> Sukladno tomu, određuje molekulsku masu i strukture čak i manjih sastojaka koji prolaze kroz kolonu. Budući da se u masenoj spektrometriji uzorak razara s ciljem pretvaranja neutralnih molekula u negativno ili pozitivno nabijene ione, radi se o ireverzibilnoj (destruktivnoj) tehnici. Nakon toga se ioni razlikuju u plinovitoj fazi na temelju omjera njihovih masa i naboja ( $m/z$ ). Ovisno o tome koju tvar analiziramo, postoji više modifikacija instrumenata za masenu spektrometriju.<sup>38</sup>

Prilikom analize komponenata iz složenih smjesa, maseni spektrometar se može povezati sa tehnikom odjeljivanja poput HPLC-a pri čemu se događa umrežena analiza sastojaka koji prolaze kroz kolonu.<sup>38,43</sup>

Vezane sustave uz to karakteriziraju povećana robusnost, automatizacija i performanse pa se danas sve učestalije koriste u mnogim analizama.<sup>41,44</sup>

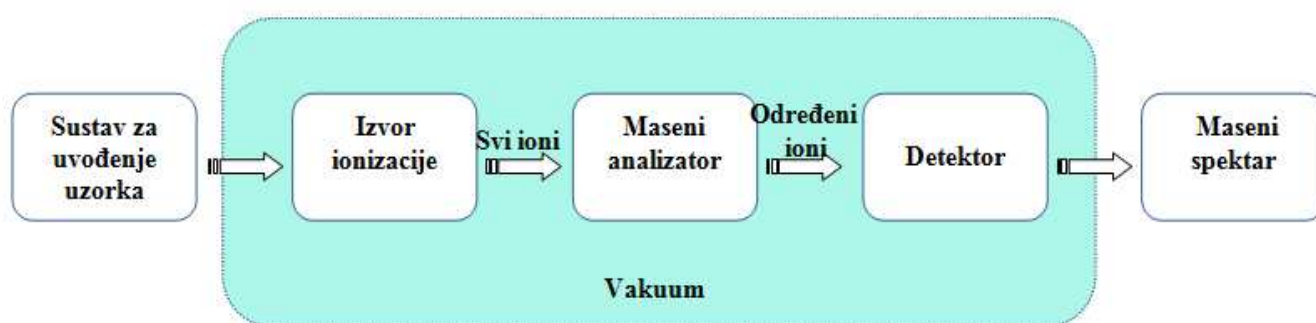
#### 1.4.1. Princip rada spektrometra masa

Najvažniji elementi spektrometra masa su: sustav za uvođenje uzorka, izvor ionizacije, maseni analizator te detektor povezan sa sustavom za obradu podataka. Budući da se ioni mjere u plinovitoj fazi, nužno je da maseni analizator bude pod vakuumom s ciljem da se reduciraju interakcije iona s česticama zraka. To je osigurano sustavom za uvođenje uzorka. Tekući uzorak putem tanke kapilare dolazi do sustava gdje se odvaja od otapala. Taj korak je neophodno učiniti s obzirom da bi golema količina tekućine pretvorene u paru narušila vakuumski sustav. Nadalje, uzorak se ionizira jednom od navedenih ionizacijskih tehnika:<sup>38</sup>

- **Ionizacija elektronima** (engl. *electron ionisation, EI*) funkcionira na principu zrake elektrona visoke energije koja prolazi kroz paru uzorka i stvara nestabilne molekulske radikale podložne fragmentaciji na manje segmente. Najčešća joj je upotreba pri kombinaciji s plinskom kromatografijom.
- **Kemijska ionizacija** (engl. *chemical ionisation, CI*) je ionizacijska tehnika karakterizirana ionizacijom plina reagensa (najčešće amonijak) zrakom elektrona u reakcijskoj komori. Uzorak se potom uvodi u sustav stabilnim protoniziranim česticama nastalim ionizacijom i tada dolazi do reakcije, uglavnom prijenosa elektrona. Tim procesom nastaju stabilni ioni molekula uzorka. Kemijska ionizacija se često koristi kod plinske kromatografije.
- Kod **ionizacije elektroraspršenjem** (engl. *electrospray ionisation, ESI*) eluent putuje uskom kapilarom na čijem završetku se nalazi izvor visokog napona, koji rezultira zakrivljenom putanjom izlaska eluenta iz cijevi prema elektrodi i formiranjem sitnih kapljica. Otapalo isparava, a kapljice se smanjuju na još sitnije kapljice i na kraju na nabijene ione. Struja iona dolazi do masenog analizatora. Slična tehnika je i ionizacija nanoraspršenjem koja ima prednost duljeg korištenja ioniziranog uzorka. Ionizacija elektroraspršenjem je trenutno najčešće korištena tehnika ionizacije kod LC sustava.<sup>33</sup>
- **Kemijska ionizacija** pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*) je idealna za tekuće uzorke koji se eluiraju s HPLC kolone. Uzorak se nebulizira tvoreći maglicu u struji dušika koja putuje kroz zagrijanu kapilaru nakon čega dolazi do ionizacije dušika korištenjem vrška

kapilare kao izvora visokog napona. Otapalo reagira s ionima dušika stvarajući ione amonijaka koji reagiraju s molekulama uzorka.

Ionizirane molekule se ubrzavaju te putuju prema masenom analizatoru gdje upotrebom električnih i magnetskih polja dolazi do razlikovanja iona na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) i njihove detekcije na detektoru. Nastaje slab signal kojeg je nužno pojačati da bi ga računalo prepoznalo i prikazalo maseni spektar.<sup>38</sup>



**Slika 1.5.** Shematski prikaz komponenti masenog spektrometra

#### 1.4.2. Analizatori masa

Maseni analizator ima ulogu mjerenja omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nabijenih čestica ioniziranih u ionizatoru.<sup>38</sup> Mjerenje se postiže upotrebom statičkih ili dinamičkih magnetskih ili električnih polja ili pak njihovom kombinacijom.<sup>45</sup>

Koji će se analizator koristiti pri analizi ovisi o njihovim karakteristikama, kao što su: osjetljivost, gornja granica vrijednosti omjera  $m/z$ , razlučivanje i točnost mjerenja.<sup>39</sup>

Neki od najučestalije korištenih masenih analizatora su: sektorski analizator, kvadripolni analizator, kvadripolni analizator s ionskom stupicom, analizator koji mjeri vrijeme preleta te analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama.<sup>38,46</sup>

- **Sektorski analizatori**
  - **Magnetski sektorski analizator** se pokazao prikladnim kod analize analita manje molekulske mase. No, s obzirom na svoju lošu osjetljivost i otežano povezivanje s kolonom, nije uobičajen kod tekućinske kromatografije spregnute sa spektroskopijom masa.<sup>38</sup>
  - **Električni sektorski analizator** karakterizira dobro razlučivanje ali mu je nedostatak dugo vrijeme analize.<sup>46</sup>
- **Kvadrupolni analizator masa** (engl. *quadrupole mass analyzer, Q*) se sastoji od dva para elektroda, pozitivnog i negativnog, povezanih električki i s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Između njih se nalazi prostor kojim putuju ioni pod utjecajem sile u ravnini kretanja. U toj ravnini ostaju samo stabilni ioni s karakterističnim omjerom  $m/z$  koji putuju dalje do detektora. Ostali ioni bivaju privučeni pozitivnoj ili negativnoj elektrodi koja ih neutralizira pa su uklonjeni i ne dolaze do detektora.<sup>38,44</sup>
- **Kvadrupolni analizator masa s ionskom klopkom** zarobljava ione koji su karakterističnog  $m/z$  omjera u ionskoj klopci djelovanjem elektrostatskog polja u dvije ili tri dimenzije. Poslije toga ioni se propuštaju na temelju njihovih  $m/z$  vrijednosti.<sup>37</sup>
  - **linearni dvodimenzijski analizator masa** (engl. *linear ion trap, LIT*)
  - **trodimenzijski analizator** (engl. *ion trap analyzer, IT*)
- **Analizator koji mjeri vrijeme preleta** (engl. *time of flight, TOF*) funkcionira na principu da je brzina iona proporcionalna njegovoj masi, odnosno omjeru  $m/z$ . Ioni se nakon ionizacije ubrzavaju pod utjecajem električnog polja i prolaze kroz cijev bez električnog polja. Budući da ioni veće vrijednosti omjera  $m/z$  putuju sporije od onih sa manjim vrijednostima omjera  $m/z$ , potonji prvi dolaze do detektora. Vrijeme potrebno ionu da prijeđe put od izvora do detektora je pokazatelj njihove mase.<sup>37,44</sup>
- **Orbitalni analizator masa** (engl. *Fourier transform orbitrap, FT-OT*) je u upotrebi od 2005. godine, a karakterizira ga vanjska elektroda oblika bačve podijeljena u dva dijela i unutarnja vretenasta elektroda koja ima funkciju zarobljavanja iona pod utjecajem elektrostatskog polja s ciljem njihovog orbitalnog gibanja oko osovine.<sup>45,47,48</sup>
- **Analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama** (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR*) ima najveću točnost i sposobnost razlučivanja.<sup>49</sup> Djeluje na principu zadržavanja iona u

ćeliji koja je u ravnini djelovanja magnetskog polja. Ioni poprimaju cikličko kretanje u osovini okomitoj izvoru magnetskog polja a nakon što se počnu pobuđivati naponom poprimaju ciklotronsko kretanje. Detektor na osnovu ciklotronskog kretanja zaprima specifičan signal.<sup>38</sup>

Osim mogućnosti biranja upotrebe analizatora prema potrebnim kriterijima, moguće je koristiti kombinaciju više analizatora istovremeno. Tada je riječ o spregnutoj (tandemskoj) spektrometriji masa (MS/MS). MS/MS funkcionira na principu praćenja individualnih iona u grupi iona kako bi se saznali podaci o ionskim fragmentima podrijetlom iz kompleksne molekulske strukture.<sup>38</sup>

Maseni analizatori mogu biti povezani na dva načina: prostorno i vremenski. Prilikom prostornog spreznjanja, analizatori su fizički odvojeni i povezani su sa ciljem održavanja vakuumskih uvjeta, primjerice kvadripol spregnut sa analizatorom koji mjeri vrijeme preleta. Karakteristika vremenski spregnutih analizatora je zajednički prostor u kojem se odvajanje iona događa sa vremenskim odmakom. Primjer je kvadripolni analizator sa ionskom klopkom spregnut sa orbitalnim analizatorom masa.<sup>37</sup>

