

Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata spregnutom tehnikom GC-MS/MS

Vučak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:038349>

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

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

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE
ODABRANIH IZOTIOCIJANATA SPREGNUTOM TEHNIKOM
GC-MS/MS

DIPLOMSKI RAD

ANA VUČAK

Matični broj: 138

Split, svibanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE
ODABRANIH IZOTIOCIJANATA SPREGNUTOM TEHNIKOM
GC-MS/MS

DIPLOMSKI RAD

ANA VUČAK

Matični broj: 138

Split, svibanj 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF
SELECTED ISOTHIOCYANATES USING GC-MS/MS**

DIPLOMA THESIS

ANA VUČAK

Parent number: 138

Split, May 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

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

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH IZOTIOCIJANATA SPREGNUTOM TEHNIKOM GC-MS/MS

Ana Vučak, 138

Sažetak: Izotocijanati su razgradni produkti hidrolize glukozinolata, fitokemikalija koje se pretežno nalaze u biljkama iz porodice kupusnjača. Izotocijanati su potencijalno biološki aktivni, zbog čega se razvijaju analitičke metode za njihovo određivanje. U ovom diplomskom radu razvijena je metoda za određivanje 2-metoksifenil-izotocijanata, 3-metoksifenil-izotocijanata i 4-metoksifenil-izotocijanata. Spregnuta tehnika plinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (GC-MS/MS) korištena je za odjeljivanje odabranih izotocijanata iz smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Za pripremu otopina korišteni su standardi 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotocijanata te otapalo n-heksan. Plinska kromatografija optimizirana je promjenom brzine povećanja temperature peći ($20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom, u MRM načinu snimanja, korišten je za praćenje specifičnih reakcija prijelaza (kvantitativni i dva kvalitativna za svaki spoj). Spektrometrija masa je optimizirana određivanjem energije sraza s dušikom za svaku specifičnu reakciju prijelaza. Prilikom izrade krivulje umjeravanja istraženi su različiti načini pripreme radnih otopina standarda (odabrano je klasično pipetiranje mehaničkim pipetama) te različita područja koncentracija otopina (odabran je raspon $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ – $20,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Ispitani parametri vrednovanja: točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i stabilnost, pokazali su se zadovoljavajućima. Metoda je uspješno primijenjena u analizi sintetskog uzorka poznate koncentracije. Navedenim je osigurana prikladnost metode za pojedinačno određivanje 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotocijanata u smjesi.

Ključne riječi: izotocijanati, plinska kromatografija, tandemska spektrometrija masa, trostruki kvadrupol, vrednovanje

Rad sadrži: 73 stranice, 41 sliku, 20 tablica, 2 priloga, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | – predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun | – član |
| 3. doc. dr. sc. Franko Burčul | – član-mentor |

Datum obrane: 19. svibnja 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Graduate study in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

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

Mentor: Franko Burčul, PhD, assistant prof.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF SELECTED ISOTHIOCYANATES USING GC-MS/MS

Ana Vučak, 138

Abstract: Isothiocyanates are degradation products of glucosinolate hydrolysis. Glucosinolates are phytochemicals found mostly in plants from the cabbage family. Isothiocyanates are potentially biologically active, which is why methods for their determination are being developed. In this thesis, a method for the determination of 2-methoxyphenyl isothiocyanate, 3-methoxyphenyl isothiocyanate and 4-methoxyphenyl isothiocyanate was developed. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was applied for the separation of selected isothiocyanates and qualitative and quantitative determination of separated compounds. Standards of 2-, 3- and 4-methoxyphenyl isothiocyanate and solvent n-hexane were used for the preparation of solutions. Gas chromatography was optimized by changing the oven temperature program rate ($20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Triple quadrupole mass spectrometer, in MRM scan mode, was used for monitoring specific fragmentation reactions (quantifier and two qualifiers for each compound). Mass spectrometry was optimized by determination of the collision energy with nitrogen for each specific reaction of fragmentation. Different approaches of preparing the calibration curve working solutions were examined (forward pipetting with mechanical pipettes was selected) as well as different concentration ranges (range $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ – $20,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ was selected) were examined for making calibration curves. The validation parameters tested: accuracy, precision, specificity, linearity, the limit of detection, the limit of quantification and stability, were proven satisfactory. The method was successfully applied in the analysis of a synthetic sample of known concentration. This ensures the suitability of the method for the individual determination of 2-, 3- and 4-methoxyphenyl isothiocyanates in the mixture.

Keywords: isothiocyanates, gas chromatography, tandem mass spectrometry, triple quadrupole, validation

Thesis contains: 73 pages, 41 figures, 20 tables, 2 supplements 22 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|-------------|
| 1. Ivica Blažević, PhD, associate prof. | chairperson |
| 2. Lea Kukoč Modun, PhD, associate prof. | member |
| 3. Franko Burčul, PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date: May 19th, 2022.

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

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

Posebno se zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Franku Burčulu na uloženom vremenu, angažmanu i stručnom vodstvu tijekom izrade mog diplomskog rada.

Beskrajno hvala mojim roditeljima na svim vrijednostima koje su mi prenijeli i na svemu što su mi pružili. Hvala mom pokojnom ocu što je uvijek vjerovao u mene i mojoj divnoj majci što je podijelila sa mnom sve trenutke studentskog života.

Veliko hvala i mom bratu Marijanu, mom najvećem životnom osloncu.

Od srca hvala prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane, posebno Ani, Josipi, Antei i Luki.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razviti metodu za odjeljivanje 2-metoksifenil-izotiocijanata, 3-metoksifenil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata iz smjese te kvalitativno i kvantitativno određivanje odijeljenih izotiocijanata korištenjem spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom.

Razvoj i optimizacija ove analitičke metode uključuje:

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

Vrednovanje ove analitičke metode uključuje:

- Ispitivanje točnosti, preciznosti, specifičnosti, linearnosti
- Određivanje linearnog dinamičkog područja, jednadžbe regresijskog pravca, koeficijenta determinacije te računanje granice dokazivanja i granice određivanja
- Analizu sintetskog uzorka.

SAŽETAK

Izotiocijanati su razgradni produkti hidrolize glukozinolata, fitokemikalija koje se pretežno nalaze u biljkama iz porodice kupusnjača. Izotiocijanati su potencijalno biološki aktivni, zbog čega se razvijaju analitičke metode za njihovo određivanje. U ovom diplomskom radu razvijena je metoda za određivanje 2-metoksifenil-izotiocijanata, 3-metoksifenil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata.

Spregnuta tehnika plinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (GC-MS/MS) korištena je za odjeljivanje odabranih izotiocijanta iz smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Za pripremu otopina korišteni su standardi 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotiocijanata te otapalo n-heksan.

Plinska kromatografija optimizirana je promjenom brzine povećanja temperature peći ($20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom, u MRM načinu snimanja, korišten je za praćenje specifičnih reakcija prijelaza (kvantitativni i dva kvalitativna za svaki spoj). Spektrometrija masa optimizirana je određivanjem energija sraza s dušikom za svaku specifičnu reakciju prijelaza. Prilikom izrade krivulja umjeravanja istraženi su različiti načini pripreme radnih otopina standarda (odabrano je klasično pipetiranje mehaničkim pipetama) te različita područja koncentracija otopina (odabran je raspon $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1} - 20,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$).

Ispitani parametri vrednovanja: točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja i stabilnost, pokazali su se zadovoljavajućima. Metoda je uspješno primijenjena u analizi sintetskog uzorka poznate koncentracije. Navedenim je osigurana prikladnost metode za pojedinačno određivanje 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotiocijanata u smjesi.

Ključne riječi: izotiocijanati, plinska kromatografija, tandemska spektrometrija masa, trostruki kvadrupol, vrednovanje

SUMMARY

Isothiocyanates are degradation products of glucosinolate hydrolysis. Glucosinolates are phytochemicals found mostly in plants from the cabbage family. Isothiocyanates are potentially biologically active, which is why methods for their determination are being developed. In this thesis, a method for the determination of 2-methoxyphenyl isothiocyanate, 3-methoxyphenyl isothiocyanate and 4-methoxyphenyl isothiocyanate was developed.

Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was applied for the separation of selected isothiocyanates and qualitative and quantitative determination of separated compounds. Standards of 2-, 3- and 4-methoxyphenyl isothiocyanate and solvent n-hexane were used for the preparation of solutions.

Gas chromatography was optimized by changing the oven temperature program rate ($20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Triple quadrupole mass spectrometer, in MRM scan mode, was used for monitoring specific fragmentation reactions (quantifier and two qualifiers for each compound). Mass spectrometry was optimized by determination of the collision energy with nitrogen for each specific reaction of fragmentation. Different approaches of preparing the calibration curve working solutions were examined (forward pipetting with mechanical pipettes was selected) as well as different concentration ranges (range $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1} - 20,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ was selected) were examined for making calibration curves.

The validation parameters tested: accuracy, precision, specificity, linearity, the limit of detection, the limit of quantification and stability, were proven satisfactory. The method was successfully applied in the analysis of a synthetic sample of known concentration. This ensures the suitability of the method for the individual determination of 2-, 3- and 4-methoxyphenyl isothiocyanates in the mixture.

