

Određivanje klorogenskih kiselina pomoću UHPLC-MS/MS

Desnica, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:171:190551>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Nina Desnica

ODREĐIVANJE KLOOROGENSKIH KISELINA POMOĆU UHPLC-MS/MS

Diplomski rad

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

Split, listopad 2023.

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Tema rada: prihvaćena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacije te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 24. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

Pomoć pri izradi: mag. chem. Ana Vučak

ODREĐIVANJE KLOROGENSKIH KISELINA POMOĆU UHPLC-MS/MS

Nina Desnica, broj indeksa: 218104

Sažetak

Cilj istraživanja: Razvoj i optimizacija metode koja služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa (UHPLC-MS/MS) i zatim vrednovanje same metode kako bi se osigurala pouzdanost rezultata.

Materijali i metode: Radni standard korišten u istraživanju je smjesa kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline te su od njega pripravljene otopine koncentracija između $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ i 50 mg L^{-1} , a one su potom korištene za razvoj i vrednovanje metode korištenjem tekućinske kromatografije i spektrometrije masa.

Rezultati: Za pripremu nižih koncentracija standardna otopina je razrijeđivana pomoću metanola. Pokretnu fazu je sačinjavala smjesa vode i metanola pomiješane s 0,2 % volumnog udjela octene kiseline kao modifikatora. Odabrana je Agilent kolona punjena C18 nepokretnom fazom, a prostor u kojem je smještena termostatan je na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Spektrometar masa je optimiziran postavljanjem napona na kapilari od 4400 V za obje kiseline. RF leće su bile podešene na 110 V za kriptoklorogensku kiselinu i 109 V za neoklorogensku. Temperatura plina korištenog za formiranje fine maglice bila je $350 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura kapilare za prijenos iona održavana je na $325 \text{ }^\circ\text{C}$. Spektar je zabilježen u negativnom ionizacijskom načinu te je metoda analizom MS/MS spektra omogućila razumijevanje fragmentacije klorogenskih kiselina. Vrednovanjem metode zabilježeni su zadovoljavajući rezultati.

Zaključci: Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom prikladna je metoda za određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline, a vrednovanjem metode uočena je mogućnost njene primjene.

Ključne riječi: motar, kriptoklorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, UHPLC, MS/MS, vrednovanje

Rad sadrži: 51 stranicu, 17 slika, 15 tablica i 31 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević - član
3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul - mentor

Datum obrane: 26. listopada 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, 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

Thesis subject: was approved by Council of Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 79 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 24

Mentor: Franko Burčul, assoc. prof, PhD

Supervisor: Ana Vučak, mag. chem.

DETERMINATION OF CHLOROGENIC ACIDS USING UHPLC-MS/MS

Nina Desnica, index number: 218104

Summary

Objectives: The development and optimization of a method used for the quantitative and qualitative determination of cryptochlorogenic and neochlorogenic acid using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), followed by the validation of the method itself to ensure the reliability of the results.

Material and methods: The working standard used in the research was a mixture of cryptochlorogenic and neochlorogenic acid, from which solutions with concentrations ranging from 0.005 mg L⁻¹ to 50 mg L⁻¹ were prepared. These solutions were then used for the development and validation of liquid chromatography and mass spectrometry method.

Results: To prepare lower concentrations, the standard solution was diluted with methanol. The mobile phase consisted of a mixture of water and methanol mixed with 0.2% volume fraction of acetic acid as a modifier. An Agilent column packed with C18 stationary phase was selected and the analysis was carried out at 25 °C. The mass spectrometer was optimized by setting the capillary voltage to 4400 V for both acids. RF lenses were adjusted to 110 V for cryptochlorogenic and 109 V for neochlorogenic acid. The temperature of the gas used to form the fine mist was 350 °C, and the temperature of the ion transfer capillary was maintained at 325 °C. The spectra were recorded in the negative ionization mode, and the method enabled the understanding of the fragmentation of chlorogenic acids by analyzing the MS/MS spectrum. The evaluation of the method yielded satisfactory results.

Conclusion: Ultra-high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer is a suitable method for the determination of cryptochlorogenic and neochlorogenic acid, and the validation confirmed its application.

Key words: sea fennel, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, UHPLC, MS/MS, validation

Thesis contains: 51 pages, 17 figures, 15 tables and 31 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Full Professor Olivera Politeo, PhD - president
2. Associate Professor Ivana Škugor Rončević, PhD - member
3. Associate Professor Franko Burčul, PhD - mentor

Defense date: October 26, 2023

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Motar	2
1.2. Klorogenske kiseline	2
1.3. Kromatografija	4
1.3.1. Principi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	5
1.3.2. Kromatografski parametri	6
1.3.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti	7
1.4. Spektrometrija masa	8
1.4.1. Princip rada spektrometra masa	9
1.4.2. Analizatori masa	10
1.5. Vrednovanje analitičke metode	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Korištena oprema i kemikalije	16
3.2. Priprema otopina	17
3.2.1. Priprema otopina za MS/MS	17
3.2.2. Priprema otopina za UHPLC tehniku	17
4. REZULTATI	18
4.1. Identifikacija neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline pomoću UHPLC-DAD-HESI-MS/MS i rješavanje spektrometra masa	19
4.2. Optimizacija parametara spektrometrije masa	20
4.3. Optimizacija UHPLC metode	22
4.3.1. Odabir pokretne faze i modifikatora	22
4.3.2. Gradijent odabranih otapala	25
4.3.3. Odabir kolone	26
4.3.4. Optimizacija temperature kolone	26
4.4. Vrednovanje metode	27
4.4.1. Specifičnost metode	27
4.4.2. Linearnost	27
4.4.3. Točnost metode	30
4.4.4. Preciznost	31
4.4.5. Granice dokazivanja i određivanja	32

4.4.6. Robusnost	33
5. RASPRAVA.....	34
5.1. Optimizacija parametara metode.....	35
5.2. Vrednovanje metode	38
6. ZAKLJUČCI	40
7. LITERATURNI IZVORI.....	42
8. SAŽETAK.....	46
9. SUMMARY.....	48
10. ŽIVOTOPIS.....	50

Zahvaljujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Franku Burčulu na utrošenom vremenu, znanju i pruženoj prilici.

Velika zahvala Ani Vučak, mag.chem. na nesebičnoj pomoći, sistematičnosti i svom uloženom trudu oko ovog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima koji su dijelili svoju sreću i svoje brige sa mnom posljednjih pet godina.

Najveća zahvala mojoj obitelji koja je vjerovala u mene i kad ja to možda nisam.

Ovaj rad je djelomično financiran sredstvima projekta SEAFENNEL4MED (PRIMA 2021, Section 2) (<https://seafennel4med.com/>).

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

1. UVOD

1.1. MOTAR

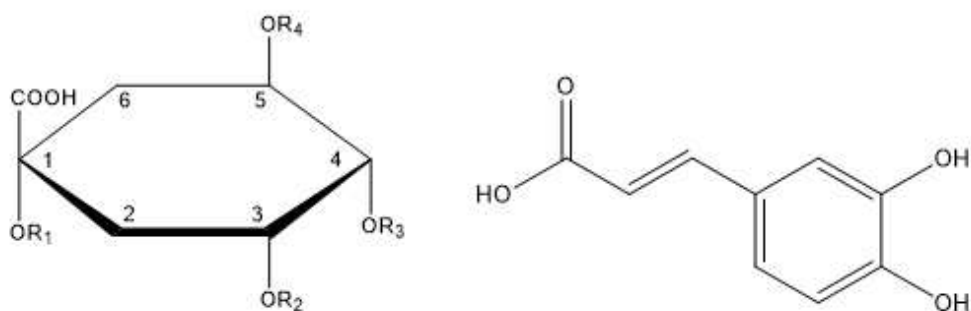
Motar ili obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) jestiva je biljka iz porodice štitarki koja raste u Mediteranskom podneblju uključujući i Jadransku obalu (1,2). Analizom ekstrakta motra pronađeni su različiti fenolni spojevi među kojima je najzastupljenija klorogenska kiselina i njezini izomeri (2,3). Iako naveliko korištena u kulinarstvu, biljka je i dalje podcijenjena usprkos bogatom sadržaju vrijednih bioloških komponenti, a potencijalna ljekovita svojstva motra nadalje se istražuju s obzirom da biljka preživljava na kamenitom području visokog saliniteta (1,3,4).

1.2. KLOROGENSKE KISELINE

Klorogenske kiseline su skupina strukturno srodnih spojeva koja je nastala spajanjem ili konkretnije esterifikacijom kininske kiseline s jednom od *trans*-cimetnih kiselina (najčešće kafeinska, *p*-kumarinska ili ferulinska) (5). Ovi spojevi imaju potencijalnu važnost u farmaceutskoj industriji zbog redukcije rizika od dijabetesa tipa II, infarkta, Alzheimerove bolesti i pretilosti. Klorogenska i neoklorogenska kiselina te njihovi metaboliti povezuju se s protuupalnim, antioksidativnim, antineoplastičnim i antimutagenim djelovanjem te promiču staničnu proliferaciju (6,7).

Ako se uzme nešto šira perspektiva na definiciju klorogenskih kiselina, može se reći kako je otkriveno oko 400 različitih struktura napredovanjem analitičkih metoda te uključivanjem u istraživanje nejestivih izvora (8). Najzastupljenija klorogenska kiselina je 5-*O*-kafeoilkininska kiselina. Uz nju, u biljkama se nalaze strukturni izomeri među kojima i 4-*O*-kafeoilkininska kiselina ili kriptoklorogenska kiselina i 3-*O*-kafeoilkininska kiselina ili neoklorogenska kiselina (Slika 1.1.) (9,10).

Klorogenske kiseline jedna su od najprisutnijih skupina fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani, a primjer su artičoka, kava, sok od jabuke i kruške u kojima je većinska fenolna komponenta upravo 5-*O*-kafeoilkininska kiselina. Upravo zato je utvrđivanje načina raspada i metabolizma klorogenskih kiselina važno za razumijevanje i praćenje kvalitete i benefita hrane bogate ovim spojevima (9-11).



	R₁	R₂	R₃	R₄
pseudoklorogenska kiselina	KK	H	H	H
neoklorogenska kiselina	H	KK	H	H
kriptoklorogenska kiselina	H	H	KK	H
klorogenska kiselina	H	H	H	KK

Slika 1.1. Strukturne formule odabranih klorogenskih kiselina (lijevo; supstituent R₁, R₂, R₃, R₄ = H ili KK), kafeinska kiselina (KK, desno).

Zbog strukturne sličnosti i služenja trivijalnim nazivljem u znanstvenim radovima literatura mjestimično može dovesti do zabune kod nomenklature ovih kiselina pa je predloženo da se klorogenske kiseline imenuju prema IUPAC nomenklaturi što je vidljivo u Tablici 1.1. Originalni naziv za klorogensku kiselinu potječe od Payena koji je ovaj spoj izolirao iz zelenih zrnaca kave 1846. godine.

Fischer i Dangschat su 1932. godine za ovaj spoj predložili naziv 3-*O*-kafeoilkininska kiselina, međutim njihov način imenovanja revidiran je IUPAC-om 1976. zbog promjene načina imenovanja ciklitolu te je kiselina preimenovana u 5-*O*-kafeoilkininsku kiselinu (11).

Tablica 1.1. Nazivlje izabranih klorogenskih kiselina (11)

Trivijalni naziv	Predstavio	Naziv prema IUPAC-u	Komentar
Klorogenska kiselina	Payen 1846.	5- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina	Originalno izolirana pod imenom 3- <i>O</i> -kafeoilkininska
Kriptoklorogenska kiselina	n.p.*	4- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina	
Neoklorogenska kiselina	Corse 1953.	3- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina	
Pseudoklorogenska kiselina	Uritani i Miyano 1955.	1- <i>O</i> -kafeoilkininska kiselina	

* Nije poznato

1.3. KROMATOGRAFIJA

Premda se pod prvi kromatografski pokus još 1906. navodi razdvajanje različito obojenih pigmenata iz biljnih ekstrakata ruskog botaničara i biokemičara M. Cveta, tek su 1952. znanstvenici Martin i Synge za svoju teoriju o kromatografiji primili Nobelovu nagradu (12). Kromatografija je analitička tehnika odvajanja komponenata smjese na temelju afiniteta komponenata prema nepokretnoj i pokretnoj fazi (13). Nepokretna faza može biti krutina ili tekućina, dok je pokretna faza tekućina, plin ili superkritični fluid (gusti plin pri uvjetima iznad svojeg kritičnog tlaka i temperature) (13, 14).

Izbor faza trebao bi omogućiti što bolju selektivnost prema zadržavanju molekula u sustavu, a na to će imati utjecaja priroda ispitivanog spoja, veza između ispitivanog spoja i nepokretne faze te priroda ravnoteže sustava (15).

