

Aromaterapi- en analyse av sitrus oljer

av

Yen Thuy Hoang Bui



Masteroppgave i farmasi



Senter for farmasi/ Kjemisk Institutt

Universitetet i Bergen

20.05.2009

Forord

Jeg vil gjerne takk veilederen min, George W. Francis, for all hjelp og veiledning han har gitt i forbindelse med denne oppgaven. Han stilte alltid opp for meg under hele prosessen og har alltid gode svar og oppmuntrende ord. Jeg vil også gjerne takke Terje Lygre og Egil Nodland for deres hjelp med apparatene og tilhørende dataprogrammer brukt i denne oppgaven.

Innholdsfortegnelse

- Målsetning
- Del 1- Innledning
 - 1.1 Sitronolje
 - 1.2 Søt appelsinolje
 - 1.3 Tangerineolje
- Del 2- Metoder
 - 2.1 Gasskromatografi
 - 2.2 Elektron ionisering
 - 2.3 Time of flight analysator
 - 2.4 Desorption in Real Time- DART
- Del 3- Eksperimentelt
- Del 4- Resultater
- Del 5- Diskusjon
- Del 6- Konklusjon
- Del.7- Sammendrag
- Del 8- Referanser

Målsetting

Målet med denne oppgaven er å analysere sitrusoljer og finne komponentinnholdet i disse oljene. Deretter skal vi blåse oljene med nitrogen for å se hvordan sammensetningen av komponentene. Tanken bak dette er å se på hva som forandres og hvor mye som forandres når oljene blir fordampet. Dette kan så direkte overføres til forståelsen av hvordan en aromaterapi behandling foreløper. Om behandlingens start og slutt varierer kjemisk og hva dette kan bety for kroppen og dermed også andre biologiske systemer. Vi skal se om forandringene er signifikante og eventuelt hvilke stoffer som forsvinner og hvilke som muligens øker i konsentrasjon. Gjennom andre studier som har blitt gjort kan vi prøve å tenke oss fram til hva konsekvensene for disse forandringene blir. Det har blitt gjennomført mange studier som fokuserer på reaksjoner mennesker og dyr får ved kontakt med kjente stoffer i sitrus essensielle oljer og ved å se på hvordan oljene oppfører seg og forandrer seg kan vi også forutse hva disse forandringene gjør med kroppen og andre biologiske systemer. Sitrus essensielle oljer har mange forskjellige komponenter og de ulike studiene gjort viste varierende resultater. Vi vil her bruke DART metoden til å bekrefte komponentfunn fra GC/MS analyse og å se om DART egner seg som en kvantitativ analysemetode da dette har blitt påstått av en del studier. Fra disse analysene kan vi også få et bilde av hvor forskjellig en type olje er når de har forskjellig opprinnelse. Dette ser vi fra komponentsammensetning av oljen vi har og sammensetning av samme olje fra annen opprinnelse gjort i andre studier.

1. Innledning

Aromaterapi er en alternativ behandlingsmetode som tradisjonelt tar i bruk forskjellige dufter til å behandle ulike tilstander. Gjennom utslipp av forskjellige aroma stoffer fra essensielle oljer og andre ekstraherte duftkomponenter, sies disse å påvirke forskjellige systemer i kroppen og dermed kurere fysiske og psykiske sykdommer. Behandlingen er en innåndingsterapi. Duft behandling kan for eksempel være innånding fra olje brennelsapparat, gjennom massasje der den essensielle oljen er fortynnet i en bærerolje og flere andre metoder. I senere tid har andre behandlingsmetoder gått inn under begrepet aromaterapi, men som teoretisk ikke skal bli betegnet som dette. Essensielle oljer laget for innvendig bruk blir ofte beregnet som aromaterapi, men har ingenting med duftbehandling å gjøre ettersom stoffet inntas, ofte som kapsler, og selve aromaen fra oljen slippes ikke ut. Behandlingen bruker derimot kjemikalier i oljen som skal virke på kroppens indre organer som konvensjonell medisinsk behandling.

Aromatiske planter og deres eteriske oljer har opp gjennom årene vært en viktig del av samfunnslivet- både religiøst, medisinsk, kulinarisk og kosmetisk. Men aromaterapi som en selvstendig behandlingsform kom ikke før det 20. århundre. Det hersker fremdeles en forvirring om hva aromaterapi er og hva som regnes som aromaterapi. En definisjon på aromaterapi er at den er en kontrollert, bevisst og allsidig bruk av plantenes eteriske oljer for å lindre mange små og store helseplager.

Leger og erfarne naturmedisinere bruker også disse oljene til å kurere alvorlige sykdommer og lidelser. Essensielle oljer er sterkt konsentrerte dråper av de stoffene som gir planten duft og smak i tillegg til dens mest potente medisinske egenskaper. De mest normale fremstillingsmetodene er dampdestillasjon og ved kaldpressing. Hos en aromaterapeut får man vanligvis en kropps- og ansiktsmassasje der oljene velges ut for den individuelle personen og blandes i vegetabilsk baseolje. Andre bruksområder inkluderer: hel- eller delbad, inhalering, i kompresser, selvoljning, i tamponger, som spray eller forstøving i luften for å hindre smitte og skape et sunnere inneklima, og i spesielle tilfeller til oral inntak [9].

Essensielle oljer, som hovedsaklig består av aroma stoffer, har tiltrukket økende oppmerksomhet etter at de ble introdusert til innendørs bruk gjennom forskjellige forbrukerprodukter. Essensielle oljer og noen ekstraherte duftkomponenter blir brukt i økende grad i det moderne samfunnet for deres påståtte egenskaper. Disse avgir behagelige dufter og sies i tillegg å ha antibiotiske aktiviteter. Denne påstanden er dessverre uten tilfredsstillende vitenskapelig bevis, der forskning ikke har klart å vise spesifikk effekt og mekanisme til stoffene.

Et annet problem som gjør at denne behandlingsmetoden ikke blir regnet som konvensjonell medisinsk behandling er at hver produksjonsenhet kan variere fra en annen. Kilder fra forskjellige steder i verden viser å ha forskjell i stoffinnhold, komposisjon og stoffmengde. Dette gjør at behandlingen ikke kan garanteres å virke likt hver gang. Det betyr ikke at

behandlingen er ineffektiv, men uten bevis er det heller ingen garanti for virkning på alle indikasjonene oppført i litteraturer [23].

I orienten blir sitrusfrukter ofte brukt for kulinære og medisinske formål. Eksempel på tradisjonell bruk er avkoking av skallet til frukten forskrevet for eksempel for dyspepsia, mot kolikk, mot hoste, stoppe oppkast, mot diaré, for sår hals og mot brystmerter [24].

Sitrus oljer inneholder en rekke terpenener som har blitt assosiert med en rekke uønskete reaksjoner. Monoterpenener, særlig de med flerumettede karbon-karbon bindinger, reagerer veldig lett med oksidanter som ozon, hydroksyl og nitrat radikaler. Dette kan føre til dannelse av en rekke sekundære organiske forurensende gasser og partikler [25]. De produktene som dannes i reaksjonen med disse oksidantene har vekket bekymring hos mange fordi de viser seg å være mer og mer irriterende, og jo mindre partiklene er jo lettere trenger de seg ned i de nedre delene av luftveiene. Essensielle oljer avgir terpenener til luften ved avdamping, og fordi disse terpenene reagerer med vanlige oksidanter som finnes i luften er det grunn til å bekymre seg for mulige bivirkninger. Tilstander som nedsatt pulmonær funksjon, astma og yrkesmessig astma har blitt assosiert med økt eksposisjon for essensielle oljer i luften innedørs [23]. I Europa er limonen klassifisert som en sensibiliseringsaktivator på huden fordi den danner allergeniske oksideringsprodukter. Mennesker med dermatitt kan få kontakt allergi med disse produktene, hovedsaklig på hender, ben, ansikt og hals. Studier viser at disse menneskene reagerer på oksidert limonen og kilden kommer fra parfymerte renseprodukter, produkter for personlig pleie og kosmetikk. Dette er fordi limonen kan lett oksideres og man får dermed stoffene i produktet [26].

1.1 Sitronolje

Botanisk navn for arten er *Citrus limonum* (L.) Burm.f. (Rutaceae)

Fremstilling fra fersk skall av sitroner gir en volatil olje. For å få en essensiell olje blir skallet damp destillert, men dette gir en annerledes sammensetning. Det brukes ikke varme under fremstilling av sitron volatil olje.

Råvaren kan komme fra Sicilia, California (USA), Argentina eller Spania. Ved kaldpressing blir oljen gul til oransje til grønn- gul og har en kortvarig, lett og fersk lukt som minner om skallet. Oljen er fargeløs til lysgul ved destillering eller rektifisert [1].

Tabell 1.1 Komponenter funnet i sitron olje: [2]

Hydrokarboner	Monoterpener (90-95 %)	Limonen 55-80 %, α -Pinen 1,9-2,4 %, β -Pinen 10-17 %, δ -Terpinen 3-10 %, sabinen 2 %, α -Thujen 0,01-0,4 %, β -Myrcen, α -Phellandren, α -Terpinen 0,2-0,4 %
	Sesquiterpener	β -Bisabolen 0,5-4 %, α -Bergamoten 0,4%, β -Carophyllen 0,2 %
	Aromatisk	ρ -Cymen 1 %
Alkoholer	Monoterpenoler	Linalool 0,1 %, terpinen-4-ol 0,05 %, α -Terpineol 0,1-0,2 %
	Andre	Heksanol, heptanol, oktanol, nonanol, dekanol
Aldehyder	Monoterpenaler	Geranial 0,9-1,6 %, neral 0,5-1 %, citronellal 0,1 %
	Andre	Nonenal, oktanal, dekanal 0,05 %
Estere	Monoterpenyl	Neryl acetat 0,5 %, geranyl acetat 0,5%, α -Terpinyl acetat 0-0,7 %
Koumariner, furanokoumariner		Bergamottin 0,2 %, citropten, bergaptol spor, phellopterin, bergapten 0,6 %, oksypeucedanin, imperatorin,

Sitron er brukt i aromaterapi som en stimulans av hjernen, til å sanse organene og til bruk for det parasympatiske nervesystemet. Den gir bevissthet og kobling mellom vårt legeme og sjel og gir dermed en beroligende effekt på konflikter mellom tanker og intellektet [3]. Annet bruk inkluderer behandling av åreknuter, behandling av anemiske tilstander, for dårlig blodsirkulasjon, hypertensjon, mot årebetennelse, tromboser, arterieskleroser og neseblødning. Sitron brukes også mot sår hals, hoste, forkjølelse og influensa. Den brukes for nyrene og urin utskilling, som en stimulans på det glandulære systemet og på glatt muskelvev, der dette er nyttig for å indusere fødselsveer ved for sen fødsel. Mot magekrampe på grunn av nyrebetennelse, mot astma og bronkitt, mot katarr, for behandling av infeksjoner i sinus, mot cellulitt, for å reparere ødelagte kapillærer, for behandling av fet og oljete hud og hår, mot munnsår, mot herpes og akne, mot byller og liktorn, mot vorter og for å balansere talg i huden er også dens bruksområder [1].

Sitron essensiell olje er forfalsket i ekstreme proporsjoner og de kommersielle produktene varierer i sammensetning og aktivitet. Oljen har en veldig liten antimikrobiell effekt og den spasmogene effekten på glatt muskulatur *in vitro* kan ha en stimulerende effekt som duft selv om den er vist å ha en sederende effekt på bølgene i menneskehjernen. Bruk av sitron essensiell olje på huden er ikke anbefalt på grunn av dens mulighet for sensitivering og potensialet for fototoksisitet. Massasje kan i seg selv behandle stresstilstander og duften brukt sammen med massasjen kan bidra til behandlingen, men det er lite sannsynlig at den essensielle oljen kan behandle alle de ulike tilstandene nevnt foran.

Bruk som urte inkluderer behandling av revmatiske sykdommer, behandling av åreknuter og blåmerker, styrke kapillærer og blodårer, forebyggende mot infeksjon, feber, arteriesklerose, blødende tannkjøtt osv. Behandling av disse tilstandene og som forebyggende middel ved bruk som urte omhandler sitron saften og ikke den essensielle oljen. Sitronoljen er brukt i forskjellige hostesafter.

Sitronolje og andre ikke-terpenholdige oljer er brukt i mange forskjellige matvarer og drikkevarer. Sitronoljen er brukt i parfyme industrien for dens forfriskende tone, særlig i cologne og i maskuline parfymer.

Limonen er den største komponenten i oljen, etterfulgt av forskjellige pinener. Det er koumarin og psoralen som forårsaker den fototoksiske aksjonen. Disse komponentene er ikke funnet i destillerte oljer fra koumarin-fri redestillerte oljer. Kaldt presset sitronolje har et limonen nivå på rundt maksimum 80 %, men denne mengden kan reduseres drastisk ved konsentrering og ved total fjerning av terpenener. Dette fører til at andre komponenter kan økes til veldig store mengder.

Bruk av forskjellige teknikker for fjerning av terpenener etter at oljen er blitt kaldpresset kan gi veldig forskjellige essensielle oljer. Sitronoljen kan bli vakuumbestillert eller "vasket" ved å vende oljen i en blanding av alkohol og vann under røring for 24 timer som metoder for å

fjerne terpenener. Fjerning av terpenener i oljen er brukt i mat- og parfymeindustrien, og det er derfor ikke mulig å bestemme hvordan sitrus oljer er blitt forandret når man kjøper det i butikken. Sitronolje kan bli forfalsket med destillert sitronolje, konsentrert sitronolje, terpenfri eller sesquiterpenfri sitronolje, syntetisk eller naturlig limonen, terpentin osv.

Test på mennesker viste ingen irritasjon eller sensitivering ved 10 % fortynning [4]. Destillert sitronolje viste heller ingen fototoksisk effekt [5]. Utpresset olje viste derimot fototoksisk effekt og sollys bør unngås i 1 time etter applikasjon på huden [4]. Sitronolje har en svak antibakteriell og antifungal aktivitet [6]. (+)-Limonen preparasjon brukes til behandling av gallesteiner [17]. Spray av sitronolje viste å avlaste depresjon [10]. Sitronolje viste også ekspektorerende egenskaper ved testing på marsvin [7]. Oksypeucedanin og bergapten er komponentene som gir fototoksitet der bergapten er 4 ganger mer potent [8].

Sitronolje er mye dyrere enn appelsinolje, derfor kan oljen forfalskes ved at man bruker appelsinolje og dens komponenter, blandet sammen med sitrongressolje og med UV-absorbent tilsatt slik at man ikke kan se at oljen ikke er presset. Antioksidanter som butylhydroksyanisol (BHA) og butylhydroksytoluen (BHT) er ofte tilsatt fordi sitrusoljer oksiderer veldig raskt.

Akutt toksisitetnivå er:

Oral LD₅₀ > 5g/kg (hos rotter)

Dermal LD₅₀ > 5g/kg (hos kaniner)

Økt forfalskning og forurensning har vist å gi økt sensitisasjon. Oljer med høy mengde *d*-limonen degraderes raskt ved åpning og produserer dermed kreftfremkallende kjemikaler eller gi økt risiko for sensitisasjon og hudirritasjon. Dette gjelder spesielt sitrusoljer. Derfor anbefales det en lagringstid på 1 år på åpne flasker dersom oppbevart riktig, eller 2 år dersom oppbevart i kjøleskap. Sitrusoljer varer i 6 måneder dersom oppbevart riktig. Kaldpresset essensiell olje har høy fototoksitet, mens furokoumarin fri essensiell olje har lav fototoksitet.

Sitronolje har en spasmogen effekt på elektrisk stimulert glatt muskulatur hos marsvin ileum *in vitro*. Limonen viste samme effekt. Sitronolje, limonen og andre komponenter studert viste en minskning i spontane kontraksjoner på livmoren hos rotter.

Oljen har en dårlig antimikrobiell aktivitet, og denne aktiviteten varierer på grunn av forskjellige komposisjoner av den essensielle oljen fra leverandør. Olje har også en dårlig antibakteriell aktivitet og antioksidant effekt var praktisk talt null.

Et preparat som inneholder *d*-limonen og andre monoterpenener er brukt til å løse opp gallesteiner. Sitron essensiell olje økte c-Fos uttrykkelse i den bueformede nukleus i hypotalamus. Resultatet indikerer sitron oljens evne til å modulere atferds- og neuronal respons relatert smerte. Oljer med høy *d*-limonen mengde har vist å stimulere vekst av tumor hos mus på applikasjonsstedet. En potensiell antidepressiv effekt av sitron duft er vist hos rotter.

Forsiktighet er anbefalt ved bruk av sitron essensiell olje under graviditet og fødsel. Det er ikke noen risiko dersom brukt som en duft i små mengder. Potensialet for sensitivering av den pressete oljen, særlig etter lagring eller etter at limonen har fått tid til å oksidere. Den essensielle oljen er også fototoksisk. Bruk på sensitiv eller ødelagt hud bør unngås og den essensielle oljen bør ikke brukes på huden før huden blir eksponert for sollys eller UV- lys fra solseng. For å unngå disse problemene kan oljer fjernet for terpener brukes i massasje istedenfor. Oljen er ikke anbefalt for bruk hos barn og unge på grunn av dens risiko for sensitivering og fototoksisitet. Barn kan reagere på både duften og ved applikasjon på huden, derfor er bruk nær barnets nese ikke anbefalt [1].

[29]

1.2 SØt appelsinolja

Botanisk navn for søt appelsin er *C. aurantium* L. var. *sinensis* L./ var. *dulcis* L.