Keywords: isothiocyanates, gas chromatography, tandem mass spectrometry, triple quadrupole, validation

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Glukozinolati	2
1.1.1. Izotiocijanati	4
1.2. Kromatografija	6
1.2.1. Podjela kromatografije	6
1.2.2. Kromatografski parametri	8
1.2.3. Plinska kromatografija	11
1.3. Spektrometrija masa	15
1.3.1. Ionski izvori	16
1.3.2. Analizatori masa	17
1.3.3. Tandemska spektrometrija masa	19
1.4. Vrednovanje analitičke metode	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	24
2.1. Korištene kemikalije i oprema	24
2.2. Identifikacija odabranih izotiocijanata	26
2.3. Analiza smjese odabranih izotiocijanata	27
2.4. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona s dušikom	28
2.5. Praćenje specifičnih reakcija prijelaza	28
2.6. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja	29
3. REZULTATI I RASPRAVA	33
3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE	33
3.1.1. Spektri masa odabranih izotiocijanata	33
3.1.2. Optimizacija plinske kromatografije promjenom brzine povećanja temperature	37
3.1.3. Optimizacija energije sraza s dušikom	40
3.1.4. Odabir optimalnog načina pripreme radnih otopina standarda	48
3.1.5. Odabir područja koncentracija otopina za izradu krivulja umjeravanja	49
3.1.6. Krivulje umjeravanja	53

3.2. VREDNOVANJE METODE.....	56
3.2.1. Točnost.....	56
3.2.2. Preciznost.....	57
3.2.3. Specifičnost.....	60
3.2.4. Linearnost	60
3.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	61
3.2.6. Stabilnost	63
3.2.7. Analiza sintetskog uzorka	64
ZAKLJUČAK.....	67
LITERATURA	69
PRILOZI	72

UVOD

Glukozinolati su biološki aktivni spojevi koji se pretežno nalaze u biljkama iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*). Enzimskom hidrolizom glukozinolata nastaju izotiocijanati, a ovisno o uvjetima hidrolize i drugi razgradni produkti, koji su zaslužni za aromu i biološku aktivnost ovih fitokemikalija. Glavni cilj istraživanja glukozinolata je odnos strukture i aktivnosti zbog čega je identifikacija glukozinolata iznimno važna. Izolacija glukozinolata iz biljaka često je vrlo zahtjevna, a kao alternativa moguća je i kemijska sinteza. Neizravna identifikacija glukozinolata analizom njihovih hlapljivih razgradnih produkata, poput izotiocijanata, također se koristi.^[1]

Značajan broj izotiocijanata izoliran je iz biljnih izvora, a neki su dobiveni sintetski. Analiza izotiocijanata najčešće se provodi plinskom kromatografijom u kombinaciji sa spektrometrijom masa. Iako je ova spregnuta tehnika vrlo osjetljiva, moguće su poteškoće u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi zbog slabe hlapljivosti i/ili nestabilnosti nekih spojeva pri povišenim temperaturama.^[2]

Kromatografija je separacijska tehnika, a odijeljene komponente identificiraju se pomoću detektora. Najbolji izbor detektora je spektrometar masa koji osim snimanja spektra masa, omogućuje praćenje odabranih iona ili odabranih specifičnih reakcija prijelaza (tandemska spektrometrija masa). U kombinaciji s plinskom kromatografijom, kao analizator masa često se koristi trostruki kvadrupol. Povezivanjem plinske kromatografije s trostrukim kvadrupolom dobiva se jedan od najmoćnijih alata za identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih spojeva.

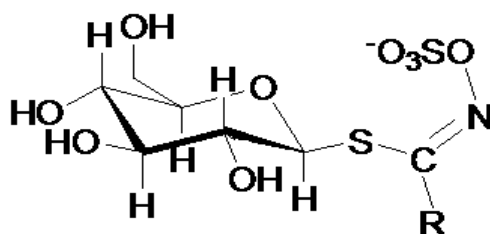
U ovom diplomskom radu razvijena je, optimizirana te u konačnici vrednovana metoda za istovremeno pojedinačno kvalitativno i kvantitativno određivanje 2-metoksifenil-izotiocijanata, 3-metoksifenil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata unutar smjese korištenjem spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom.

1. OPĆI DIO

1.1. Glukozinolati

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti koji se smatraju fitokemikalijama. Riječ je o biološki aktivnim spojevima koji hrani biljnog podrijetla daju boju, aromu (miris i okus), prirodnu toksičnost za štetnike te uglavnom imaju povoljan utjecaj na čovjekovo zdravlje. Glavni izvor glukozinolata u ljudskoj prehrani su biljke iz porodice *Brassicaceae* (kupusnjače). Glukozinolati se mogu naći u svim dijelovima biljke, u različitim oblicima i koncentracijama, a uglavnom su najzastupljeniji u sjemenu.^[1,2]

Glukozinolati su organski anioni koji se iz biljaka izoliraju kao kalijeve i natrijeve soli. Zajedničke strukturne karakteristike svih glukozinolata su: β -D-tioglukozidni dio, sulfonirani oksim (sulfatna skupina koja je preko C=N skupine vezana za ostatak molekule) i bočni lanac (oznaka R).^[2]



Slika 1.1. Opća struktura glukozinolata^[2]

Osnova strukturne raznolikosti glukozinolata i biološke aktivnosti njihovih razgradnih produkata je varijabilni bočni lanac. Glukozinolati se najjednostavnije mogu podijeliti na alifatske, aromatske i heterocikličke (indolne), koji su do sada najviše istraživani. Identificirano je između 90 i 139 glukozinolata iz biljaka, a najbrojniji su oni koji sadrže nerazgranate ili razgranate alifatske bočne lance. Jedna trećina poznatih glukozinolata u bočnom lancu sadrži atom sumpora koji može biti različitog oksidacijskog stupnja.^[2]

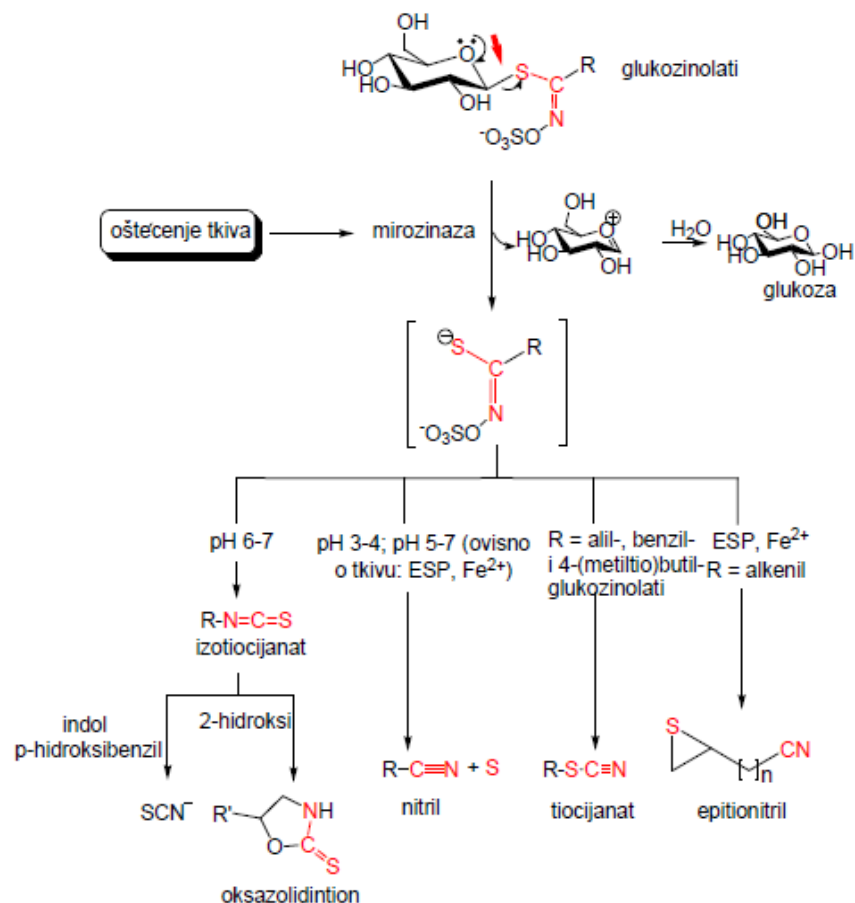
Pronađeni su i tzv. seleno-glukozinolati, kod kojih su glukonski i aglukonski dio molekule, umjesto sumporom, povezani atomom selenija. Seleno-glukozinolati se enzimskom hidrolizom pretvaraju u izoselenocijanate, a formiranje izoselenocijanata značajno je odstupanje od svojstava glukozinolata. Međutim, prisutnost selenija u bočnim lancima u potpunosti je kompatibilna s definicijom glukozinolata te se takvi spojevi mogu nazvati selenometionin-izvedenim glukozinolatima, kako bi se izbjegla zabuna sa seleno-glukozinolatima. Navedeno nazivlje je prikladno jer od prvih nastaju izotiocijanati, a ne izoselenocijanati kao produkti hidrolize.^[1]

Glukozinolati se u biljkama sintetiziraju iz aminokiselina u tri neovisna stupnja: produženje aminokiselinskog lanca ugradnjom dodatnih metilenskih grupa u bočni lanac, pretvorba u glukozinolatnu strukturu i modifikacija bočnog lanca.^[3] Danas je poznata većina međuprodukata, enzima i gena koji sudjeluju u biosintezi. Metionin je posebno važan aminokiselinski prekursor nastanka velikog broja glukozinolata. Osim metionina, alanin, valin, leucin i izoleucin prekursori su alifatskih, fenilalanin i tirozin arilalifatskih, a triptofan indolnih glukozinolata.^[1,2]

Glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi sve dok su u biljnim stanicama odvojeni od enzima. Tek oštećenjem biljnog tkiva (sjeckanjem, žvakanjem) glukozinolati dolaze u kontakt s mirozinazom. U reakciji hidrolize cijepa se tioglukozidna veza te se oslobađaju glukoza, sulfat i aglukon. Oslobođeni aglukon je nestabilan pa se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte, uglavnom gorkog okusa i/ili oštrog mirisa.^[2] Ovisno o strukturi bočnog lanca, prisustvu kofaktora i uvjetima hidrolize nastaju izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, i epitionitrili (Slika 1.2.).^[3]

Moguća je i neenzimska (kemijska) razgradnja glukozinolata pod utjecajem povišene temperature. Iako je toplinska razgradnja glukozinolata nedovoljno istražena, pokazalo se da razgradni produkti mogu nastati i bez prisustva enzima.^[2]

Neki od nastalih razgradnih produkata su štetni, dok neki posjeduju antioksidacijska, antimikrobna, antifugalna, čak i antikancerogena svojstva. Zbog biološke aktivnosti i karakteristične arome koju daju povrću, glukozinolati i njihovi razgradni produkti postali su posljednjih godina predmetom brojnih istraživanja. Također se smatra da ovi spojevi štite biljke od napada insekata, zbog čega se ispituje mogućnost njihove primjene kao pesticida.^[1,2]



Slika 1.2. Opća shema hidrolize glukozinolata te uvjeti nastajanja i strukture glavnih razgradnih produkata^[3]

1.1.1. Izotiocijanati

Izotiocijanati (ITC) su reaktivni organosumporovi spojevi, opće strukturne formule $R-N=C=S$. To su hlapljivi spojevi, intenzivnog mirisa i arome koji nastaju razgradnjom glukozinolata. Povijesno su poznati kao ulja gorušice budući da su zaslužni za oštar okus senfa.^[1]

Prehrambeni izvor glukozinolata su kupusnjače, poput gorušice, kelja i brokule. Količina izotiocijanata nastalih iz glukozinolata promjenjiva je i djelomično ovisi o načinu pripreme hrane. Iako kuhanje inhibira mirozinaznu aktivnost, laganim kuhanjem (kraće od 5 minuta na laganoj vatri) može se sačuvati dio enzima koji omogućava nastanak izotiocijanata i brzu apsorpciju u tankom crijevu. Međutim, tek se mali dio

intaktnih glukozinolata može apsorbirati u tankom crijevu i veći dio odlazi u debelo crijevo. U debelom crijevu mikrobiom omogućava stvaranje različitih metabolita, ovisno o pH-vrijednosti i prisutnim kofaktorima, ali apsorpcija teče sporije. Nakon apsorpcije u proksimalnom dijelu debelog crijeva, izotiocijanati se u jetri vežu na glutation pomoću enzima glutation-S-transferaze (GST), a potom metaboliziraju do merkapturane kiseline koja se izlučuje mokraćom.^[4]

Izotiocijanati mogu modulirati ekspresiju i aktivnost enzima uključenih u metabolizam i eliminaciju ksenobiotika (npr. kancerogena) iz tijela. U kultiviranim stanicama i životinjskim modelima, izotiocijanti su pokazali antioksidativno i protuupalno djelovanje te omeli brojne ciljeve i putove povezane s nastankom raka. U tablici 1.1. prikazani su izotiocijanati čija se antikancerogena svojstva aktivno istražuju.^[4]

Tablica 1.1. Potencijalno antikancerogeni izotiocijanati, njihovi prekursori te hrana u kojoj zastupljeni^[4]

Izotiocijanat (ITC)	Glukozinolat (prekursor)	Prehrambeni izvor
alil-izotiocijanat (AITC)	sinigrin	brokula, prokulice, kupus, hren, senf, koraba, rotkvica
benzil-izotiocijanat (BITC)	glukotropeolin	kupus, sjetvena grbica
fenetil-izotiocijanat (PETIC)	glukonasturtin	potočarka
sulforafan	glukorafanin	brokula, prokulice, cvjetača, kupus, kelj

Odabrani izotiocijanati: 2-metoksifenil-izotiocijant (2-MOPITC), 3-metoksifenil-izotiocijant (3-MOPITC) i 4-metoksifenil-izotiocijant (4-MOPITC), sintetski su spojevi koji do sada nisu pronađeni u biljkama, ali se ispituju s ciljem boljeg razumijevanja strukturne raznolikosti i biološke aktivnosti glukozinolata.

1.2. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda za analitička i preparativna odjeljivanja komponenata smjese, a temelji se na različitoj raspodjeli komponenata između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze.^[5]

Za otkriće kromatografije zaslužan je ruski znanstvenik M. S. Cvet koji je 1906. godine kromatografijom eluiranjem (ispiranjem) razdvojio različito obojene pigmente iz biljnih ekstrakata. Kao nepokretnu fazu koristio je kalcijev karbonat kojim je napunio kolonu te je kroz nju propuštao etersku otopinu biljnog pigmenta. Ispiranje kolone pokretnom fazom eterom (eluens) dovelo je do razdvajanja pigmenata u obliku obojenih vrpca (eluati) zbog različitog afiniteta prema nepokretnoj fazi. Cvet je razvijenu metodu nazvao kromatografija (grč. *chroma* – boja, *graphein* – pisati), a doslovni prijevod „ispis bojama“ slikovito opisuje rezultate njegovog eksperimenta.^[5]

Značaj njegovih istraživanja prepoznat je tek sredinom 20. stoljeća kada su proširena teorijska znanja o heterogenoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Za to su posebno zaslužni znanstvenici A. J. P. Martin i R. L. M. Synge koji su zbog svog doprinosa u razvoju kromatografije 1952. godine dobili Nobelovu nagradu za kemiju.^[5]

Danas je kromatografija najuspješnija analitička tehnika za odjeljivanje analita iz složenih smjesa. Moderne kromatografske tehnike (primjerice plinska kromatografija i tekućinska kromatografije visoke djelotvornosti) instrumente su tehnike koje s prikladnim detektorom omogućuju dobivanje kvalitativnih i kvantitativnih informacija o odijeljenim komponentama smjese.^[6]

1.2.1. Podjela kromatografije

Od opisanog početka razvoja pa do današnjih dana razvijene su različite vrste kromatografije, ali sve imaju zajedničku teorijsku podlogu.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti s obzirom na tri osnovna kriterija:

- način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze
- agregatno stanje pokretne faze
- priroda ravnoteže između pokretne i nepokretne faze.

S obzirom na način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze, razlikuje se plošna i kolonska kromatografija. **Plošna kromatografija** može biti papirna ili tankoslojna, ovisno o korištenoj nepokretnoj fazi. Kod papirne kromatografije nepokretna faza je celuloza iz papira, a danas se koriste i modificirani oblici papira (impregnacija npr. ionskom smolom, silikagelom, aluminijevim oksidom). Kod tankoslojne kromatografije nepokretna faza je sloj sorbensa nanesen na čvrsti inertni nosač (aluminijaska folija, staklo, polimerni materijal). U oba slučaja pokretna faza (otapalo) pod djelovanjem kapilarnih sila putuje nepokretnom fazom noseći komponente uzorka različitim brzinama, pri čemu se razvija kromatogram. U **kolonskoj kromatografiji** nepokretna se faza nalazi u uskoj cjevčici (koloni) kroz koju prolazi pokretna faza djelovanjem gravitacijske sile ili pod utjecajem primijenjenog tlaka. Nepokretna faza ispunjava kolonu ili je nanesena na stijenkku kolone, a to mogu biti čvrste čestice, odnosno tanak sloj tekućine nanesen na stijenkku kolone ili na čvrste čestice. Uzorak se dodaje na vrh kolone, a pojedine komponente uzorka više se zadržavaju na nepokretnoj fazi i sporije prolaze kroz kolonu.^[5]

S obzirom na agregatno stanje pokretne faze, razlikuje se plinska, tekućinska i fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima. Pokretna faza kod **plinske kromatografije** je inertni plin, kod **tekućinske kromatografije** tekućina male viskoznosti, a kod **fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima** gusti plin (fluid) iznad svoje kritične temperature i tlaka.^[5]

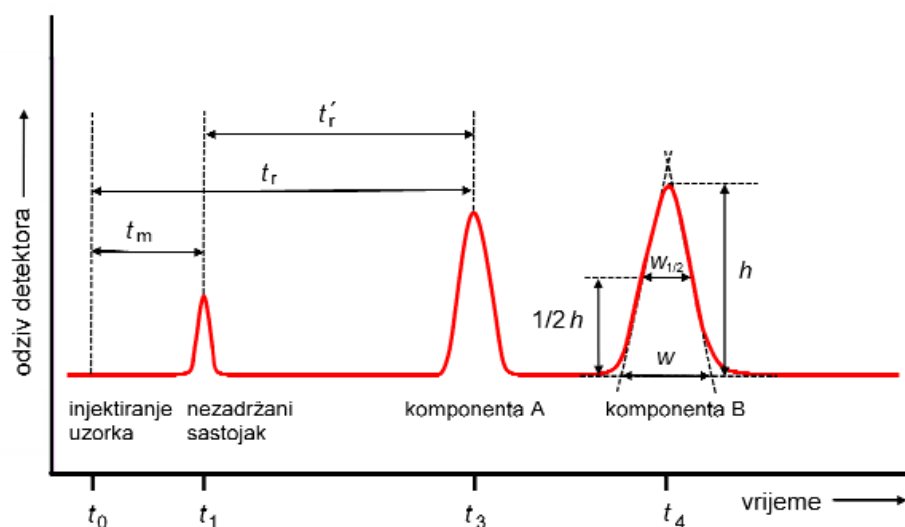
S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, razlikuje se razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem i kromatografija ionskom izmjenom. U tablici 1.2. dane su osnovne značajke svake od ovih vrsta kromatografskih tehnika.^[5]