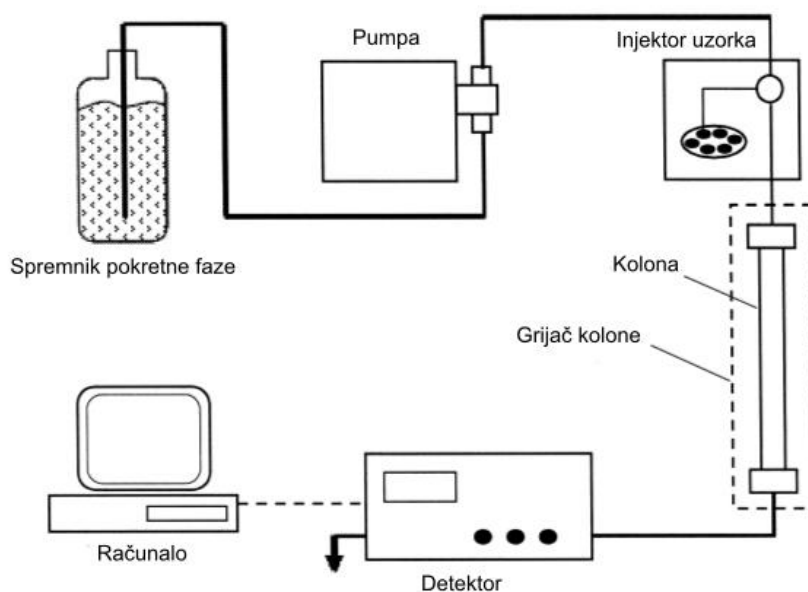
Nekoliko je načina podjele kromatografskih tehnika, a jedna od glavnih je s obzirom na način ostvarivanja kontakta mobilne i stacionarne faze pa ih možemo podijeliti na kolonsku kromatografiju u kojoj se nepokretna faza kroz usku cijev (kolonu) kreće pod utjecajem gravitacije ili tlaka, te plošnu kromatografiju u kojoj je nepokretna faza položena na ravnu pločicu ili pore kromatografskog papira (12, 14).

Podjela koja se odnosi na podrijetlo ravnoteže između pokretne i nepokretne faze kategorizira tehnike kao: razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu, kromatografiju ionskom izmjenom i kromatografiju isključenjem.

1.3.1. Principi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

U svojim začetcima se tekućinska kromatografija oslanjala na kolone velikih promjera i na gravitaciju, a upotreba vakuuma ili tlaka nije bila uspješna jer je povišen protok bio praćen i smanjenom efikasnosti razdvajanja sastojaka. Krajem 60-ih godina prošlog stoljeća, predstavljena je poboljšana izvedba instrumentacije za izvođenje tekućinske kromatografije u kojoj je djelotvornije odjeljivanje omogućila primjena visokih tlakova (14).

Moderni uređaji (slika 1.2.) sadržavaju jedan ili više spremnika koji mogu pohraniti barem 500 mL otapala, a značajnom napretku u odjeljivanju pridonijela je mogućnost gradijentnog eluiranja otapala. Kod takvog principa protoka pokretne faze, unaprijed je programiran odnos otapala koji će se u vremenu izvođenja analize propuštati kroz kolonu, u zadanim intervalima. Drugi je način aplikacijom izokratne pokretne faze pri kojoj se za vrijeme trajanja analize ne mijenja sastav ni protok pokretne faze (14,17).



Slika 1.2. Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (17)

Budući da je iz otapala potrebno ukloniti otopljene plinove uređaji imaju ugrađene otplinjače koji sprječavaju interferenciju s detektorom ili reakciju s analitom (16,17). Onečišćenja su uglavnom izbjegnuta upotrebom kemikalija visoke čistoće ili mogu biti prije upotrebe provedena kroz filtere koji ih čiste do čestica $0,2 \mu\text{m}$ (17,18). Pokretna faza iz spremnika ulazi u crpku koja određuje optimalan protok i tlak dovoljan za prolaz kroz kolonu (17).

Petlja za uzorkovanje omogućava da volumen uzorka ostane fiksni cijelim trajanjem analize (14). Ručno injektiranje uzorka u visoko djelotvornim uređajima zamijenjeno je automatskim uzorkivačem koji osigurava ujednačenost procesa, bez prekidanja protoka pokretne faze koja je pod tlakom. Glavna komponenta uzorkivača je ventil za ubrizgavanje uzoraka te je rotacijski ventil sa šest otvora najčešća izvedba (17).

Kolone za tekućinsku kromatografiju uglavnom su izrađene od kirurškog čelika, ali ponekad su dostupne i kolone od stakla ili polimera. Najčešće su duljine 5 do 25 cm, promjera 3 do 5 mm i veličine čestica od 3 ili 5 μm (14).

Između injektora i kolone može se nalaziti nešto kraća pretkolona ili zaštitna kolona. Pretkolona sprječava da onečišćenja stignu do osnovne analitičke kolone i na taj način produljuje njen vijek trajanja (12,16). Periodički se mijenja, a obično je izrađena od istog materijala kao i glavna kolona (16).

Kontrola temperature kolone i konzistentnost u istoj važan su čimbenik osiguranja stabilnosti i obnovljivosti metode (16). Temperatura može poremetiti i kromatografsku selektivnost, pogotovo ako je koeficijent razlučivanja graničan ($R_s \leq 1,5$). Ako pokretna faza nije zagrijana na temperaturu kolone prije ulaska u nju, to može rezultirati iskrivljenim signalima (17).

Prijeđen je veliki put od prvog kromatografskog eksperimenta u prošlom stoljeću u kojem je kao detektor razdvajanja poslužilo ljudsko oko do današnjih klasičnih detektora. Kromatografski detektor je prevoditelj nekog kemijskog ili fizičkog svojstva analita u uzorku u električni signal koji je ovisan o koncentraciji analita. Detektor u HPLC-u je smješten neposredno iza kolone koja propušta eluens te nakon detekcije pokretna faza odlazi u otpad ili u sljedeći detektor (19).

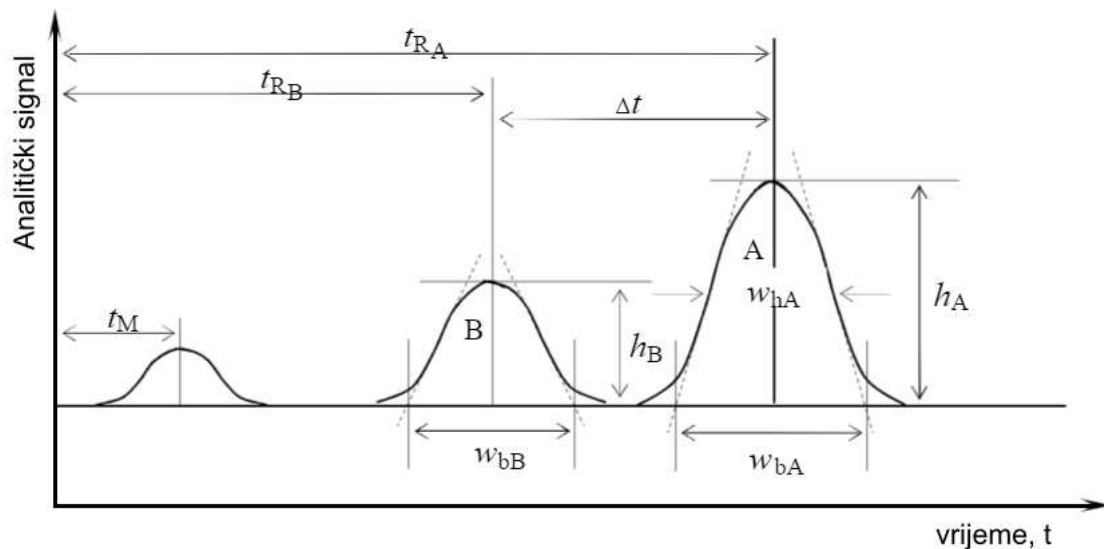
Niz je različitih detektora kod tekućinske kromatografije, a neki češći su: UV-Vis detektor od kojih je danas najprisutniji detektor s nizom dioda (engl. *diode-array detector*), spektrometar masa (engl. *mass spectrometer*), fluorescentni detektor (engl. *fluorescence detector*), elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*), detektor indeksa loma (engl. *refractive index detector*) i detektor raspršenja svjetlosti (engl. *light-scattering detector*) (14,19).

1.3.2. Kromatografski parametri

Ako se na kraj kolone za vrijeme protjecanja analita i pokretne faze smjesti detektor koji bilježi signal ovisan o funkciji vremena ili volumena pokretne faze dobit će se signali vidljivi

na slici 1.3. Kromatogram je dakle grafički prikaz odziva detektora te služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj signala na kromatogramu omogućava identifikaciju pojedinih sastojaka smjese, a poznavanjem površine ispod signala moguće je i kvantitativno određivanje odijeljenih komponenti (12,20).

Osnovni parametar prilikom analize kromatograma jest ukupno vrijeme zadržavanja, t_R , koje podrazumijeva vrijeme potrebno pojedinom analitu od trenutka injektiranja do dolaska na detektor (12,14).



Slika 1.3. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima (16); t_M – zadržano vrijeme, t_{RA} i t_{RB} - ukupna vremena zadržavanja tvari A i B, w_{bA} i w_{bB} – širine signala u osnovici, w_{hA} – širina signala tvari A na polovici visine signala (h_A), h_B – visina signala B

1.3.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Iako se zasniva na principima HPLC-a, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) prvi put predstavljena 2004. godine, donijela je značajni napredak na scenu u smislu detektiranja puno užih i viših signala te boljeg razlučivanja. Osnovni dijelovi uređaja su crpke, uzorkivač, kolona i detektori (22).

Superiornost UHPLC-a odnosi se na puno više vrijednosti tlaka pod kojima radi uređaj. Dok kod HPLC-a tlak ne prelazi 400 bara, novija tehnologija omogućava tlak od 1000 bara ili čak nešto iznad toga. Kolone sadrže manje čestice od onih veličine 2,5 – 5 μm koje su bile standardne kod HPLC-a, a sukladno tome potrebne su kraće kolone te je manji utrošak otapala

i ukupno vrijeme analize. Injektori uzoraka zahtijevaju niže volumene što dovodi do uštede samog uzorka (21).

Ovisno o vrsti detektora, osjetljivost UHPLC-a može biti dva do tri puta veća u odnosu na HPLC. Neke negativne strane upotrebe UHPLC-a su puno viša cijena i potreba za češćim mijenjanjem kolona zbog korištenja vrlo visokih tlakova (22).

1.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je instrumentna tehnika bazirana na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka u plinovitoj fazi. Budući da se molekule fragmentiraju na jedinstven način, produkti mogu služiti za identifikaciju specifičnih spojeva (23). Osim što pruža uvid u strukturu, daje informaciju o molekulskoj formuli, kao i postojanju izotopa za navedeni spoj (24). Uzorak korišten u spektrometriji masa uništava se, a dobiveni produkti (pozitivno i negativno nabijeni ioni) analiziraju se na temelju omjera mase i naboja (m/z) u detektoru (20,25).

Tehniku su prvi put predstavili J. J. Thomson i F. W. Aston 1912. godine (25). Danas ima opsežnu primjenu u farmaceutskom području i to u proučavanju farmakokinetike, metabolizma lijekova i otkrića novih farmaceutika. Varijacije između različitih ionizacijskih tehnika s različitim analizatorima omogućava ispitivanje struktura i do razine femtograma, 1×10^{-18} g (24).

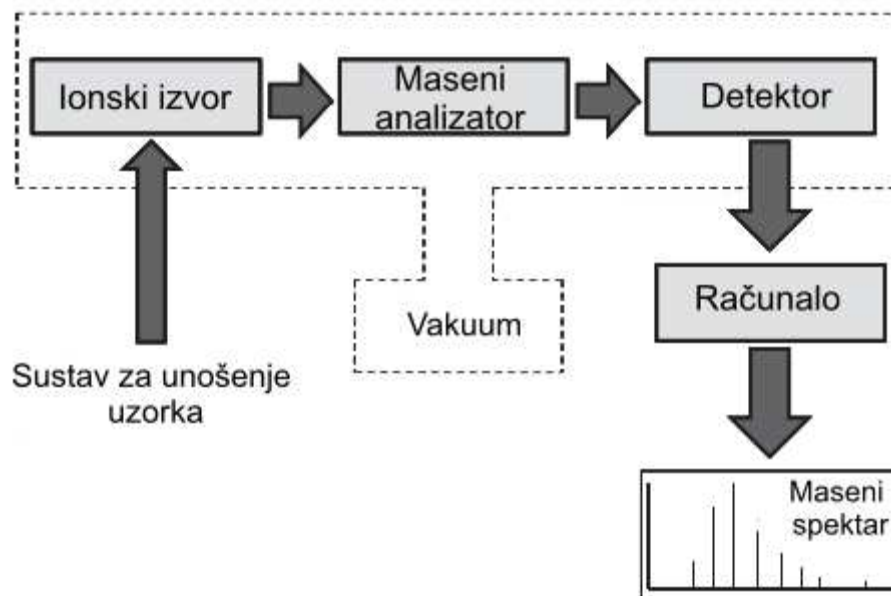
U prošlosti je bilo nespojivo povezivati tekućinsku kromatografiju sa spektrometrom masa, budući da jedan od instrumenata djeluje pri atmosferskom tlaku, a drugi u vakuumu. Taj je problem riješen pomoću atmosferske tlačne ionizacije koja je uspješno omogućila kombiniranje dviju tehnika. Danas je ova kombinacija u širokoj upotrebi zbog svoje efikasnosti, specifičnosti i osjetljivosti (26). Osim uz tekućinsku kromatografiju (LC-MS), često je povezana s plinskom kromatografijom (engl. *gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS) i kapilarnom elektroforezom (engl. *capillary electrophoresis–mass spectrometry*, CE-MS), pa omogućava dodatnu informaciju o komponentama smjese kad sastojci smjese napuste kolonu (23,24).