Grensen for bruk med sikkerhet anbefalt av RIFM er 10 % for søt appelsin. Den essensielle oljen er framstilt ved kaldpressing av fersk skall av søt appelsin. En annen måte å framstille den essensielle oljen på er damp destillering av skallet, men dette gir en annen komposisjon enn ved kaldpressing. Oljen er hovedsakelig laget som et biprodukt fra appelsin juice industrien gjennom bruk av forskjellige prosesser. Prosessene er for eksempel ekstraksjon med løsemiddel av bearbeidet gjenværende vann, eller destillering av den konsentrerte appelsin juice som gir en rimelig stor mengde olje. Damp destillering av presset lag med skall etter ekstraksjon av appelsin juice eller damp destillering av ubrukt appelsin skall er også metoder for å få appelsinolja. De ulike prosessene gir ulike typer appelsinolja, men en blanding av oljene gir en tilfredsstillende produkt. SØt appelsinolja er en essensiell olje produsert uten bruk av varme, og en passende antioksidant blir ofte tilsatt. Appelsinolja inneholder ikke mindre enn 1,2 % w/v og ikke mer enn 2,5 % av aldehyder, her som dekanal. Terpenfri appelsinolja er laget ved å konsentrere appelsinolja til nesten alle terpenene er fjernet, eller ved bruk av løsemiddel for å skille vekk stoffene. Fordi det er tilstedeværelse av voks kan ikke oljen konsentreres mer enn 15 ganger, og konsentrert olje inneholder hovedsakelig alkoholer og aldehyder. Alkoholene er (+)-Linalol og (+)-Terpineol og ikke mindre enn 18 % w/w dekanal. Oljen er løselig i forhold 1/1 med alkohol.

Kilder for råmateriale er USA, Brasil, Kina, Vest India og Spania.

Appelsinolja er dyp gul til oransje, oliven- gul og noen ganger brunlig dersom presset. Den har en sitrus lignende duft, frisk og bitter og har en rik og langvarig søt undertone. De destillerte oljene er fargeløs til lys gul, er frisk og søt, men har lite duft sammenlignet med den pressete oljen. Destillert olje blir fortere ram så tilføyelse av en antioksidant så fort oljen er produsert er nødvendig.

Tabell 1.2 Komponenter funnet i søt appelsin olje: [2]

Hydrokarboner	Monoterpener (95 %)	(+)-Limonen >90 %, β -Myrcen 2,3 %, camphen, α -Pinen 8,9 %, β -Pinen 0,3 %, cis- og trans- β -Ocimen, α -terpineolen spor, β -Phellandren 1,5 %,
	Sesquiterpener	β -Carphyllen spor, valencen, α -Ylangen
	Aromatisk	ρ -Cymen 0,2%
Alkoholer	Monoterpenoler	(+)-Linalool 1,8%, (+)- α -Terpineol 0,1-0,7%, nerol, geraniol 0,4%, cis-

		carveol, trans-carveol
	Sesquiterpenoler	Farnesol, nerolidol
	Andre	Octanol 0,2 %
Aldehyd (1,2-2,5%)	Monoterpenal	Citronellal 0,5 %, neral
	Andre	Dekanal, n-oktanal, nonanal, n-dekanal, dodekanal, trans-2-heksenal, acetaldehyd, formaldehyd
Ketoner	Monoterpenon	Carvone 1,8 %
	Andre	Jasmone, α -Ionol
Ester (0,2-0,4 %)	Monoterpenyl	Linalyl acetat, geranyl acetat 0,1 %
Koumariner		Bergapten, aurapten, isoimperatorin, auraptenol
Frie syrer (0,1-0,3 %)		Oktadekadienoic syre
Oksider	Monoterpenoid	trans-Linalool oksid spor

Bruk innen aromaterapi er stor og inkluderer: for å forynge huden, behandling av eksem, behandling av dermatitt, mot rynker etter soling, for oljete hud, mot utmattelse, for overgangsalder, mot ødem og palpitasjoner, mot premenstruell spenning og stress, mot fedme. Oljen brukes for behandling av munnsår, forkjølelse og influensa, mot bronkitt, mot dyspepsi, mot forstoppelse og diaré, og mot spasmer. Den brukes også mot angst, nervøsitet og søvnløshet.[1]

Oksidering av den høye mengden limonen i oljen etter kort lagringstid fører til produksjon av sensitiveringsagenter addert med problemet med fototoksisitet, særlig ved bruk av den pressete essensielle oljen, gjør at bruk på huden blir risikabel. Derfor er bruk av destillert essensiell olje eller furanokoumarin-fri essensiell olje mer sikker med tanke på fototoksisitet problemer, men problemet med sensitivering er fremdeles til stede. Massasje kan i seg selv lindre mange stress symptomer og bruk av den stimulerende oljen som duft i tillegg kan være en fordel. Men oljen har også blitt rapportert for å være ikke irriterende og ikke sensitiverende, og heller ikke fototoksisk selv om den inneholder koumariner [11-13]. Oljen kan være fotosensitiverende dersom brukt på huden. (+)-Limonen kan forårsake kontakt dermatitt hos mennesker, og dette kan være et problem ettersom største delen av oljen inneholder dette. Kilden til syntese av carvon er appelsinolja der (+)-Limonen er komponenten som brukes [10]. Oljen er også antikarsinogen [12]. Søt appelsinolja er anbefalt ved mangel av magnesium og kalsium pektat. Oljen er rapportert å promotere tumor dannelse på muse hud behandlet med primær karsinogen.

Appelsinolja viste seg å være mer effektiv enn sitronolja i en test med 7 bakterier, 3 gjærsopp og 3 Aspergillus arter. Appelsinolja var i tillegg den eneste som hemmet Aspergillus artene [14]. Aurapten har indikert å være kjemoforebyggende på hud [15].

Appelsinolja er et irriterende middel, og i noen grad narkotisk. Dette gjør at de som håndterer oljen kan bli utsatt for mental forvirring, muskulær svakhet, neuralgi, hodepine, forstyrret fordøyelse, hudrødme, papula og vesikkeldannelse på huden. *Citrus aurantium* blir i Puerto Rico brukt mot søvnproblemer, mot gastrointestinale sykdommer, mot respiratoriske lidelser og forhøyet blodtrykk. Appelsin sies å være antiinflammatorisk, antimikrobial, karminativ, aromatisk og magestyrkende. Juicen er kjent for dens innhold av C- vitaminer, noe som man ikke finner i den essensielle oljen. Appelsin essensiell olje brukes til å løse opp lim når man fjerner stomi poser.

Appelsinolja brukes også i forskjellige typer sirup og infusjoner. Destillert og terpenfri appelsinolja brukes i mange typer matvarer og drikker. Oljen brukes i parfymeindustrien fordi den blandes godt med andre sitrusoljer, petitgrain, neroli og appelsin blomster.

Oljen inneholder hovedsakelig limonen, myrcen og α -pinen. Mindre komponenter er kumariner og psoralener, som er fototoksiske. Disse komponentene finnes ikke i destillerte oljer av typen furanokoumarinfri redestillerte oljer. α - og β -sinensal sammen med (+)-valensen og (-)-caryophyllen bidrar til appelsin duften. Fjerning av terpenener fører til reduksjon i total mengde limonen, noe som fører til at andre komponenter kan øke til ekstremt høye mengder.

Deterpenisering og andre prosesser gjør at man får et stort utvalg av appelsinoljer med variert komposisjon. Oljen kan forfalskes ved at terpenener fra andre sitrusoljer og destillert bitter appelsinolja eller andre sitrusoljer blandes med søt appelsinolja. Det er også tilføyelse av syntetisk limonen til oljen. Terpenfri, sesquiterpenfri og konsentrert bitter- og søt appelsinolja blir også blandet inn. Antioksidanter som butylhydroksyanisol og butylhydroksytoluen blir ofte tilsatt fordi oksidering oppstår relativt raskt og reduserer lagringstiden til oljen. Sød appelsin olje brukes ofte som en substituent for bergamottolje.

Akutt toksisitet for søt appelsinolja er:

Oral $LD_{50} > 5\text{g/kg}$ hos rotter

Dermal $LD_{50} > 10\text{g/kg}$ hos kaniner

1 av 200 pasienter med dermatitt var sensitiv til søt appelsinolja. Rapportene for sensitivering har økt opp gjennom årene for alle sitrusoljer. Dette kan skyldes dårlig lagring og nedbryting av oljen. Sitrusoljer med høy innhold av *d*-limonen vil nedbrytes fort etter åpning og produsere svake kreftfremkallende kjemikalier eller øke risikoen for sensitivering og hudirritasjon. Lagringstiden etter åpning er derfor anbefalt å være 1 år dersom oppbevart riktig eller 2 år dersom oppbevart i kjøleskap. Sitrusoljer varer i minst 6 måneder dersom oppbevart korrekt.

Mild til veldig seriøs fototoksisitet har oppstått etter hudmassasje med appelsinolje etterfulgt av eksponering av sollys eller UV- lys. Naturlige ekstrakter som inneholder furanokoumarin lignende substanser kan bli brukt i kosmetiske produkter så lenge innholdet av disse substansene ikke overskrider 1ppm. Destillerte appelsinoljer er ikke fototoksiske.

Søt appelsinolje har en spasmogenisk effekt på elektrisk stimulert glatt muskulatur hos marsvin *in vitro*. Limonen viste en lignende effekt. Oljen gav en minkning i spontane kontraksjoner på livmoren hos rotten, og limonen og de andre komponentene viste å ha en relakserende effekt. Oljer som har høy innhold av *d*-limonen har vist å stimulere tumorvekst på applikasjonsstedet hos mus. Søt appelsinolje viste noe antibakteriell og antifungal aktivitet, men ingen antioksidant effekt.

Potensialet for sensitisering og mulig virkning på livmormuskelen vist fra dyrestudiene *in vitro* antyder forsiktighet ved bruk av den essensielle oljen til massasje under graviditet og fødsel. Bruk av oljen som en duft i små mengder anses som trygt.

Risikoen for oksidering av limonen til å produsere sensitiseringsagenter etter kort lagringstid og i tillegg problemet med fototoksisitet, særlig ved bruk av den pressete oljen, gjør bruk av appelsin essensiell olje på huden risikofylt. Ved å bruke den destillerte essensielle oljen eller en FCF essensiell olje vil risikoen for fototoksisitet reduseres kraftig, men potensialet for sensitisering vil fremdeles være et problem om ikke oljen blir behandlet slik at innholdet av limonen blir minst mulig. Dette ville da ikke blitt akseptert av aromaterapeuter.

Det er ikke anbefalt å bruke noen essensielle oljer, særlig fototoksiske oljer, i massasje hos babyer og barn på grunn av deres ømfintlige og umodne hud. Det er heller ikke anbefalt å bruke essensielle oljer nær deres neser ettersom de kan reagere på duften [1].

[29]

1.3 Tangerineolje

Botanisk navn for tangerine er *Citrus Reticulata* blanco og tilhører familien Rutaceae. Tangerine olje blir ekstrahert ved kaldpressing av skallet. Oljen produseres hovedsakelig i Italia, Spania, USA, Brasil og Argentina. Denne lille appelsinen er den amerikanske versjonen av den øst-asiatiske mandarin. Tangerine har fått navnet sitt fra porten av Tangier og indikerer at den vokser på denne plassen. Frukten ble først grodd i Marokko hvor de senere ble eksportert rundt omkring i verden. Tangerine er teknisk sett mandariner som ved isolert vekst gradvis utviklet distinktive egenskaper. Skallet er lys rødlig, oransje farget og har mange frø. Det er på grunn av frø antallet at denne frukten ble utkonkurrert av satsuma mandarin på markedet i Europa. Tangerine har en tynn, blank og lettskrelt skall og veldig søt kjøtt, men ulempen er at de ikke varer lenge etter plukking [16].

Tangerine essensiell olje er en oransje-gul, klar løsning. Den har en frisk og søt-bitter appelsin lignende aroma, med en jevn sitrus aroma. Oljen varer i 12 måneder eller mer dersom oppbevart under riktige forhold. Tangerineolje skal oppbevares kjølig, på en tørr plass i tette beholdere og beskyttet mot lys og varme.

Tangerine essensiell olje blir tradisjonelt brukt som antiseptisk middel, antispasmodisk middel og cytofylaktisk. Den brukes som sedativa, mot magesmerter og som tonikum. Oljen brukes mot blek hud, hjelper å bryte ned cellulitt, øker sirkulasjonen til huden og glatter ut strekkmerker. På muskel og skjellettet brukes olje mot muskelspasmer, kramper og mot trøtete og vonde ledd. Oljen brukes også for fordøyelsessystemet og bruk inkluderer: for å stimulere leveren, for galleblæren, redusere væskeretensjon, stimulere fordøyelsen, mot flatulens og mot forstoppelse. Den brukes også som tonikum for det vaskulære systemet, for å øke lymfatisk drenering, lette menstruelle kramper og mot PMS. Tangerine essensiell olje har en hypnotisk effekt og brukes mot stress og spenning, den er beroligende og styrkende på nervesystemet. Olje sies å ha en oppløftende effekt og fjerner følelser av sorg og frykt.

Tangerine essensiell olje blander godt med basilikum, kamille, muskat salvie, frankincense, geranium, grapefrukt, ingefær, lavendel, sypryss, sedertre, sitron, lime og rosmarin. Oljen er ikke toksisk, ikke irriterende og ikke sensitiverende, men det har blitt rapportert tilfeller av fototoksitet. Det er derfor anbefalt å ikke eksponere områder av huden som har blitt behandlet med oljen for sollys eller annen form for UV-lys innen 72 timer. Men som de fleste oljene har ikke mandarinolje blitt testet for langvarig sikkerhet. Noen hevder til og med at det er trygt for gravide å bruke oljen. Dette kan stemme, men på grunn manglende vitenskapelig forskning på mandarin gjør at det er umulig å bevise disse påstandene per i dag.

Oral toksisitet er $LD_{50} > 5$ g/kg hos rotter

Dermal toksisitet er $LD_{50} > 5$ g/kg hos kaniner

IFRA restriksjon av enkeltkomponenter er:

- citral < 0,03% (sensitiveringsagent)

- citronellol < 0,10% (sensitiseringsagent)

Det er anbefalt bruk av opptil 10,0% i duft konsentrat og 810,0 ppm. i bruk som smak.

Kjemiske hovedkomponenter i tangerineolje er α -Thujon, α -Pinen, kamfen, sabinen, β -Pinen, myrcen, limonen, γ -Terpinolen, linalool, citronellal, terpineol-4-ol, nerol og geranial.

Ocatanal og decanal er de to hoved alifatiske aldehydene. Det er også blitt funnet undecanal, (*E*)-2-decenal og (*E*)-2-dodecenal [24].

Oljen brukes i dampapparater og damp behandling sies å kunne hjelpe med å berolige nervesystemet og reduserer dermed stress og spenning, mens den i tillegg forsterker fordøyelsessystemet. Som massasje eller i bad kan tangerineolje hjelpe nervesystemet, redusere flatulens, mot diaré, mot forstoppelse og andre fordøyelsesplager. Oljen øker også blodsirkulasjonen til huden, redusere væskeretensjon og glatter strekkmerker. I krem eller lotion blir oljen bruk til å forebygge strekkmerker ved graviditet mens den øker sirkulasjonen og redusere væskeretensjon.

(Mandarin olje)-[29]

2. Metoder

2.1 Gasskromatografi

Gasskromatografi er en analytisk metode som brukes til å separere og detektere gasser og flyktige komponenter i en løsning. Organiske løsninger er vanligst.

GC-apparatet har en injeksjonsport der prøven innsettes. Etter injeksjonen vandrer prøven gjennom en kolonne som inneholder bæregass under trykk. Denne bæregassen hjelper prøven med å komme seg gjennom kolonnen. De ulike kjemiske komponentene vandrer gjennom kolonnen med ulik hastighet avhengig av forskjeller i fysiske og kjemiske egenskaper, for eksempel molekylvekt, kokepunkt, lipofilisitet osv. Vandrings tiden er også avhengig av kolonnematerialets type, kolonnens temperatur og bæregassens hastighet som måles i ml/min. Alle disse faktorene påvirker komponentenes hastighet gjennom systemet og til detektoren som måler tiden hver komponent passerer den. Dataprogrammer styrer alle temperaturene på de ulike stedene på apparatet, alt etter hvilke stoffer som skal analyseres.

Kolonnetemperaturen forandres i løpet av en analyse slik at det oppnås passende separasjon alt etter flyktighet.

GC-detektoren registrerer mengdene av komponentene og tiden de passerer den. Man får ikke noe informasjon om komponentenes identitet. For å finne identiteten må man vite sånn noenlunde hva prøven inneholder og dermed sammenligne komponentenes tidspunkter med et arkiv av referanseprøver som er analysert under de samme betingelsene. Et annet alternativ er å kople GC-apparatet med et annet apparat som er i stand til å identifisere komponentene. Et eksempel er å kople et GC-apparat med et massespektrometer (GC/MS).

[27-28]

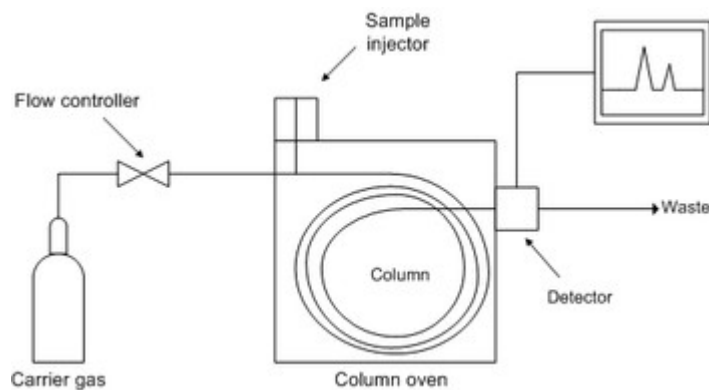
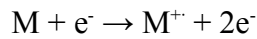


Diagram av et GC- apparat, tatt fra Wikipedia, Internett

2.2 Elektron ionisering (EI)

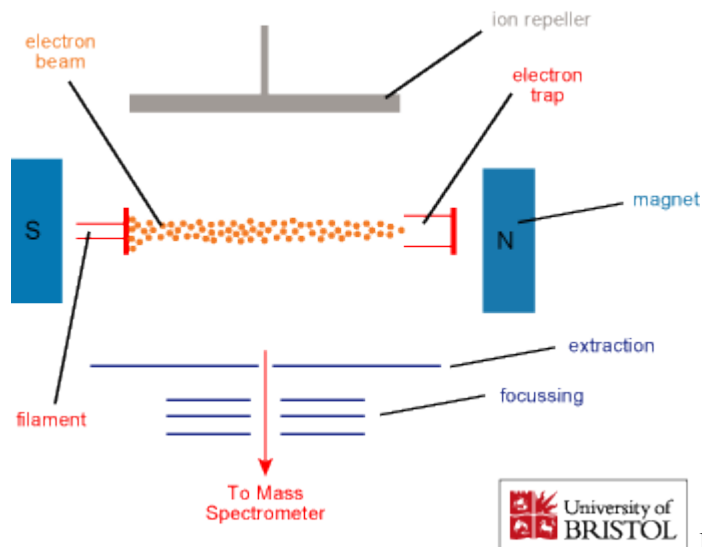
Elektron ionisering er tidligere kjent som elektron kollisjons metode og er en ioniseringsmetode der energetiske elektroner interagerer med gassfase molekyler til å produsere ioner. Denne metoden brukes i massespektroskopi, spesielt for organiske molekyler.