Tablica 1.2. Kromatografske tehnike s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze

Kromatografska tehnika	Priroda ravnoteže i mehanizam odjeljivanja
Razdjelna kromatografija	Ravnoteža između dviju tekućina ili između plina i tekućine, razlika u polarnosti pokretne i nepokretne faze
Adsorpcijska kromatografija	Ravnoteža između tekućine ili plina i čvrste nepokretne faze, adsorpcija analita na površinu čvrstog adsorbensa
Afinitetna kromatografija	Specifične interakcije analita s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze
Kromatografija isključenjem	Nepokretna faza djeluje kao molekulsko sito pa se odjeljivanje temelji na razlikama u veličini i obliku analita
Kromatografija ionskom izmjenom	Na nepokretnoj fazi (ionska smola) vezane su nabijene skupine za koje se vezuju analiti suprotnog naboja iz uzorka

1.2.2. Kromatografski parametri

Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora, odnosno ovisnost bilo koje funkcije koncentracije komponenata analizirane smjese o vremenu ili volumenu. Budući da je kromatografija metoda odjeljivanja, svaki signal na kromatogramu predstavlja odijeljenu komponentu smjese. Ovisno o tome koliko se vremena zadržala u koloni, vezana za nepokretnu fazu, komponenta smjese dolazi do detektora na kraju kolone u određenom vremenu ili pri određenom volumenu utrošene pokretne faze. Ako postoji dovoljna razlika afiniteta komponenata uzorka prema nepokretnoj fazi, profili komponenata će se razdvojiti. Kromatogram također može poslužiti i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka. Položaj pika na vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju sastojka, a iz površine ispod kromatografske krivulje može se izračunati količina svakog odijeljenog sastojka.^[5] Na slici 1.3. je prikazan kromatogram za dvokomponentni uzorak (A i B). Komponenta A provodi više vremena vezana za nepokretnu fazu, a komponenta B brže prolazi kroz kolonu i prije dolazi do detektora.



Slika 1.3. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima^[5]

Zadržano vrijeme, t_m , je vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti za prolazak kroz kolonu. Ukupno vrijeme zadržavanja, t_r , je vrijeme od injektiranja uzorka u kolonu do vremena maksimalnog odziva detektora. Prilagođeno vrijeme zadržavanja, t'_r je vrijeme potrebno razmatranoj komponenti za dolazak do detektora, a nakon što je pristigao nezadržani sastojak: $t'_r = t_r - t_m$. Visina kromatografske krivulje je h , dok je širina kromatografske krivulje u osnovici w . Širina, w , očitava se na baznoj liniji kao udaljenost između dviju tangenti u infleksijama s obje strane krivulje. Širina kromatografske krivulje na polovici visine, $w_{1/2}$, očitava se kao razmak između tangenti na polovici visine ($1/2h$).^[5]

Važan faktor za optimizaciju kromatografskog odjeljivanja je faktor zadržavanja, k' . Definira se kao omjer vremena koji komponenta provede u nepokretnoj fazi prema vremenu koje provede u pokretnoj fazi:

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

Veći faktor zadržavanja omogućuje bolje odjeljivanje, a vrijednost mu se može povećati povećanjem volumena (odnosno duljine) nepokretne faze. Budući da je potrebno napraviti kompromis između povoljnog odjeljivanja i vremena elucije, prihvatljive su vrijednosti (k') između 1 i 5.^[5]

Za odjeljivanje komponenata smjese nužno je da se one kolonom gibaju različitim brzinama. Omjer njihovih faktora zadržavanja, koji je također jednak omjeru prilagođenih vremena zadržavanja, predstavlja faktor odjeljivanja (naziva se još i faktorom selektivnosti), α :

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

U brojniku je duže zadržavana komponenta B pa je vrijednost (α) uvijek veća od 1.^[5]

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

$$R_s = \frac{2 \times \{t_r(A) - t_r(B)\}}{w_A + w_B}. \quad (3)$$

Za uspješnu analizu R_s -vrijednost mora biti veća od 1,5. Na temelju gornjeg izraza vidljivo je kako boljem razlučivanju pridonose dva faktora: razlika vremena zadržavanja komponenti i širina osnovice kromatografske krivulje.^[5]

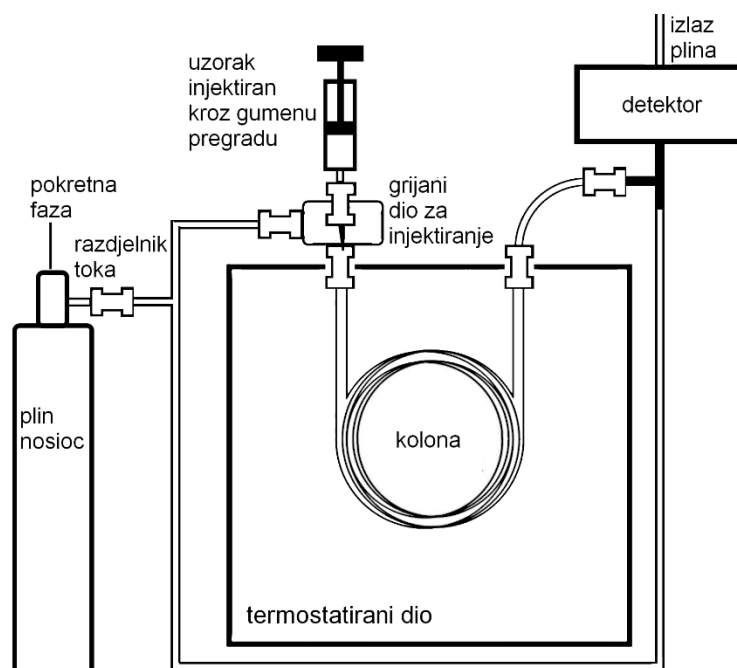
Svako pojedinačno uspostavljanje heterogene ravnoteže pojedine komponente između pokretne i nepokretne faze slikovito se može zamisliti kao teorijski tavan. Dakako, to je virtualni pojam jer kolona fizički ne sadrži tavane. Djelotvornost kromatografske kolone veća je što je veći broj teorijskih tavana, N , i što je manja njegova visina, H :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \text{ i } N = \frac{L}{H}, \quad (4 \text{ i } 5)$$

gdje je L duljina nepokretne faze (punila) u koloni.^[5]

1.2.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) je moderna instrumentna tehnika koja omogućava odjeljivanje komponenata iz vrlo složenih smjesa. Pokretna faza je inertan plin (helij, argon, dušik, ugljikov dioksid) koji vrlo brzo prolazi kroz kolonu što značajno skraćuje vrijeme analize. Kod adsorpcijske kromatografije koristi se čvrsta nepokretna faza. Međutim, češća je razdjelna kromatografija kod koje je nepokretna faza nehlapljiva tekućina nanosena na kruti nosač.^[5,7]



Slika 1.4. Shematski prikaz plinskog kromatografa^[5]

Injektori

Uzorak se, ako već nije plinovit, mora prevesti u plinovito stanje. Kako bi se osiguralo brzo uplinjavanje uzorka, dio za injektiranje grijan je na višu temperaturu (obično 50 °C više od temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente u uzorku), u odnosu na kolonu. Za analizu je dovoljan vrlo mali volumen uzorka (1 mL – 10 mL plinovitog uzorka, 0,1 µL – 1,0 µL tekućeg uzorka).^[5]

Za tekuće uzorke koriste injektori za djelomično (engl. *split*) ili potpuno (engl. *splitless*) unošenje uzorka koji se nalaze u termostatiranom dijelu. Obično se špricom injektira 1 μL uzorka kroz gumenu pregradu (engl. *septum*) koja se nalazi na samom vrhu injektora i sprječava izlazak uzorka i plina nosioca. Kod *split* načina rada, za analizu se uzima samo dio uzorka (ovisno o zadanom omjeru), a ostatak se ispušta jer se s manjom količinom uzorka postiže bolje razlučivanje. Ako je analit u uzorku prisutan u tragovima ($< 0,01\%$), bolje je izabrati *splitless* način rada i analizirati cijeli uzorak. Uzorak koji se raspada iznad svog vrelišta, injektira se izravno na kolonu kako bi se izbjegao prolaz kroz vrući injektor.^[8]

Primjena automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*) omogućava brzu, kontroliranu i ponovljivu isporuku uzorka u kolonu, a postupak rada znatno je olakšan u usporedbi s ručnim injektiranjem.^[9] Većina automatskih uzorkivača, nakon ispiranja igle nekoliko puta u otapalu, uzima zrak, zatim otapalo, potom ponovno zrak pa uzorak i još zraka. Ovom tehnikom uzorkovanja sprječava se mogući gubitak vrlo hlapljivih komponenata, čim igla prođe kroz gumenu pregradu, jer tada u igli još nema uzorka. Zrak služi za izbacivanje otapala, sprječavanje miješanja otapala i uzorka te ispiranje igle od uzorka.^[8]