Uloga prvog analizatora je odabir karakterističnih iona i njihovo cijepanje na manje fragmente koji su procesuirani drugim masenim analizatorom. U farmaceutskoj industriji se, zbog zadovoljavajuće selektivnosti, za kvantitativna određivanja najučestalije koristi trostruki kvadripol (QQQ).<sup>38</sup>

QQQ radi na principu da se određeni ioni nastali ionizacijom uzorka izabiru u prvom kvadripolu na temelju omjera mase i naboja. Oni putuju dalje do drugog kvadripola koji se još naziva i kolizijska ćelija, gdje će biti bombardirani molekulama plina argona ili dušika s ciljem fragmentacije na manje dijelove. Takvi fragmentirani ioni dolaze do trećeg kvadripola gdje se mjere na osnovu  $m/z$  vrijednosti i detektiraju na detektoru.<sup>33</sup>

## 1.5. Validacija analitičke metode

Prikladnost metode za svrhu koja joj je namijenjena se dokazuje procesom koji se naziva validacija, odnosno vrednovanje. Validacija je neophodna budući da njome nastaje dokumentirani dokaz da će korištenjem metode rezultati analize biti točni. Posebnu pozornost treba posvetiti razlikovanju validacije od razvoja analitičke metode, sukladno činjenici da validirana metoda ne znači nužno da je ona dobra i učinkovita. Kriteriji koje analitička

metoda treba ispuniti navedeni su u smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization, ICH*).<sup>38</sup>

Pri validaciji treba ispitati sljedeće parametre: granicu određivanja, granicu dokazivanja, linearnost, domet, ponovljivost (unutar ispitivanja-unutar dana i između ispitivanja - između dana), točnost, selektivnost i robusnost.<sup>50,51</sup>

- **Točnost** (engl. *accuracy*) - za analizu se kaže da je točna u slučaju da je rezultat ispitivanja jednak istinskoj vrijednosti. Budući da ta vrijednost često nije poznata, drugi parametri provjere valjanost posljedično dovode do točnosti ukoliko su u prihvatljivim granicama.
- **Linearnost** (engl. *linearity*) - za metodu se može tvrditi da je linearna u slučaju da postoji linearni odnos između analitičkog odgovora i koncentracije analita u otopini uzorka u određenom rasponu koncentracija analita.
- **Granica dokazivanja** (engl. *limit of detection*) - ona količina analita za koju vrijedi da je pouzdano otkrivena u eksperimentalnim uvjetima.
- **Granica određivanja** (engl. *limit of quantification*) - količina analita za koju se tvrdi da se može pouzdano kvantificirati pod izloženim eksperimentalnim uvjetima.
- **Specifičnost** (engl. *specificity*) - mogućnost sigurne procjene analita u prisutnosti drugih tvari.
- **Preciznost** (engl. *precision*) - definira se kao stupanj raspršenja rezultata. Izražava se kao postotak relativne standardne devijacije.
  - **Ponovljivost** (engl. *repeability*) izražava preciznost u istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom razmaku.
  - **Srednja preciznost** (engl. *intermediate precision*) je definirana varijacijama u laboratoriju, kao što su upotreba druge opreme, drugi analitičar ili analiziranje drugi dan.<sup>38</sup>
- **Domet** (engl. *range*) - interval vrijednosti koje graniče s gornjom i donjom koncentracijom ili količinom analita s dokazanom razinom preciznosti, linearnosti i točnosti analitičkog postupka.

## **2. Cilj istraživanja**



- Razvoj i optimizacija metode za analitičko određivanje klorogenske i vanilinske kiseline korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom
- Odabrati najprikladnije otapalo za analizu uzoraka
- Optimizacija odabranih parametara masenog spektrometra
- Optimizacija određenih parametara tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti
- Određivanje linearnosti, točnosti i iskorištenja, granice kvantifikacije, granice dokazivanja, preciznosti i robusnosti kao odabranih parametara validacije kromatografske metode

### **3. Materijali i metode**

### 3.1. Korištene kemikalije i oprema

U tablici 3.1. i 3.2. prikazani su popisi standarda i kemikalija koje su korištene pri analizi.

**Tablica 3.1.** Popis korištenih standarda

Naziv	Proizvođač	Čistoća
<b>Klorogenska kiselina</b>	Sigma Aldrich	≥ 95%
<b>Vanilinska kiselina</b>	Merck	> 98%

**Tablica 3.2.** Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	CAS broj	Čistoća
<b>Acetonitril</b>	CH <sub>3</sub> CN	Honeywell (Riedel-de Haen)	75-05-8	LC-MS ≥ 99,9%
<b>Metanol</b>	CH <sub>3</sub> OH	Honeywell (Riedel-de Haen)	67-56-1	LC-MS ≥ 99,9%
<b>Octena kiselina</b>	CH <sub>3</sub> COOH	VWR Chemicals Prolabo	64-19-7	100%
<b>Mravlja kiselina</b>	HCOOH	VWR Chemicals Prolabo	64-18-6	LC-MS ≥ 99,9%
<b>Trifluorocena kiselina</b>	C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Merck	76-05-1	> 99%
<b>Amonijak</b>	NH <sub>3</sub>	T. T. T.	1336-21-6	p.a
<b>Amonijev acetat</b>	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Lach-Ner	631-61-8	p.a

Popis upotrijebljene opreme:

- vaga - AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD);
- pipete - Tacta (Sartorius, Göttingen, Njemačka);
- uređaj za pročišćavanje vode - Purelab Flex 3 (18.2 M $\Omega$ , UV 185/254 nm, TOC <5 ppb, Tip 1, Elga, Pariz Francuska);
- ultrazvučna kupelj - JP-010, (Digital Pro, Kina);
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti - UltiMate 3000RS(Thermo-Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- spektrometar masa s trostrukim kvadripolom - TSQ Quantis, (Thermo-Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- pumpa sa špricom - F100T2 (Chemyx, Stafford, Teksas, SAD).

### 3.2. Odabir otapala

Prije nego što se pristupi mjerenju i optimizaciji kromatografskih parametara i parametara na masenom spektrometru, potrebno je odabrati otapalo u kojem su klorogenska kiselina i vanilinska kiselina topljive da bi se uspješno pripravile početne (radne) otopine istih. Također, potrebno je obratiti pažnju na usklađenost otapala sa pokretnom fazom.

Prema istraživanju Wen i sur. utvrđeno je da su klorogenska i vanilinska kiselina topljive u smjesi vode i metanola u omjeru 50:50.<sup>52</sup>

### 3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu

#### 3.3.1. Priprema otopina klorogenske i vanilinske kiseline

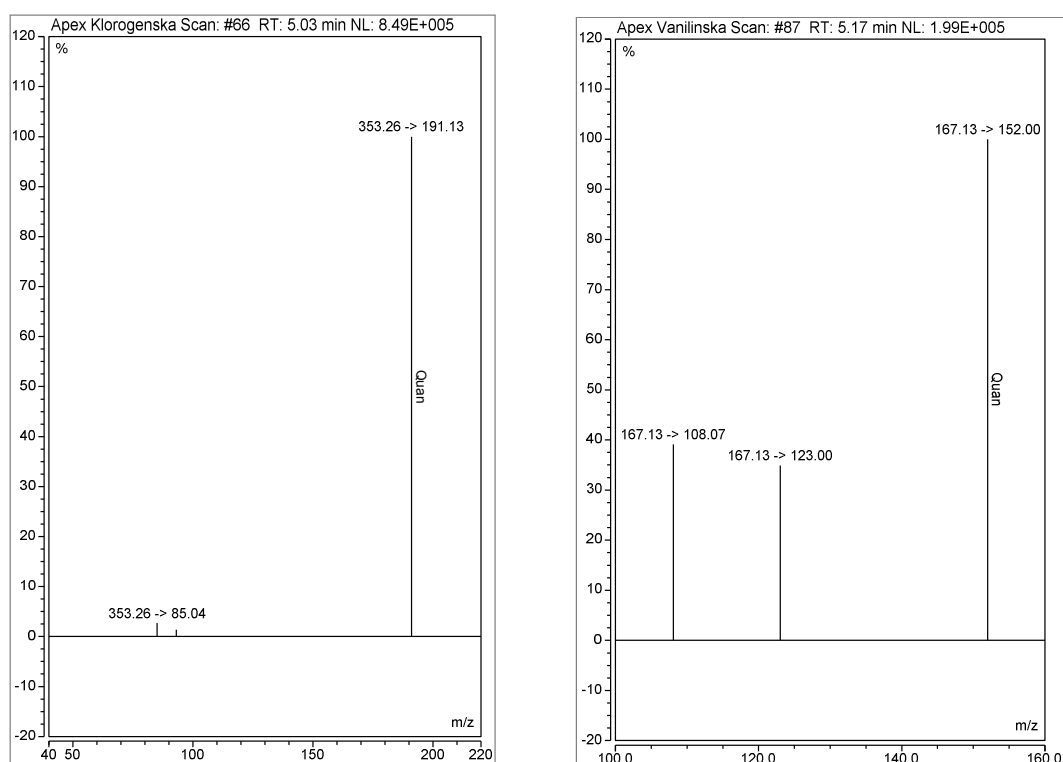
Odvagano je 3,1 mg klorogenske kiseline te je kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je do oznake nadodano otapalo (voda:metanol = 50:50). Tikvica se snažno promiješa. Nakon toga se odvažuje 2,9 mg vanilinske kiseline te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL koju se do oznake nadopuni jednakim otapalom, nakon čega tikvicu, također, treba snažno promiješati.

Radni standard je pripremljen kao smjesa klorogenske i vanilinske kiseline koncentracije 100 mg L<sup>-1</sup>, otapanjem svake u otapalu voda:MetOH = 4:1. Razrjeđivanjem radnog standarda pripravljene su otopine sljedećih koncentracija: 20, 5, 1, 0,5 i 0,1 mg L<sup>-1</sup>, koje su nadalje korištene prilikom izrade umjerne krivulje i optimizacijeparametara metode.