1.4.1. Princip rada spektrometra masa

Spektrometar masa koji radi u visokom vakuumu sastoji se od četiri osnovna dijela vidljiva na slici 1.4.: sustava za unošenje uzorka, izvora iona, analizatora masa, i detektora (23,24). Sustav za uvođenje uzorka osigurava unos uzorka s minimalnim gubitcima vakuuma (14). Kako bi se ioni odvojili u plinovitoj fazi potrebno je da sustav ostane u visokom vakuumu da ne bi došlo do interferencije čestica zraka s ionima (24). Uvođenje uzorka u spektrometar masa ovisit će o prirodi samog analita. Ono može biti direktno ili nastupiti nakon kromatografskog odjeljivanja ako su uređaji povezani (25). Analit može biti u krutom, tekućem ili plinovitom stanju ovisno o prikladnosti ionizacijskog izvora (14).

Ako su molekule uzorka neutralne, moguća je ionizacija pri unosu u spektrometar masa, a ako se ionizacija ne dogodi molekule analita prevode se u ione pomoću energije koja dolazi od izvora ionizacije. Ona se može odviti na nekoliko načina:

- **Ionizacija elektronima** (engl. *electron impact ionisation*, EI) jedna od starijih tehnika u kojoj se kroz plinoviti uzorak propušta snop elektrona visoke energije. Stvara nabijene radikale koji zbog izrazite nestabilnosti nerijetko dalje fragmentiraju. Ionizacija elektronima najčešće je vezana za plinsku kromatografiju (24).
- **Kemijska ionizacija** (engl. *chemical ionisation*, CI) sadrži reakcijsku komoru u kojoj se plin reagens ionizira elektronima. Fragmentacijom analita nastaju ioni manje energije od one upotrebom elektronske ionizacije. Može biti pri sniženom ili atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI).
- **Ionizacija elektroraspršenjem** (engl. *electrospray ionisation*, ESI) je ionizacija pri atmosferskom tlaku u kojoj uzorak u tekućem stanju ulazi kroz metalnu kapilaru pri čemu dolazi do formiranja električki nabijenih kapljica. Upotrebom sredstva za sušenje otapalo isparava, a smanjenjem volumena povećava se gustoća naboja dok odbojne Coulombove sile ne uzrokuju raspad kapljica u mikrokapljice koje prelaze u ione (20,24).
- **Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem** (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*, MALDI) ide u dva koraka. U prvom se koraku uzorak otapa u otapalu koje sadrži male organske molekule (matrici). Nakon otapanja se sušenjem otopine uklanja višak otapala, a zatim, u drugom koraku, dolazi do desorpcije matrice s uzorkom u vakuumu pri čemu dolazi do desolvatacije i ionizacije (20).



Slika 1.4. Shematski prikaz spektrometra masa

Iz ionskog izvora fragmenti se ubrzavaju i usmjeravaju prema analizatoru masa gdje se odjeljuju na temelju omjera m/z , pri čemu je m masa, a z naboj čestice (23). Zatim se prikupljaju fragmenti specifičnih omjera mase i naboja te prevode u električni signal, a rezultate obrađuje sustav za obradu podataka koji stvara spektar masa (14).

1.4.2. Analizatori masa

Uloga analizatora masa je razdvajanje iona koji su nastali u vakuumu prema omjeru njihove mase i naboja (m/z). Parametri koji su najbitniji za vrednovanje same analize su: gornja granica vrijednosti omjera m/z , razlučivanje i točnost te osjetljivost mjerenja (20). U često korištene analizatore spadaju jednostruki kvadripol, analizator koji mjeri vrijeme preleta, kvadripolni analizator s ionskom stupicom i analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (20,23,24).

Kvadripolni analizator sadrži četiri paralelne elektrode smještene uz centralnu os po kojoj se kreću ioni. Između suprotnih parova šipki primjenom radiofrekvencijskih voltaža nastaje električno polje. Samo ioni uskog raspona vrijednosti m/z proći će do detektora dok će ostali biti izgubljeni neutralizacijom naboja u dodiru s elektrodama (23,24).

U upotrebi je i tandemski spektrometrija masa koja je još selektivnija od kvadripolnog analizatora. Kao primjer može poslužiti trostruki kvadripol (engl. *triple quadrupol*, QqQ) u kojem se u prvom kvadripolu ionizira spoj, u drugom kvadripolu (kolizijskoj ćeliji) dolazi do fragmentacije spoja, a u trećem kvadripolu odvajaju se odabrani fragmenti (20).

Analizator koji mjeri vrijeme preleta (engl. *Time-of-Flight*, TOF) sastoji se od polja za ubrzavanje iona, cijevi i detektora. Na početku cijevi svi ioni imaju jednaku kinetičku energiju, ali i različite brzine zbog svoje mase. Dužina putovanja do detektora bit će proporcionalna njihovoj masi, tako da će najteži ioni stići posljednji i doći će do razdvajanja (26).

Kvadripolni analizator s ionskom stupicom (engl. *ion trap mass analyzer*) srodan je jednostrukom kvadripolu ali je izveden trodimenzionalno (26). Jedan par njegovih elektroda čini prstenastu elektrodu, dok drugi par stoji na krajevima te propušta ione unutar analizatora. Električno polje s vremenom izbacuje ionske fragmente većih vrijednosti m/z (14,23).

Analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) koristi statično magnetsko ili električno polje koje dovodi do periodičkog, zarobljenog gibanja iona na specifičnim frekvencijama koje se zatim mogu prevesti u omjer mase i naboja (27).

1.5. Vrednovanje analitičke metode

Pri razvoju analitičke metode korak validacije je neizbježan kako bi se postigla pouzdanost rezultata. Informacija omogućava analitičaru da preispita djelotvornost metode i napravi preinake ako je to potrebno, ali daje potvrdu i krajnjem korisniku. Osim osobne potrebe analitičara za potvrdom ispravnosti vlastitog rada u porastu je kontrola analitičkih laboratorija u svrhu suglasja o uvjetima rada. Iako je generalno uvriježeno koje parametre je potrebno ispitati kako bi se metoda vrednovala i dalje postoje razlike u detaljima vrednovanja i metodologiji. Najreferentnije upute za vrednovanje analitičke metode zadaje Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za humanu upotrebu (engl. *The international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*, ICH) i kao takve metoda ih mora ispunjavati. U nastavku će se definirati terminologija pojmova:

- **Specifičnost** (engl. *specificity*) označava u kojoj mjeri na određivanje komponente prema nekom postupku utječu druge tvari. Ovaj parametar ukazuje na to koliko će ostali sastojci uzorka (npr. metaboliti, otpadne tvari) interferirati sa signalom analita.
- **Točnost** (engl. *accuracy*) ukazuje koliko se dobiveni rezultat razlikuje od rezultata koji je prihvaćen kao referentan ili ispravan.
- **Preciznost** (engl. *precision*) opisuje slaganje u rezultatima ako se homogeni uzorak pod propisanim uvjetima višestruko mjeri. Može se definirati na tri razine: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. **Ponovljivost** (engl. *repeatability*) označava

preciznost u kraćem vremenskom roku i u istim uvjetima. **Srednja preciznost** (engl. *intermediate precision*) odnosi se na razlike u rezultatima u istom laboratoriju pri različitim uvjetima (različiti dan, oprema, analitičar ili dr.). **Obnovljivost** (engl. *reproducibility*) izražava preciznost metode između različitih laboratorija.

- **Granica dokazivanja** (engl. *detection limit*) definira se kao najniža koncentracija analita u uzorku koju se može dokazati prilikom nekog analitičkog postupka, ali ne nužno i kvantificirati.
- **Granica određivanja** (engl. *quantitation limit*) predstavlja najnižu koncentraciju analita koju precizno možemo odrediti.
- **Linearnost** (engl. *linearity*) je odrednica analitičke metode da u zadanom rasponu koncentracija analita u uzorku bude linearno ovisna o signalu koji je dobiven provođenjem same metode.
- **Raspon** (engl. *range*) obuhvaća razliku između najviše i najniže koncentracije analita kojima je rezultat određen s točnošću, linearnošću i preciznošću.
- **Robusnost** (engl. *robustness*) je mogućnost metode da se odupre potencijalnim promjenama parametara u mjerenju te ostane dosljedna očekivanim rezultatima (28,29).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Razvoj i optimizacija metode za određivanje klorogenskih kiselina pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti koja je vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (UHPLC-MS/MS);
2. Optimizacija parametara tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti;
3. Optimizacija parametara spektrometrije masa;
4. Vrednovanje analitičke metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korištena oprema i kemikalije

U tablicama 3.1. i 3.2. navedeni su podatci o korištenim standardima i kemikalijama prilikom rada u laboratoriju.

Tablica 3.1. Popis korištenih standarda

Naziv	Čistoća	Proizvođač
Kriptoklorogenska kiselina 1 mg/mL	≥ 98.0 %	SIGMA ALDRICH (65969-10mg Steinheim, Germany)
Neoklorogenska kiselina 1 mg/mL	≥ 98.0 %	SIGMA ALDRICH (94419-10mg Steinheim, Germany)

Tablica 3.2. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	≥ 99.9 %	Honeywell
Metanol	≥ 99.8 %	VWR Chemicals
Mravlja kiselina	98-100 %	T.T.T. d.o.o. (Sv. Nedelja, Croatia)
Octena kiselina	99 %	Grammol

Korištena voda je pročišćena do čistoće prikladne za UHPLC.

Popis opreme koja je korištena prilikom rada u laboratoriju:

- pipete - Tacta (Sartorius, Göttingen, Njemačka);

- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti - UltiMate 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- spektrometar masa s trostrukim kvadripolom - TSQ Quantis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- pumpa sa špricom - F100T2 (Chemyx, Stafford, Teksas, SAD);
- uređaj za pročišćavanje vode - Purelab Flex 3 (18.2 MΩ, UV 185/254 nm, TOC <5 ppb, Tip 1, Elga, Pariz, Francuska).

3.2. Priprema otopina

3.2.1. Priprema otopina za MS/MS

Kako bi se pripremila standardna otopina potrebno je izabrati optimalno otapalo. Dobiveni standardi su bili otopljeni u smjesi etanola i vode u omjeru 80 : 20. Kao otapalo za pripremu otopina nižih koncentracija odabran je metanol budući da su u njemu topljive klorogenske kiseline (9).

Od svakog standarda zasebno uzeto je 500 µL uzorka i pipetirano u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeno do oznake s metanolom. U objema odmjernim tikvicama nalazila se koncentracija standarda od 0,05 mg mL⁻¹ te su otopine zatim korištene za razvijanje MS/MS fragmentacije.