Razgrađeni uzorak, nehlapljive komponente i ostatci septuma akumuliraju se u staklenom umetku (engl. *liner*) koji se mijenja po potrebi. Gumena bi pregrada, bez staklenog umetka koji zadržava kontaminacije, izdržala svega dvadesetak injektiranja.^[8]

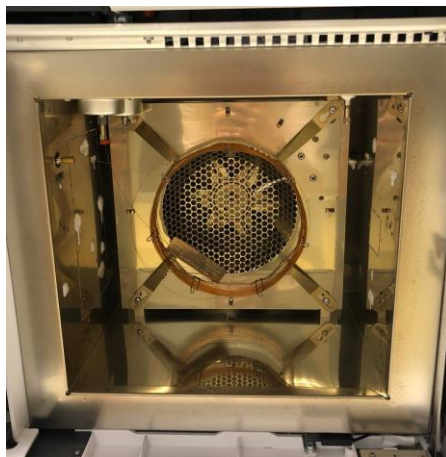


Slika 1.5. Stakleni umetak – *liner*

Kolone

Uzorak, zajedno s pokretnom fazom, zadanom brzinom protoka prolazi kroz kolonu, u kojoj se nalazi nepokretna faza. Na koloni se odvija odjeljivanje komponenti

uzorka. Kolona se nalazi u termostatiranoj peći kako bi se osiguralo plinovito stanje uzorka.^[5] Peć može imati izotermne uvjete ili zadani temperaturni program, što je češći slučaj.^[9] Kako bi se mogla smjestiti u termostatirani prostor, kolona je savijena u svitke promjera oko 15 cm.^[7]



Slika 1.6. Prikaz kapilarne kolone u termostatiranoj peći plinskog kromatografa

Dvije su vrste kromatografskih kolona: punjene i kapilarne.

Punjene kolone (engl. *packed columns*) izrađene od čelika, bakra, aluminijske ili stakla, obično su duljine 2 m – 3 m i unutarnjeg promjera 2 mm – 4 mm. U njima se nalazi inertni nosač (najčešće dijatomejska zemlja) na koji je nanesen tanki sloj (0,05 μm – 1 μm) tekuće nepokretne faze (polimer visokog vrelišta). Druga je mogućnost kolona ispunjena sitnozrnatom čvrstim polimerom koji djeluje kao molekulsko sito.^[7] Čestice krute nepokretne faze mogu biti namočene otapalom pa se u tom slučaju ravnoteža uspostavlja na granici tekućeg i plinovitog.^[6]

Kapilarne kolone (engl. *open-tubular columns*) izrađene su od taljenog kvarca (SiO_2) i izvana obložene slojem poliimida koji osigurava otpornost na visoke temperature. Veće su duljine (15 m – 100 m; obično 30 m) i manjeg unutarnjeg promjera (0,1 mm – 0,53 mm) u odnosu na punjene kolone. Glavne prednosti kapilarnih kolona su bolje razlučivanje, veća osjetljivost i kraće vrijeme analize, ali je nedostatak manji kapacitet uzorka. Nehlapljiva tekućina nanosena je na unutarnju stijenkicu kolone, a debljina sloja nepokretne faze je 0,1 μm – 5 μm .^[8,9]

Razlikuju se tri vrste kapilarnih kolona ovisno o izvedbi nepokretne faze nanese na unutarnju stijenkku kolone:

- sloj tekuće nepokretne faze (engl. *Wall-coated open tubular column*, WCOT)
- čvrsti nosač obložen tekućom nepokretnom fazom (engl. *Support-coated open tubular column*, SCOT)
- čvrsti porozni sloj polimera (engl. *Porous-layer open tubular column*, PLOT).

Kod SCOT i PLOT kolona osigurana je veća dodirna površina nepokretne faze s analitom pa je kapacitet uzorka povećan.^[8]

Detektori

Komponente uzorka koje eluiraju s kolone određuju se na detektoru. Kako bi se spriječila kondenzacija eluiranih komponenti dolaskom na detektor, poput injektora, i detektor je grijan na nešto višu temperaturu nego kolona. Signal s detektora šalje se računalu pomoću kojeg se stvara kromatogram.^[8]

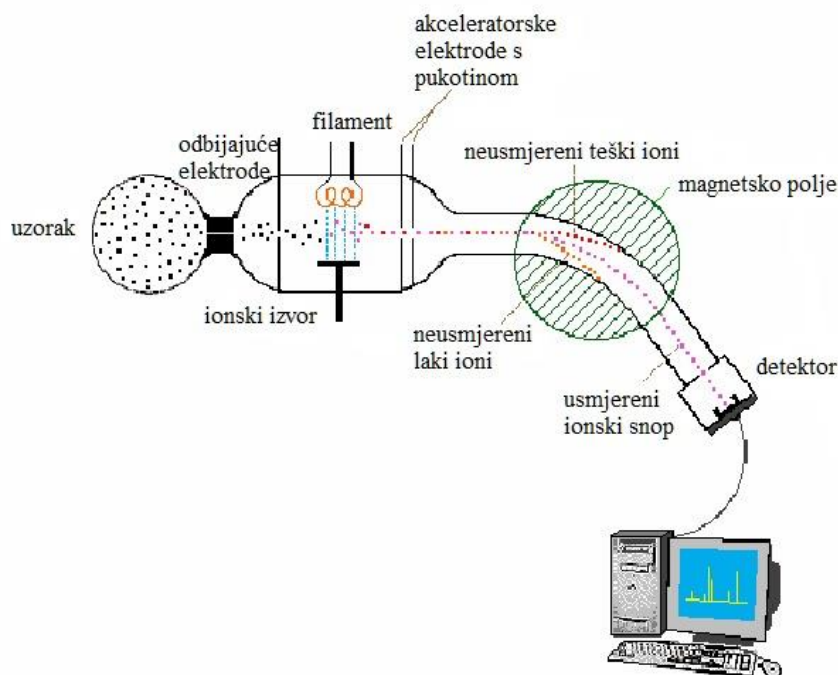
Kvantitativni detektori omogućuju neizravnu identifikaciju odijeljenih komponenti usporedbom izmjerenog vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja standarda čistih tvari. Kvantifikacija je moguća iz površine ispod kromatografske krivulje, koja je proporcionalna koncentraciji analita.^[5] Postoje detektori različite osjetljivosti i selektivnosti koji signaliziraju prisutnost eluirane komponente, a najčešće se koriste: detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD), plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame ionization detector*, FID) i detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron capture detector*, ECD).^[8]

Spektrometar masa (engl. *Mass spectrometer*, MS) i infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transformation infrared spectrophotometer*, FTIR) selektivni su detektori pomoću kojih se može izravno identificirati komponente uzorka.^[8] Mogućnost sprežanja plinske kromatografije s različitim detektorima i automatsko bilježenje signala čine ovu tehniku vrlo popularnom i korisnom u modernoj kemijskoj analizi.^[5]

1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry*, MS) je destruktivna tehnika razbijanja neutralnih molekula na fragmentne ione koji se razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z) te potom kvalitativno i kvantitativno određuju.^[10]

Spektrometar masa se sastoji od ulaznog sustava, ionskog izvora, analizatora masa i detektora. Sustav za uvođenje uzorka mora osigurati uvjete visokog vakuuma koje zahtijeva instrument, kako bi se spriječile moguće kolizije s ostalim molekulama u plinovitoj fazi. Uzorak se ionizira, obično gubitkom jednog elektrona iz molekule, pri čemu nastaje molekulski ion. Zbog velikog suviška energije kojeg prima prilikom ionizacije, molekulski ion sklon je cijepanju na fragmentne ione. Ioni se ubrzavaju pomoću akceleratorских elektroda koje imaju pukotinu za prolaz formiranog ionskog snopa. Prolaskom kroz pukotinu, ionski snop dolazi u dio instrumenta s promjenjivim magnetskim poljem te ioni skreću s putanje ovisno o omjeru mase i naboja. Ione koji su prošli kroz analizator masa, detektor prevodi u mjerljiv signal.^[11]



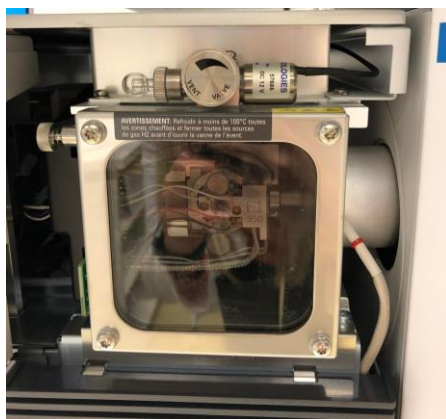
Slika 1.7. Shematski prikaz spektrometra masa

Grafički prikaz ovisnosti intenziteta signala o omjeru mase i naboja se naziva spektar masa. Položaj signala (na apscisi) odgovara m/z vrijednosti iona nastalog ionizacijom, a visina signala (na ordinati) odgovara intenzitetu koji je izravno povezan s količinom tog iona. Najintenzivniji signal naziva se osnovnim signalom i njegov intenzitet dogovoreno je normaliziran kao 100 % relativnog intenziteta. Signal molekuskog iona, odnosno intaktne ionizirane molekule, je signal pri najvećoj m/z vrijednosti, koja predstavlja relativnu molekulsku masu spoja. Iz slike cijepanja molekuskog iona (spektra masa) mogu se dobiti brojne informacije o strukturnim karakteristikama analiziranih spojeva.^[11]