Gassfase reaksjonen som produserer elektron ionisering er



der M er molekylet som blir ionisert, e^- er elektronet og M^+ er det resulterende molekyllære ionet.

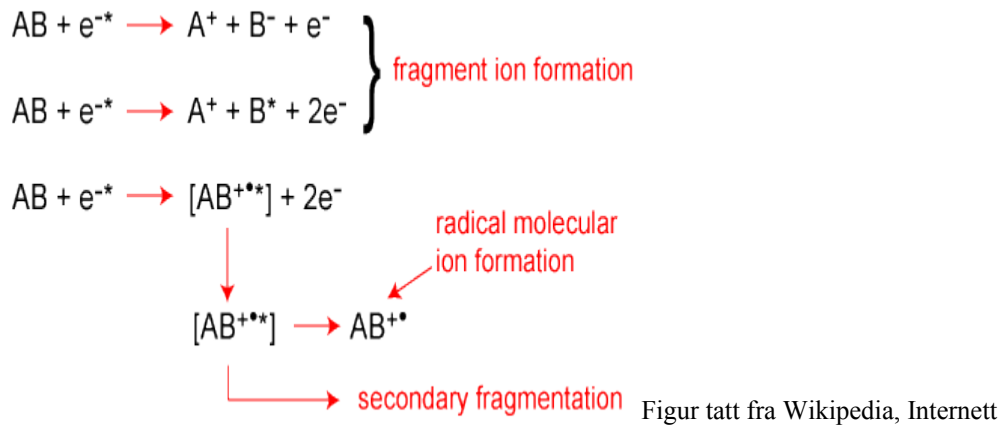
Først må prøven vaporiseres og dette gjøres ved å varme opp probe spissen som inneholder en dråpe av analytten i løsning. Når prøven har gått over til gassfasen går den inn i EI-kammeret der den interagerer med en homogen stråle av elektroner. Elektronene akselererer gjennom ioniseringskammeret mot en anode. I ioniseringskammeret blir analytten i gassfase ionisert til en radikal og forårsaker deretter hyppig kløvningsreaksjoner og gir opphav til fragmenterings ioner. Fragmenterings ioner kan gi strukturelle informasjon om analytten. Elektronstrålen er ofte på 70 eV for å oppnå effektiv ionisering.



Figur tatt fra Wikipedia, Internett

Elektronstrålen blir produsert av et filament (rhenium eller W. Wolfram tråd) og styres gjennom EI-kammeret til en elektron felle. En elektrisk strøm går gjennom filamentet og støter av elektroner fra filamentet. En fiksert magnet med motsatte poler er plassert i kammeret for å lage spiraler i elektronstrålen. Dette er for å øke sjansen for interaksjon mellom strålen og analytten. Ionisering er forårsaket av elektron utstøtning fra analytten eller av analytt dekomposisjon.

Tenk at analyttmolekylet er AB. Man får følgende reaksjoner:



De to første prosessene som kan inntreffe er et direkte resultat av energi overføring fra elektronstrålen til analytten, som gir primær fragmentering og den nest største fragmenteringsmetoden. Den tredje prosessen er elektronavstøtning fra analytten til å danne et radikal ion med energi. Dette ionet kan dermed enten miste energi gjennom ”ion nedkjøling” og stabilisere seg eller miste energi gjennom sekundær fragmentering.

Denne metoden sies å være en hard ioniseringsmetode fordi forholdene må være harde for å kunne gjøre noen typer analytter flyktige, og de høye, gjenværende energi mengdene som ionene har etter ioniseringsprosessen forårsaker høy fragmenteringsnivå sett i massespektret. Effektiviteten av ioniseringen og produksjonen av fragmenterings ioner er avhengig av analyttens kjemi og energien til elektronene.

[27]

2.3 Time of flight analytator

TOF er en analytator som brukes i massespektroskopi. Ioner blir akselerert av en positiv elektrisk potensial V med kjent styrke. Akselereringen fører til at ionene får samme kinetisk energi som ioner med samme ladning. Ionets fart er avhengig av masse/ladning forholdet. Ioner med alle m/z verdi blir dannet nesten med en gang på grunn av filamentet i ion kammeret. Tiden det tar for en partikkel å nå detektoren med kjent avstand blir målt. Denne tiden avhenger av masse/ladning forholdet, jo tyngre en partikkel er dess lavere fart har den. Forskjell på 1 ns kan til og med bli fanget opp. Ved å sammenligne denne tiden med kjente parametre kan man finne masse/ladning forholdet til et ion. Ionet som blir akselerert blir styrt til ”flight”-kammeret ved hjelp av ion fokuserende plater. I enden av kammeret er det ion speil som ionene styres til og reflekteres tilbake til detektoren. Hvor langt ionene går over lagene av speil før de bøyer seg og går til detektoren er avhengig av massen av ionet.

TOF instrumenter kan analyseres så å si ioner med alle m/z verdier, og detekterer alle ioner dannet ved hver ioniseringspuls. Derfor er instrumentet svært sensitiv. Disse grunnene gjør at TOF masse spektrometer er blitt populær.

[27-28]

2.4 Direct analysis in real time (DART)

Direct analysis in real time (DART) er en ioniseringsmetode som gjør at det er mulig å ionisere små partikler under omsluttende forhold hurtig og enkelt [18].

Denne analysemetoden baserer seg på prinsippet med elektronisk eller vibronisk eksitert tilstand partikler med molekyl reagenser og polar eller ikke- polar analytter. Elektronisk eksitert tilstand av helium eller vibronisk eksitert tilstand av nitrogen er ofte komponentene som er ansvarlig for ionisering av prøven. Nitrogen vil kun ionisere analytter som har en ioniseringspotensiale som er lavere enn energien til den vibronisk eksiterte tilstanden [19]. Prosesser som fører til ionisering inkluderer direkte overføring av energi fra metastabile partikler og proton overføring etter ionisering av atmosfærisk vann utført av de metastabile partiklene [20].

DART analyserer væske, fast- og gassfase materialer uten at prøvene trenger å bli preparert på forhånd. Analyseringen blir gjort i åpen luft og prøven kommer ikke i kontakt med apparatet. Prøven blir hurtig analysert og apparatet er koblet til et massespektrometer for registrering av fragmentene funnet [21].

DART kilden er delt inn i forskjellige kamre der nitrogen eller helium strømmer gjennom. Gassen går inn i et utladningskammer som inneholder en katode og en anode. Ioner, elektroner og eksitert tilstand partikler i et plasma produseres ved at et elektrisk potensial på flere kilovolt skaper en elektrisk utladning. Metastabile helium atomer eller nitrogen molekyler er trodd å være reagensene i DART analyse. Gjennom turen inn i det andre kammeret blir ioner fjernet fra gass strømmen av en perforert elektrode. Deretter flyter gassen inn i et tredje kammer som kan varmes opp til ønsket temperatur. Når gassen passerer gjennom den tredje perforerte elektroden blir den fanget opp av massespektrometerets prøvemunning. En isolasjons hette beskytter prøven og operator fra å bli eksponert av gitteret. Gassen kan styres direkte mot massespektrometerets munning eller reflektert fra en prøveoverflate og inn i massespektrometeret [19].

Polariteten av elektrodene er kritiske, men resultater av god kvalitet kan oppnås med et vidt spekter av potensielle verdier. Gass flyting kan justeres, men vanlig flytehastighet er 1L/min. Gass temperatur kan også justeres fra romtemperatur og opp til 250°C [19].

DART/MS kan også være en fordel når det gjelder rask bestemmelse av molekylvekt til forbindelser for å samle det i et bibliotek og for å finne et akkurat masse på en rask måte [18]. DART kan analysere og overvåke duft utslipp fra overflater som levende eller rekonstruerte hud, fliser osv. i nåtid. Resultater kan oppnås innen mindre enn 1 minutt der sensitiviteten er akseptabel og det er mulig med semi- kvantitative analyser under optimale forhold [20].

DART har blitt brukt til å analysere mange forskjellige materialer, både polare og ikke- polare kjemikalier på ulike overflater. Farmasøytiske preparater i tablettform eller kapsler kan analyseres uten å knuse eller åpne preparatene på noen måter. DART har også blitt brukt til å

detektere eksplosiver på ulike overflater og i gjørmete vann [19]. DART er spesielt nyttig i analysering av stoffer som ligger på ulike overflater som betong, menneske hud, penger, boarding pass på fly, frukt, grønnsaker, klær, farmasøytiske preparater og biologiske vev uten å måtte foreberede prøven på forhånd. DART er i stand til å ionisere et videre spekter av komponenter enn APCI og ESI [22].

3. Eksperimentelt

De essensielle oljene ble kjøpt i USA, fra Planlife i California og er 100% olje uten annen tilsetning. For denne oppgaven ble oljene valgt fra sitrus gruppen og inkluderer sitron olje, søt appelsin olje og tangerine olje. Første delen bestod av å analysere oljenes komponenter ved bruk av gasskromatografi (GC) og GC koplet til TOF-massespektrometer. Analysing med gasskromatografi var tenkt å være en kontroll og for å få en idé om hva oljene inneholder og generell retensjonstid. GC ble brukt i begynnelsen for å finne en kolonne som separerte stoffene på en tilfredsstillende måte. Videre analysing med GC/MS var for å bekrefte tidligere funn og identifisering av komponentene. Identifisering ble gjort ved søk i bibliografi av kjente komponenter gjort fra tidligere analyser.

Prøvene for kjøring med GC ble laget med ca. 10 ng/ml konsentrasjon og oljene ble veid og blandet med et løsemiddel, i dette tilfellet med isooktan. Tabell 3.1 viser oppveid mengde olje og olje med løsemiddel.

Right inlet temperatur ble satt til 260 °C, ovnen på 80 °C. Høyre kolonne trykk var på 1,50 bar. Med en initial temperatur på 80 °C var det satt 4 minutter fra prøve til kolonne. Fra 30 °C til 150 °C var isotiden 0 minutter og fra 8 °C til 300 °C var isotiden 5 minutter. 1 µL prøve ble injisert inn i apparatet og det tok rundt 37- 40 minutter før hele prøven hadde passert kolonnen. Kromatogrammene ble lagret i programmet chromeleon.

Det ble brukt et Jeol Accutof JMS – T100GC med positiv EI, elektro ionisering (EI+) som GC/MS maskin. Helium gass ble stilt inn på 0,7 ml/min hastighet. Kolonnetrykket var 81,8 kPa Split- Splitless. Kolonnetypen var VF-1MS med en lengde på 25.0, diameter 200.0 mikrometer og filmtykkhet på 0.33 mikrometer. Starttemperaturen var 50 °C i 0 minutter, deretter 30 grader/minutt til 150 grader holdt i 0 minutter, så 8 grader/minutt til 300 grader holdt i 5 minutter.

Prøvene for analysering med GC/MS ble laget med 10 % konsentrasjon i heksan. 0,1g olje ble oppveid og deretter ble det tilsatt et løsemiddel til 1,0g prøve.

Tabell 3.2 Oppveid mengde olje og olje med løsemiddel for første GC/MS kjøring

	Olje (g)	Olje+heksan (g)
Sitron olje	0,1006	1,0017
Søt appelsin olje	0,1009	1,0032
Tangerine olje	0,1058	1,0073

Tabell 3.3 Oppveid mengde olje og olje med løsemiddel for andre GC/MS kjøring:

	Olje (g)	Olje+heksan (g)
Sitron olje	0,1054	1,0024
Søt appelsin olje	0,1026	1,0057
Tangerine olje	0,1026	1,0019

De første tre prøvene av de tre oljene var ren fullolje i heksan. Deretter ble det laget to prøver for hver av oljene der 1 mL fullolje ble blåst med nitrogen. Oljene ble blåst først til 50 % av opprinnelig mengde under konstant temperatur på ca. 40 °C. Oljene måtte holdes i denne temperaturen for å unngå kjøling og eventuelt kondensasjon av vann fra luften der dette kan gi problemer ved tilsetning av løsemiddel. Deretter ble det tatt ut 0,1 g olje til å lage 10 % prøve med heksan som løsemiddel. Resten av oljen ble deretter blåst med nitrogen til 10 % av opprinnelig mengde. 0,1 g ble så tatt ut for å lage en 10 % prøve med heksan.

Tabell 3.4 Oppveid mengde olje og olje med heksan for nitrogen blåst olje.

	50%		10%	
Søt appelsin olje	0,1049g olje	1,0030g olje+heksan	0,9042g olje	1,0010g olje+heksan
Tangerine olje	0,1016g olje	1,0055g olje+heksan	0,9017g olje	0,9498g olje+heksan
Sitron olje	0,1015g olje	1,0019g olje+heksan	0,1067g olje	1,0220g olje+heksan

Disse to prøvene samt prøven med ublåst olje ble så kjørt på GC/MS for å se på opprinnelig sammensetning av komponentene i oljene og forandring av sammensetning, mengde og konsentrasjon av de ulike komponentene. Identifisering av komponentene funnet ble gjort ved å søke på biblioteket for komponenter, med en sikkerhet uttrykt med et tallforhold.

Det ble også laget prøver av fulloljen for kjøring på DART. 0,1 g olje ble veid og deretter fortynnet med metanol til 10 % prøve for DART analysering.

Tabell 3.5 Oppveid mengde fullolje og fullolje med metanol for DART analysering.

	Olje (g)	Olje+metanol (g)
Sitron olje	0,1030	1,0054
Søt appelsin olje	0,1068	1,0410
Tangerine olje	0,1008	1,0009

Fulloljen, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje ble så analysert på DART for på kvantitet samtidig som det ble bestemt om dette var en god metode for å bruke i slike prosjekter. Disse prøvene ble altså kjørt på DART (Direct analysis in real time) analyse for å analysere duftutslipp fra oljene, både styrke og mengde av komponentene ble målt. DART var koplet til et MS- apparat lik den koplet til GC- apparatet. DART maskin brukt var en Jeol AccuTOF JMS T100LC med positiv ionisering.

Kromatogrammene for fullolje, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje ble så sammenlignet med kromatogrammene fra GC/MS analysen.

4. Resultater

De ulike m/z verdiene ble sammenlignet med kjente stoffer i spektrumbiblioteket for identifisering av innholdet i oljene. Tabellene under viser funnene detaljert med retensjonstid.

Tabell 4.1 Komponenter funnet i sitrusoljer

Komponenter	Sitron	Søt appelsin	Tangerine
1-Isopropyl-4-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-en	908/921		
α -Pinen	942/944	928/932	939/941
Camphen	844/926		
β -Phellandren	912/913	909/940	908/933
β -Pinen	936/943	910/929	911/921
α -Phellandren		752/896	
3-Carene		816/913	
o-Cymen	925/936		896/933
Limonen	918/918	906/916	900/903
p-Metha-1,4-dien	918/919		861/903
β -Linalool	850/894	857/872	844/874
Terpinolen	893/927		
<i>cis</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol			761/820
Isopulegol		644/845	765/853
Decanal		764/823	789/880
α -Terpineol	735/865		
<i>cis</i> -Carveol			694/756
β -Citral	863/890		
α -Citral	900/905	739/857	
D-Carvon			658/885
Nerol	843/884		
Neryl acetat	713/768		
α -Copaen			787/856
β -Cubeben			739/851
α -Bergamoten	828/902		
Germacren D			680/855
β -Bisabolen	852/923		
Valencen		769/913	
δ -Cadinen			673/787

Tabell 4.2 Retensjonstid for komponentene funnet for sitrusoljer

Komponenter	Sitron	Søt appelsin	Tangerine
1-Isopropyl-4-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-en	2,86		
α -Pinen	2,94	2,94	2,94
Camphen	3,03		
β -Phellandren	3,14	3,14	3,14
β -Pinen	3,2	3,18	3,18
α -Phellandren		3,33	
3-Carene		3,38	
o-Cymen	3,41		3,41
Limonen	3,46	3,46	3,49
p-Metha-1,4-dien	3,63		3,63
β -Linalool	3,81	3,81	3,81
Terpinolen	3,84		
<i>cis</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol			4,1
Isopulegol		4,13	4,13
Decanal		4,53	4,52
α -Terpineol	4,54		
<i>cis</i> -Carveol			4,73
β -Citral	4,83		
α -Citral	5,06	5,05	
D-Carvon			4,91
Nerol	5,87		
Neryl acetat	6,03		
α -Copaen			6,40
β -Cubeben			6,49
α -Bergamoten	6,91		
Germacren D			7,48
β -Bisabolen	7,63		
Valencen		7,64	
δ -Cadinen			7,85

Tabell 4.3 m/z- verdier for de forskjellige komponentene i sitrusoljer

	β -Pinen
	α -Phellandren
	3-Carene
	Limonen
	p-Metha-1,4-dien
	Terpinolen
m/z 150	D-Carvon
m/z 152	<i>cis</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol
	β -Citral
	α -Citral
	<i>cis</i> -Carveol
m/z 154	β -Linalool
	Isopulegol
	Nerol
	α -Terpineol
m/z 170	Decanal
m/z 196	Neryl acetat
m/z 204	α -Copaen
	β -Cubeben
	α -Bergamoten
	Germacren D
	β -Bisabolen
	Valencen
	δ -Cadinen

Søt appelsinolje hadde langt færre komponenter enn de to andre oljene. 11 komponenter ble funne i oljen ved analysering med GC/MS. Få av dens komponenter var unike i den forstand at de andre oljene ikke inneholdt det samme. Dette kan vi se ut fra spektrene, der spekteret til søt appelsinolje var mye enklere enn sitron- og tangerineolje. α -phellandren, 3-carene og valencen var de tre komponentene som ikke ble funnet i de andre oljene.