#### **4. Rezultati**

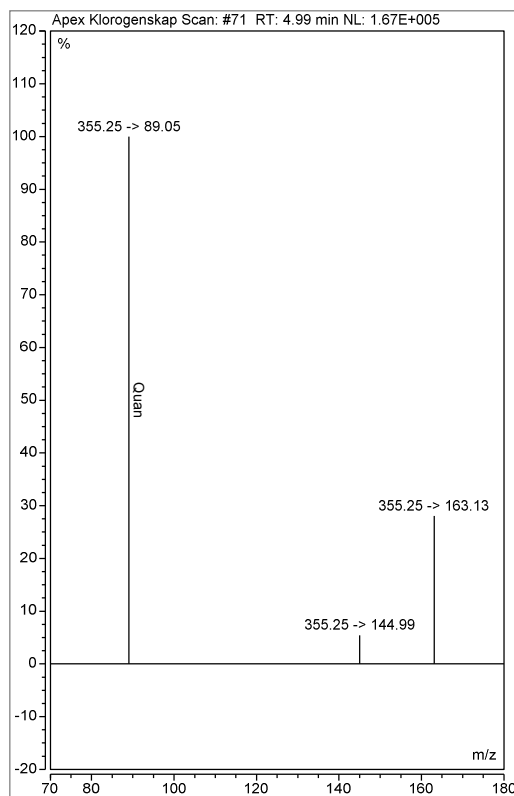
#### 4.1. Identifikacija klorogenske i vanilinske kiseline uporabom UHPLC-DAD-HESI-MS/MS – rješavanje masenog spektra/fragmentacija

Otopina standarda klorogenske i vanilinske kiseline koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  je injektirana zasebno u tekućinski kromatograf opremljen sa DAD i MS/MS detektorima. Svakom analitu je snimljen UV-Vis (slika 4.3.) i MS/MS spektar (slike 4.1. i 4.2.) radi što točnije identifikacije. Maseni spektri su snimani i u pozitivnom i u negativnom načinu rada.



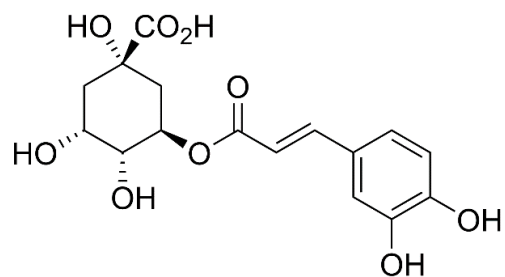
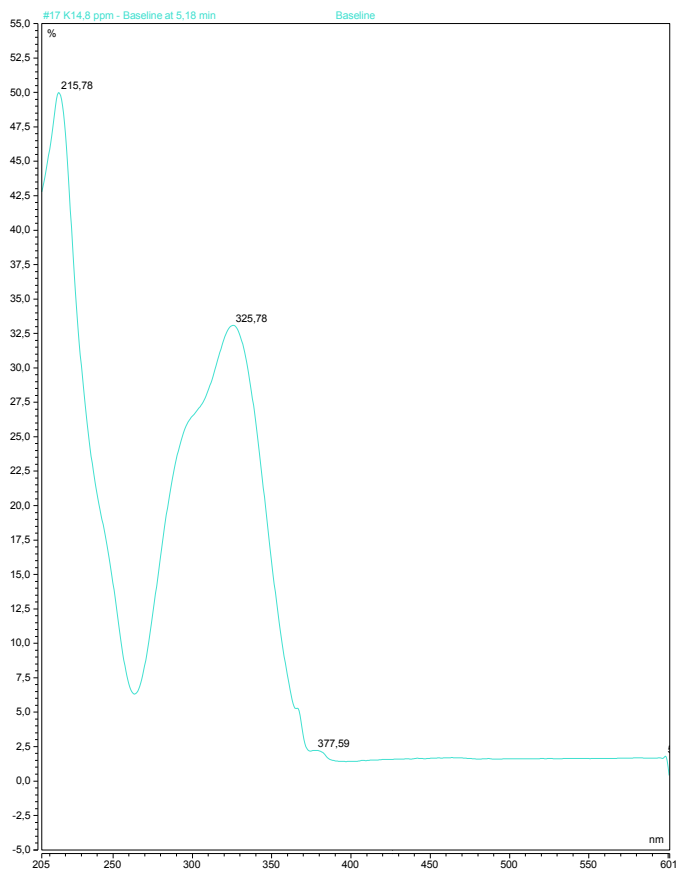
**Slika 4.1.** MS/MS spektar masa klorogenske (lijevo) i vanilinske kiseline (desno) u negativnom načinu rada

U negativnom načinu rada, za klorogensku kiselinu, u prvom kvadripolu (Q1) snima se molekularni ion mase 353 Da  $[\text{M-H}]^-$  dok se u drugom kvadripolu snimaju karakteristični ioni fragmenata molekularskog iona ( $353 \rightarrow 191$ ,  $353 \rightarrow 85$  i  $353 \rightarrow 93 \text{ m/z}$ ), slika 4.1. lijevo. Za vanilinsku kiselinu se, na isti način, u prvom kvadripolu (Q1) snima molekularni ion mase 167 Da  $[\text{M-H}]^-$  dok se u drugom kvadripolu snimaju karakteristični ioni fragmenata molekularskog iona ( $167 \rightarrow 152$ ,  $167 \rightarrow 108$  i  $167 \rightarrow 123 \text{ m/z}$ ), slika 4.1. desno.



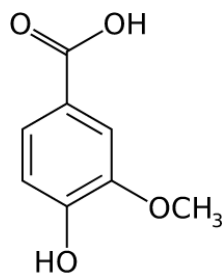
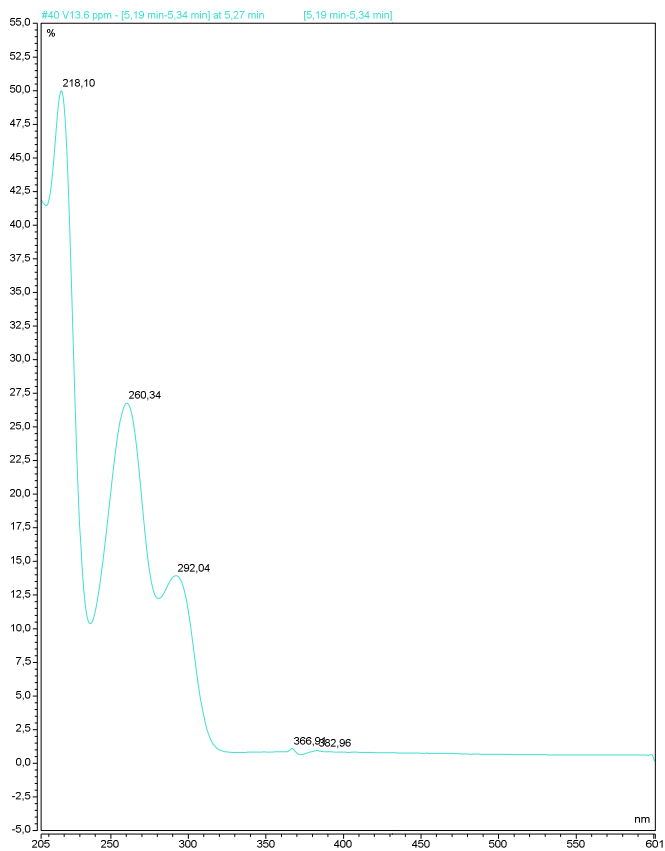
**Slika 4.2.** MS/MS spektar masa klorogenske kiseline u pozitivnom načinu rada

Vanilinska kiselina nema vidljiv spektar masa u pozitivnom načinu rada. Na slici 4.2. prikazan je maseni spektar klorogenske kiseline u pozitivnom načinu rada. U prvom kvadripolu (Q1) snima se molekularni ion mase 355 Da  $[M+H]^+$  dok se u drugom kvadripolu snimaju karakteristični ioni fragmenata molekularnog iona ( $355 \rightarrow 89$ ,  $355 \rightarrow 163$  i  $355 \rightarrow 145$   $m/z$ ). Za daljnje optimiziranje parametara spektrometra korištena je otopine smjese standarda klorogenske i vanilinske kiseline koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .



Klorogenska kiselina

$Mr = 354,311 \text{ g/mol}$



Vanilinska kiselina

$Mr = 168,148 \text{ g/mol}$

Slika 4.3. UV-Vis spektri klorogenske (gore) i vanilinske kiseline (dolje)



## 4.2. Optimizacija parametara masenog spektrometra

Otopina standarda smjese klorogenske i vanilinske kiseline koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup> je injektirana direktno u maseni spektrometar koristeći pumpu sa špricom povezanu s tekućinskim kromatografom i masenim spektrometrom pomoću T-spoja. Na ovaj način se omogućava protok pokretne faze kroz ionski izvor masenog spektrometra i detaljnija optimizacija parametara u prisustvu pokretne faze. Uzorak je ioniziran elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation, ESI*) u miješanom načinu rada (pozitivnom i negativnom) tj. načinu rada s promjenom polariteta (engl. *polarity switching*). Pokretanjem modula za optimizaciju u programu Chromeleon (Chromeleon 7.2.10., ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, SAD) instrument ispituje i ugađa odabrane parametre za rad spektrometra na način da se dobiva najveći odziv detektora za pojedine analite.

Optimizirani su slijedeći parametri spektrometra masa:

- napon na kapilari (elektrospreja),
- protok plina za formiranje finog spreja - maglice (engl. *sheath gas*),
- temperatura plina za formiranje finog spreja - maglice (engl. *vaporizer temperature*),
- protok pomoćnog plina za formiranje maglice (engl. *aux gas*),
- protok plina za poboljšanje finog spreja - maglice (engl. *sweep gas*),
- temperatura kapilare za prijenos iona (engl. *ion transfert tube temperature*)
- napon fokusirajućih leća, RF,
- energija sraza za svaki ion za oba analita,
- praćeni ioni za kvantifikaciju.

Optimizirani parametri spektrometra masa nalaze se u tablici 4.1. za oba analita u smjesi.