1.3.1. Ionski izvori

Ionski izvori generiraju ione uglavnom ionizacijom molekula analita u plinovitoj fazi. Najčešće se to događa izbijanjem elektrona, zahvatom elektrona, protoniranjem, deprotoniranjem, nastajanjem adukata ili prijenosom nabijene vrste iz kondenzirane u plinovitu fazu. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, koriste se različite vrste ionskih izvora.^[10]

Elektronska ionizacija (engl. *Electron Impact Ionization*, EI), podrazumijeva bombardiranje uzorka udarom snopa elektrona visoke energije (najčešće 70 eV). Ionizacija elektronima često se primjenjuje kod kombinacije spektrometrije masa s plinskom kromatografijom.^[11]



Slika 1.8. Ionizator opremljen elektronskom ionizacijom (EI)

Ionizacija elektronima (EI), kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI) i ionizacija poljem (engl. *field ionization*, FI) ograničene su samo za dovoljno hlapljive i termički stabilne spojeve.^[10]

Za termički labilne spojeve ionizacija se mora izvršiti izravno iz kondenzirane faze. Za ionizaciju analita iz otopine primjenjuje se ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure photoionization*, APPI) te ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray ionization*, TSP).^[10]

Za ionizaciju analita iz krutog stanja potrebno je uvesti matricu, a ioni se desorbiraju s površine ili iz blizine same površine pomoću visokoenergijskih čestica ili fotona. Ovakav način ionizacije koristi se kod laserske ionizacije/desorpcije (engl. *laser desorption/ionization*, LDI), matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI), ionizacije sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS) i desorpcije plazmom (engl. *plasma desorption*, PD). Kod ionizacije bombardiranjem s brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) koristi se nehlapljiva tekuća matrica.^[10]

1.3.2. Analizatori masa

Nakon ionizacije, generirani se ioni moraju moći razdvojiti i odrediti. Analizatori masa razdvajaju ione prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z), a razdvajanje se može temeljiti na različitim principima. U tablici 1.3. prikazani su analizatori masa koji se koriste u spektrometriji masa. Svi analizatori masa koriste zasebna ili kombinirana, statična ili dinamična, električna i magnetna polja, a razlikuju se u načinu korištenja tih polja kako bi se postiglo razdvajanje.^[10]

Kvadrupolni analizator masa i magnetski sektorski analizator masa propuštaju samo ione određenih vrijednosti m/z tijekom zadanog vremena, dok analizatori masa poput IT, TOF, FT-ICR, FT-OR, istovremeno propuštaju sve ione.^[11]

U spregnutoj tehnici GC-MS često se koristi kvadrupolni analizator masa (Q), a prikladan je i analizator masa koji mjeri vrijeme leta (TOF). Kod TOF analizatora masa,

nakon ionizacije, ioni se ubrzavaju i putuju kroz cijev do detektora, a bilježi se vrijeme dolaska iona na detektor. Ioni s manjim vrijednostima m/z brže dolaze do detektora, dok teži ioni (s većim m/z) do detektora dolaze sporije.^[11]

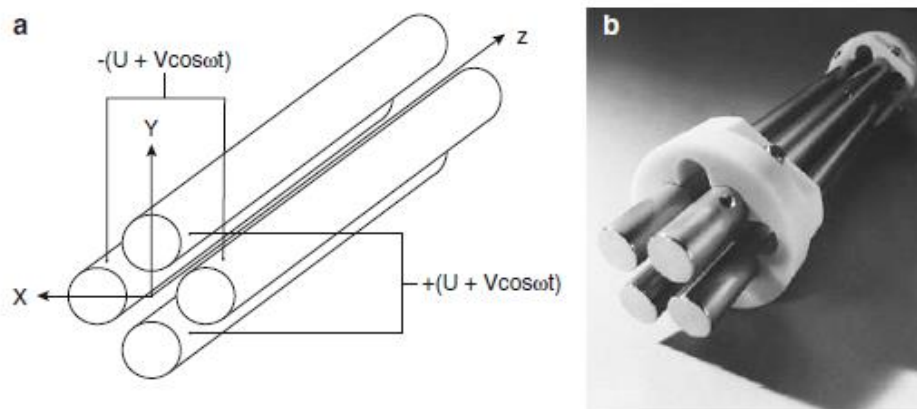
Tablica 1.3. Analizatori masa koji se koriste u spektrometriji masa^[10]

Analizator masa	Oznaka	Princip odjeljivanja
Električni sektorski analizator	E	kinetička energija
Magnetski sektorski analizator	B	magnetski moment
Kvadrupolni analizator (engl. <i>quadrupole</i>)	Q	m/z (stabilnost putanje)
Analizator ionska stupica (engl. <i>ion trap</i>): linearni i trodimenzijski kvadrupolni ^[11]	IT LIT i QIT	m/z (frekvencija rezonancije)
Analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. <i>time of flight</i>)	TOF	brzina (vrijeme leta)
Analizator ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (engl. <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)	FT-ICR	m/z (frekvencija rezonancije)
Orbitalni analizator s Fourierovim transformacijama (engl. <i>Fourier transform orbitrap</i>)	FT-OR	m/z (frekvencija rezonancije)

Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupol se sastoji od četiri paralelno postavljene cilindrične ili hiperbolične elektrode, duljine 15 cm – 25 cm i promjera 10 mm – 20 mm. Na sve četiri elektrode primjenjuje se promjenjiv izmjenični i istosmjerni napon (10^2 V – 10^3 V). Kvadrupol djeluje kao filtar masa i do detektora se propuštaju ioni uskog područja omjera m/z . Ioni putuju između nabijenih elektroda pod utjecajem sile u ravnini kretanja. Samo ioni koji su stabilni s obzirom na m/z omjer ostaju u ravnini i dolaze do detektora. Ostale ione

privlači katoda ili anoda, uklanjaju se i ne dolaze do detektora. Promjenom potencijala postiže se snimanje kroz cijeli spektar masa.^[11]



Slika 1.9. Kvadrupolni analizator masa: shematski prikaz (a) i fotografija (b)^[11]

1.3.3. Tandemska spektrometrija masa

Tandemska spektrometrija masa (MS/MS) podrazumijeva kombinaciju više analizatora masa kako bi se omogućilo snimanje višestrukih fragmentacija. Moguće je povezivanje istih analizatora masa (npr. trostruki kvadrupol, QqQ) ili različitih analizatora masa (hibridni instrument, npr. vezani kvadrupol i analizator koji mjeri vrijeme leta, Q-TOF).^[10]

Tandemskom spektrometrijom masa ion određene vrijednosti m/z podvrgava se dodatnoj analizi. Ovisno o ukupnom broju fragmentacija (2, 3, ..., n) razlikuju se MS^2 , MS^3 i općenito MS^n eksperimenti. Disocijacija iona koji se gibaju kroz spektrometar masa može se dogoditi spontano ili izazvati kolizijom s molekulama kolizijskog plina. Iako su sudari iona s atomima ili molekulama neutralnog plina proturječni uvjetima visokog vakuuma, instrumenti se nadograđuju kako bi se mogle proizvesti fragmentacije iona koji bi inače bili stabilni.^[11]

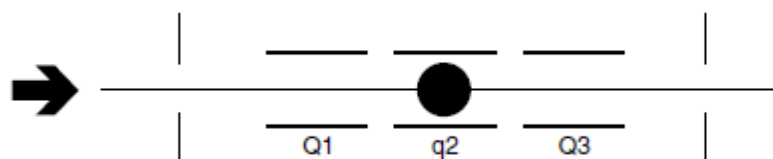
Kolizijom inducirane disocijacije (engl. *Collision-induced dissociation*, CID) korisne su za razjašnjavanje strukture iona niske unutarnje energije. Provede se usmjeravanjem struje iona u kolizijsku ćeliju u koju se uvodi struja inertnog plina

(dušik, helij, argon) pod tlakom većim od tlaka visokog vakuuma koji okružuje tu kolizijsku ćeliju. Kolizijom izazvane disocijacije razlikuju se prema količini dovedene energije. Niskoenergijske kolizije (1 eV – 100 eV) primjenjuju se kod instrumenata koji kao analizator masa imaju kvadrupole ili ionske stupice. Kod instrumenata s magnetskim analizatorima masa ili TOF analizatorima, kolizije su visokoenergijske (nekoliko keV).^[11]

Dvije su osnovne instrumentne izvedbe tandemске spektrometrije masa: u prostoru i u vremenu. Tandemska spektrometrija masa u prostoru zahtjeva povezivanje dvaju analizatora masa za dva koraka analize. U prvom analizatoru masa odabiru se ioni, koji potom disociraju u središnjem dijelu instrumenta, a u drugi analizator masa uvode se nastali produkti. Osim analize fragmentnog iona (tj. iona produkta), moguća je analiza iona prekursora ili analiza gubitka neutralne molekule. Primjer ovakve izvedbe je spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (QqQ). Kod tandemске spektrometrije masa u vremenu dovoljan je jedan analizator masa u kojem se sekvencijalno u vremenu odvija odabir iona, disocijacija i analiza produkta. Primjere ovog pristupa nalazimo kod analizatora masa na principu ionske stupice koji omogućavaju provođenje fragmentacija viših redova na istom dijelu instrumenta, ali je moguća samo analiza iona produkta.^[11]