3.2.2. Priprema otopina za UHPLC tehniku

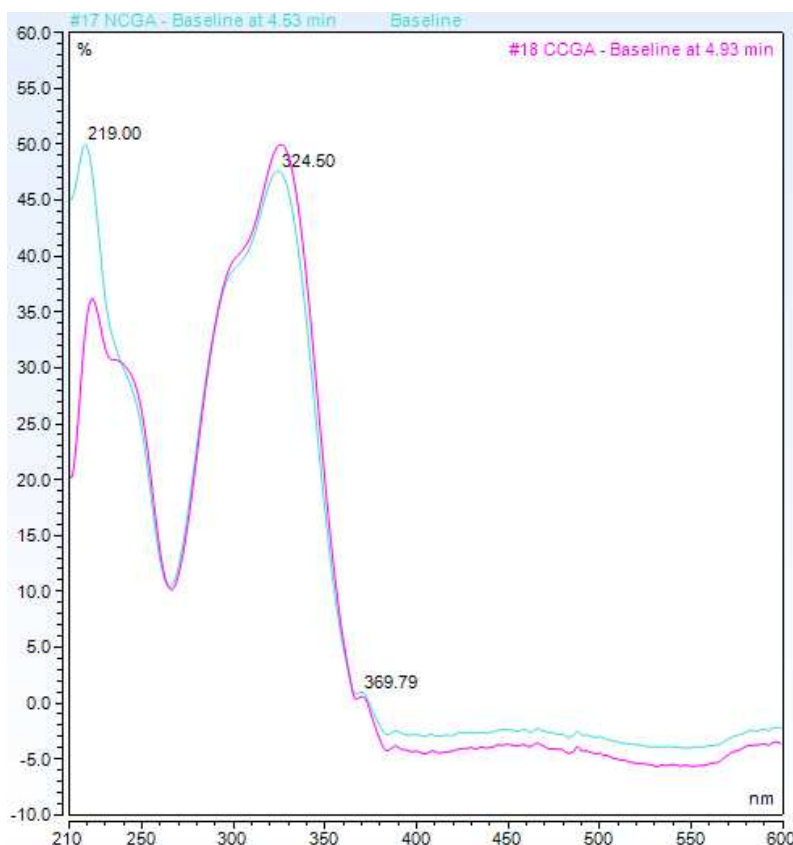
Za pripravu standardne otopine uzeto je po 500 µL svakog standarda koji su zatim preneseni u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeni do oznake metanolom i promiješani. Standardna otopina je u koncentraciji od 50 mg L⁻¹ i ta koncentracija vrijedi za oba standarda. Potom su pripremljene otopine nižih koncentracija daljnjim razrjeđivanjem u metanolu u koncentracijama od 25 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹, 0,025 mg L⁻¹, 0,01 mg L⁻¹ i 0,005 mg L⁻¹. Razrjeđenja na niže koncentracije pripremana su u bočice na ukupni volumen od 1 mL.

Za početak su se otopine standarda neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline, obje u koncentracijama od 0,05 mg mL⁻¹, zasebno injektirale u tekućinski kromatograf koji ima detektor s nizom dioda kojim je snimljen UV-Vis spektar te spektrometar masa koji potom daje i spektar masa pojedinog spoja.

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline pomoću UHPLC-DAD-HESI-MS/MS i rješavanje spektrometra masa

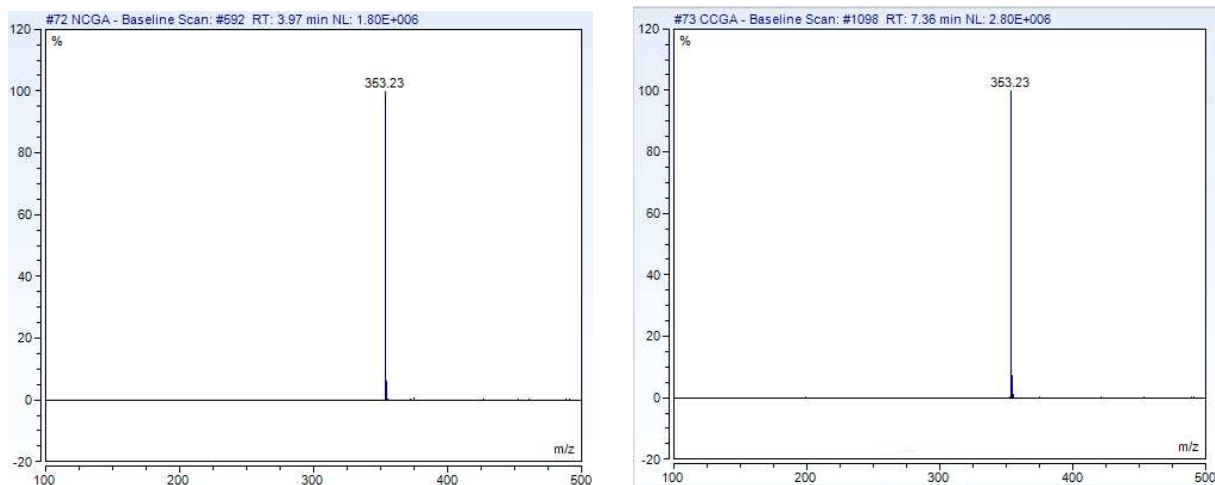
Kako bi prepoznali izabrane klorogenske kiseline standardi spojeva su zasebno ubrizgavani u tekućinski kromatograf koji je opremljen DAD i MS/MS detektorima. Otopine su bile u koncentracijama od 0,05 mg mL⁻¹. U svrhu boljeg raščlanjivanja ovih spojeva snimljeni su njihovi UV-Vis spektri i spektri masa.



Slika 4.1. Preklapanje UV-Vis spektara neoklorogenske (plavo) i kriptoklorogenske (rozo) kiseline

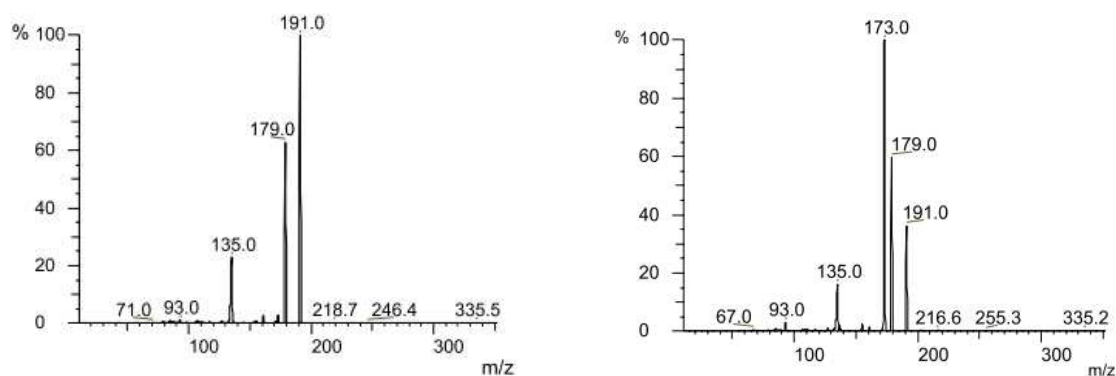
Budući da su kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina izomeri, odnosno imaju jednake funkcijske skupine te pripadaju u istu klasu spojeva, dolazi do preklapanja njihovih UV-Vis spektara.

Ionizacija je tekla putem elektroraspršenja (engl. *electrospray ionisation*, ESI), te je pregledom literature Choi i sur. te Wang i sur. odlučeno kako će se uzorci snimati u negativnom načinu rada zbog boljeg omjera signala i šuma te bolje kvantifikacije. Masa neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline u negativnom načinu rada (umanjena za masu iona H⁺) je jednaka te iznosi 353,23 Da. Molekulski ion oba spoja snimljen je u prvom kvadripolu (Q1).



Slika 4.2. Prikaz spektara masa neoklorogenske (lijevo) i kriptoklorogenske (desno) kiseline

U trećem kvadripolu (Q3) su snimljeni specifični ionski fragmenti molekulskog iona oba spoja. Za neoklorogensku kiselinu snimljeni su fragmenti maksimalnog intenziteta 191 Da, 179 Da i 135 Da. Za kriptoklorogensku kiselinu fragmenti najvećeg intenziteta su 173 Da, 179 Da i 191 Da.

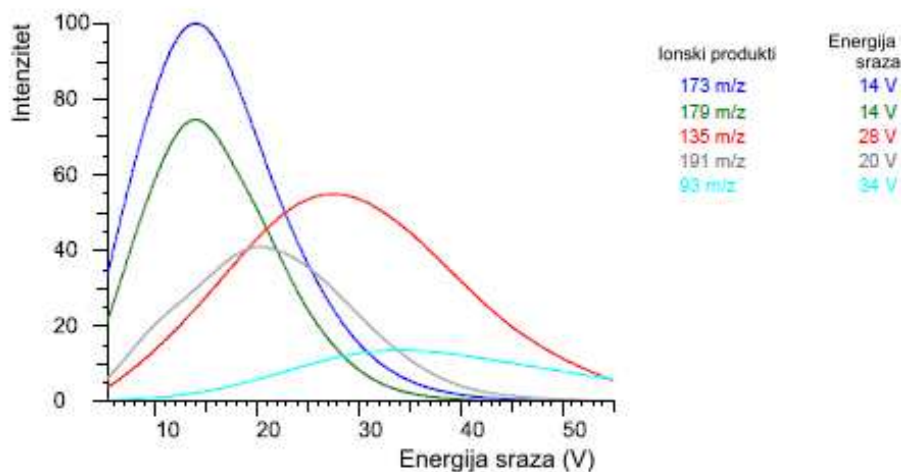


Slika 4.3. MS/MS spektar neoklorogenske (lijevo) i kriptoklorogenske (desno) kiseline

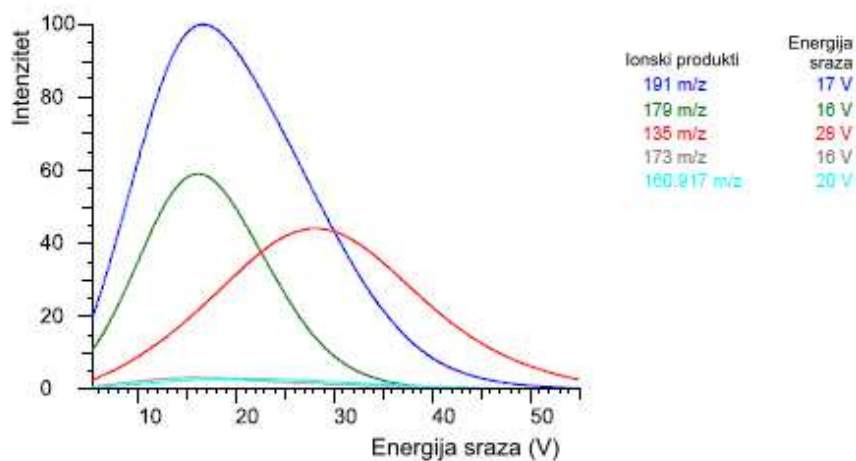
4.2. Optimizacija parametara spektrometrije masa

Kako bi se spojevi identificirali što uspješnije provedena je optimizacija parametara spektrometrije masa. Ona je izvršena automatski putem programa Chromeleon (Chromeleon 7.2.10., ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji ugađa pojedine parametre kako bi odziv na detektoru za obje kiseline bio što viši. Parametri koji su ispitani u svrhu optimizacije metode su napon kapilare, protok plina za poboljšanje finog raspršenja - maglice (engl. *sweep gas*), protok plina za formiranje finog raspršenja - maglice (engl. *sheath gas*), protok pomoćnog

plina za formiranje maglice (engl. *auxiliary gas*), napon fokusirajućih leća (RF), energija sraza za svaki ion za oba analita, praćeni ioni za kvantifikaciju. Otopine koncentracije 0,05 mg L⁻¹ su zasebno unesene u spektrometar masa te im je sniman spektar. Ulazni tlak argona u kolizijsku ćeliju (engl. *Collision-induced dissociation gas*, CID Gas) je sniman pri 1,5 mTorr zbog jasne i izražene krivulje što je vidljivo na slikama 4.4. i 4.5.



Slika 4.4. Krivulja fragmentacije kriptoklorogenske kiseline



Slika 4.5. Krivulja fragmentacije neoklorogenske kiseline

Tablica 4.1. Optimizirani parametri spektrometrije masa

Parametri	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina
Način snimanja	Negativan	
Kvantitativni ion; (Energija sraza)	173 (14 eV)	191 (17 eV)
1.kvalitativni ion; (Energija sraza)	179 (14 eV)	179 (16 eV)
2.kvalitativni ion; (Energija sraza)	191 (20 eV)	135 (28 eV)
RF (V)	110	109
Napon kapilare (V)	4400	
„Sweep gas“	2,45	19,59
„Sheath gas“	60	60
„Auxiliary gas“	0,41	10,57
Tlak plina za disocijaciju kolizijom (mTorr)	1,5	
Temperatura kapilare za prijenos iona (°C)	325	
Temperatura plina za formiranje fine maglice (°C)	350	

4.3. Optimizacija UHPLC metode

Prilikom optimizacije UHPLC bilo je potrebno izabrati najpogodniju pokretnu fazu uključujući najpogodniji modifikator, gradijent otapala koja se koriste kao pokretna faza, optimalnu kolonu i temperaturu iste.