Det ble funnet 17 komponenter i sitronolje, hvorav 9 av de var bare i sitronolje. Det mest flyktige komponentet var 1-Isopropyl-4-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-en som hadde retensjonstid 2,86 minutter. Dette komponentet ble bare funnet i sitron olje med en sikkerhet på 908/921. Komponenter som oljene hadde til felles var α -pinen, β -Phellandren, β -Pinen, limonen og β -Linalool med identisk eller ganske lik retensjonstid.

De minst flyktige komponentene er de som skiller oljene fra hverandre i denne analysen. Det er disse som kun finnes i en eller to av oljene. δ -cadinen med en retensjonstid på 7,85 minutter er den minst flyktige komponenten og finnes i tangerineolje.

Ut ifra spektrene fra GC/MS analysering kan vi se at sitronolje hadde mest komponenter og disse bredte seg utover hele spekteret. Tangerineolje hadde litt mindre komponenter enn sitronolje, men mer enn søt appelsin olje. Komponentene i sitronolje hadde også større intensiteter enn de samme komponentene i de andre oljene. Det er altså større mengder av de ulike komponentene i sitron olje enn de to andre oljene. Se vedlegg av spektrene i slutten av oppgaven.

Ved sammenligning av fulloljen, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje ser vi at sammensetningen og mengden av komponentene forandrer seg veldig mye. De mest flyktige komponentene forsvinner nesten helt fullstendig fra fulloljen til 10 % blåst olje. 50 % blåst olje var som forventet en midtpunkt mellom disse to endepunktene. For søt appelsinolje minker de flyktige komponentene i mengden, men sammensetningen blir noenlunde det samme. For sitron- og tangerineolje ser vi at de flyktige komponentene minker i mengden, men det blir samtidig en økning av de mindre flyktige komponentene. I fulloljen kan man knapt se disse komponentene og de har veldig liten intensitet i forhold til de mer flyktige komponentene. Men i 10 % blåst olje ser vi at de mindre flyktige komponentene får mye større intensiteter enn før. Dette betyr at disse komponentene har økt i mengde og sammensetningen i oljene har forandret seg.

For DART er resultatene mer usikkert. Første delen av spekteret viser den naturlige sammensetningen av oljen som er forventet. Siste delen av spekteret derimot viser sannsynligvis dimerer, trimerer og kanskje naturlige plantesteroler. Naturlige plantesteroler er ikke så flyktige og kommer derfor ut mot slutten av analysen. Dette ser vi ikke med GC/MS fordi sterolene får ikke nok tid til å komme seg gjennom systemet. Den siste delen av spektrene var uventet og vi er ikke sikker på hvilke komponenter disse m/z- verdiene skal representere. Fra m/z- verdi 300 og utover ser det ut som at analyseapparatet har registrert komponenter som ikke ble registrert av GC/MS. Dannelse av dimerer og trimerer kan tenkes å ha vært dannet i selve apparatet som biprodukter laget under selve ioniseringsreaksjonen. Glycerider og gykosider ser vi ikke i GC/MS fordi de ikke rekker å komme seg gjennom kolonnen i tide.

Fordi DART er et veldig sensitiv analyseringsapparat kan den plukke opp stoffer fra omgivelsene i tillegg til prøven. Det er altså mulig at ikke bare prøven registreres, og dette gjør det vanskelig for oss å ta et standpunkt om resultatene med sikkerhet. Vi valgte å kun se på DART spektrene av fulloljene og 10 % blåst olje ettersom det er her forskjellen mellom de to prøvene blir interessant. 50 % blåst olje viste en forskjell som ligger midt imellom de to andre prøvene. Fra spektrene kan vi se at det er små forskjeller i intensitet mellom fulloljen og 10 % blåst olje, men fordi det ligger mye usikkerhet rundt resultatene fra denne analysen kan vi ikke si noe om en sikker forandring i kvantitet på komponentene.

5. Diskusjon

Målet med oppgaven var å analysere og finne de forskjellige komponentene i oljene. I tillegg skulle forandring i komponentsammensetningen og konsentrasjonen ved blåsing med nitrogen kartlegges. Forandring i oljen ved nitrogenblåsing skulle kvantifiseres dersom det var mulig og resultatene funnet kan her direkte overføres til bestemmelsen av hvor mye som forandres under en aromaterapi behandling. Når en pasient for eksempel skal ha 1 time behandling med massasje med aromaolje er ideen at pasienten får den samme mengden virkestoff i oljen og dermed dens effektivitet utover hele behandlingen. Men dersom oljen forandrer seg signifikant i løpet av denne tiden forandrer behandlingen og effektiviteten i samme grad. Kan en aromaterapeut da garantere sikker og effektiv behandling?

De fleste oljene inneholder mange forskjellige terpenener. Terpenener er kjent for å gi dermatitt, fototoksisitet, fotosensitivitet, sensitivering og irritasjon i forskjellige konsentrasjoner alt etter hvilke terpen det gjelder. Men ofte trengs det ikke store mengder terpenener før utsatte mennesker reagerer på stoffene. Det er også mulig å bruke terpenfrie oljer, som blant annet brukes ved bruk i matvarer, drikker og annet. Men noen studier har vist at oljene forandrer effektivitet og virksomhet dersom enkelte komponenter blir fjernet fra fulloljen. En teori er at det er hele sammensetningen som gir den effekten som er individuelt for oljen. Fjerning av en eller flere komponenter forandrer denne sammensetningen og oljen forandrer effekt. Det er altså samspillet mellom komponentene og ikke en individuell komponent som gir en olje dens distinktive effekt. Så dersom oljen forandrer seg under blåsing med nitrogen så forandrer komponentenes naturlige sammensetning og dermed kanskje også effekten.

Fra kromatogrammene fra analysering av oljene med GC/MS ser man at ved blåsing med nitrogen forandres komponentenes konsentrasjon. Dette er en signifikant forandring der de mest flyktige komponentene forsvinner nesten helt fullstendig eller fullstendig fra fulloljen til 10 % blåst olje. 50 % blåst olje var som forventet midt mellom disse to endepunktene. Ved forsvinning eller minskning av de flyktige komponentene konsentreres de mindre flyktige komponentene. Dette kan gi problemer ettersom noen terpenener får mer konsentrert konsentrasjon og kan være farlig ved behandling av pasienter som er sensitive eller spesielt utsatte. Det tok mindre enn 1 time med blåsing med nitrogen før oljen hadde forandret seg merkbart. Dette kan dermed tolkes at 1 time aromaterapi behandling kan variere fra begynnelsen av behandlingen og mot slutten av den. Sikkerhet og effektivitet kan dermed ikke garanteres.

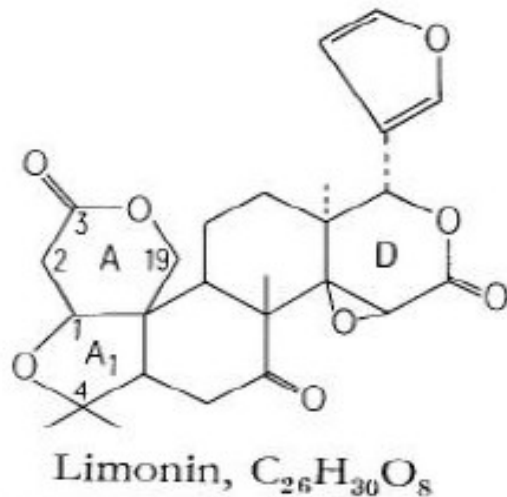
Bruken av dufter har økt kraftig og finnes i de fleste produktene som brukes idag, fra vaskemidler og røkelse til mat og drikke. Økt bruk betyr økt risiko for sensitivering blant befolkningen og gir dermed et problem for aromaterapien. Flere mennesker kan oppleve uønskete effekter med behandlingen og graden av alvorlighet kan tenkes å øke i takt med sensitiveringen.

Kromatogrammene fra DART analysen viser at oljene forandres veldig mye ved blåsing med nitrogen. De vanlige, flyktige komponentene er der i begynnelsen av spektrene med forskjellige intensiteter på de samme komponentene dersom man sammenligner fulloljen, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje. Men mot slutten av spektrene ble det observert dannelse av dimere og muligens også trimerer. Dette var ganske uventet og betydningen av disse reaksjonene med dannelse av nye komponenter er fortsatt usikkert. Det man vet er at oljene vil forandre seg over tid og også under feil oppbevaring, som for eksempel en dårlig lukket beholder, for varm temperatur osv.

Selv om det ble brukt samme analysemetoder og apparater som mange andre studier, ble ikke alle komponentene funnet. De mest vanlige komponentene, som er forventet ble funnet. De forskjellige studiene har funnet forskjellige komponenter og til og med nye komponenter som ikke har blitt funnet før. Resultatene varierte dermed veldig fra studie til studie. Ut fra resultatene fra GC/MS analysering fant vi at søt appelsinolja var den eneste oljen som inneholdt 3-careen. Dette stemte ikke med en av kildene der en litt mer variert form for 3-careen ble også funnet i sironolja [29]. Dette er en bekreftelse på at opprinnelse av oljen og metode for framstilling har veldig mye å si for oljenes sammensetning, effekt og forandring over tid kan dermed kun trekkes for oljer med samme opprinnelse. Dette betyr ikke at oljer med ulik opprinnelse er helt forskjellige, men videre forskning må til for å trekke en generell slutning om en type olje eller bestemme at forskjellig opprinnelse har altfor mye å si for å trekke en felles konklusjon.

DART er en hurtig analyseringsmetode som krever ingen forhåndsbehandling av prøve og kan detektere innholdet i prøven på mange forskjellige overflater. Den trenger en veldig liten mengde prøve og registrerer prøvens duftutslipp. Fordi DART er en veldig sensitiv analyseringsmetode og trenger dermed en veldig liten mengde prøve, kan den også være en usikker metode i dette tilfellet. DART analyserer duftutslippet av prøven, registrerer komponentene og går deretter videre til et massespektrometer for videre analysering. Siden DART er sensitiv kan den dermed også plukke opp duftutslipp fra omgivelsene og ikke kun fra prøven. Dette vil da virke inn på resultatet. DART egner seg ikke som en kvantitativ analysemetode her, noe som var intensjonen. Mange studier gjort tidligere har funnet at DART er en god analyseringsmetode for kvantitativ bestemmelse av ukjente prøver. Men i dette tilfellet kunne ikke det samme sies ettersom det ble funnet mange andre komponenter som var uventet og ukjent og sår tvil om en konklusjon kunne trekkes i det hele tatt. Spektrene viste de forventede komponentene i tillegg til andre komponenter som ikke kom fram under analysering med GC/MS. Dette kan skyldes at disse ikke-flyktige komponentene ikke hadde nok tid til å komme seg gjennom kolonnen. Fordi DART er en hurtig analyseringsmetode klarte den å fange opp de lite flyktige delene i oljen i tillegg til det som ble funnet på GC/MS. Ellers kan det skyldes at disse komponentene dannes under oppbevaring og behandling med nitrogen. Som sagt var de så lite flyktige at de ikke rakk å komme seg gjennom GC kolonnen før analysetidens slutt. Komponentene kommer seg med andre ord ikke gjennom fort nok.

Fra m/z-380 og utover er det muligens vanlige plantesteroler vi ser, der disse vil vanligvis ikke være i oljene, men kun i plantene. Det er muligens tilstedeværelse av forskjellige limonoider fordi m/z verdiene i spekteret har en likhet med disse. Men hvilken limonoid det er og struktur er ikke mulig å finne ettersom likheten ikke er 100 % og det er fortsatt usikkert om hva de forskjellige m/z-verdiene skal representere. Et forslag er at m/z-480 er muligens limonin, men dette er med usikkerhet fordi m/z-verdiene stemmer ikke helt [30].



Fra m/z-600 og utover er det antakeligvis glycerider vi ser. Under m/z-380 har vi oljenes forventede sammensetning, samt muligens dannelse av dimerer og trimerer. Mistenkte dimerer og trimerer er toppene som ligger rundt midt på spektrene.

Gasskromatografi analyse kan kun brukes som en separasjonsmetode for å finne de ulike retensjonstidene til komponentene i oljene. Apparatet må kobles til et mer spesifikk analyseapparat som gir mer informasjon om oljene, innhold, sammensetning, mengde osv. I dette tilfellet ble gasskromatografi brukt som en kontroll for analysering med GC/MS og i tillegg for å gi et bilde av flyktigheten av stoffene. GC-analysing ble brukt også for å finne en passende kolonne som kunne separere stoffene tilstrekkelig, men til slutt bestemte vi oss for en annen type kolonne. Bruk av GC-analyse som en kontroll og for å få en idé om sammensetning av et stoff er enkel og grei.

6. Konklusjon

Ved analysering med fullolje, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje ser vi en signifikant forskjell i komponentsammensetning mellom disse prøvene. Dette betyr at oljen ved fordamping med hjelp av nitrogen forandrer seg på en måte at oljens effekt og sikkerhet ikke kan garanteres. GC/MS spektrene viser en minking av de flyktige komponentene, men også en økning av de mindre flyktige komponentene. Noen terpenener viste seg å øke i mengde ved blåsing med nitrogen, og dette kan være en uungåelig bivirkning der mange av tilstandene assosiert med bruk av duft og aromaterapi oljer gjelder reaksjoner med terpenener. Økt bruk og økt eksponering i hverdagen kan føre til økt sensitivering.

DART-analysen gav liten informasjon fordi den var for sensitiv og detekterte ukjente komponenter. Nye komponenter ble observert og vi er ikke sikker på hvilke komponenter disse er. Vi prøvde å søke i biblioteket for komponenter, men fant ingen som samsvarer 100 % med de m/z-verdiene vi fant. DART-metoden var ment til å gi et kvantitativt resultat fordi dette var blitt hevdet i mange studier. Men fordi spektrene viste komponenter som gav tvil og spektrene var veldig kompliserte hadde vi enkelt nok ikke tiltrekkelig tid til å gå videre med funnene. Fordi DART-spektrene gav ingen sikker kvantitativ resultat kunne vi ikke trekke noen bestemte konklusjoner. Men metoden var veldig effektiv i å finne absolutt alle komponentene oljene inneholdt. De ukjente komponentene var sannynligvis dimerer, trimerer, plantesteroler, flavonoider og glycerider. Mulige plantesteroler er tetrasykliske triterpener og/eller limonoider. Disse siste komponentene ble ikke identifisert fordi tiden ikke strakk til.

7. Sammendrag

Sitrusoljer blir mye brukt i hverdagen og finnes i en rekke produkter, alt fra parfymer og kremer til mat og drikke. Økt bruk fører også til økt interesse for oljenes effekter og mulige uønskete effekter. Oppmerksomheten har ført til en rekke studier som prøver å besvare spørsmålene som oppstår. Vi ville prøve å bruke ulike metoder for å analysere oljene og finne komponentinnholdet. I tillegg blåste vi oljene med nitrogen under konstant temperatur for å se om komponentsammensetningen forandret seg. Vi skulle her se på sitron-, søt appelsin- og tangerine essensiell olje. Disse oljene er i sitrus gruppen og vi var interessert i å se forskjellen mellom dem samt likheter.

Metodene som ble brukt var gasskromatografi (GC), gasskromatografi koblet med massespektrometer (GC/MS) og Desorption Analysis in Real Time (DART). Først laget vi fullolje blanding med 10 % olje i løsemiddel. Deretter blåste vi oljene med nitrogen under konstant temperatur fra 1 ml til 0,5 ml og 0,1 ml. Så lagte vi 10 % olje med løsemiddel fra 50 % og 10 % blåst olje. Fulloljen, 50 % blåst olje og 10 % blåst olje ble så analysert på GC/MS og DART.

En del komponenter som var funnet fra andre studier ble også funnet her. Men det er en del komponenter som har blitt funnet i tidligere studier som vi ikke fant. Oljene har både komponenter som er felles for alle tre, men også komponenter som er unike for den ene oljen. Vi fant store forskjeller mellom fulloljen og 10 % blåst olje. 50 % blåst olje viste å være en mellomstadie mellom de to andre prøvene. De flyktige komponentene forsvant nesten helt fullstendig ved 10 % prøve, mens de mindre flyktige komponentene konsentrerte seg mer.

Konsentrering av de mindre flyktige komponentene kan tilby problemer. Dersom et menneske er sensitiv overfor noen av de mindre flyktige komponentene kan oppkonsentrering gi sterke reaksjoner og er dermed potensielt helsefarlig. Økt forståelse for hvordan oljene oppfører seg kan hjelpe med at brukere blir mer forsiktige og tar de forholdsreglene som trengs for sikker bruk. Noen terpenener har i mange studier vist seg å gi kontakt allergi, dermatitt og er fototoksiske, irriterende og sensitiverende. Det er derfor viktig å finne ut hvordan brukere kan unngå disse problemene og eventuelt når et individ ikke bør bruke en bestemt type olje. Videre forskning må til for å si noe konklusivt om resultatene vi har funnet.