Trostruki kvadrupol

Trostruki kvadrupol (engl. *triple quadrupole*, QqQ) je tandemski analizator masa koji se sastoji od tri serijski povezana kvadrupola. Prvi kvadrupol (Q1) i treći kvadrupol (Q3) standardni su analizatori masa, dok je centralni kvadrupol (q) kolizijska ćelija na koju se primjenjuje samo izmjenični napon i protok kolizijskog plina.^[10]



Slika 1.10. Shema trostrukog kvadrupola; Q = analizator masa, q = kolizijska ćelija^[10]

Trostruki kvadrupolni analizator masa omogućava praćenje odabranih iona na različite načine: analiza iona produkta (engl. *product ion*), analiza iona prekursora (engl. *precursor ion*) ili analiza gubitka neutralne molekule (engl. *neutral loss*).^[10,12]

- U analizi iona produkta, u prvom kvadrupolu odabire se ion točno određene vrijednosti m/z koji u centralnom kvadrupolu disocira prilikom sudara s molekulama kolizijskog plina, a nastali produkti snimaju se u trećem kvadrupolu.
- U analizi iona prekursora, u trećem kvadrupolu odabere se ion točno određene vrijednosti m/z , a u prvom kvadrupolu detektiraju se svi ioni koji, disocijacijom u kolizijskoj ćeliji, rezultiraju odabranim ionom.
- Kod analize neutralnog gubitka, u prvom kvadrupolu snima se ion ($m/z = x$), a u trećem kvadrupolu snima se ion ($m/z = x - a$) umanjen zbog gubitka neutralne molekule nakon kolizijski inducirane disocijacije.

Trostrukim kvadrupolom također je moguće praćenje specifičnih reakcija prijelaza. U prvom kvadrupolu odabere se ion prekursor (određene vrijednosti $m/z = a$), a u trećem kvadrupolu odabere se samo traženi ion produkt (određene vrijednosti $m/z = b$) koji nastaje nakon sudara s kolizijskim plinom.^[10,12]

Tablica 1.4. Usporedba različitih mogućnosti snimanja korištenjem trostrukog kvadrupola: Q = analizator masa, q = kolizijska ćelija^[12]

Q1	q	Q2	Rezultat
odabrani m/z	plin	snimljeno	Ion produkt
snimljeno	plin	odabrani m/z	Ion prekursor
snimljeno $m/z = x$	plin	snimljeno $m/z = x - a$	Neutralni gubitak
odabrani m/z	plin	odabrani m/z	Specifična reakcija prijelaza

1.4. Vrednovanje analitičke metode

Cilj vrednovanja analitičke metode je pokazati da je ista prikladna za svrhu kojoj je namijenjena. Vrednovanje ili validacija je neophodno za sve analitičke metode, a složenost procesa vrednovanja ovisi o vrsti analitičkog postupka. Za određivanje odabranih izotiocijanata korištena je sofisticirana tehnika GC-MS/MS koja se u pravilu koristi za analizu složenijih uzoraka. Stoga je važno pokazati da razvijena metoda radi u skladu s očekivanjima i daje pouzdane rezultate.^[13,14]

Važnost vrednovanja dovela je do kreiranja različitih smjernica s uputama za vrednovanje analitičkih metoda. Iako postoji opća suglasnost oko parametara koje treba ocijeniti, različite smjernice predlažu različite metodologije i različite kriterije prihvaćanja dobivenih rezultata.^[14] Prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH), kao najvažniji parametri vrednovanja navode se: točnost, preciznost (ponovljivost, srednja preciznost, obnovljivost), specifičnost, linearnost, granica dokazivanja, granica određivanja, raspon i robusnost. Ovisno o metodi, nije uvijek potrebno ispitati sve parametre.^[13]

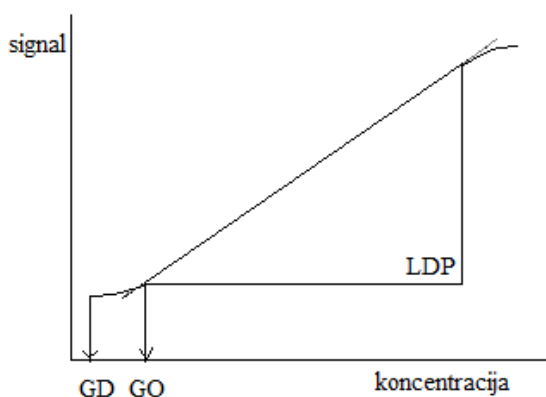
Točnost prikazuje stupanj podudaranja mjerene vrijednosti s pravom ili očekivanom vrijednosti, a izražava se kao apsolutna, odnosno relativna pogreška.^[5]

Preciznost opisuje slaganje između dvaju ili više rezultata mjerenja izvedenih na potpuno isti način. Izražava se standardnim odstupanjem, varijancom ili relativnim standardnim odstupanjem.^[5] Preciznost se može promatrati kroz tri razine: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. **Ponovljivost** izražava preciznost pod istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom periodu. **Srednja preciznost** izražava varijacije unutar laboratorija (drugi analitičar, korištenje druge opreme, provedba analize drugi dan). **Obnovljivost** izražava preciznost između različitih laboratorija.^[13]

Specifičnost je sposobnost određivanja analita u prisutnosti drugih komponenti koje se mogu naći u uzorku.^[13]

Linearnost je sposobnost metode da u određenom području koncentracija daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.^[13]

Linearno dinamičko područje (LDP) je područje koncentracija u kojem analitički signal linearno raste s porastom koncentracije. Donja granica LDP-a je granica određivanja (GO), dok je gornja granica LDP-a koncentracija za koju vrijedi: $S - S' \leq 0,03 \times S$, gdje je S očekivani signal, a S' dobiveni signal.^[6]



Slika 1.11. Prikaz linearnog dinamičkog područja^[6]

Linearni dio krivulje umjeravanja predstavlja grafički prikaz linearne ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji. Nagib linearnog dijela krivulje umjeravanja izražava osjetljivost, a metoda je osjetljiva ako mala promjena koncentracije analita uzrokuje značajnu promjenu signala. Selektivnost je odnos osjetljivosti za različite komponente u uzorku. Metoda je visokoselektivna, odnosno specifična ako za samo jedan analit signal raste s koncentracijom, dok ostale komponente uzorka ne utječu na taj signal.^[6]

Granica dokazivanja (GD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, a da pritom nije moguća točna kvantifikacija.^[15]

Granica određivanja (GO) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću točnost i preciznost.^[15]

Raspon je interval između najniže i najviše koncentracije analita u uzorku (uključujući te koncentracije) za koje je dokazano da analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost.^[13]

Robusnost je svojstvo metode kojim izražavamo otpornost iste prema utjecaju malih, namjernih promjena u parametrima mjerenja a da pritom ostane pouzdana tijekom uobičajene primjene.^[13]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištene kemikalije i oprema

Tablica 2.1. Korištene kemikalije

Naziv	Sažeta strukturna formula	Relativna molekulska masa	CAS broj	Proizvođač	Čistoća
2-MOPITC ¹	CH ₃ OC ₆ H ₄ NCS	165,21	3288-04-8	Sigma-	98 %
3-MOPITC ²			3125-64-2	Aldrich	
4-MOPITC ³			2284-20-0	Njemačka	
n-heksan	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	86,18	110-54-3	BDH Prolabo UK	≥ 97 %



Slika 2.1. 2-, 3-, i 4-Metoksifenil-izotiocijanat te n-heksan korišteni za pripremu standardnih otopina

¹ 2-metoksifenil-izotiocijanat

² 3-metoksifenil-izotiocijanat

³ 4-metoksifenil-izotiocijanat

Popis korištene opreme:

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



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

2.2. Identifikacija odabranih izotiocijanata

Uzorci za analizu pripremljeni su otapanjem 100 μL pojedinog metoksifenil-izotiocijanata (MOPITC) u 1 mL heksana (10 % (v/v)). Pojedinačni uzorci 2-, 3- i 4-MOPITC-a injektirani su automatskim uzorkivačem u plinski kromatograf spregnut s tandemskim spektrometrom masa (GC-MS/MS), a analizator masa je trostruki kvadrupol (TQ, QqQ). Prvi kvadrupol snima sve fragmentne ione, dok kolizijska ćelija i treći kvadrupol samo propuštaju ione do detektora. Korištena je modificirana metoda koju je razvio R. P. Adams, a koja se vrlo često koristi i u analizi komponenti eteričnih ulja.^[16]

Radni uvjeti plinskog kromatografa:

- plin nosioc: helij
- protok plina nosioca: 1 mL min⁻¹
- temperatura injekcijskog bloka (engl. *inlet*): 250 °C
- volumen injektiranog uzorka: 1 μL
- omjer raspodjele (engl. *split mode*): 50 : 1
- početna temperatura peći: 60 °C, izotermno zadržana 2 min
- brzina povećanja temperature: 3 °C min⁻¹
- konačna temperatura peći: 246 °C, izotermno zadržana 25 min
- temperatura „*transfer line*“: 280 °C
- trajanje mjerenja: 89 min.

Radni uvjeti spektrometra masa:

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

Za svaki spoj zabilježen je kromatogram na kojem najveći signal, pri vremenu zadržavanja od oko 27 minuta, odgovara MOPITC-u. Za svaki MOPITC snimljen je i spektar masa. Eksperimentalno dobiveni spektri masa uspoređeni su sa spektrima masa dostupnim u bazama podataka: Wiley (engl. *The Wiley Registry of Mass Spectral Data*) i NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology*). Na taj način identificirani su i potvrđeni odabrani izotiocijanati te su odabrani početni ioni koji će se koristiti u daljnjoj analizi.