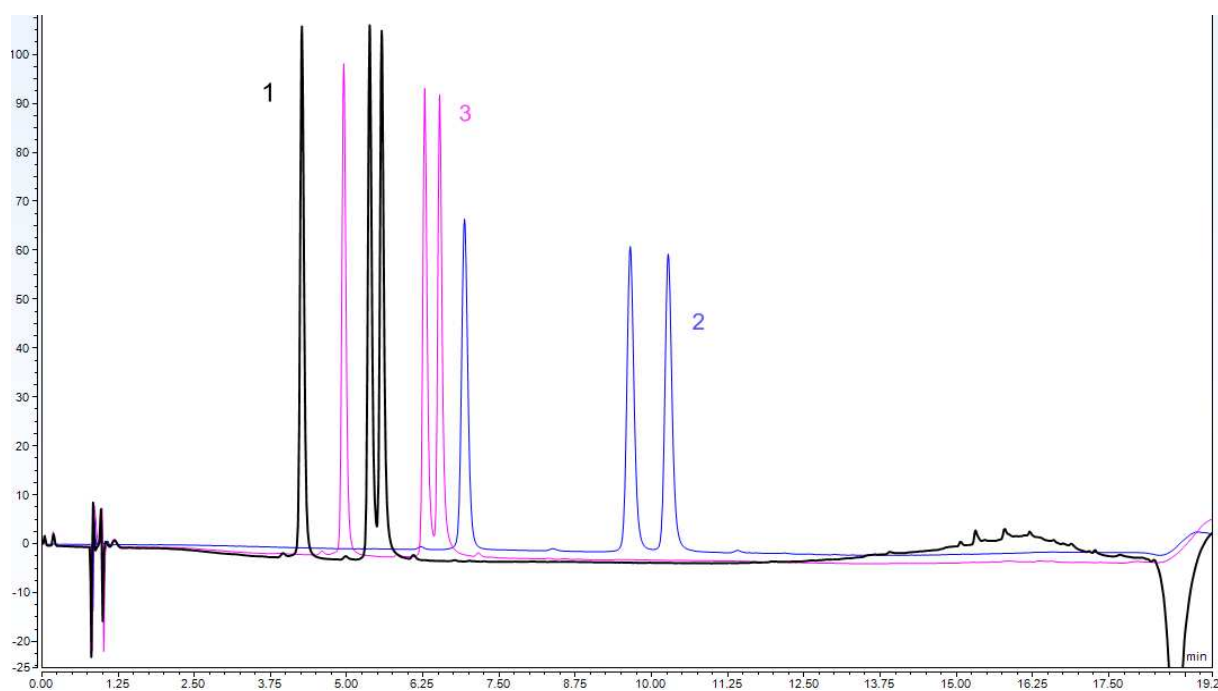
4.3.1. Odabir pokretne faze i modifikatora

Klorogenske kiseline ne ioniziraju u čistoj vodi, a budući da je pri analizi za identifikaciju bio korišten spektrometar masa bio je potreban dodatak modifikatora. Ispitana su tri različita otapala: voda (H₂O), metanol (CH₃OH) i acetonitril (CH₃CN) i dodatak dva različita modifikatora: mravlja (HCOOH) i octena kiselina (CH₃COOH). Prvo se ispitala razlika u

uspjehu kod prisutnosti metanola i/ili acetonitrila, dok je voda bila uključena u sve tri analize (Tablica 4.2. i slika 4.6.).

Tablica 4.2. Odabir vode, metanola i/ili acetonitrila kao mobilne faze

	A	B	C
1	0,1 % HCOOH u H ₂ O	CH ₃ OH	CH ₃ CN
2	0,1 % HCOOH u H ₂ O	CH ₃ OH	-
3	0,1 % HCOOH u H ₂ O	-	CH ₃ CN

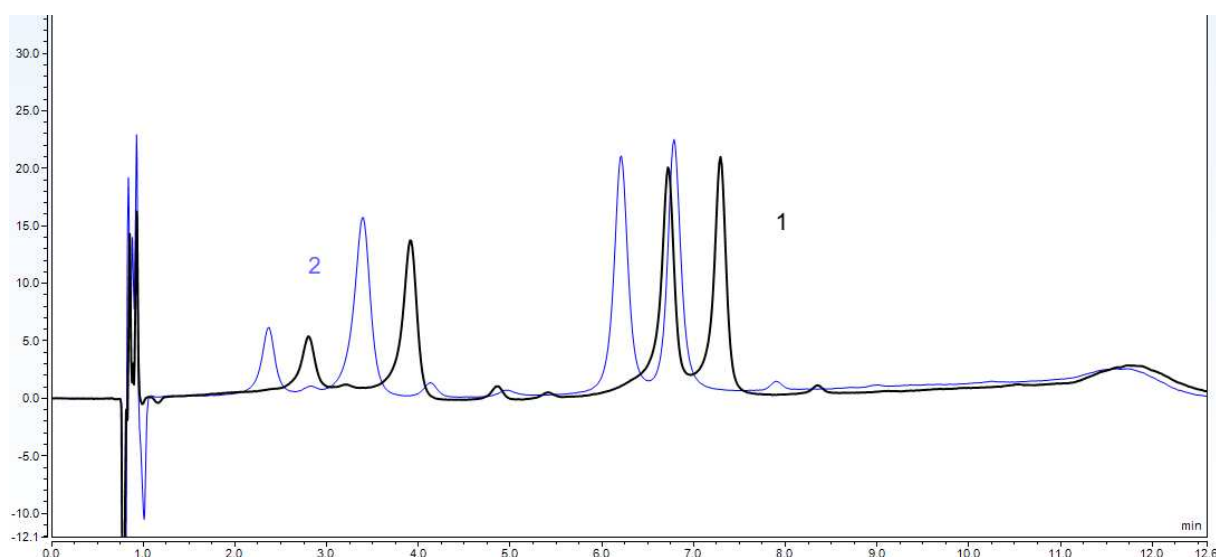


Slika. 4.6. Preklapanje kromatograma za tri mobilne faze iz tablice 4.2.

Nakon odabira otapala bilo je potrebno samostalno usporediti modifikatore i njihov utjecaj na uspješnost odjeljivanja i odziv detektora (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Odabir modifikatora u otapalima za UHPLC-MS/MS

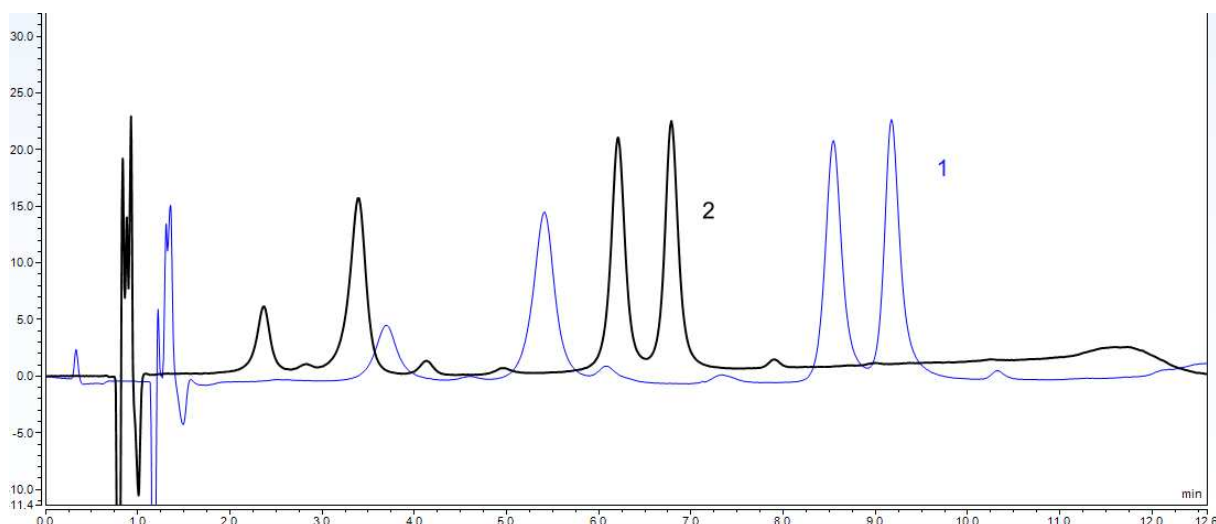
	A	B
1	0,1 % HCOOH u H ₂ O	CH ₃ OH
2	0,1 % CH ₃ COOH u H ₂ O	CH ₃ OH

**Slika 4.7.** Preklapanje kromatograma uz tablicu 4.3.

Ispitani su različiti volumni udjeli modifikatora u otapalu (0,2 % CH₃COOH i 0,5 % CH₃COOH) te izabran prikladniji s obzirom na uspješnost odjeljivanja sastojaka.

Tablica 4.4. Udjeli modifikatora u otapalima za UHPLC-MS/MS

	A	B
1	0,2 % CH ₃ COOH u H ₂ O	0,2 % CH ₃ COOH u CH ₃ OH
2	0,5 % CH ₃ COOH u H ₂ O	0,5 % CH ₃ COOH u CH ₃ OH



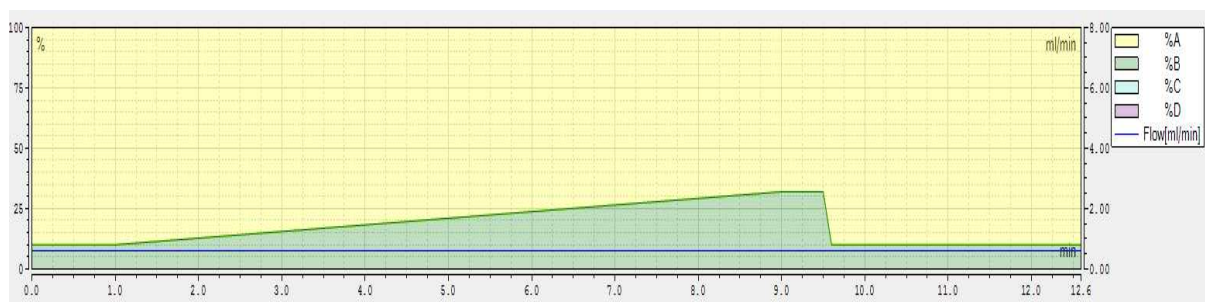
Slika 4.8. Kromatogram uz tablicu 4.4.

4.3.2. Gradijent odabranih otapala

Ispitivanjem različitih gradijenata, višestrukim pokušajima, izabran je gradijent prikazan u tablici 4.5. i na slici 4.9. Započeto je s vodom i metanolom u omjeru 90 : 10, oboje uz dodatak 0,2 % octene kiseline. Potom je udio otapala A smanjen na 68 %, a udio otapala B povećan na 32 % da bi se na kraju vratilo na početni odnos. Protok pokretne faze je u svim vremenskim segmentima $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Tablica 4.5. Gradijent otapala

Vrijeme (min)	H ₂ O + 0,2% CH ₃ COOH;	CH ₃ OH + 0,2% CH ₃ COOH;
	% A	% B
0,0	90,0	10,0
1,0	90,0	10,0
9,0	68,0	32,0
9,5	68,0	32,0
9,6	90,0	10,0
12,6	90,0	10,0



Slika 4.9. Grafički prikaz protoka mobilne faze u gradijentnom načinu eluiranja

4.3.3. Odabir kolone

Uzorak je prolazio kroz tri različite kolone pri istim uvjetima pri čemu je odabrana najkvalitetnija postavka. Ispitane su dvije kolone punjene C18 stacionarnom fazom i jedna s C8 što je prikazano u Tablici 4.6. Metoda podrazumijeva kromatografiju obratnih faza. Kolone Accucore su zbog manjeg volumena zahtijevale snižen protok ($0,4 \text{ mL min}^{-1}$ u odnosu na $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ kod XDB kolone) kako bi se zadržala jednolikost i objektivnost pri usporedbi.

Volumen injektiranja je bio fiksna pri svim mjerenjima, odnosno iznosio je $5 \mu\text{L}$.

Tablica 4.6. Odabir najprikladnije kolone

Naziv	Dimenzija kolone i veličina čestice	Nepokretna faza
Agilent™ Zorbax Eclipse XDB-C18	$100 \times 3,0 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$	C18
Thermo Scientific™ Accucore™ C18	$150 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,6 \mu\text{m}$	C18
Thermo Scientific™ Accucore™ C8	$50 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,6 \mu\text{m}$	C8

4.3.4. Optimizacija temperature kolone

Metoda je ispitivana pri četiri različite temperature termostiranog prostora u kojem se nalazi kolona ($15 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $45 \text{ }^\circ\text{C}$), a optimalna je temperatura izabrana na temelju uspješnosti odjeljivanja komponenti.

4.4. Vrednovanje metode

Metoda za određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline pomoću UHPLC-MS/MS-a vrednovana je sukladno ICH smjernicama te su u svrhu ispitivanja kvalitete metode ispitani sljedeći parametri: specifičnost, linearnost, točnost, preciznost, robusnost te granica dokazivanja i određivanja (31).

4.4.1. Specifičnost metode

Metoda je za detekciju podrazumijevala korištenje spektrometra masa s trostrukim kvadripolom što osigurava samo po sebi dostatnu specifičnost (selektivnost). Analizom uzorka otopina je prvo propuštena kroz prvi kvadripol (Q1) u kojem je analiziran molekularni ion, a nakon prolaska kroz kolizijsku ćeliju u trećem su kvadripolu (Q3) analizirani specifični ionski fragmenti molekularnog iona za obje kiseline te je na taj način potvrđena specifičnost.