1. Lis-Balchin, M. (2006). *Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals* (London: Pharmaceutical Press).
2. Shirley Price, L.P. (2007). *Aromatherapy for health professionals*.
3. Lunny, V.N. (1997). *Aromaterapi for kropp og sjel*.
4. Opdyke, D.L.J. (1974). Monographs on fragrance raw materials : Lemon oil expressed. *Food and Cosmetics Toxicology* 12, 725-726.
5. Opdyke, D.L.J. (1974). Monographs on fragrance raw materials : Lemon oil distilled. *Food and Cosmetics Toxicology* 12, 727-727.
6. Deans, S.G., and Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165-180.
7. Boyd, E.M., and Pearson, G.L. (1946). On the expectorant action of volatile oils. *American Journal of the Medical Sciences* 211, 602-610.
8. Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K., and Someya, T. (1985). A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives of Dermatological Research* 278, 31-36.
9. Fosstvedt, G. (2002). *Naturens duftende apotek*, 2.utg
10. Rovesti, P., Colombo, E. (1993). Contact dermatitis. 2: 196-200
11. Opdyke, D.L.J. (1974). Monographs on fragrance raw materials : Bitter orange oil. *Food and Cosmetics Toxicology* 12, 735-736.
12. Opdyke, D.L.J. (1974). Monographs on fragrance raw materials : Orange oil expressed. *Food and Cosmetics Toxicology* 12, 733-734.
13. Opdyke, D.L.J. (1976). Neroli oil, tunisian. *Food and Cosmetics Toxicology* 14, 813-814.
14. M. S. Subba, T.C.Soumithri, R. Suryanarayana Rao, (1967). Antimicrobial Action of Citrus Oils. *Journal of Food Science* 32, 225-227.
15. Akira Murakami, W.Kuki, Y.Takahashi, H.Yonei.Y.Nakamura, Y.Ohto, H.Ohigashi, K.Koshimizu. (1997). Auraptene, a Citrus Coumarin, Inhibits 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Tumor Promotion in ICR Mouse Skin, Possibly through Suppression of Superoxide Generation in Leukocytes. *Cancer Science* 88, 443-452.
16. Page, M. (2008). *Growing citrus* (Timber Press, Inc.).
17. Reynolds, J.E.F. (1972). *Martindale, the extra pharmacopoeia*, 26th edition. Pharmaceutical Press, London.
18. Petucci, C., Diffendal, J., Kaufman, D., Mekonnen, B., Terefenko, G., and Musselman, B. (2007). Direct analysis in real time for reaction monitoring in drug discovery. *Anal Chem* 79, 5064-5070.
19. Cody, R.B., Laramee, J.A., and Durst, H.D. (2005). Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem* 77, 2297-2302.
20. Haefliger, O.P., and Jeckelmann, N. (2007). Direct mass spectrometric analysis of flavors and fragrances in real applications using DART. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 1361-1366.
21. Pierce, C.Y., Barr, J.R., Cody, R.B., Massung, R.F., Woolfitt, A.R., Moura, H., Thompson, H.A., and Fernandez, F.M. (2007). Ambient generation of fatty acid methyl ester ions from bacterial whole cells by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Chem Commun (Camb)*, 807-809.

22. Song, L., Dykstra, A.B., Yao, H., and Bartmess, J.E. (2009). Ionization mechanism of negative ion-direct analysis in real time: a comparative study with negative ion-atmospheric pressure photoionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 20, 42-50.
23. Su, H.-J., Chao, C.-J., Chang, H.-Y., Wu, P.-C. (2007). The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric Environment* 41(6): 1230-1236.
24. N.T. Minh Tu, L.X. Thanh, A. Ue, H. Ukeda, M. Sawamura. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal* 17(3): 169-174.
25. Weschler, C.J. (2000). Ozone in indoor environments: concentration and chemistry. *Indoor Air* 10: 269-288.
26. Matura, M., A. Gossens, et.al. (2002). Oxidized citrus oil (*R*-limonene): A frequent skin sensitizer in Europe. *J Am Acad Dermatol* 40(5): 709-714.
27. Smith, R.M. (2004). Understanding mass spectra: a basic approach. Hoboken, N.J., Wiley- Interscience.
28. Williamsen, D.H., Fleming I. (1995). Spectroscopic methods in organic chemistry. London, McGraw- Hill.
29. Kubeczka, K. H. and V. Formáček (2002). Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. Chichester, Wiley.
30. Hegnauer, R. (1973). Dicotyledoneae: Rafflesiaceae – Zygophyllaceae. *Chemotaxonomie der Pflanzen*.

Liste over vedlegg:

- Vedlegg 1: DART fullolje
- Vedlegg 2: DART 50% og 10% blåst olje
- Vedlegg 3: Sitron fullolje første del
- Vedlegg 4: Sitron fullolje andre del
- Vedlegg 5: Sitron 10% blåst olje første del
- Vedlegg 6: Sitron 10% blåst olje andre del
- Vedlegg 7: Søt appelsin fullolje første del
- Vedlegg 8: Søt appelsin fullolje andre del
- Vedlegg 9: Søt appelsin 10% blåst olje første del
- Vedlegg 10: Søt appelsin 10% blåst olje andre del
- Vedlegg 11: Tangerine fullolje første del
- Vedlegg 12: Tangerine fullolje andre del
- Vedlegg 13: Tangerine 10% blåst olje første del
- Vedlegg 14: Tangerine 10% blåst olje andre del
- Vedlegg 15: GC/MS spekter av alle oljene
- Vedlegg 16: GC/MS spekter sitronolje
- Vedlegg 17: GC/MS spekter søt appelsinolje
- Vedlegg 18: GC/MS spekter tangerineolje

Acq. Data Name: 101208
Internal Sample Id:
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08
Reduction History: TIC(MS[1])
Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

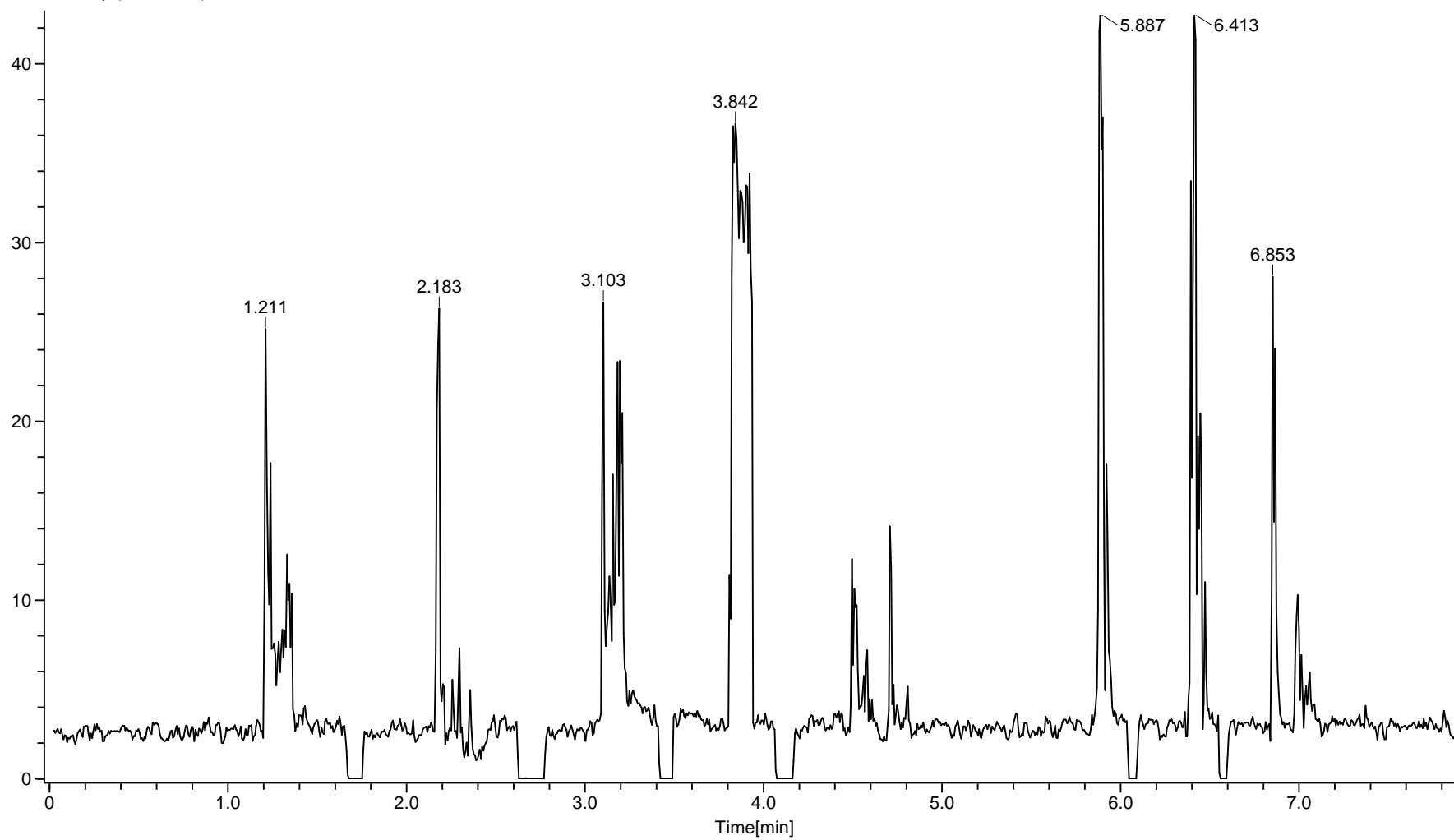
Type: Total Ion Chromatogram

Spec. Record Interval: 0.4[s]

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Operator Name: Accutof

$\times 10^6$ Intensity (42741736)



Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: TIC(MS[1])
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

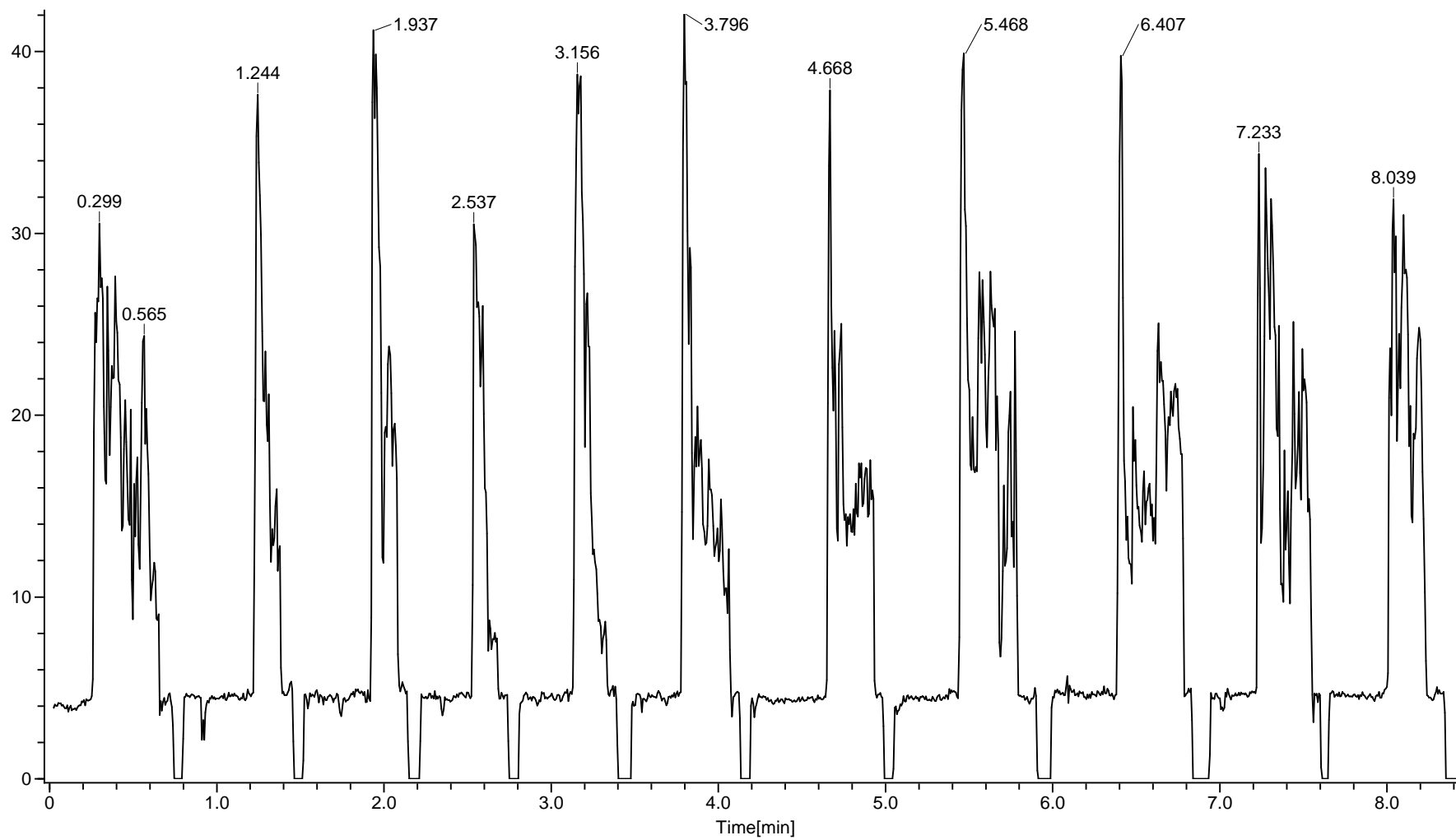
Type: Total Ion Chromatogram

Spec. Record Interval: 0.4[s]

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Operator Name: Accutof

$\times 10^6$ Intensity (42060493)



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 2.120..2.223)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

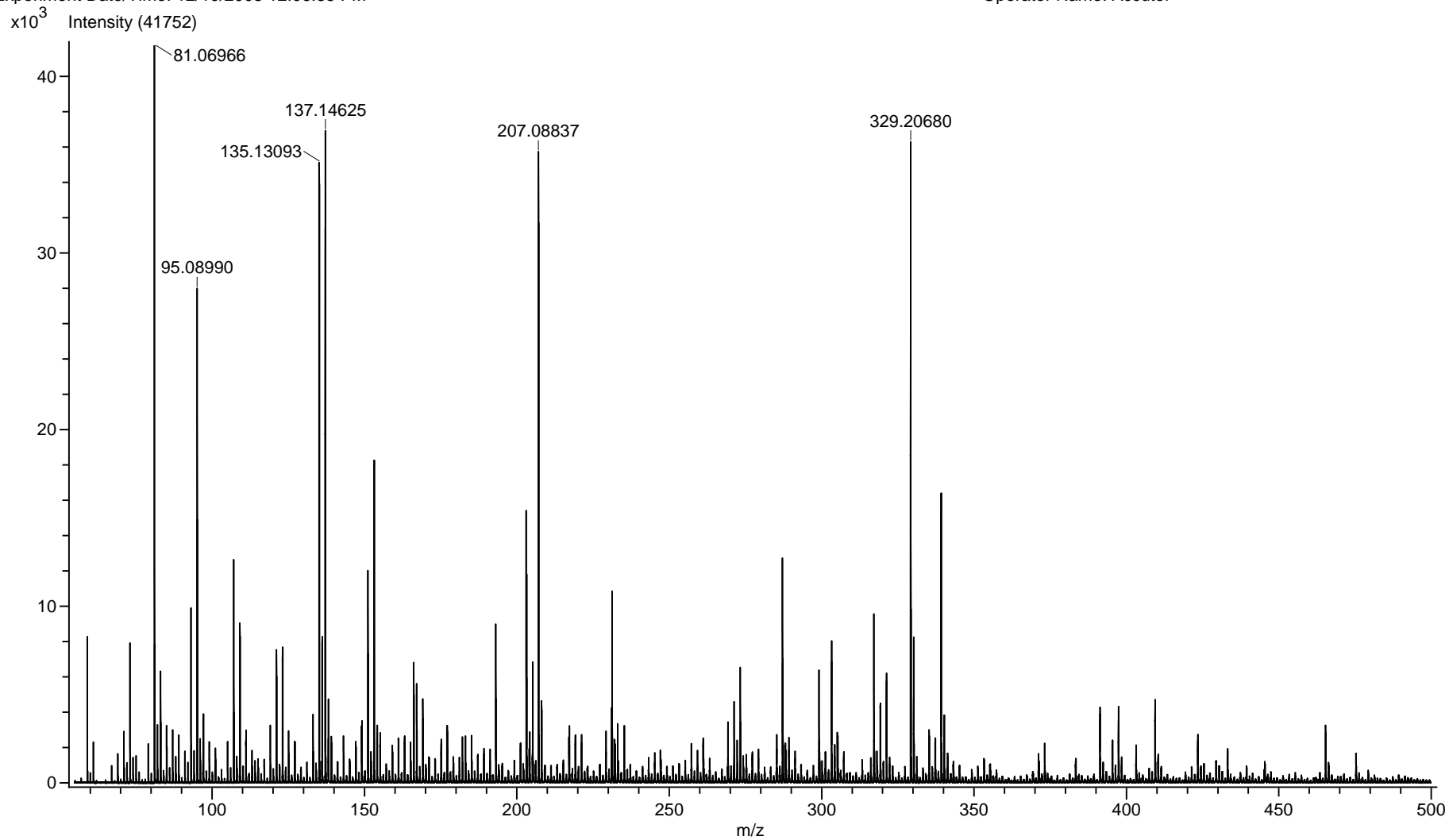
Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 2.183[min]

Operator Name: Accutof



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 2.242..2.382)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