**Tablica 4.1.** Optimizirani parametri spektrometra masa za klorogensku i vanilinsku kiselinu

Parametri	Klorogenska kiselina	Vanilinska kiselina
Način snimanja	Pozitivni	Negativni
Napon kapilare (V)	3500	3600
Kvantitativni ion ( $m/z$ )- (energija sraza)	355→89 (53 eV)	167→108 (16 eV)
1. Potvrdni ion ( $m/z$ ) - (energija sraza)	355→163 (11 eV)	167→152 (12 eV)
2. Potvrdni ion ( $m/z$ ) - (energija sraza)	355→145 (28 eV)	167→123 (10 eV)
RF (V)	69	62
Vrijeme snimanja prijelaza ( <i>engl. Dwell time, ms</i> )	100	
Rezolucija Q1 (FWHM)	0,7	
Rezolucija Q3 (FWHM)	1,2	
Tlak plina za fragmentaciju u q2 (mTorr)	1,5	
<i>Sheath gas</i> (AJ)	40	
<i>Aux gas</i> (AJ)	13	
<i>Sweep gas</i> (AJ)	2	
Temperatura kapilare za prijenos iona (°C)	350	
Temperatura plina za formiranje finog spreja (°C)	450	

FWHM - širina pika određenog ion na pola visine, AJ - proizvoljne jedinice

### 4.3. Optimizacija UHPLC metode

Optimizacija kromatografskog dijela metode uključivala je odabir pogodnog modifikatora pokretne faze i odgovarajućeg gradijenta pokretnih faza.

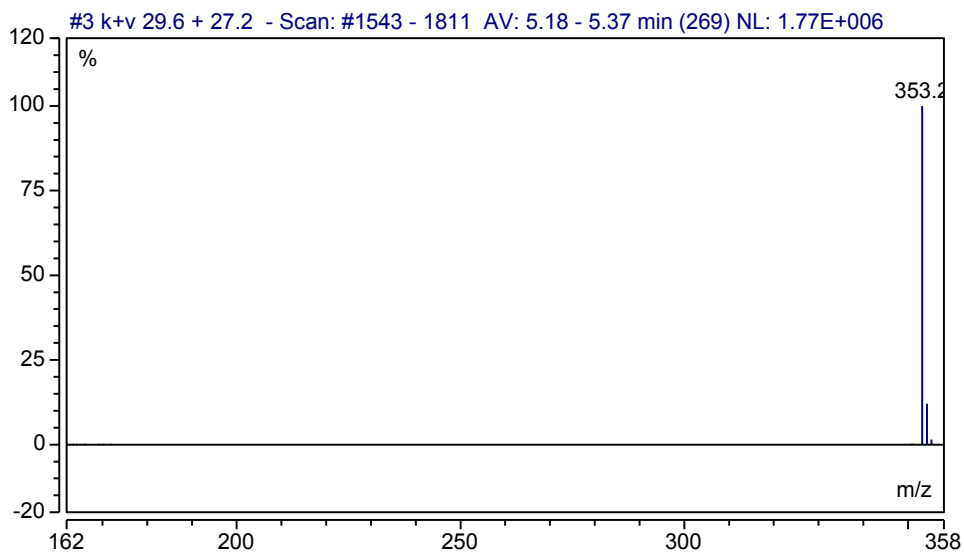
#### 4.3.1. Odabir nepokretne faze

Pregledom literature Wen 2005., Griemann 2015. i Shafaei 2019., kao pogodna nepokretna faza odabrana je C18.<sup>52-54</sup>

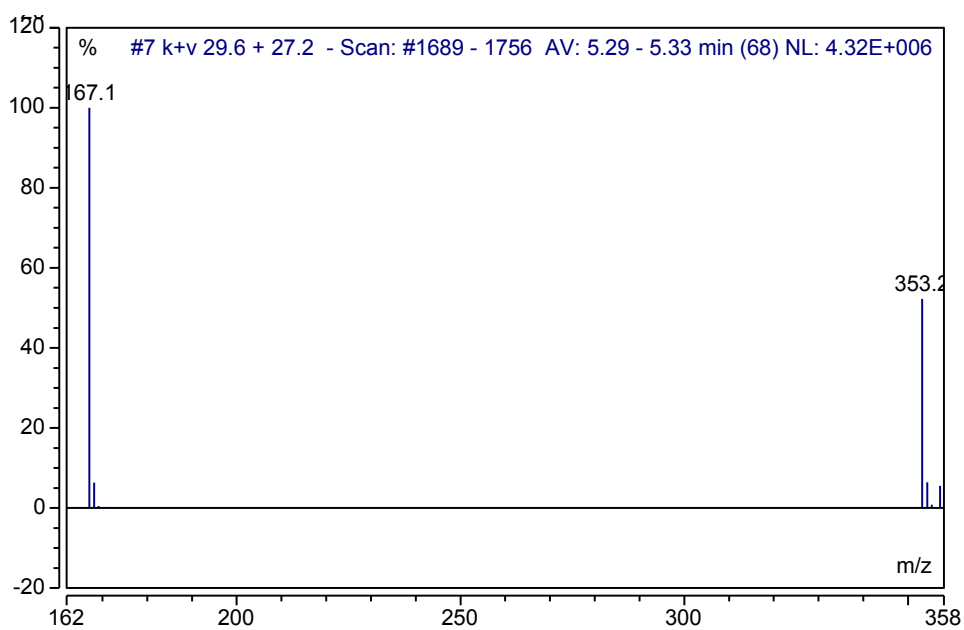
#### 4.3.2. Odabir modifikatora

Pregledom literature Wen 2005. i Shafaei 2019., utvrđeno je da su kolege kao pokretne faze koristile vodu i metanol sa dodatkom 0,1 % mravlje ili 0,2 % trifluoroctene kiseline.<sup>52,54</sup>

Prilikom prvih mjerenja utvrđeno je da se molekularni ion vanilinske kiseline 167  $m/z$   $[M-H]^-$  ne vidi na masenom spektru (slika 4.4.). Nakon toga se dodatnim pregledom literature utvrdilo da mravlja kiselina može "suzbiti" nastanak molekularnih iona fenolnih kiselina u izvoru te se kao alternativa koristi octena kiselina (Hua i sur. 2012.).<sup>55</sup> Ponovljena su mjerenja sa 0,1 % octenom kiselinom kao modifikatorom pokretne faze (slika 4.5.). Dodatnim mjerenjima utvrđeno je da pokretna faza sa dodatkom octene od 0,5 % pokazuje najbolji odziv detektora prema molekularnom ionu vanilinske kiseline.



**Slika 4.4.** Maseni spektar smjese klorogenske i vanilinske kiselina sa 0,1 % mravljom kiselinom kao modifikatorom pokretne faze (negativni način)



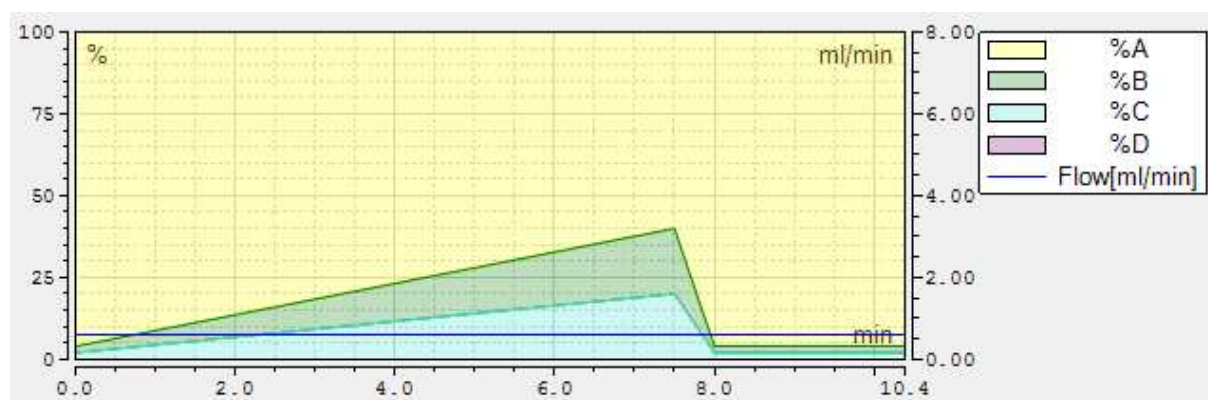
**Slika 4.5.** Maseni spektar smjese klorogenske i vanilinske kiselina sa 0,1 % octenom kiselinom kao modifikatorom pokretne faze (negativni način)

### 4.3.3. Odabir otapala u mobilnoj fazi

Kao pokretna faza odabrana su tri otapala koja su miješana u obliku gradijenta tijekom mjerenja kako je to prikazano u tablici 4.2 i na slici 4.6. Početni omjeri vode (sa 0,5 % octene kiseline), acetonitrila i metanola su iznosili 96:2:2.

**Tablica 4.2.** Gradijent pokretne faze

Vrijeme (min)	Voda + 0.5% HAc A (%)	Acetonitril B (%)	Metanol C (%)
0,00	96,0	2,0	2,0
7,50	60,0	20,0	20,0
8,00	96,0	2,0	2,0
10,40	96,0	2,0	2,0



**Slika 4.6.** Grafički prikaz gradijenta metode

### 4.3.4. Parametri UHPLC metode

Nakon odabira stacionarne faze, modifikatora pokretne faze te same pokretne faze, određeni su optimalni parametri kromatografske metode kako slijedi. Korištena je Zorbax Elipse XDB-C18 kolona duljine 100 mm, promjera 3,0 mm i promjera čestica 3,5  $\mu\text{m}$  C18

punjenja. Udjeli otapala i modifikatora korištenih za pokretnu fazu dani su u tablici 4.2. Protok homogene mobilne faze bio je  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura kolone je održavana konstantnom na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a kao detektor je korišten trostruki kvadripol.

#### 4.4. Validacija metode

Metoda je vrednovana korištenjem ICH smjernica za vrednovanje. Vrednovani parametri su uključivali: specifičnost, linearnost, granica određivanja i dokazivanja, preciznost, robusnost, točnost i iskorištenje.

##### 4.4.1. Specifičnost

Specifičnost metode ukazuje na mogućnost metode da razlikuje ciljani analit u prisustvu ostalih sastavnica smjese ili matice uzorka.<sup>56</sup> Kako je kao detektor korišten maseni spektrometar sa trostrukim kvadripolom, specifičnost se osigurala na način da je za svaki analit u prvom kvadripolu sniman odgovarajući molekularski ion, dok su se u drugom kvadripolu snimala tri iona nastala fragmentiranjem odgovarajućih molekularskih iona. Za svaku fragmentaciju su korištene točno određene energije sraza što je dodatno povećalo specifičnost metode (tablica 4.1.).