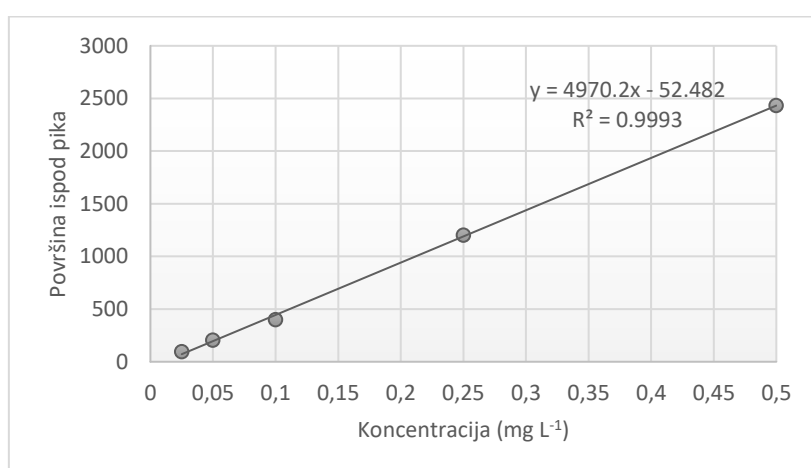
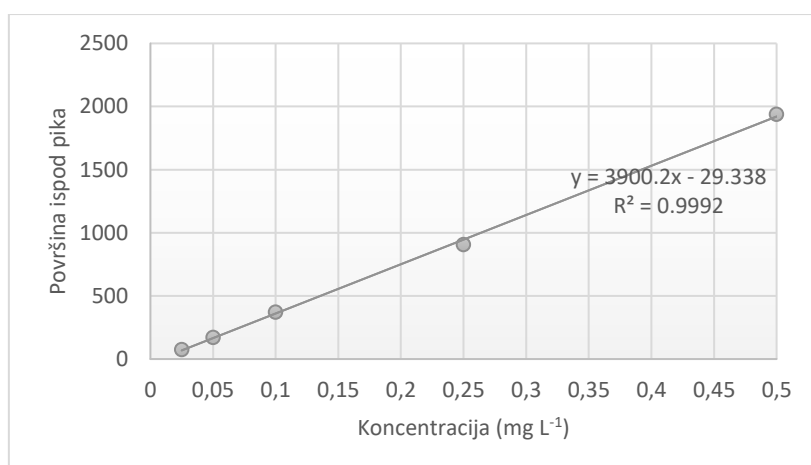
4.4.2. Linearnost

Linearnost metode je ispitivana upotrebom korelacijskog faktora (R^2). Obradom rezultata utvrđeno je kako primjena dva opsega podataka, odnosno dva linearna dinamička područja dovodi do najmanje pogreške u vidu linearnosti. Daljnji prikaz podataka podijeljen je na područje nižih te područje viših koncentracija. Rezultati za krajnje niske i visoku koncentraciju ($0,005 \text{ mg L}^{-1}$, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ i 50 mg L^{-1}) su zanemareni zbog gubitka linearnosti. Krivulje umjeravanja za obje kiseline odnose se na ovisnost površine ispod krivulje o koncentraciji analita te je iz njih izvedena jednadžba pravca za svako područje. Podatci za niže koncentracijsko područje obje kiseline nalaze se u tablici 4.7.

Grafički prikaz ovisnosti površine ispod krivulje na kromatogramu o koncentraciji analita vidljiv je na slici 4.10. za niže koncentracijsko područje. Jednadžba pravca za kriptoklorogensku kiselinu je $y = 3900.2x - 29.338$ ($R^2 = 0.9992$), dok za neoklorogensku kiselinu vrijedi $y = 4970.2x - 52.482$ ($R^2 = 0.9993$).

Tablica 4.7. Koncentracije i pripadajući odzivi detektora za područja nižih koncentracija

Koncentracija (mg L ⁻¹)	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina
0,025	75	95
0,05	170	203
0,1	371	401
0,25	907	1202
0,5	1937	2433

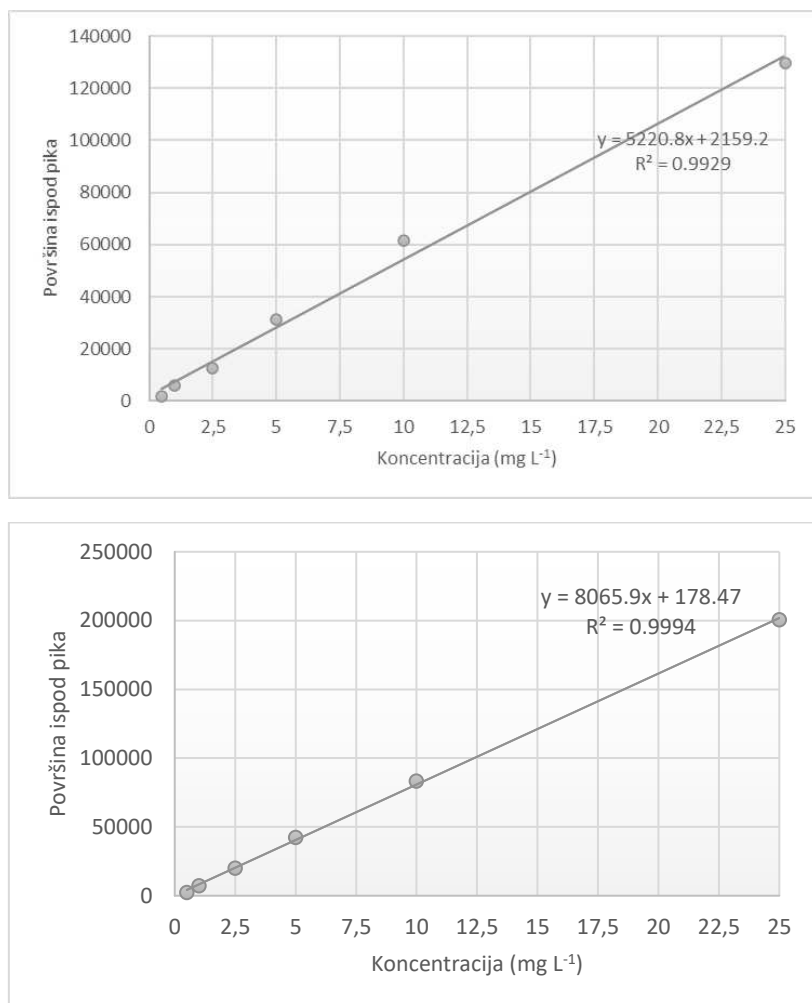


Slika 4.10. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora u području nižih koncentracija kriptoklorogenske (gore) i neoklorogenske kiseline (dolje)

Za više koncentracijsko područje podatci su prikazani u tablici 4.8. dok je grafički prikaz vidljiv na slici 4.11. Jednadžba pravca za kriptoklorogensku kiselinu je $y = 5220.8x + 2159.2$ ($R^2 = 0.9929$), a za neoklorogensku kiselinu vrijedi $y = 8065.9x + 178.47$ ($R^2 = 0.9994$).

Tablica 4.8. Koncentracije i pripadajući odzivi detektora za područja viših koncentracija

Koncentracija (mg L⁻¹)	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina
0,5	1937	2433
1,0	5820	7236
2,5	12684	19979
5,0	31101	42450
10	61495	83314
25	129631	200560



Slika 4.11. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora u području viših koncentracija kriptoklorogenske (gore) i neoklorogenske kiseline (dolje)

4.4.3. Točnost metode

Točnost metode izrazit će se kao postotak iskorištenja koje je računano uz pomoć krivulja umjeravanja obju kiselina. Iskorištenje prikazano u tablici 4.9. podrazumijeva odstupanje teorijske koncentracije od koncentracije izračunane iz odziva detektora.

Tablica 4.9. Točnost metode

Koncentracija (mg L ⁻¹)	Kriptoklorogenska kiselina		Neoklorogenska kiselina	
	Računska	Iskorištenje	Računska	Iskorištenje
0,025	0,0268	107,3	0,0297	119,0
0,05	0,0512	102,4	0,0515	102,9
0,1	0,1027	102,7	0,0912	91,2
0,25	0,2400	96,0	0,2525	101,0
0,5	0,5042	100,8	0,5001	100,0
1,0	0,7012	70,1	0,8749	87,5
2,5	2,0160	80,6	2,4548	98,2
5,0	5,5436	110,9	5,2407	104,8
10	11,3653	113,7	10,3071	103,1
25	24,4162	97,7	24,8431	99,4

4.4.4. Preciznost

Kako bi se ispitala preciznost samog instrumenta, otopina smjese analita u koncentraciji od 5 mg L⁻¹ se uzastopno 6 puta injektirala u uređaj. Iz krivulje umjeravanja izračunana je koncentracija za dvije kiseline pri svakom injektiranju te iz njih dobivena relativna standardna devijacija (*RSD*) svih koncentracija, koja je potvrdila preciznost injektiranja. Za kriptoklorogensku kiselinu ona je iznosila 0,67 %, a za neoklorogensku kiselinu 1,26 %.

Ponovljivost metode ispitana je pripremom četiri iste koncentracije u dva primjerka čime je dobivena relativna standardna devijacija za koncentracije od 0,025 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ i 25 mg L⁻¹. Ona je za kriptoklorogensku kiselinu redom iznosila 2,59, 4,54, 7,60 i 3,63 %. Za neoklorogensku kiselinu *RSD* je redom 0,71, 7,98, 10,36 i 5,46 %.

Srednja preciznost ispitana je na dva načina. Prvi se odnosio na pripremu otopina na različit dan, a drugi način potvrde bio je pripremom otopina od strane drugog analitičara. Rezultati svih mjerenja nalaze se u tablici 4.10.

Tablica 4.10. Srednja preciznost metode

<i>c</i> [*] (mg L ⁻¹)	<i>RSD</i> (%)			
	Drugi dan		Drugi analitičar	
	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina
0,025	1,31	4,02	7,12	10,86
0,25	2,04	2,51	0,77	5,38
2,5	11,74	15,23	2,19	0,04
25	5,94	5,62	1,48	0,96

* *c* – koncentracija

4.4.5. Granice dokazivanja i određivanja

Kako bi se izračunale granice dokazivanja i određivanja potrebno je utvrditi omjer signala i šuma. ICH smjernice definiraju taj omjer jednakim ili većim od 3 za granicu dokazivanja, odnosno 10 za granicu određivanja. Radi bolje točnosti injektiranje je ponavljano tri puta za oba linearna dinamička područja. Za niže koncentracije analizirana je otopina koncentracije 0,025 mg L⁻¹, a za više 1,0 mg L⁻¹. Relativna standardna devijacija izračunana je iz odziva detektora.

Tablica 4.11. Podatci za izračun granica određivanja i dokazivanja

Injektiranje	Koncentracija (mg L ⁻¹)	Kriptoklorogenska kiselina		Neoklorogenska kiselina	
		Odziv	S/N	Odziv	S/N
1	0,025	164	19,4	115	22,6
2		89	76,6	89	35,5
3		125	26,7	82	11,3
<i>RSD</i> %		7,48		13,73	
1	1	8356	134,8	6089	130,4
2		7532	142,4	7821	128,7
3		8733	94,8	7797	91,8
<i>RSD</i> %		29,77		18,24	

Granice dokazivanja i određivanja su računane iz omjera signala i šuma te one za kriptoklorogensku kiselinu iznose 3,6 i 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, a za neoklorogensku 2,0 i 6,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.4.6. Robusnost

Provjera robusnosti izvršena je na način da se u postavkama metode promijenila temperatura kolone i protok. Novi uvjeti su ispitani za koncentraciju otopine od 5 mg L^{-1} te je sve prikazano u tablici 4.12. Izračunom koncentracije sastojaka smjese robusnost je prikazana kroz iskorištenje (%).