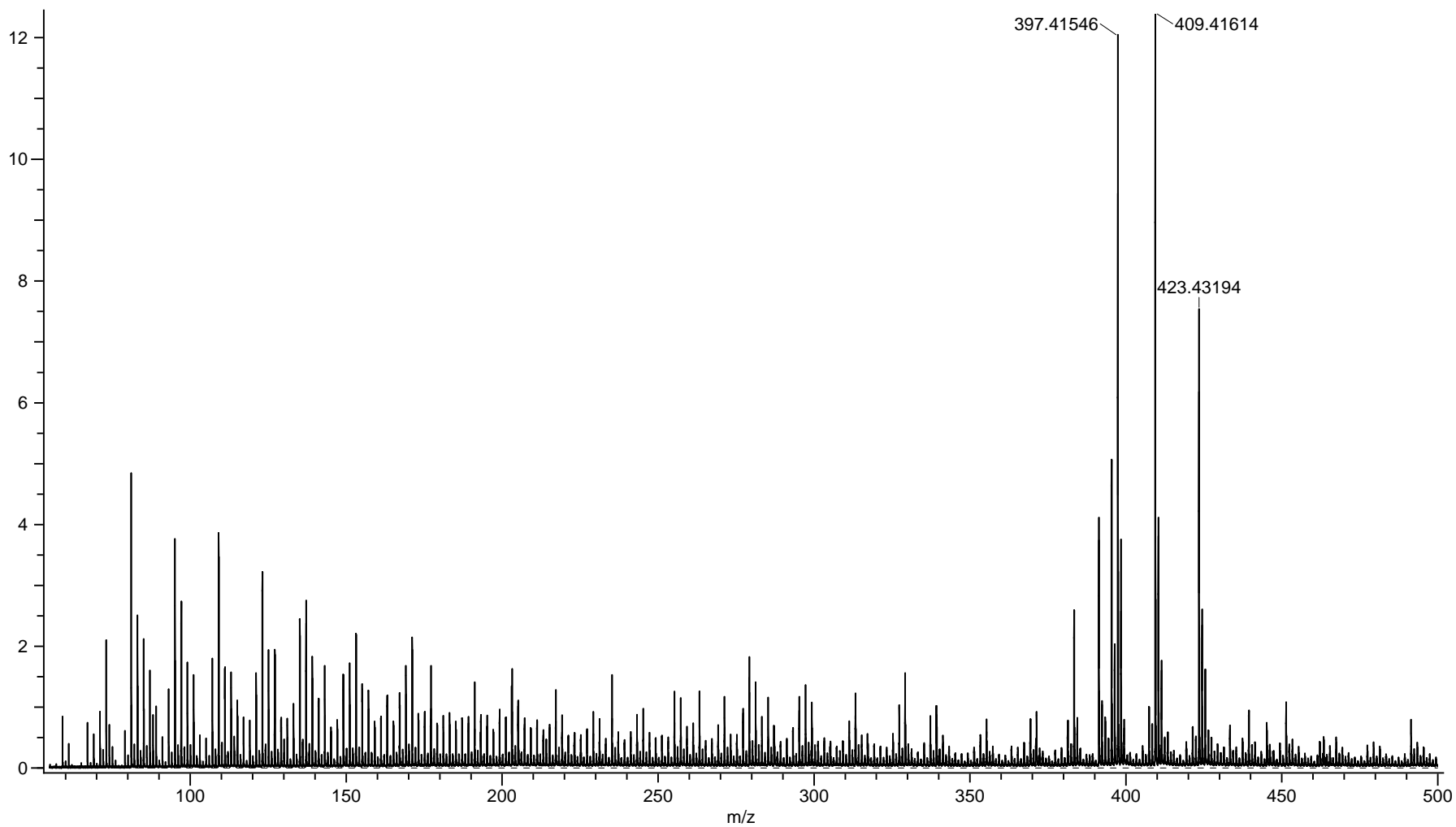
Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 2.297[min]

Operator Name: Accutof

$\times 10^3$ Intensity (12389)

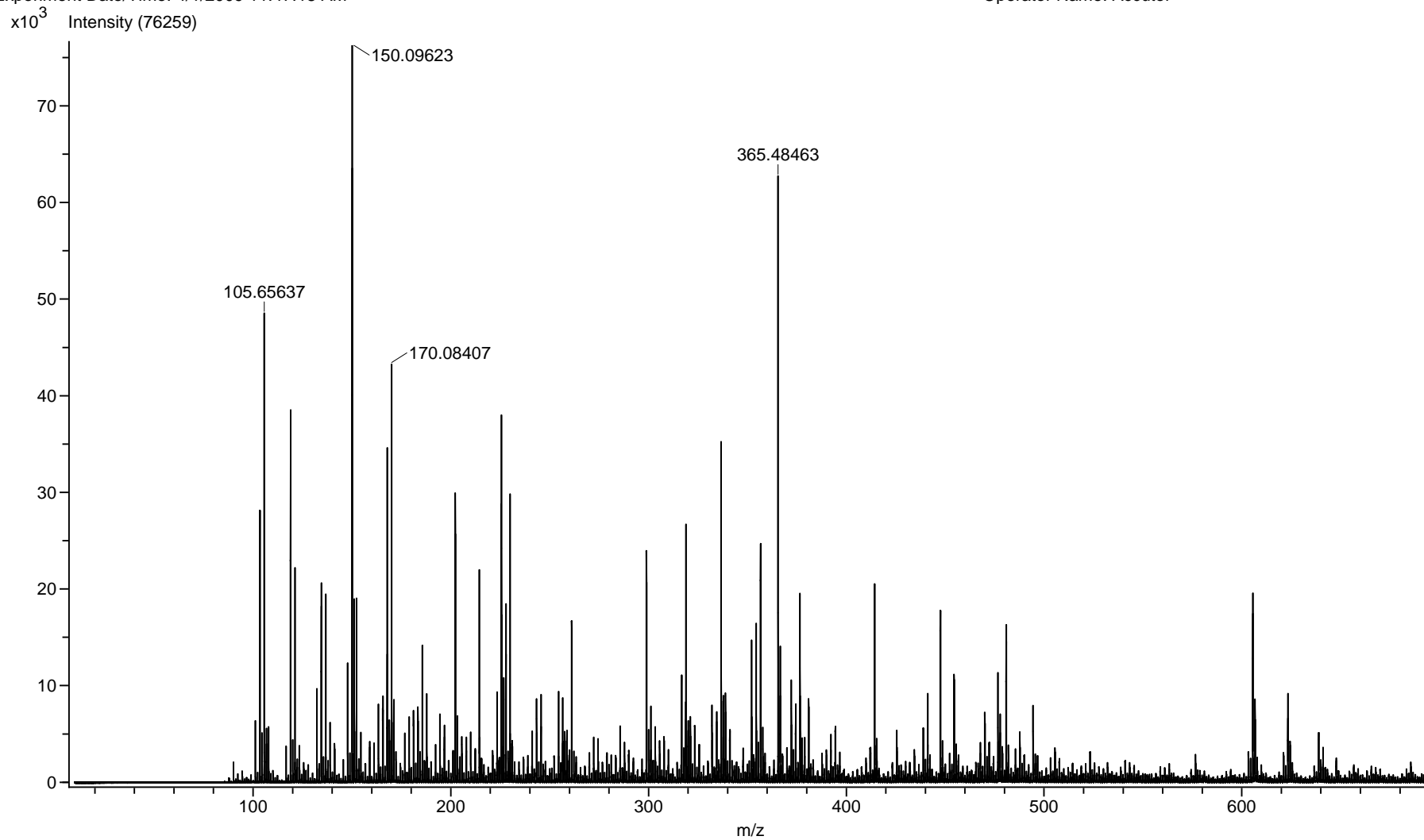


Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 4.627..4.783)
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

Orifice1 Volt Sweep: 28V
Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]
Ring Lens Volt: 10[V]
Time of Maximum: 4.668[min]

Operator Name: Accutof

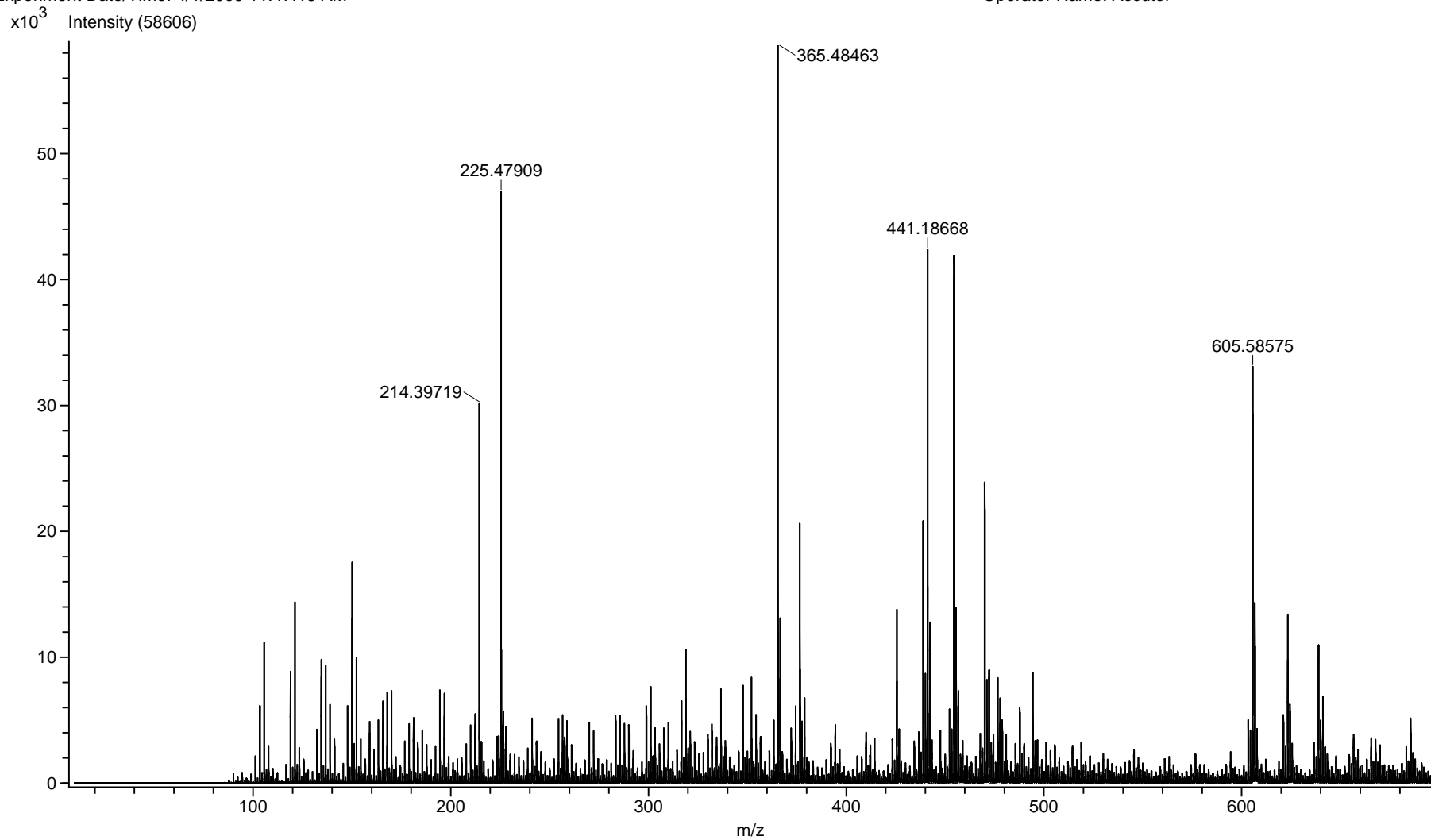


Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 4.757..4.947)
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

Orifice1 Volt Sweep: 28V
Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]
Ring Lens Volt: 10[V]
Time of Maximum: 4.908[min]

Operator Name: Accutof



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 3.065..3.144)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

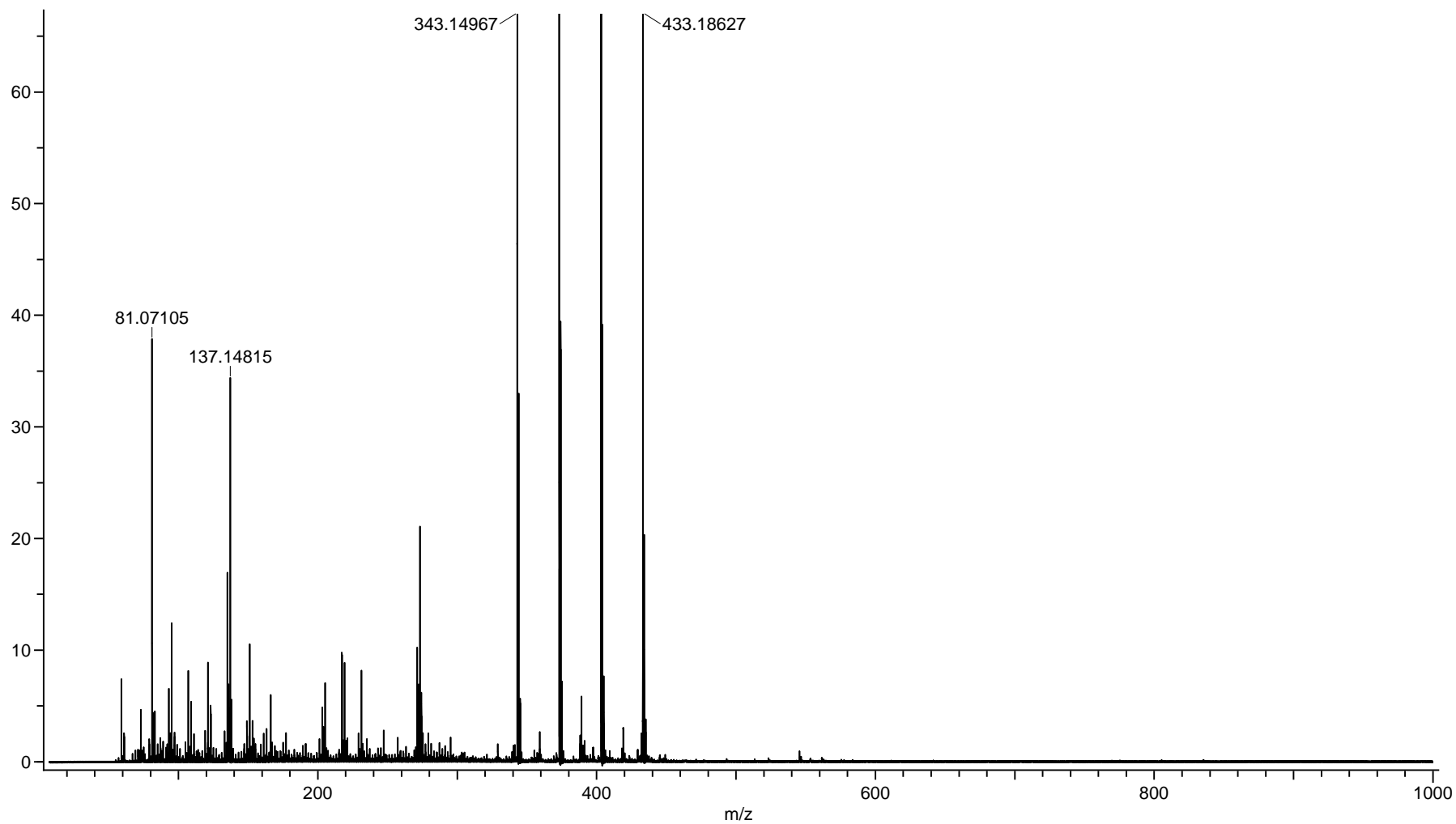
Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 3.103[min]

Operator Name: Accutof

$\times 10^3$ Intensity (67000)



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 3.150..3.248)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

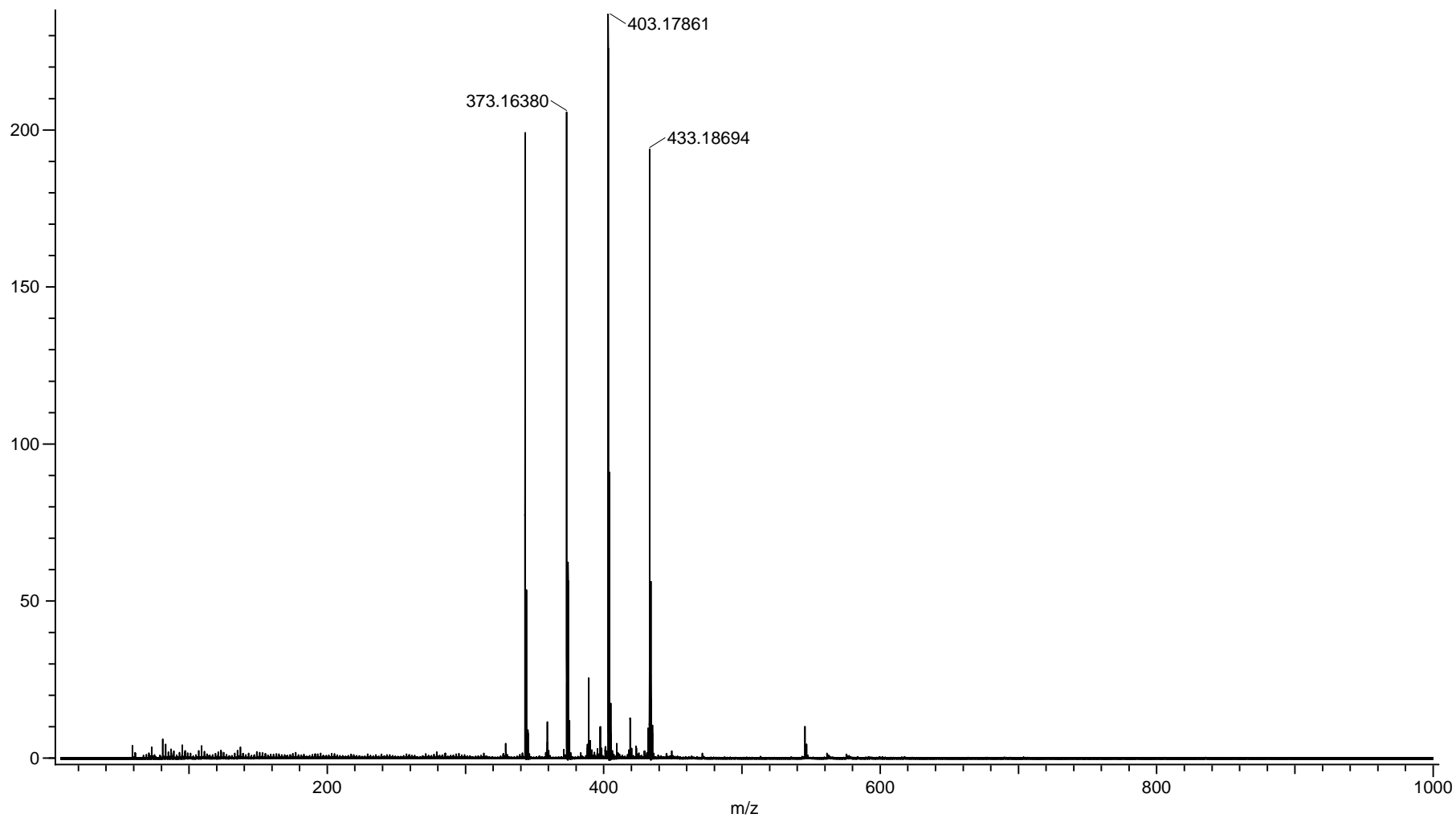
Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 3.196[min]