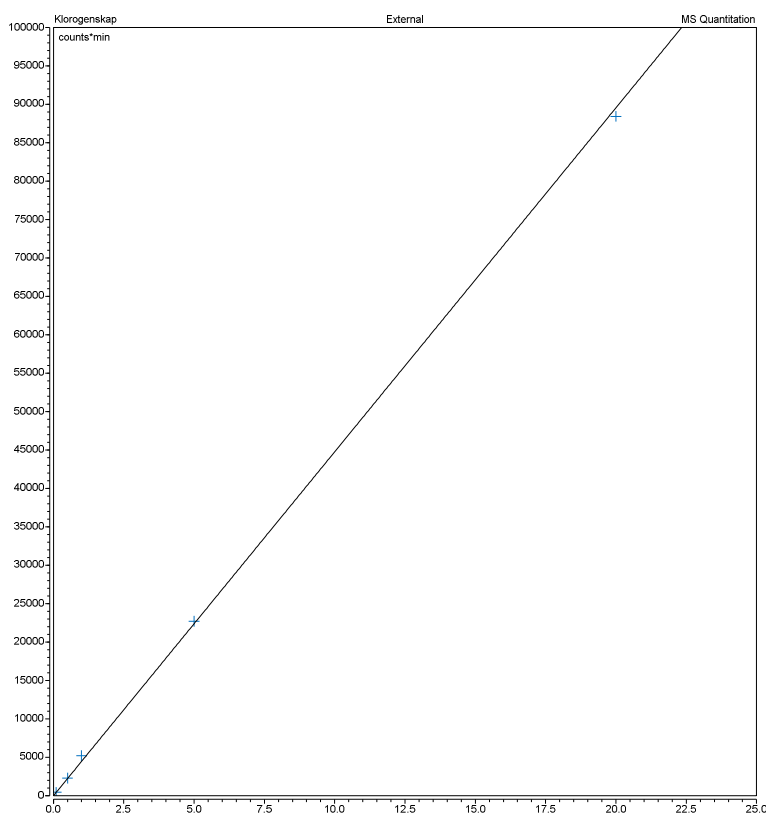
##### 4.4.2. Linearnost

Linearnost metode je potvrđena korelacijskim faktorom ( $R^2$ ) koji je iznosio 0,9987 za klorogensku kiselinu i 0,9967 za vanilinsku kiselinu. Umjerne krivulje za klorogensku i vanilinsku kiselinu su prikazane, redom, na slikama 4.7. i 4.8.

**Tablica 4.3.** Koncentracije i odgovarajući odzivi detektora za oba analita

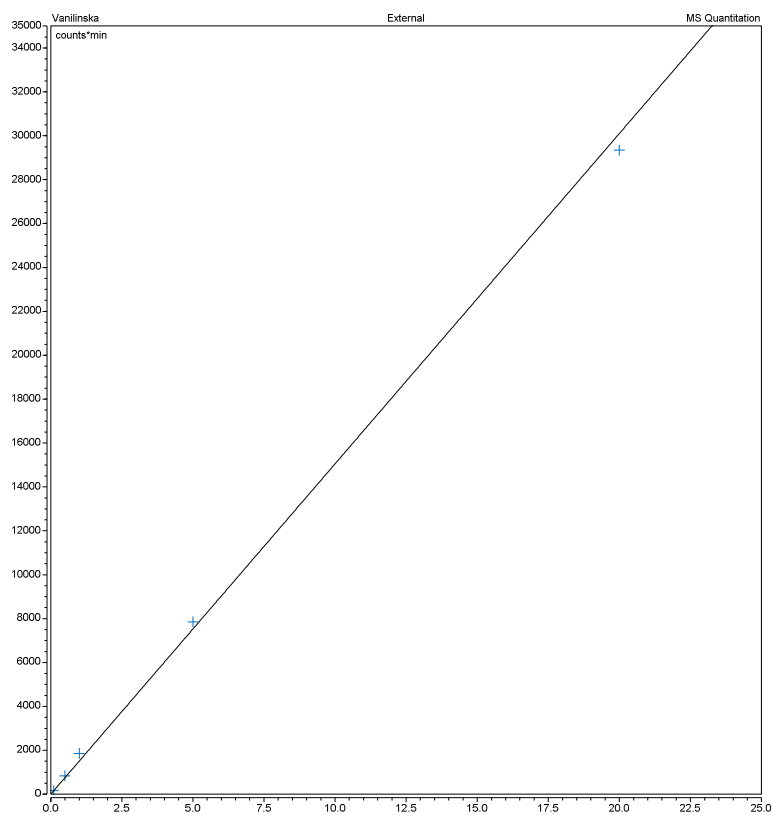
Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> )	Klorogenska kiselina	Vanilinska kiselina
0,1	323,2	146,5
0,5	1652,5	769,0
1	3807,5	1722,3
5	18537,9	7830,3
20	16859,6	7301,7

Jednadžba pravca umjerne krivulje za klorogensku kiselinu glasi:  $y=4477,83x$  ( $R^2=0,9987$ ).



**Slika 4.7.** Umjerna krivulja za klorogensku kiselinu

Jednadžba pravca umjerne krivulje za vanilinsku kiselinu glasi:  $y=1505,22x$   
( $R^2=0,9967$ ).



**Slika 4.8.** Umjerna krivulja za vanilinsku kiselinu



#### 4.4.3. Granice kvantifikacije i dokazivanja

ICH smjernice propisuju granicu određivanja i granicu dokazivanja kao odnose signala i šuma i to redom, 10 i 3. Otopina standarda koncentracije  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  je ispitana na način da je injektirana osam puta te je mjerena površina i omjer signala i šuma za svaki od analita. Iz površina je izračunata odgovarajuća relativna standardna devijacija.

**Tablica 4.4.** Odzivi detektora dobiveni uzastopnim injektiranjem otopine iste koncentracije smjese klorogenske i vanilinske kiseline.

Injektiranje	Koncentracija ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Klorogenska kiselina		Vanilinska kiselina	
		Odziv	S/N	Odziv	S/N
1	0,1	393,8	90	160,9	225
2	0,1	342,8	141	174,3	111
3	0,1	356,3	178	160,1	136
4	0,1	367,9	243	157,8	133
5	0,1	345,1	187	158,6	142
6	0,1	306,1	133	154,1	157
7	0,1	343,7	149	166,0	127
8	0,1	325,7	153	154,8	174
<b>RSD (%)</b>		6,5		2,7	

Iz odnosa signala i šuma izračunate su granice određivanja i dokazivanja. Granice određivanja i dokazivanja za klorogensku kiselinu su, redom, 6 i  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , dok se granice određivanja i dokazivanja za vanilinsku kiselinu, redom, 7 i  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.4.4. Točnost i iskorištenje

Točnost i iskorištenje određivanja klorogenske i vanilinske kiseline je vrednovana na način da su koncentracije pripremljenih otopina proračunale putem umjerne krivulje te je izračunato iskorištenje. Vidljivo je da se iskorištenja za oba analita kreću u relativno zadovoljavajućem rasponu od 81,2 - 102,6 %.

**Tablica 4.5.**Točnost i iskorištenje

Koncentracija (mg L <sup>-1</sup> )	Klorogenska kiselina		Vanilinska kiselina	
	Računski	Iskorištenje	Računski	Iskorištenje
<b>0,1</b>	0,0995	100,5	0,104	96,2
<b>0,5</b>	0,5144	97,2	0,5522	90,5
<b>1,0</b>	1,1629	86,0	1,2321	81,2
<b>5,0</b>	5,0714	98,6	5,219	95,8
<b>20,0</b>	19,7518	101,3	19,4926	102,6

#### 4.4.5. Preciznost

Preciznost instrumenta je ispitana na način da se otopine smjese dvaju analita koncentracije 5 mg L<sup>-1</sup> zasebno pripreme u šest ponavljanja i svako je injektirano u instrument te je izračunata koncentracija putem umjerne krivulje, a zatim je izračunata relativna standardna devijacija izračunate koncentracije (RSD %). Relativne standardne devijacije injektiranja za klorogensku i vanilinsku kiselinu iznose, redom, 3,3 i 3,1 %.

#### 4.4.6. Robusnost

Robusnost metode je provjerena na način da su mijenjani protok pokretne faze i temperatura kolone. Mjerena je koncentracija smjese standarda od 20 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su dani u tablici 4.6.

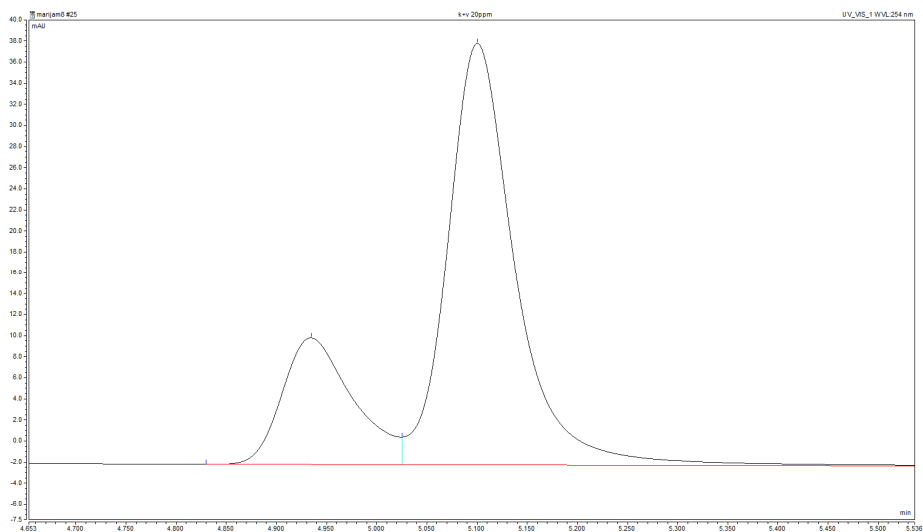
**Tablica 4.6.** Robusnost u ovisnosti promjena parametara metode

Parametar	Klorogenska kiselina	Vanilinska kiselina
<b>Prema metodi</b>	/	/
<b>Protok + 0,05 mL min<sup>-1</sup></b>	107,3	105,4
<b>Protok - 0,05 mL min<sup>-1</sup></b>	95,9	94,9
<b>Temperatura kolone + 5 °C</b>	110,9	102,8
<b>Temperatura kolone - 5 °C</b>	103,2	100,6