Tablica 4.12. Robusnost metode prilikom promjene odabranih parametara

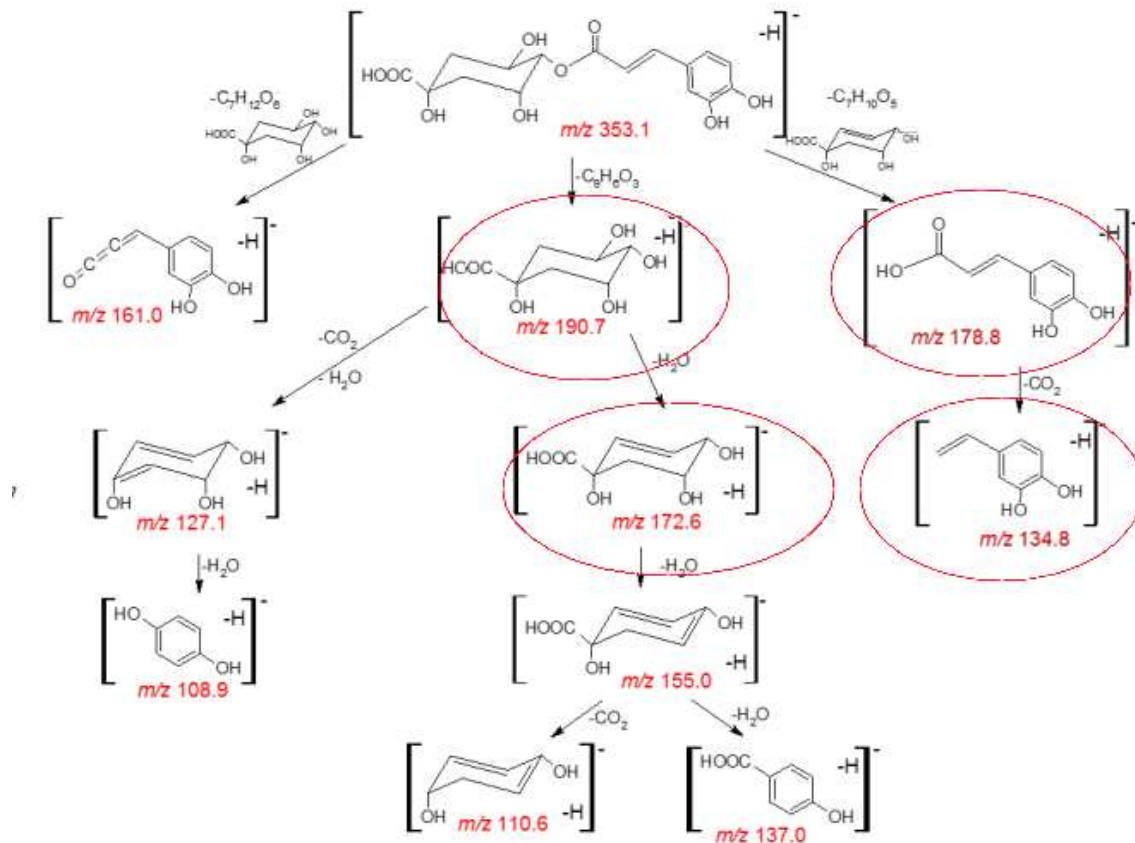
Parametar	Kriptoklorogenska kiselina	Neoklorogenska kiselina
Temperatura kolone + 5 °C	144,11	105,58
Temperatura kolone – 5 °C	148,75	129,14
Protok + 0,05 mL/min	171,29	112,79
Protok – 0,05 mL/min	120,89	132,28

5. RASPRAVA

5.1. Optimizacija parametara metode

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi najbolje kriterije za provođenje kvantifikacije klorogenskih kiselina pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti koja je spregnuta sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom. U eksperimentalnom radu odijeljene su četiri kiseline (neoklorogenska, pseudoklorogenska, klorogenska i kriptoklorogenska), a kvantificirane su dvije (neoklorogenska i kriptoklorogenska) zbog sličnosti. Naime, riječ je o kiselinama koje pripadaju istoj klasi spojeva što znači da dijele funkcionalne skupine, a također imaju i jednake molekulske mase. Budući da klorogenska, kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina imaju jednaki kvantitativni ion te sve četiri dijele produkte fragmentacije bio je težak zadatak potpuno odijeliti sve kiseline. Metoda je na samom početku trajala preko 19 minuta, a optimizacijom skraćena je na 12,6 minuta. Isprobano je daljnje kraćenje na 9 minuta, međutim takvi uvjeti onemogućili su uspješno odjeljivanje kiselina.

Ovim putem dobiveni su svi fragmenti i slikom 5.1. predložen je potencijalni način fragmentacije kiselina. Spektri masa snimljeni su u negativnom načinu rada



Slika 5.1. Predloženi put fragmentacije kriptoklorogenske kiseline (10)

U prvom kvadripolu (Q1) prema negativnom načinu rada snimljen je molekularni ion kriptoklorogenske kiseline mase 353,1 Da. U trećem kvadripolu (Q3) snimljeni su ionski fragmenti molekularnog iona u masama 173 Da, 179 Da i 135 Da.

Za neoklorogensku kiselinu također je snimljen molekularni ion mase 353,1 Da, a zatim u trećem kvadripolu ionski fragmenti specifičnih masa koje redom iznose 191 Da, 179 Da i 135 Da.

Crveno zaokruženi na slici 5.1. su svi dobiveni fragmenti kriptoklorogenske kiseline, međutim jednaki su ionski produkti pronađeni i na MS/MS spektru neoklorogenske kiseline pa nisu dvaput prikazivani. Molekularni ion mase 191 Da prema tome nastaje cijepanjem kafeinske kiseline, a daljnjim oduzimanjem vode ostaje molekularni ion mase 173 Da. Otkidanjem kininske kiseline s molekularnog iona ostaje ion mase 179 Da, od kojeg oduzimanjem ugljikovog dioksida ostaje ionski produkt od 135 Da.

Za zadovoljavajuću identifikaciju kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline bilo je nužno optimizirati određene parametre spektrometrije masa. Tlak argona koji ulazi u kolizijsku ćeliju (eng. *collision-induced dissociation gas*, CID gas) je bio fiksiran zbog jasnih krivulja te iznosi 1,5 mTorr. Parametri koji su optimizirani su: napon na kapilari koji je iznosio 4400 V za obje kiseline, RF leće je za kriptoklorogensku bio 110 V, a za neoklorogensku kiselinu 109 V. Temperatura kapilare za prijenos iona iznosila je 325 °C, a temperatura plina za formiranje fine maglice 350 °C. Ionski produkt upotrijebljen za kvantifikaciju kriptoklorogenske kiseline je onaj od 173 Da pri energiji sraza od 14 V, dok je kod neoklorogenske to produkt od 191 Da pri energiji sraza od 17 V.

Određeni su optimalni kriteriji kromatografske tehnike pri čemu su ispitani i određeni: kolona, temperatura kolone, komponente mobilne faze i modifikator prisutan u mobilnoj fazi te gradijent mobilne faze u trajanju eluiranja.

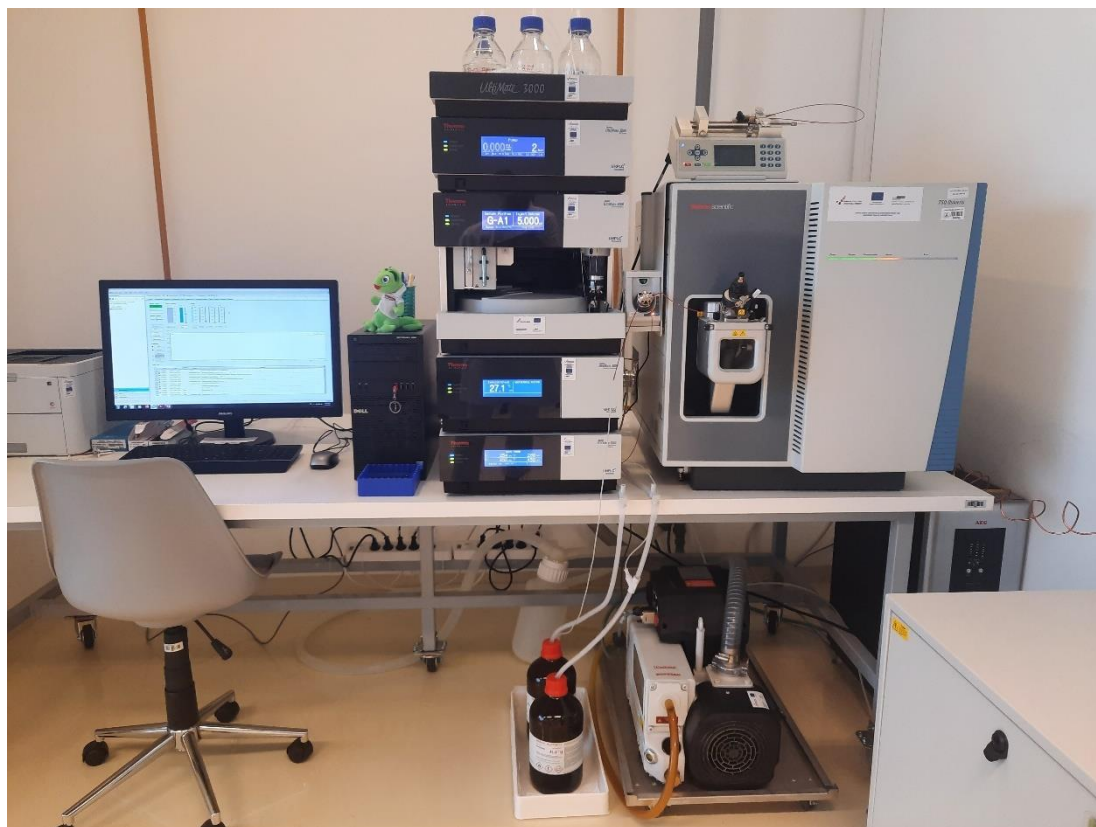
Ispitane su tri kolone pri istim uvjetima od kojih su dvije sadržavale C18, a jedna C8 nepokretnu fazu. Prema kromatogramu bilo je vidljivo kako je Agilent XDB kolona s C18 fazom čije su dimenzije 100 × 3,0 mm i veličine čestica 3,5 μm pokazala najučinkovitije razdvajanje.

Temperatura kolone zatim je ispitivana u razmacima od 10 °C, na četiri različite temperature, a najpravilniji signali i odjeljivanje pokazali su se na 25 °C. Temperatura automatskog uzorkivača podešena je na 15 °C i ta vrijednost nije dodatno optimizirana.

Budući da se kiseline dobro u njemu otapaju što je potvrđeno literaturom Tomac I, za gradijentno eluiranje mobilne faze izabran je metanol te uz njega još ispitane voda i acetonitril

(9). Dodatak modifikatora bio je nužan budući da klorogenske kiseline ne ioniziraju u vodi, tako da su u tu svrhu ispitane mravlja i octena kiselina. Pregledom kromatograma (slika 4.6.) izmjenom samo mobilne faze, utvrđeno je kako najbolji rezultat daje kombinacija vode i metanola. Iduće je na slici 4.7. vidljivo kako dodatak octene kiseline uzrokuje bolji odziv detektora te signali brže izlaze. Na kraju, ispitan je udio octene kiseline dodan u otapala te je određeno kako 0,2 % CH_3COOH daje bolju razdvojenost signala (slika 4.8.).

Gradijent prolaska pokretne faze prikazan je tablicom 4.5. Eluiranje je započelo protokom $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ vode i metanola u omjeru 90 : 10, oboje uz dodatak modifikatora (octene kiseline) u koncentraciji 0,2 %. Volumen injektiranja uzorka iznosio je $5 \mu\text{L}$.



Slika 5.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (Dionex UltiMate 3000) vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (TSQ Quantis)

5.2. Vrednovanje metode

Linearnost je određivana za područje koncentracija od $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ do 25 mg L^{-1} . Procjenom rezultata zaključeno je kako bolju linearnost odražava podjela podataka u dva linearna područja, ono nižih koncentracija (od $0,025$ do $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) i viših koncentracija (od $0,5$ do 25 mg L^{-1}). Prema tome, za niže koncentracije korelacijski faktor (R^2) za kriptoklorogensku kiselinu iznosi $0,9992$ dok je za neoklorogensku kiselinu $0,9993$. Za područje viših koncentracija R^2 kriptoklorogenske kiseline iznosi $0,9929$, a neoklorogenske $0,9994$.

Za kalkulaciju točnosti metode bilo je potrebno računski dobiti koncentracije svih točaka iz krivulje umjeravanja čije su stvarne koncentracije već poznate, a zatim njihovom usporedbom izračunati iskorištenje. Ono se za sve točke kretalo u vrijednostima između $80,6$ i $119,0 \%$ što potvrđuje pouzdanost metode s iznimkom za $70,1 \%$ za koncentraciju 1 mg L^{-1} kriptoklorogenske kiseline koja ukazuje na nešto značajniju pogrešku u točnosti. Izvor pogreške može biti i u pripremi otopine.

Glede preciznosti metode ispitivanje se vršilo na tri razine: preciznost samog instrumenta, ponovljivost i srednja preciznost. Za preciznost instrumenta uređaj je injektirao šest puta otopinu jednake koncentracije čime je potvrđena preciznost. Ponovljivost metode zahtijevala je pripremu četiriju koncentracija u dva primjerka čime je izračunata relativna standardna devijacija (*RSD*). Potencijalno bi vrijednost *RSD* mogla biti niža kod više od dva ponavljanja za svaku koncentraciju. U smislu srednje preciznosti ispitivanje se vršilo na dvije zasebne razine. Jedno ispitivanje provedeno je izradom otopina jednakih koncentracija na drugi dan, a drugo na način da za iste koncentracije analizu provede drugi analitičar. U rezultatima su uočena odstupanja među relativnim standardnim devijacijama, budući da kod prvog analitičara postoji veća pogreška na koncentraciji $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ dok god drugog analitičara pogreška uglavnom utječe na koncentraciju $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ što ponovno dovodi u pitanje mogućnost varijacije pri pripremi otopina, upotrebi mikro-pipeta i sl.