Operator Name: Accutof

$\times 10^3$ Intensity (236986)



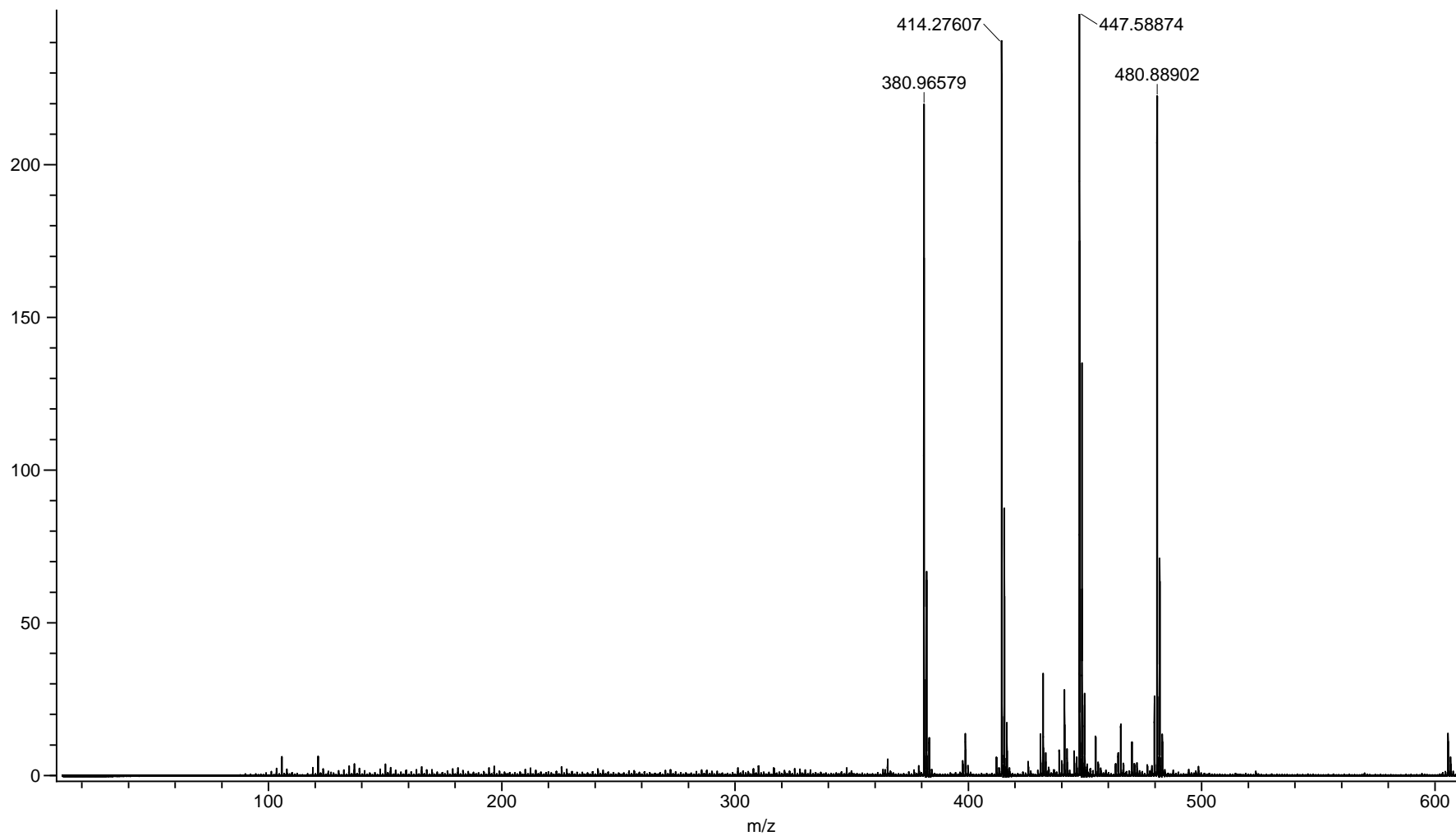
Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 5.540..5.827)
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

Orifice1 Volt Sweep: 28V
Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]
Ring Lens Volt: 10[V]
Time of Maximum: 5.628[min]

Operator Name: Accutof

$\times 10^3$ Intensity (249318)



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 3.785..3.882)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

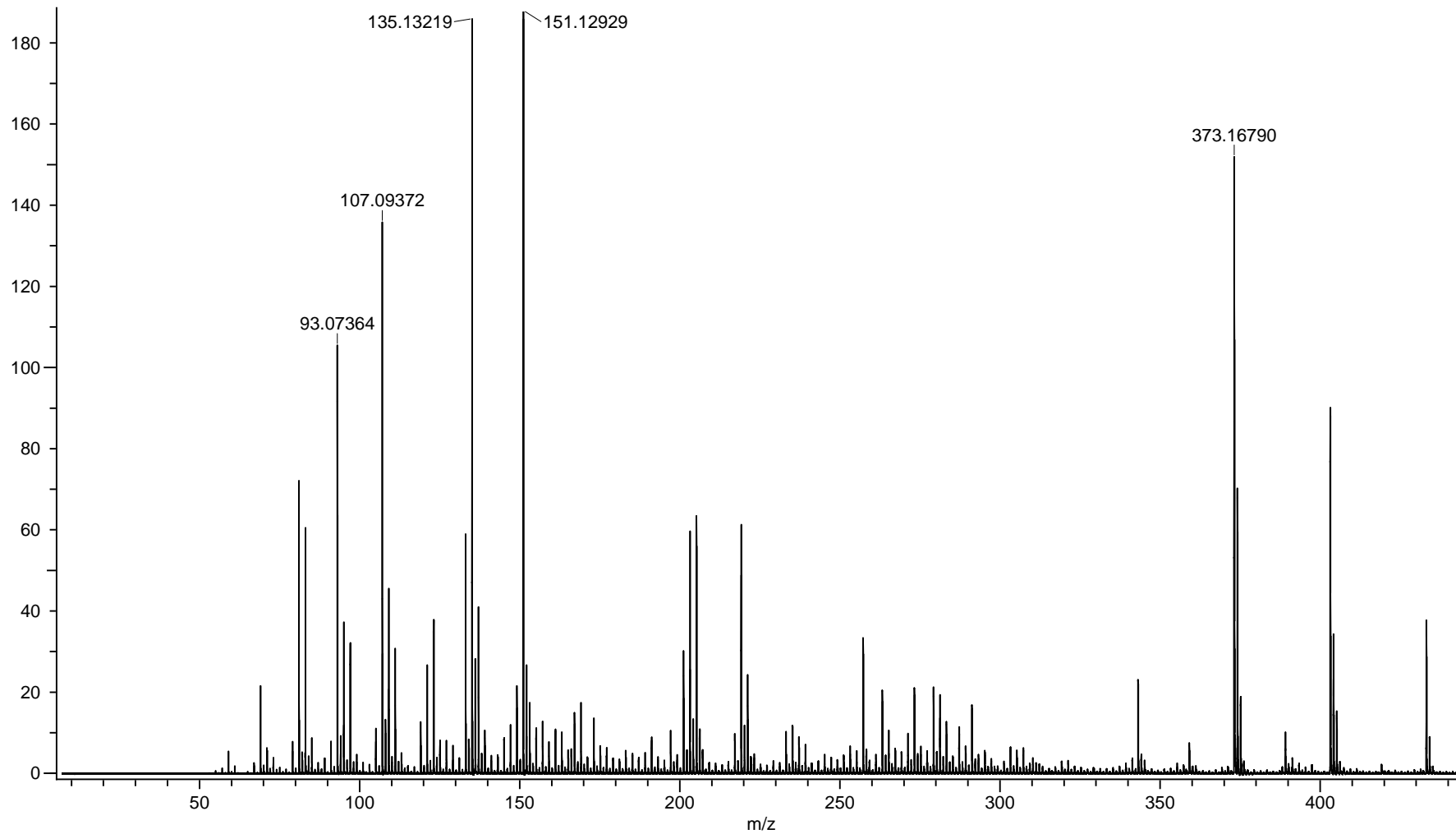
Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 3.842[min]

Operator Name: Accutof

$\times 10^3$ Intensity (187698)



Acq. Data Name: 101208

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI_pos_19Feb08

Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 3.888..3.974)

Experiment Date/Time: 12/10/2008 12:06:35 PM

Orifice1 Volt Sweep: 20V

Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

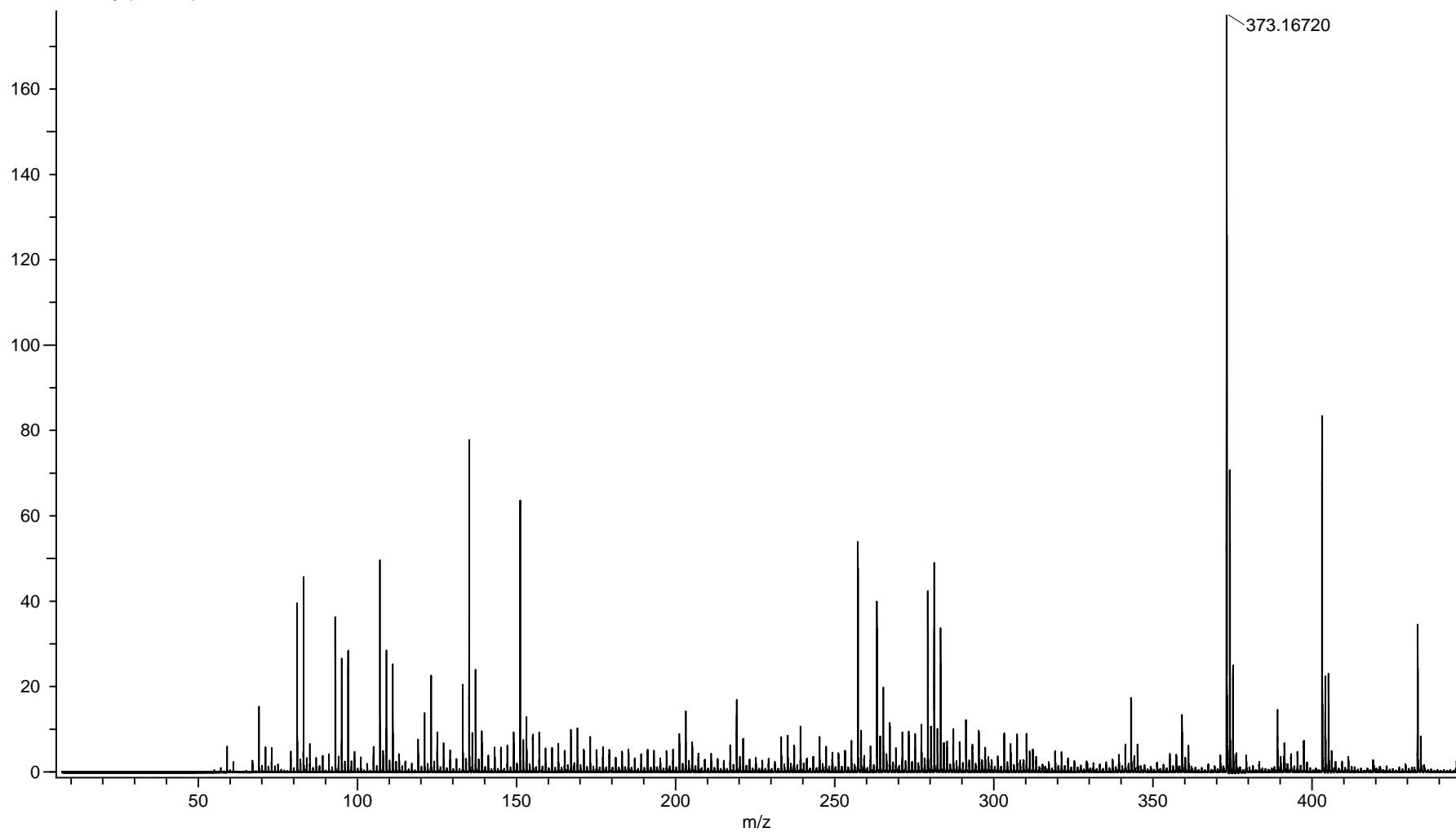
Spec. Record Interval: 0.4[s]

Ring Lens Volt: 6[V]

Time of Maximum: 3.922[min]

Operator Name: Accutof

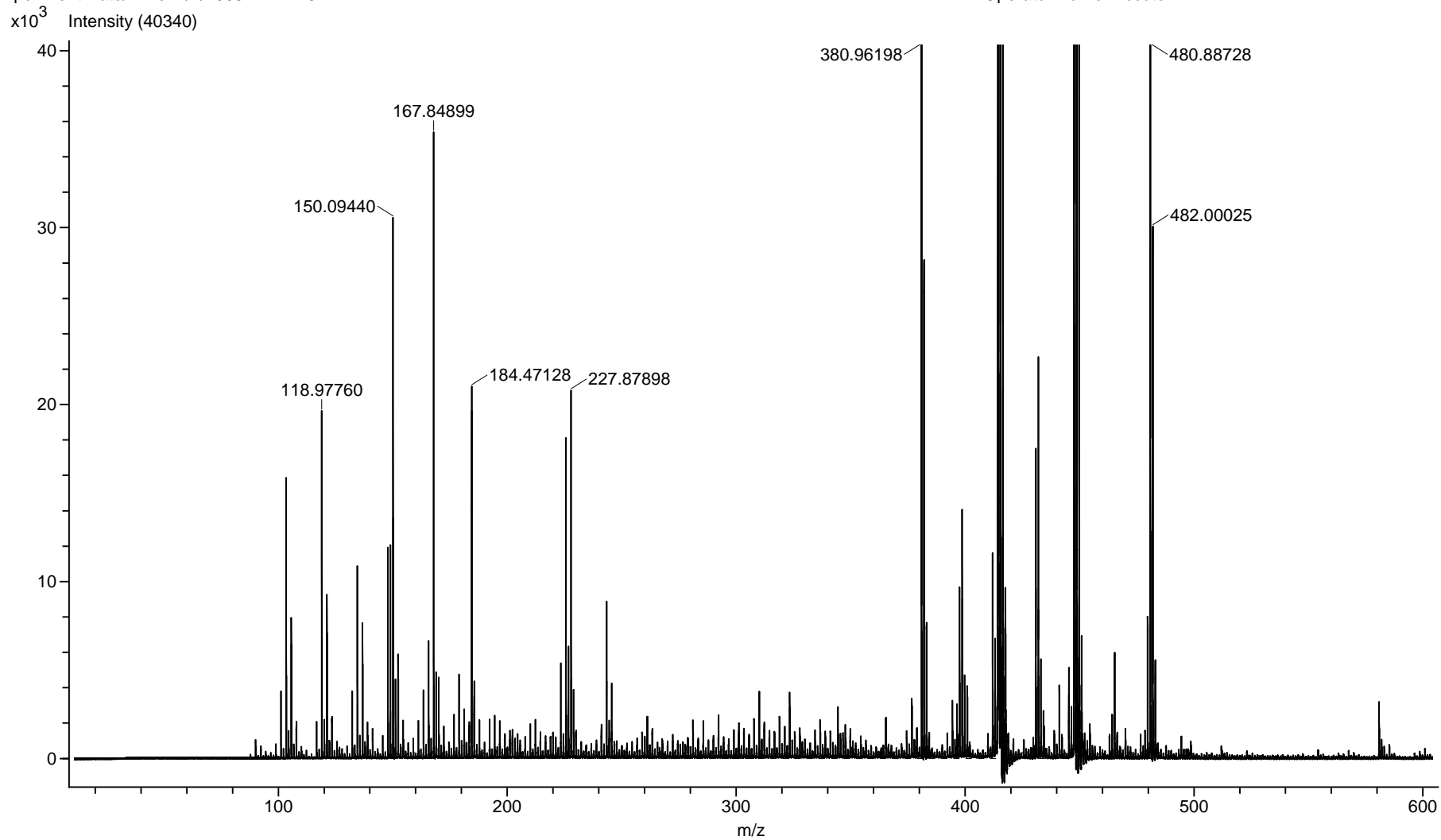
$\times 10^3$ Intensity (177386)



Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 7.209..7.379)
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

Spec. Record Interval: 0.4[s]
Ring Lens Volt: 10[V]
Time of Maximum: 7.233[min]