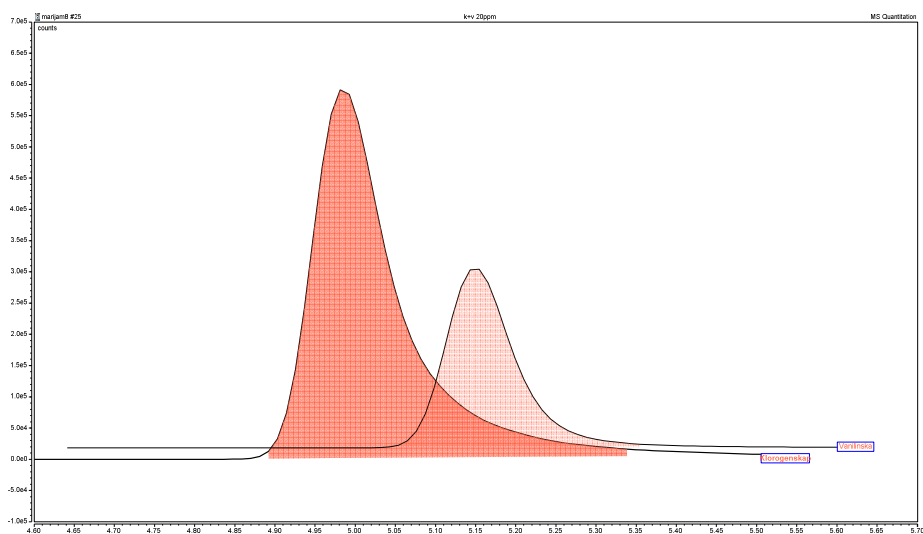
## **5. Rasprava**

## 5.1. Optimizacija parametara metode

Cilj diplomskog rada bio je razviti i optimizirati metodu određivanja klorogenske i vanilinske kiseline upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom te istu metodu validirati, tj. utvrditi njenu prikladnost kroz validacijske parametre. Budući da je korištenjem tekućinske kromatografije otežana kvantifikacija klorogenske i vanilinske kiseline u smjesi zbog preklapanja površine pikova, maseni spektrometar sa trostrukim kvadripolom se vidi kao rješenje ovog problema.



**Slika 5.1.** Kromatogram smjese klorogenske i vanilinske kiseline s DAD detektorom

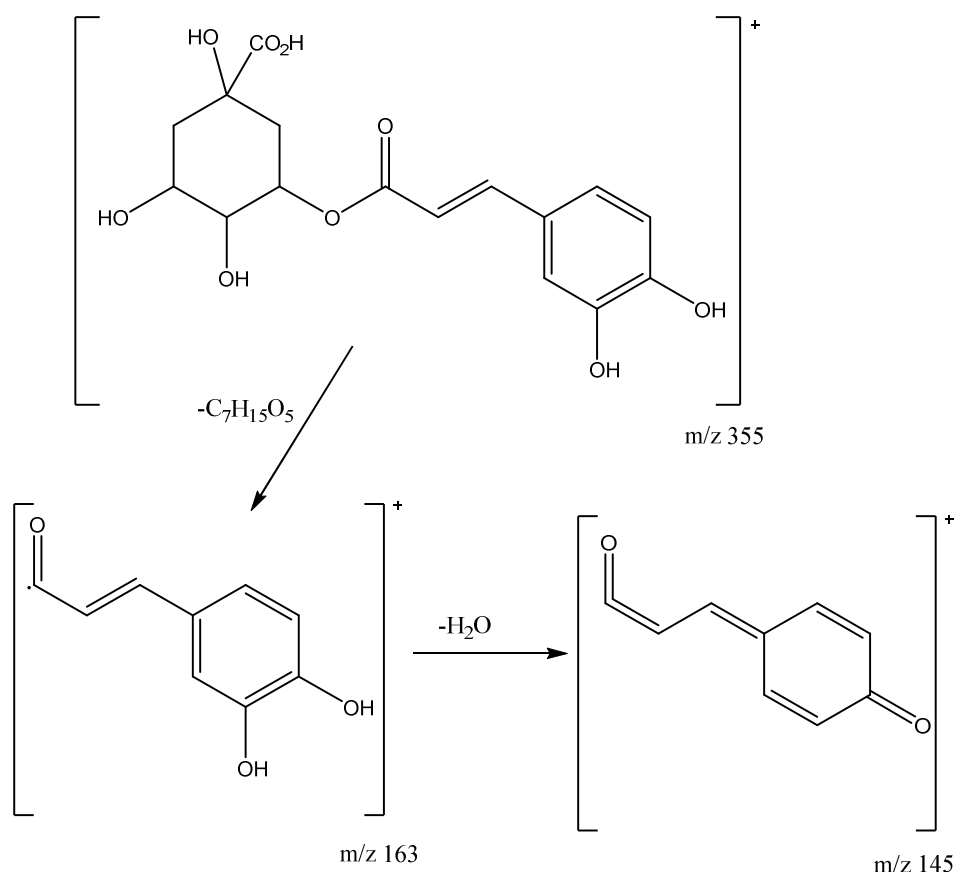


**Slika 5.2.** Kvantifikacijski "kromatogram" smjese klorogenske i vanilinske kiseline s MS/MS detektorom

Razlog tomu leži u činjenici da fragmentacijom molekuskog iona nastaju produkt ioni koji se koriste za kvantifikaciju i identifikaciju pojedinog analita.

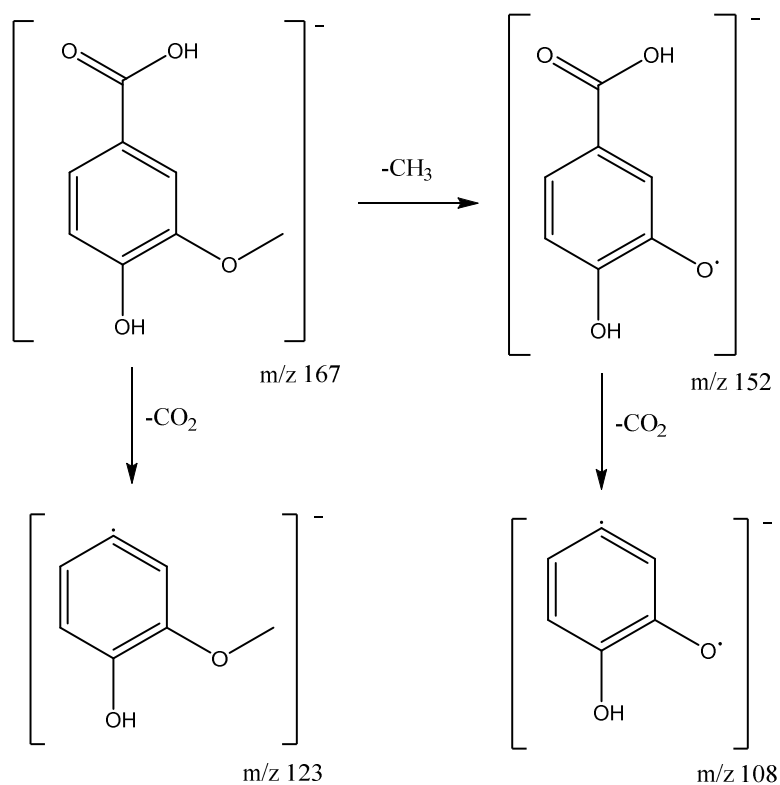
Prije nego se pristupilo mjerenju, bilo je potrebno odabrati najprikladnije otapalo u kojem su klorogenska kiselina i vanilinska kiselina topljive da bi se uspješno pripravile početne otopine istih. Prema istraživanju Wen i sur. utvrđeno je da su klorogenska i vanilinska kiselina topljive u smjesi vode i metanola u omjeru 1:1.<sup>52</sup>

Učinjena je identifikacija klorogenske i vanilinske kiseline koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup> UHPLC-MS/MS tehnikom i snimljeni su maseni spektri u pozitivnom i negativnom načinu rada. Prikazani na slikama 4.1. i 4.2. uz iznimku vanilinske kiseline koja nema vidljiv spektar masa u pozitivnom načinu rada. Prema fragmentima vidljivim na njima, predložen je mehanizam fragmentacije klorogenske kiseline prikazan na slici 5.3. te mehanizam fragmentacije vanilinske kiseline prikazan na slici 5.4.



**Slika 5.3.** Predloženi put fragmentacije klorogenske kiseline u pozitivnom načinu rada<sup>57</sup>

U prvom kvadripolu (Q1) snima se molekularni ion mase 355 Da  $[M+H]^+$  dok se u drugom kvadripolu snimaju karakteristični ioni fragmenata molekularnog iona ( $355 \rightarrow 163$  i  $355 \rightarrow 145$   $m/z$ ).



**Slika 5.4.** Predloženi put fragmentacije vanilinske kiseline u negativnom načinu rada<sup>58</sup>

Za vanilinsku kiselinu se, na isti način, u prvom kvadripolu (Q1) snima molekularni ion mase 167 Da  $[M-H]^-$  dok se u drugom kvadripolu snimaju karakteristični ioni fragmenata molekularnog iona ( $167 \rightarrow 152$ ,  $167 \rightarrow 108$  i  $167 \rightarrow 123$   $m/z$ ).

Optimizacija parametara spektrometra masa je postignuta direktnim injektiranjem otopine standarda u maseni spektrometar koristeći pumpu sa špricom povezanu s HPLC-MS/MS pomoću T-spoja špricom, i pokretanjem modula za optimizaciju u programu Chromeleon čime instrument ispituje i ugađa odabrane parametre za rad spektrometra na način da se dobiva najveći odziv detektora za pojedine analite. Time se postiže bolja osjetljivost metode.

Optimizirani su slijedeći parametri spektrometra masa: napon na kapilari od 3500 V za klorogensku a 3600 V za vanilinsku kiselinu, RF od 69 V za klorogensku kiselinu i 62 V za

vanilinsku kiselinu, temperatura plina za formiranje finog spreja od 450 °C i temperatura kapilare za prijenos iona od 350 °C. Praćeni ion za kvantifikaciju kod klorogenske kiseline je onaj od 89 Da, a energije sraza su: 53,11 i 28 eV. Praćeni ion za kvantifikaciju kod vanilinske kiseline je onaj od 108 Da, a energije sraza su: 16,12 i 10 eV.