Kako bi se odredila granica dokazivanja bilo je potrebno odrediti omjer signala i šuma minimalne vrijednosti 10 , a granica određivanja bio bi omjer od 3 . Injektiranje se ponavljalo 3 puta za obje koncentracije, svaka za jedno linearno dinamičko područje. Granica dokazivanja kriptoklorogenske kiseline iznosila je $3,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ i $2,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ za neoklorogensku kiselinu. Granice određivanja kriptoklorogenske i neoklorogenske su $10,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, odnosno $6,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Robusnost metode ispitivana je za koncentraciju otopine od 5 mg L^{-1} tako da su izvršene male izmjene u temperaturi i protoku kolone. Potom je izračunato iskorištenje kojim je

vrednovana robusnost. Razvijena metoda nije se pokazala robusnom budući da dolazi do velikih promjena u iskorištenju uslijed povećanja ili smanjenja temperature kolone za 5 °C i promjene protoka za 0,05 mL min⁻¹. Ispitanim manjim namjernim promjenama parametara bolje se odupire neoklorogenska u odnosu na kriptoklorogensku kiselinu.

6. ZAKLJUČCI

1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa je povoljna tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline.
2. Spektrometar masa optimiziran je tako da je napon na kapilari za obje kiseline 4400 V. RF leće za kriptoklorogensku kiselinu bio je 110 V, a za neoklorogensku 109 V. Temperatura plina koji služi za formiranje fine magline iznosila je 350 °C, a kapilare za prijenos iona 325 °C. Spektar je sniman u negativnom načinu rada te je kvantitativni ion kriptoklorogenske kiseline bio onaj od 173 Da, a kvalitativni ioni su oni od 179 i 191 Da, energija sraza bila je redom 14, 14 i 20 V. Za neoklorogensku kiselinu kvantitativni ion iznosio je 191 Da, a kvalitativni 179 i 135 Da, dok su energije sraza redom iznosile 17, 16 i 28 V.
3. Tekućinska kromatografija optimizirana je na način da su kao pokretna faza odabrani voda i metanol, oboje s dodatkom 0,2 % volumnog udjela octene kiseline kao modifikatora, a optimiziran je i najpogodniji gradijent za ta otapala. Za nepokretnu fazu odabrano je C18 punjenje, a optimalna temperatura kolone je 25 °C.
4. Vrednovanjem metode potvrđena je linearnost uz zadovoljavajući korelacijski faktor. U smislu točnosti rezultati su relativno zadovoljavajući. Uređaj je jako precizan pri mjerenju, a do većih odstupanja dolazi prilikom izračuna srednje preciznosti. Granice dokazivanja iznose 3,6 za kriptoklorogensku a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ za neoklorogensku, dok granice određivanja iznose 10,8 za kriptoklorogensku i 6,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ za neoklorogensku kiselinu. Ispitivanjem robusnosti uočeno je da se ispitanim promjenama bolje odupire neoklorogenska kiselina.

7. LITERATURNI IZVORI

- (1) Flora Croatica Database [Internet]. *Crithmum maritimum* L. [pristupljeno 9. rujna 2022.]; Dostupno na: <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=3130&taxon=Crithmum+maritimum+L>.
- (2) Piatti D, Angeloni S, Maggi F, Caprioli G, Ricciutelli M, Arnoldi L i sur. Comprehensive characterization of phytochemicals in edible sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) grown in central Italy. *J. Food Compost. Anal.* 2023;115:104884.
- (3) Politeo O, Popović M, Veršić Bratinčević M, Kovačević K, Urlić B, Generalić Mekinić I. Chemical profiling of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils and their isolation residual waste-waters. *Plants.* 2023;12(1):214.
- (4) Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdelly C, Ksouri, R. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*, 2014;145:1031-38.
- (5) Eravuchira PJ, El-Abassy RM, Deshpande S, Matei MF, Mishra S, Tandon P, Kuhnert N, Materny A. Raman spectroscopic characterization of different regioisomers of monoacyl and diacyl chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 2012;61:10-16
- (6) Yang J, Yao L, Gong K, Li K, Sun L, Cai W. Identification and Quantification of Chlorogenic Acids from the Root Bark of *Acanthopanax gracilistylus* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometry. *ACS Omega.* 2022;7 (29):25675-25685
- (7) Choi W, Kim J, Kyun Kim D, Lee Y, Yoo J, Sheen D i sur. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid Isomers and Metabolites in Rat Plasma Using LC-MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Study Following Oral Administration of *Stauntonia Hexaphylla* Leaf Extract (YRA-1909) to Rats. *Pharmaceutics.* 2018. doi: 10.3390/pharmaceutics10030143.
- (8) Clifford M, Jaganath I, Ludwig I, Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* 2017;34:1391-421
- (9) Tomac I. Karakterizacija klorogenskih kiselina i analiza antioksidacijske aktivnosti u različitim vrstama kave primjenom elektrokemijskih metoda [disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2016.
- (10) Willems J, Khamis M M, Saeid W M. i sur. Analysis of a Series of Chlorogenic Acid Isomers using Differential Ion. Mobility and Tandem Mass Spectrometry *Anal Chim Acta.* 2016; 933:164-74.
- (11) ResearchGate [Internet]. 2017. Some Notes on the Chlorogenic Acids. 1. Numbering and Nomenclature Version 5 January 2017 with table margins corrected [citirano 9. rujna 2023.]

- Dostupno na:
https://www.researchgate.net/publication/312647842_Some_Notes_on_the_Chlorogenic_Acids_1_Numbering_and_Nomenclature_Version_5_January_2017_with_table_margins_corrected
- (12) Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga. 2016; 630-657. str.
- (13) Encyclopedia Britannica, [Internet] 2023. [citirano 10. rujna 2023.] Dostupno na : <https://www.britannica.com/science/chromatography>.
- (14) Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch S R. Fundamentals of Analytical Chemistry. 9. izdanje. SAD: Cengage Learning; 2013. 1072.
- (15) 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.
- (16) Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2015
- (17) Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W. Equipment. U: Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W, urednici. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Treće izdanje. Hoboken: Wiley; 2009. str. 87-45.
- (18) Stoll D R. Filters and filtration in liquid chromatography—what to do. LCGC North America. 2017;35:98-3.
- (19) Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W. Detection. U: Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W, urednici. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Treće izdanje. Hoboken: Wiley; 2009. str. 147-97.
- (20) Runje M. Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2018 [pristupljeno 19.09.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:085301>
- (21) Rathod R H, Chaudhari S R, Patil A S, Shirkhedkar A A. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. Futur J Pharm Sci. 2019. doi: 10.1186/s43094-019-0007-8.
- (22) Ahmed F, Eticha T, Hymete A, Ashenef A. Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography. U: Núñez O, Sentellas S, Granados M, Saurina J, urednici. High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications. Prvo izdanje. London: IntechOpen; 2023. doi: 10.5772/intechopen.110540

- (23) Smith R W, Mass Spectrometry. U: Siegel J A, Saukko P J, Houck M M, urednici. Encyclopedia of Forensic Sciences. Drugo izdanje. London: Elsevier; 2013. str. 603-8.
- (24) Lee DC, Webb ML. Pharmaceutical analysis. Oxford: Blackwell Publishing/CRC Press; 2004. str. 165-2.
- (25) Baghel U S, Singh A, Singh D, Sinha M. Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. U: Sharmin E, Zafar F, urednici. Spectroscopic Analyses - Developments and Applications. Prvo izdanje. London: IntechOpen; 2017. str. 105-21.
- (26) Blasco C, Pico Y. Liquid chromatography-mass spectrometry. U: Y. Pico, urednica. Food Toxicants Analysis. Prvo izdanje. Amsterdam: Elsevier; 2006. str. 509-59.
- (27) Tsybin Y O, Nagornov K O, Kozhinov A N. Advanced fundamentals in Fourier transform mass spectrometry. Schmitt-Kopplin P, Kanawati B, urednici. Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry. Prvo izdanje. San Diego: Elsevier; 2019. str. 113-32.
- (28) Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop M-L, Evard H, Herodes K i sur. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. Anal. Chim. Acta. 2015;870:29-44.
- (29) Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop M-L, Evard H, Herodes K i sur. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. Anal. Chim. Acta. 2015;870:8-28.
- (30) Wang Y, Wen J, Zheng W, Zhao L, Fu X, Wang Z i sur. Simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and geniposide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of Reduning injection. Biomed. Chromatogr. 2015;29:68-74.
- (31) ICH Guidelines [Internet]. 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [Citirano 27. rujna 2023.] Dostupno na:
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Razvoj i optimizacija metode koja služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa (UHPLC-MS/MS) i zatim vrednovanje same metode kako bi se osigurala pouzdanost rezultata rezultata.

Materijali i metode: Radni standard korišten u istraživanju je smjesa kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline te su od njega pripravljene otopine koncentracija između 0,005 mg L⁻¹ i 50 mg L⁻¹, a one su potom korištene za razvoj i vrednovanje metode korištenjem tekućinske kromatografije i spektrometrije masa.

Rezultati: Za pripremu nižih koncentracija standardna otopina je razrijeđivana pomoću metanola. Pokretnu fazu je sačinjavala smjesa vode i metanola pomiješane s 0,2 % volumnog udjela octene kiseline kao modifikatora. Odabrana je Agilent kolona punjena C18 nepokretnom fazom, a prostor u kojem je smještena termostatiran je na 25 °C. Spektrometar masa je optimiziran postavljanjem napona na kapilari od 4400 V za obje kiseline. RF leće su bile podešene na 110 V za kriptoklorogensku kiselinu i 109 V za neoklorogensku. Temperatura plina korištenog za formiranje fine maglice bila je 350 °C, a temperatura kapilare za prijenos iona održavana je na 325 °C. Spektar je zabilježen u negativnom ionizacijskom načinu te je metoda analizom MS/MS spektra omogućila razumijevanje fragmentacije klorogenskih kiselina. Vrednovanjem metode zabilježeni su zadovoljavajući rezultati.

Zaključci: Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom prikladna je metoda za određivanje kriptoklorogenske i neoklorogenske kiseline, a vrednovanjem metode uočena je mogućnost njene primjene.

Ključne riječi: motar, kriptoklorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, UHPLC, MS/MS, vrednovanje

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Determination of chlorogenic acids using UHPLC-MS/MS

Objectives: The development and optimization of a method used for the quantitative and qualitative determination of cryptochlorogenic and neochlorogenic acid using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), followed by the validation of the method itself to ensure the reliability of the results.

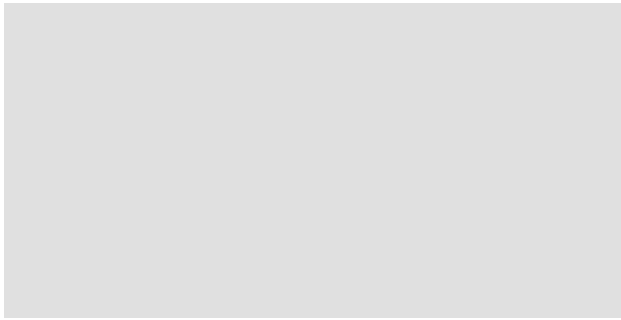
Materials and methods: The working standard used in the research was a mixture of cryptochlorogenic and neochlorogenic acids, from which solutions with concentrations ranging from 0.005 mg L⁻¹ to 50 mg L⁻¹ were prepared. These solutions were then used for the development and validation of liquid chromatography and mass spectrometry method.

Results: To prepare lower concentrations, the standard solution was diluted with methanol. The mobile phase consisted of a mixture of water and methanol mixed with 0.2% volume fraction of acetic acid as a modifier. An Agilent column packed with C18 stationary phase was selected and the analysis was carried out at 25 °C. The mass spectrometer was optimized by setting the capillary voltage to 4400 V for both acids. RF lenses were adjusted to 110 V for cryptochlorogenic and 109 V for neochlorogenic acid. The temperature of the gas used to form the fine mist was 350 °C, and the temperature of the ion transfer capillary was maintained at 325 °C. The spectra were recorded in the negative ionization mode, and the method enabled the understanding of the fragmentation of chlorogenic acids by analyzing the MS/MS spectrum. The evaluation of the method yielded satisfactory results.

Conclusions: Ultra-high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer is a suitable method for the determination of cryptochlorogenic and neochlorogenic acid, and the validation confirmed its application.

Key words: sea fennel, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, UHPLC, MS/MS, validation

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:**Obrazovanje:**

- 2014. – 2018. Srednja škola Biograd, smjer: opća gimnazija, Biograd na Moru
- 2018. – 2023. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: Farmacija

Radno iskustvo:

- 2023. Stručno osposobljavanje: 20. veljače – 25. kolovoz; Ljekarne Splitsko – dalmatinske županije, ljekarna Marjan

Posebne vještine:

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