Operator Name: Accutof

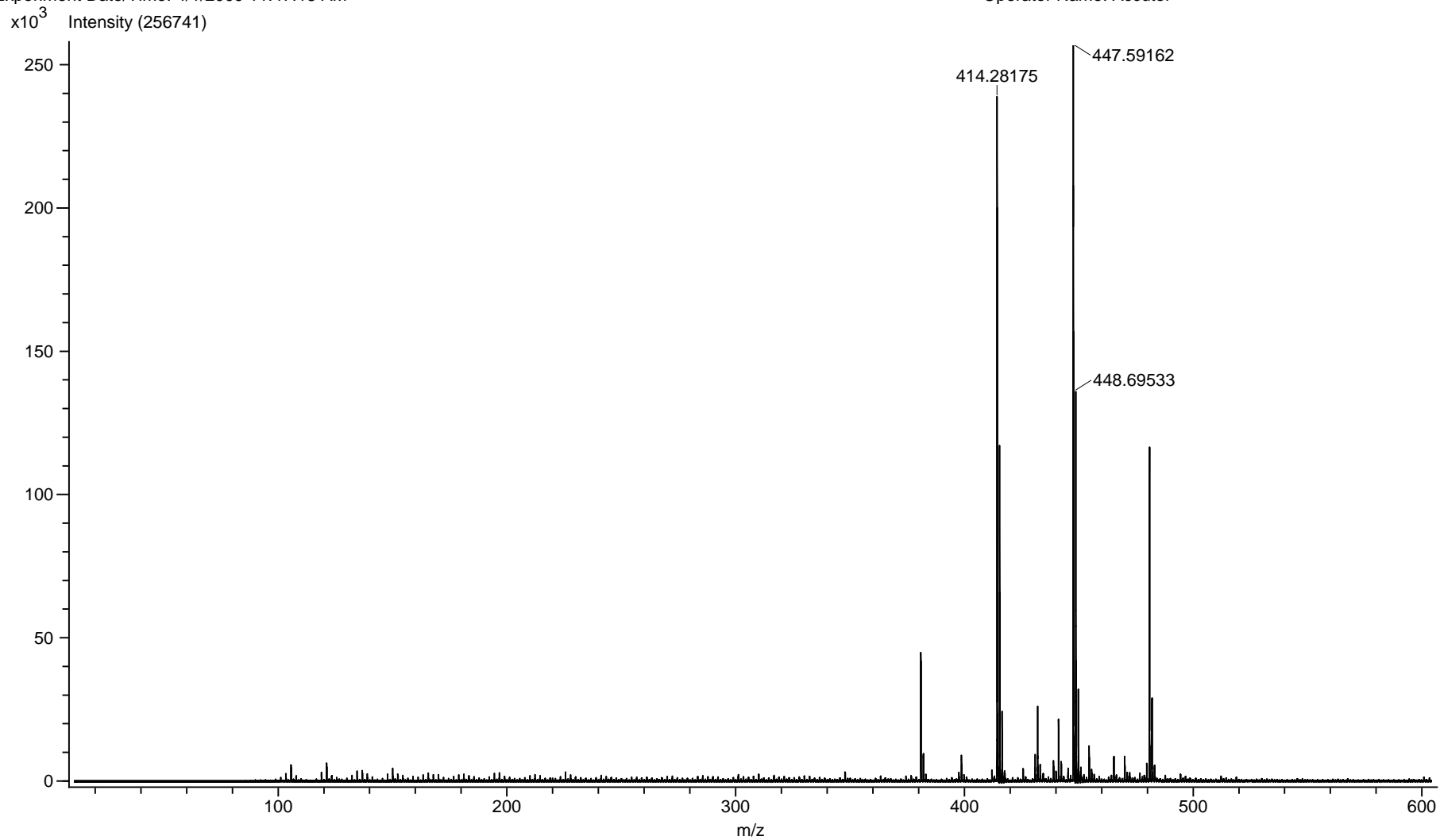


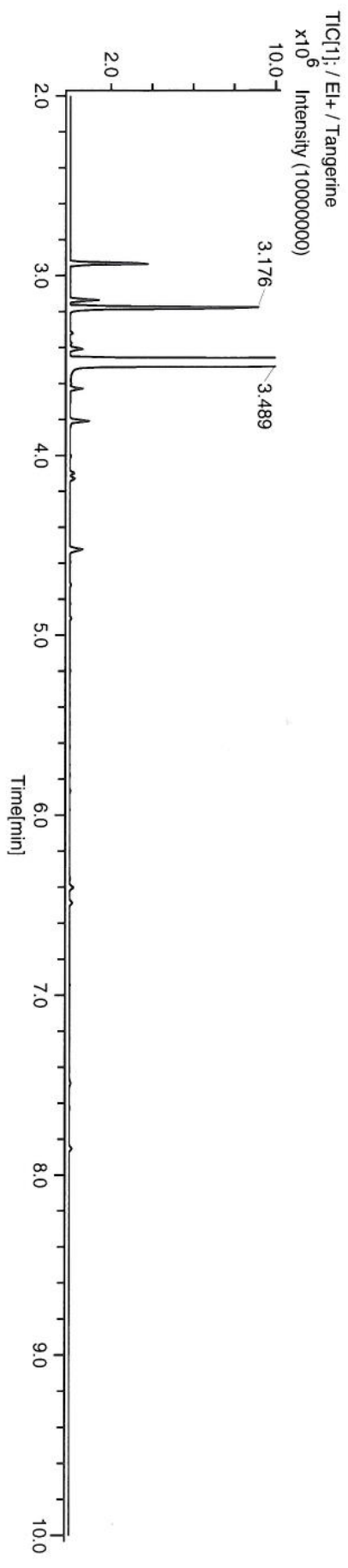
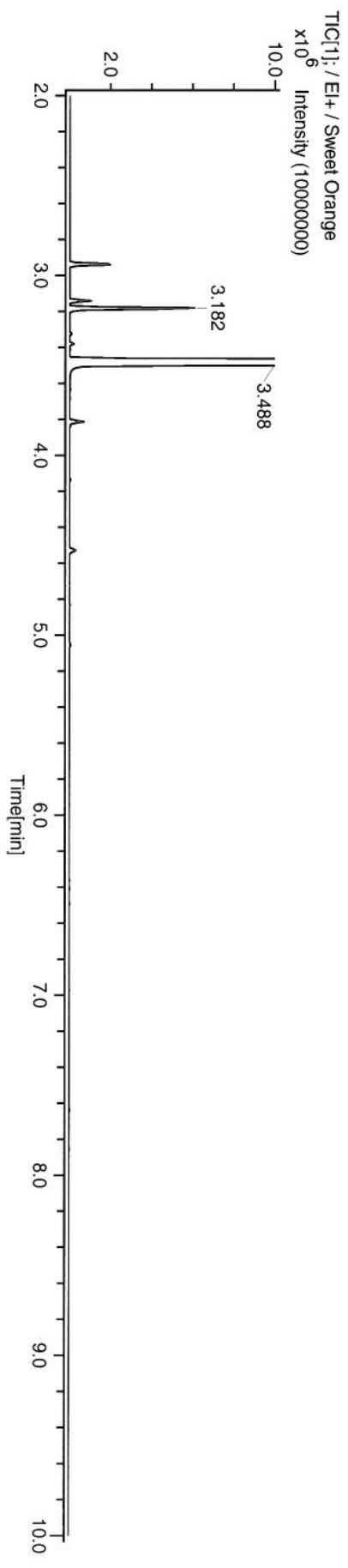
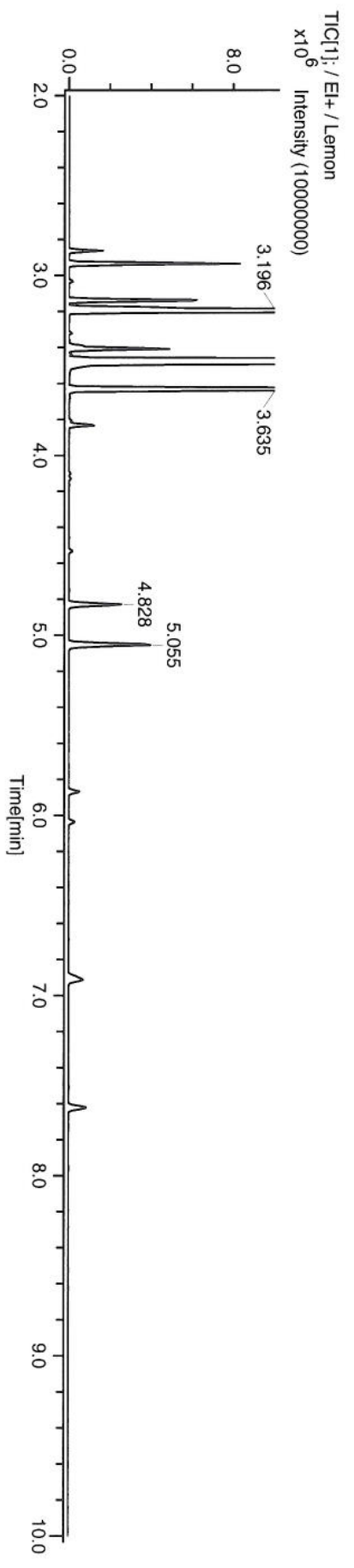
Acq. Data Name: 010409
Internal Sample Id: IS,p50,p10,jp50,s10,l50,l10,o10,t50,t10,is
Ionization Mode: ESI+
MS Calibration Name: PEG_ESI+_12feb09_4
Reduction History: Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 7.372..7.581)
Experiment Date/Time: 4/1/2009 11:47:18 AM

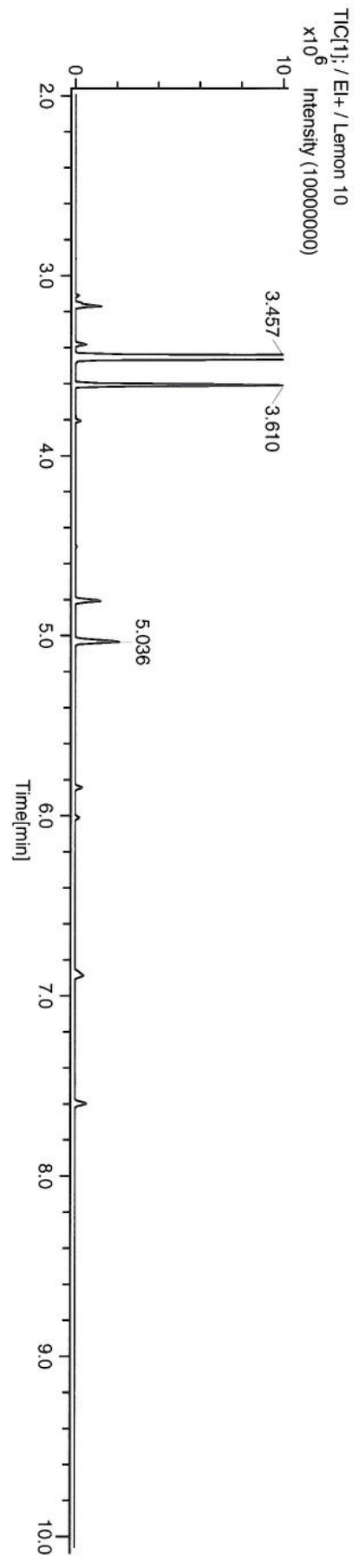
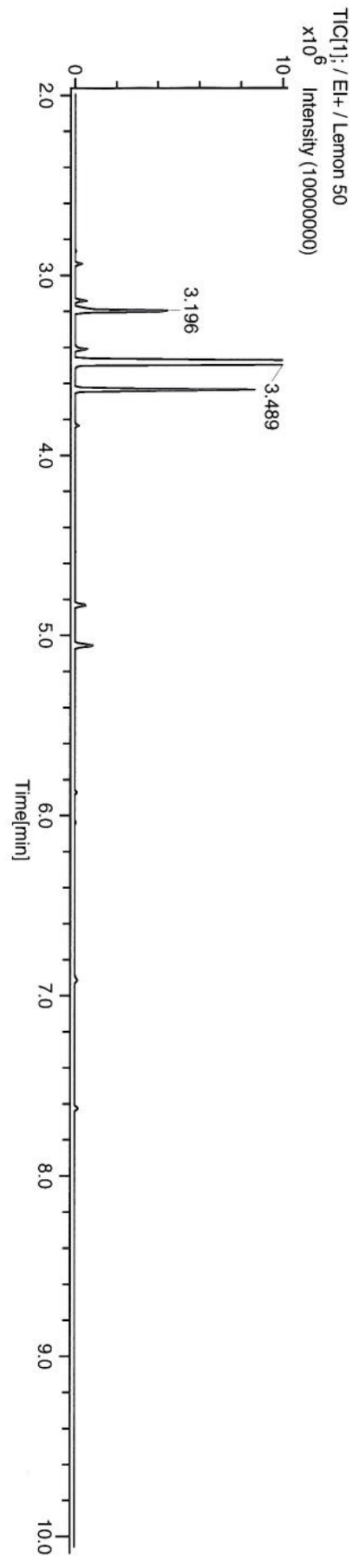
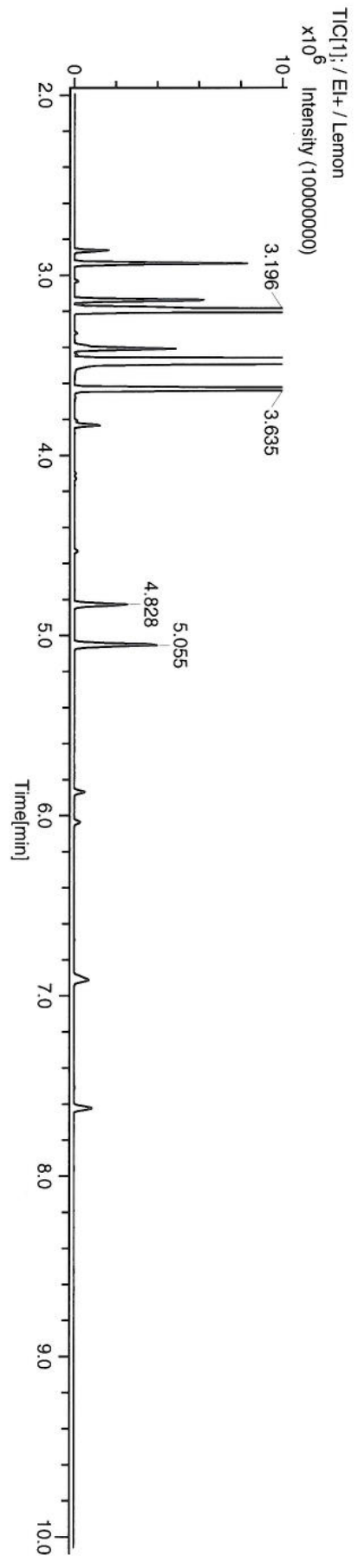
Orifice1 Volt Sweep: 28V
Acquired m/z Range: 7.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]
Ring Lens Volt: 10[V]
Time of Maximum: 7.439[min]

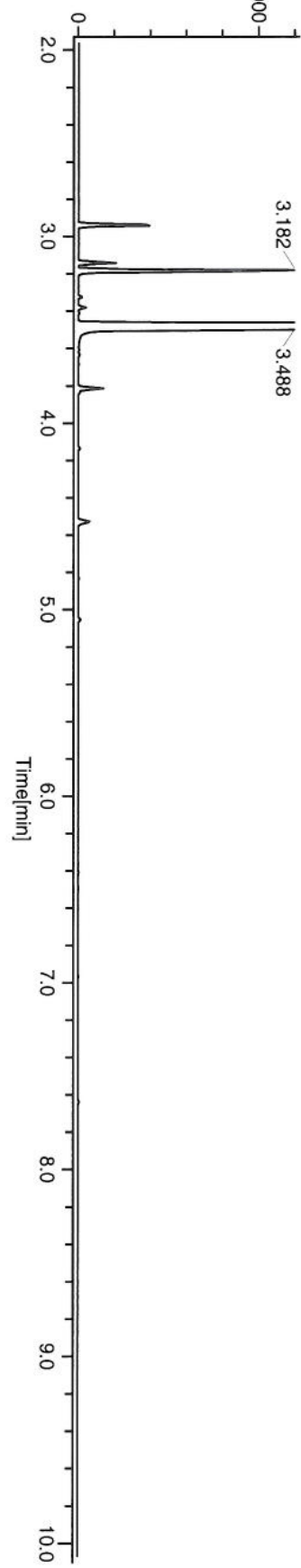
Operator Name: Accutof



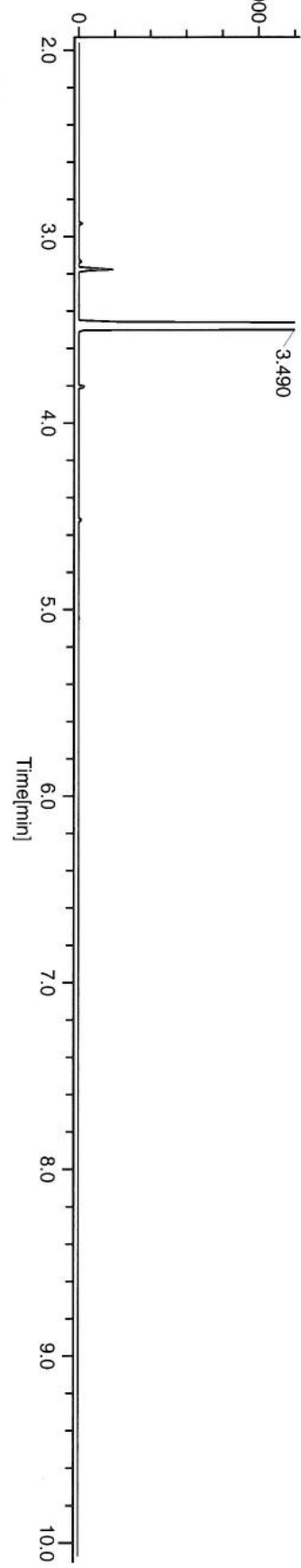




TIC[1]: /EI+ / Sweet Orange
x10³
Intensity (6000000)



TIC[1]: /EI+ / S. Orange 50
x10³
Intensity (6000000)



TIC[1]: /EI+ / S. Orange 10
x10³
Intensity (6000000)