**Slika 3.5.** Pumpa sa špricom spojena sa tekućinskim kromatografom i spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom pomoću T-spoja za optimizaciju parametara masenog spektrometra

Optimizirani su i kromatografski parametri analize: nepokretna faza, modifikator otapala i otapalo u pokretnoj fazi.

Pregledom literature Wen 2005., Griemann 2015. i Shafaei 2019., kao pogodna nepokretna faza odabrana je C18.<sup>52-54</sup>

Pri određivanju modifikatora, pregledana je literatura i ispitani su modifikatori koje su kolege koristile: mravlja kiselina i trifluorocetna kiselina.<sup>52,54</sup> Prilikom prvih mjerenja utvrđeno je da se molekularni ion vanilinske kiseline  $167 m/z [M-H]^-$  ne vidi na masenom spektru pa se dodatnim pregledom literature utvrdilo da mravlja kiselina može "suzbiti" nastanak molekularnih iona fenolnih kiselina u izvoru te se kao alternativa koristi octena kiselina.<sup>55</sup> Ponovljena su mjerenja sa 0,1 % i 0,5 % octene kiseline kao modifikator pokretne

faze i, s obzirom da posljednja pokazuje najbolji odziv detektora prema molekulsom ionu vanilinske kiseline, ona je odabrana kao najprikladniji modifikator (slike 4.4. i 4.5.).

Kao pokretna faza odabrana su tri otapala koja su miješana u obliku gradijenta tijekom mjerenja: voda sa 0,5% octenom kiselinom, acetonitril i metanol. Od početka analize do 7,5 minute omjeri su se mijenjali do 96:2:2, od 7,5 minute do 8,0 minute mijenjali su se do 60:20:20 i do 10,40 minute su se opet postepeno vratili na 96:2:2.

## 5.2. Validacija metode

Linearnost metode je određena za koncentracije u rasponu od 0,1 do 20 mg L<sup>-1</sup> kroz pet točaka umjerne krivulje. Potvrđena je korelacijskim faktorom ( $R^2$ ) koji je iznosio 0,9987 za klorogensku kiselinu i 0,9967 za vanilinsku kiselinu.

Pri definiranju granice određivanja potrebno je zadovoljiti kriterij omjera signala i šuma 10:1, a pri definiranju granice dokazivanja omjer signala i šuma od 3:1. Otopina standarda koncentracije 0,1 mg L<sup>-1</sup> injektirana je osam puta i izračunom su dobivene granice određivanja i dokazivanja koje za klorogensku kiselinu iznose 6 i 2 µg L<sup>-1</sup>, dok granice određivanja i dokazivanja za vanilinsku kiselinu iznose 7 i 2 µg L<sup>-1</sup>.

Uspoređivanjem računski dobivenih vrijednosti koncentracija iz umjerne krvulje sa stvarnim vrijednostima koncentracija dobivena su iskorištenja za pet koncentracija standarda smjese klorogenske i vanilinske kiseline u rasponu od 0,1 do 20 mg L<sup>-1</sup>. Iskorištenja u rasponu 81,2 – 102,6 % ukazuju na potvrdu točnosti ove metode.

Preciznost instrumenta je ispitana na način da su otopine smjese dvaju analita koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup> uzastopno injektirane šest puta te je za svako injektiranje izračunata koncentracija putem umjerne krivulje i relativna standardna devijacija izračunate koncentracije (RSD %) koja je za klorogensku iznosila 3,3 %, a za vanilinsku kiselinu 3,1 %. Dobivenim rezultatima potvrđena je preciznost instrumenta.

Robusnost metode je provjerena na način da su mijenjani protok pokretne faze i temperatura kolone prilikom mjerenja koncentracije smjese standarda od 20 mg L<sup>-1</sup>. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da male promjene metode ne utječu značajno na dobivene rezultate i time je potvrđena zadovoljavajuća robusnost metode.

Provedeni postupci u svrhu validacije prethodno optimizirane kvalitativne i kvantitativne metode pokazali su da je ista prihvatljiva za tu svrhu.

## **6. Zaključci**

1. Tekućinska kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom je prikladna metoda za odjeljivanje smjese vanilinske i klorogenske kiseline te kvalitativno i kvantitativno određivanje.
2. Kao otapalo izbora za smjesu klorogenske i vanilinske kiseline odabrana je smjesa vode i metanola u omjeru 50:50.
3. Maseni spektrometar je optimiziran sljedećim parametrima: napon na kapilari od 3500 V za klorogensku, a 3600 V za vanilinsku kiselinu, RF od 69 V za klorogensku kiselinu i 62 V za vanilinsku kiselinu, vaporizer temperature od 450 °C i temperatura kapilare za prijenos iona od 350 °C. Praćeni ion za kvantifikaciju kod klorogenske kiseline je  $355 \rightarrow 89$   $m/z$ , dok su  $355 \rightarrow 145$ , i  $355 \rightarrow 163$   $m/z$  služili kao potvrdni ioni, a energije sraza su iznosile, redom: 53,11 i 28 eV. Praćeni ion za kvantifikaciju kod vanilinske kiseline je  $167 \rightarrow 108$   $m/z$ , dok su  $167 \rightarrow 152$ , i  $167 \rightarrow 123$   $m/z$  služili kao potvrdni ioni, a energije sraza su iznosile, redom: 16,12 i 10 eV.
4. Tekućinska kromatografija je optimizirana na način da je odabrano C18 punilo kolone te je za pokretnu fazu odabrana smjesa 0,5% octene kiseline u vodi, acetonitrila i metanola u početnom omjeru 96:2:2. Tijekom prvih 7,5 minuta mjerenja omjer pokretne faze stalno se mijenja do omjera 60:20:20, nakon čega se u vremenu 7,5 - 8,0 minuta omjer pokretne faze vraća na početnu vrijednost 96:2:2 i zadržava se konstantnim u vremenu 8,0 – 10,40 minuta.
5. Razvijena metoda ima zadovoljavajuće vrijednost parametara validacije čime je osigurana njena prikladnost za određivanje klorogenske i vanilinske kiseline.

## **7. Prilozi**

## 7.1. Korištena oprema



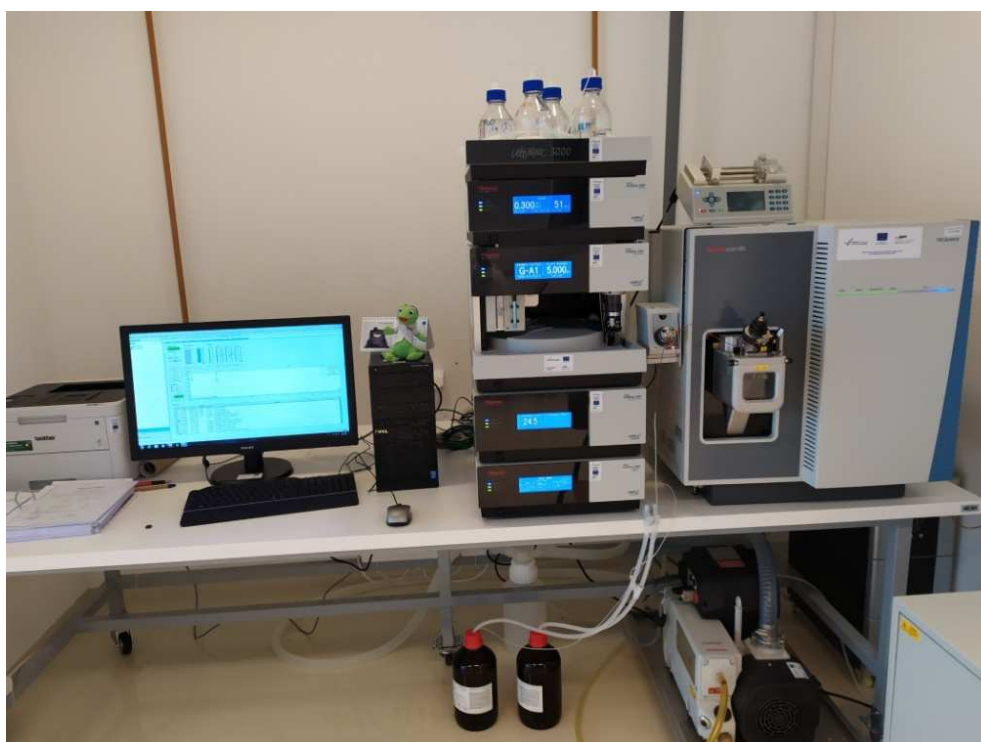
**Slika 1.** Vaga (AT261 DigitalRange, Mettler Toledo)



**Slika 2.** Uređaj za pročišćavanje vode (Purelab Flex 3 (18.2 M $\Omega$ , UV 185/254 nm, TOC <5 ppb, Tip 1), Elga)



**Slika 3.** Ultrazvučna kupelj (JP-010, Digital Pro)



**Slika 4.** Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (Dionex UltiMate 3000) vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (TSQ Quantis)



**Slika 5.** Pumpa za špricu (F100T2, Chemyx).



## **8. Literaturni izvori**

1. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003; 54: 519–546.
2. Clifford MN, Johnston KL, Knigh S, Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chemistry.* 2003; 51(10): 2900–2911.
3. Wikipedia. Chlorogenic acid. [Internet]. [pristupljeno 19.10.2020.] Dostupno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid)
4. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79(3): 362–372.
5. Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant.* 2010; 3(1): 2–20.
6. Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J. Agric. Food Chemistry.* 2001; 49 (20): 4646–4652.
7. Clifford MN. The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79(3): 362-372.
8. Jalal Mahbulul AF, Read DJ, Haslam E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry.* 1982; 21(6): 1397–1401.
9. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *J. Nutr.* 2001; 131(1), 66–71.
10. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(10): 2900-11.
11. Freedman SO, Shulman R, Krupey J, Sehon AH. Antigenic properties of chlorogenic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1964; 35(2): 97–107.
12. Friedman M. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. *J. Agric. Food Chemistry.* 1997 ; 45(5): 1523–1540.
13. Cheng GW, Crisosto CH. Browning Potential, Phenolic Composition, and Polyphenoloxidase Activity of Buffer Extracts of Peach and Nectarine Skin Tissue. *Journal of the American Society for Horticulture.* 1995; 120(5): 835–838.
14. Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Food Sci. Nutr.* 2001; 41(4): 251–286.
15. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M i sur. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 2018; 97: 67–74.

16. Tajik N, Tajik M, Mack I, Enck P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health. *Eur. J. Nutr.* 2017; 56(7): 2215–2244.
17. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *J. Nutr.* 2003; 133(6): 1806–1814.
18. Higdon JV, Frei B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006; 46(2), 101–123.
19. Layton LL, Panzani R, Corse JW. Nondiffusible allergenic contaminant isolated from samples of chlorogenic acid causing allergic. *Allergy Clin. Immunol.* 1966; 38(5), 268-275.
20. Wikipedia. Vanillic acid. [Internet] [pristupljeno 16.10.2020.] Dostupno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Vanillic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Vanillic_acid)
21. Wikipedia. Acide vanillique. [Internet] [pristupljeno 16.10.2020.] Dostupno na: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide\\_vanillique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_vanillique)
22. Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault JF, Ceccaldi BC, Brunerie P, Asther M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Biotechnol.* 1996; 50(2–3): 107–113.
23. Civolani C, Barghini P, Roncetti AR, Ruzzi M, Schiesser A. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(6): 2311–2317.
24. Gitzinger M, Kemmer C, Fluri DA, Daoud El-Baba M, Weber W, Fussenegger M. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Res.* 2011; 40(5): 37.
25. Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(12): 4631–4636.
26. Wikipedia. Vanillinsäure. [Internet] [pristupljeno 16.10.2020.] Dostupno na: <https://de.wikipedia.org/wiki/Vanillins%C3%A4ure>
27. Gálvez MC, Barroso CG, Pérez-Bustamante JA. Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples. *Zeitschrift für. Lebensmitteluntersuchung und Forschung.* 1994; 199: 29–31.

28. Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *BioFactors*. 1998; 8(1–2): 111–8.
29. Yvonne K. Antibacterial effect of selected natural substances on the growth of *Listeria monocytogenes*. [Diploma thesis]. Bonn; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2006.
30. Agnieszka T, Antoni R. Inhibition of crystallization Caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. *Microbiol. Res*. 2014; 169(7-8): 579-584.
31. Ašperger D, Babić S, Bolanča T, Mutavdžić Pavlović D, Ukić Š. Kromatografska analiza u sustavu kvalitete analitičkoga procesa u Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. *Kem. Ind*. 2019; 68(9-10): 535–546.
32. Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga. 2016; 630-657. str.
33. Debeljak Ž. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije. Zagreb: Medicinska naklada. 2018; 73-4. str.
34. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb: Medicinska naklada, 1997; 231-270. str.
35. Settle FA. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997; 149-153. str.
36. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2015
37. Periša M. Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu. [Doktorski rad] Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2015.
38. Marković, T. Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa. [Diplomski rad] Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.
39. Runje M. Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku. [Doktorski rad] Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2018.
40. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb: Školska knjiga. 1999; str. 645-668., 692-9. str.

41. Meyer VR. Practical high-performance liquid chromatography. Hoboken: John Wiley & Sons (Wiley), 2004; 82. str.
42. Ursić, I. Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka. [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, 2017.
43. Hrvatska enciklopedija (LZMK). Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 1999.-2009.
44. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Flum.* 2009;45(3): 218-232.
45. De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications.* Chichester: John Wiley & Sons, 2007; 85-6. str.
46. Wikipedija. Masena spektrometrija. [Internet] [pristupljeno 18.10.2020.] Dostupno na: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Masena\\_spektrometrija](https://hr.wikipedia.org/wiki/Masena_spektrometrija)
47. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 2000; 72(6): 1156–62.
48. Hu, Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass. Spectrom.* 2005; 40(4): 430–43.
49. Nikolaev EN, Kostyukevich YI, Vladimirov GN. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. *Mass. Spectrom.* 2014; 32(2): 219-258.
50. Lundanes E, Reubsaet L, Greibrokk T. *Chromatography Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2014; 212-4. str.
51. EMEA (1995): CPMP/ICH/381/95, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, Amsterdam
52. Wen D, Li C, Di H, Liao Y, Liu H. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 6624-6629.
53. Grieman MM, Greaves J, Saltzman ES. A method for analysis of vanillic acid in polar ice cores. *Clim. Past.* 2015; 11, 227–232.
54. Shafaei A, Croft K, Hodgson J, Boyce MC. Simultaneous quantitative analysis of polyphenolic compounds in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2019; 42(18): 2909-2921.

55. Hua Y, Yenke D. Increasing the Sensitivity of an LC–MS Method for Screening Material Extracts for Organic Extractables via Mobile Phase Optimization. *J. Chromatogr. Sci.* 2012; 50: 213–227.
56. Vessman J, Stefan RI, Van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Thorburn Burns D, Fajgelj A, Muller H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001.). *Pure Appl. Chem.* 2001; 73(8): 1381-6.
57. Wu ZJ, Ma XL, Fang DM, Qi HY, Ren WJ, Zhang GL. Analysis of Caffeic Acid Derivatives from *Osmanthus Yunnanensis* Using Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2009; 15(3): 415–429.
58. Ostrowski W, Wojakowska A, Grajzer M, Stobiecki M. Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2014; 967: 21-7.



*Cilj istraživanja:* Razvoj i optimizacija te validacija metode kvantitativnog i kvalitativnog određivanja klorogenske i vanilinske kiseline pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornost vezane s masenim spektrometrom s trostrukim kvadripolom.

*Materijali i metode:* U istraživanju je korišten radni standard, smjesa klorogenske i vanilinske kiseline, od kojeg su pripravljene otopine u rasponu od 0,1 mg L<sup>-1</sup> do 20 mg L<sup>-1</sup>, te su iste korištene za optimizaciju parametara masenog spektrometra, tekućinske kromatografije te validaciju metode.

*Rezultati:* Kao otapalo izbora za smjesu vanilinske i klorogenske kiseline izabrana je smjesa vode i metanola u omjeru 50:50. Maseni spektrometar je optimiziran na napon na kapilari od 3500 V za klorogensku, a 3600 V za vanilinsku kiselinu, RF od 69 V za klorogensku kiselinu i 62 V za vanilinsku kiselinu, temperatura plina za formiranje finog spreja od 450 °C, i temperatura kapilare za prijenos iona od 350 °C. Korištena je nepokretna faza s C18 punilom kolone, te smjesa 0,5% octene kiseline u vodi, acetonitrila i metanola u omjerima 96:2:2 (0,0 min), 60:20:20 (7,5 min), 96:2:2 (8,0 min) i 96:2:2 (8,0 10,4 min), kao pokretna faza te predstavljaju optimalne kromatografske parametre. Na temelju analize MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture iona produkata i pretpostavljeni mehanizam njihove fragmentacije. Ispitani parametri validacije koji uključuju specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu kvantifikacije i detekcije te robusnost dali su zadovoljavajuće vrijednosti.

*Zaključci:* Tekućinska kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom je prikladna metoda za odjeljivanje smjese vanilinske i klorogenske kiseline te kvalitativno i kvantitativno određivanje klorogenske i vanilinske kiseline. Razvijena metoda je validirana čime je osigurana njena prikladnost za određivanje smjese klorogenske i vanilinske kiseline.

Ključne riječi: klorogenska kiselina, vanilinska kiselina, tekućinska kromatografija, validacija, spektrometrija masa s trostrukim kvadripolom



## **10. Summary**

*Diploma Thesis Title:* Separation of a mixture of vanillic and chlorogenic acid and qualitative and quantitative determination using UHPLC-DAD-HESI/MS/MS

*Objectives:* Development, optimization and validation of the method for quantitative and qualitative determination of chlorogenic and vanillic acid using ultrahigh efficiency liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer.

*Material and methods:* In this study a working standard prepared as a mixture of chlorogenic and vanillic acid was used to prepare solutions ranging from 0.1 mg L<sup>-1</sup> to 20 mg L<sup>-1</sup>. These solutions were used for optimization of mass spectrometer and liquid chromatography parameters as well as for method validation.

*Results:* Mixture of water and methanol (50:50) was chosen as the solvent for dissolution of the vanillic and chlorogenic acid mixture. Mass spectrometer was optimized for capillary voltage of 3500 V for chlorogenic and 3600 V for vanillic acid, RF of 69 V for chlorogenic acid and 62 V for vanillic acid, vaporizer temperature of 450 °C, and ion transfer tube temperature of 350 °C. Stationary phase with C18 column filling and a mixture of 0.5% acetic acid in water, acetonitrile and methanol in the ratios 96:2:2 (0,0 min), 60:20:20 (7,5 min), 96:2:2 (8,0 min) and 96:2:2 (8,0 10,4 min), was used as the mobile phase represent optimal chromatographic parameters. Based on the analysis of MS and MS/MS spectra, the structures product ions and the possible mechanism of their fragmentation were given. Examined validation parameters including specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantification and detection, and robustness yielded satisfactory values.

*Conclusions:* Ultra-high performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer is a suitable method for the separation of a mixture of vanillic and chlorogenic acid and qualitative and quantitative determination. The developed method was validated to ensure its suitability for the determination of chlorogenic and vanillic acid mixture.

Key words: chlorogenic acid, vanillic acid, liquid chromatography, validation, triple quadrupole mass spectrometry



**Osobni podaci:**

- Ime i prezime: Marija Markota
- Datum rođenja: 10.07.1996.
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Pristupak 11, 20352 Vid
- E-mail: marija.markota15@gmail.com

**Obrazovanje:**

- 2011. – 2012. Gimnazija Metković, opći smjer, Metković
- 2012. – 2015. Gimnazija Metković, prirodoslovno-matematički smjer, Metković
- 2015. – 2020. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: Farmacija

**Radno iskustvo:**

- 2016. Sobarica u Valamar d.o.o., Dubrovnik
- 2017. Konobarica u U.O. Sirena vl. Joško Šalov, Marina
- 2017. Konobarica u U.O. Nakovana, bistro Montun, Viganj
- 2020. Stručno osposobljavanje: 28. veljače – 19. rujan; Ljekarne Splitsko – dalmatinske županije, ljekarna Brda

**Posebne vještine:**

- Strani jezici: engleski, njemački
- Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000

**Priznanja:**

- članica CPSA-e 2017. - 2018.
- 2019. – 2020. stipendistica Ljekarne Prima Pharme