2.3. Analiza smjese odabranih izotiocijanata

Smjesa 2-, 3- i 4-MOPITC-a pripravljena je od po 300 μL pojedine 10 % (v/v) otopine u heksanu te je dodano još 400 μL heksana ($V_{\text{uk}} = 1,0 \text{ mL}$). Pripravljena smjesa odabranih izotiocijanata analizirana je na GC-MS/MS-u. Za odjeljivanje izotiocijanata iz smjese korištena je nepolarna kapilarna kolona HP-5MS (Agilent Technologies, SAD) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine nepokretne faze ((5 % fenil)-metilpolisiloksan) 0,25 μm . Temperaturni raspon u kojem se ova kolona smije koristiti je od $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ do $325/350 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brzina povećanja temperature termostetiranog prostora („peći“) u kojoj se nalazi kolona je optimizirana, dok ostali radni uvjeti plinskog kromatografa i spektrometra masa nisu mijenjani (Poglavlje 2.2.).

Temperaturni program plinskog kromatografa:

- početna temperatura peći: $60 \text{ }^\circ\text{C}$
- izotermno zadržavanje 1: 3 min
- brzina povećanja temperature: $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ i $50 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$
- konačna temperatura peći: $246 \text{ }^\circ\text{C}$
- izotermno zadržavanje 2: 3 min.

2.4. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona s dušikom

Na temelju snimljenih spektara masa za svaki spoj odabrana su dva do tri signala (fragmenta, engl. *fragment ions*) s najvećim odzivom prema detektoru. Odabrani signali odgovaraju početnim ionima (prekursori, engl. *precursor ions*) koji se podvrgavaju disocijaciji. Disocijacija iona koji se gibaju kroz spektrometar masa namjerno se izaziva kolizijom s neutralnim molekulama inertnog plina dušika. Prvi kvadrupol spektrometra masa propušta samo odabrani ion prekursor koji u kolizijskoj ćeliji disocira nakon sudara s dušikom, a treći kvadrupol snima sve ione produkte te disocijacije (engl. *Full Scan Product Ion*).^[12]

Fragmentni ioni koji nastaju nakon sraza početnog iona s dušikom snimani su pri četiri različite energije sraza: 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV. Uvidom u spektre masa snimljene pri različitim energijama sraza s dušikom tražene su specifične reakcije prijelaza, odnosno fragmentacije.

2.5. Praćenje specifičnih reakcija prijelaza

Specifična reakcija prijelaza prati se tako što prvi kvadrupol spektrometra masa propušta samo odabrani ion prekursor koji u kolizijskoj ćeliji disocira nakon sudara s dušikom, a treći kvadrupol do detektora propušta samo odabrani ion produkt (engl. *Multiple/Selected Reaction Monitoring, MRM/SRM*).^[12]

Specifične reakcije prijelaza, odnosno fragmentiranja iona za svaki se spoj prate pri 30 različitih energija sraza s dušikom: 2 eV, 4 eV, 6 eV, ... , 58 eV, 60 eV. Cilj je za svaku specifičnu reakciju prijelaza optimizirati energiju sraza s dušikom, odnosno pronaći energiju sraza pri kojoj je za pojedinu reakciju fragmentacije odziv detektora najveći.

Sljedeći korak je istovremeno praćenje više različitih specifičnih reakcija prijelaza pri optimiziranim energijama sraza s dušikom. Uvidom u spektre masa za svaki je spoj određen prijelaz koji ima najveći odziv prema detektoru te će se koristiti kao kvantitativni prijelaz, dok ostali prijelazi s relevantnim odzivom prema detektoru

služe kao kvalitativni, odnosno potvrdni. U konačnici su za svaki spoj izabrana tri prijelaza, kvantitativni i dva kvalitativna. Smjernice zahtijevaju te se u praksi koriste kvantitativni i najmanje jedan potvrdni prijelaz.^[14,17,18]

Kod MRM snimanja smjese koja sadrži sva tri izotiocijanata korištena su dva vremenska segmenta. U prvom segmentu, od treće minute, praćeno je ukupno šest reakcija prijelaza koji pripadaju 3-MOPITC-u i 2-MOPITC-u. Ovi spojevi prije eluiraju s kolone te imaju bliske vrijednosti vremena zadržavanja (engl. *Retention time*, t_r). U drugom segmentu, nakon 9,9 minuta, praćena su tri prijelaza 4-MOPITC-a ($t_r = 9,982$ min).

2.6. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja

Otopalo korišteno za pripremu radnih otopina standarda je n-heksan, hlapljiva tekućina, vrelišta 69 °C.^[19] Kod pipetiranja hlapljivih tekućina uobičajeno je kapanje tekućine s vrha pipete, uzrokovano visokim tlakom pare tekućine, zbog čega dolazi do isparavanja i ekspanzije pare iznad tekućine.^[20]

Na primjeru pripreme otopina 2-MOPITC-a, koncentracija 0,05 mg mL⁻¹ – 2,0 mg mL⁻¹, istražena su četiri načina pripreme otopina, različitim pipetama i tehnikama pipetiranja, kako bi se odabrao optimalan način rada uz koji će analitička pogreška biti najmanja.

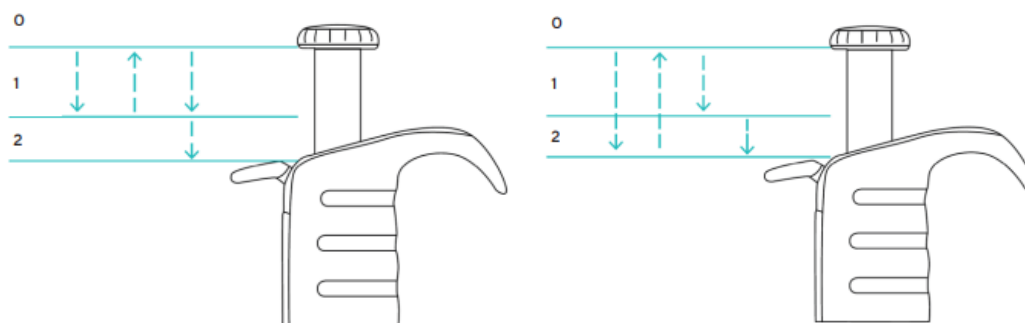
Prvi set otopina pripremljen je na način da se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL, izravno na analitičkoj vagi, doda odgovarajući volumen standarda 2-MOPITC-a (procijenjen na temelju gustoće) kako bi se dobila približno željena masena koncentracija. U odmjernu tikvicu dodan je heksan do oznake. Na temelju izvagane mase 2-MOPITC-a izračunana je točna masena koncentracija svake otopine u ovom području koncentracija. Na ovaj način pripremljena je i početna otopina u odmjernoj tikvici koja je kasnije korištena za razrjeđenja do željenih koncentracija različitim tehnikama pipetiranja.

Drugi set otopina pripremljen je razrjeđenjem početne pripremljene otopine, izravno u bočice na ukupni volumen od 1,0 mL, koristeći pipete na principu pozitivno istisnutog volumena (engl. *positive displacement pipettes*, Pos-D). Klasične pipete imaju klip koji istiskuje zrak, a nalazi se unutar tijela pipete, dok se kod pipeta s pozitivnim pomakom klip nalazi u plastičnim nastavcima. Na slici 2.3. vidljiv je klip u plastičnom nastavku Pos-D pipete. U pipetama za istiskivanje zraka između klipa i tekućine ostaje određeni volumen zraka, dok je kod pipeta s pozitivnim pomakom klip u izravnom kontaktu s tekućinom pa fizička svojstva tekućine ne utječu na točnost odabranog volumena.^[21]



Slika 2.3. Mehaničke pipete Tacta (Sartorius, Njemačka) i pipete na principu pozitivno istisnutog volumena Pos-D (Mettler Toledo, SAD)

Treći set otopina pripremljen je u skladu s preporukom proizvođača korištene mehaničke pipete. Kako bi se izbjeglo kapanje, kod pipetiranja hlapljivih tekućina, preporuča se minimalno pet puta isprati vrh (plastični nastavak) kako bi se pipeta zasitila parama tekućine (engl. *pre-wetting*). Kod pipetiranja manjih volumena broj ispiranja trebao bi biti manji. Otopine su pripremljene razrjeđenjem početne otopine izravno u bočice na ukupni volumen od 1,0 mL te je *pre-wetting* ponovljen tri puta. Korištena je tehnika obrnutog pipetiranja (engl. *reverse pipetting*). Na ovaj način eliminira se utjecaj preostalog isparavanja na odabrani volumen, budući da tekućina koja kapa sada „izlazi iz viška“ i nema gubitaka u pipetiranju.^[20]



Slika 2.4. Usporedba klasičnog pipetiranja (lijevo) i tehnike obrnutog pipetiranja (desno)^[20]

Četvrti set otopina pripremljen je klasičnom tehnikom pipetiranja (engl. *forward pipetting*) i bez *pre-wetting*-a, ali vodeći računa o svim faktorima koji utječu na uspješnost pipetiranja. Pipetu je potrebno postaviti vertikalno, uroniti dovoljno, ali ne preduboku u tekućinu, a tekućinu ispustiti pod kutom od 20° – 45° u odnosu na stijenke. Sve otopine pripremljene su razrjeđenjem početne otopine, ali u odmjernim tikvicama na ukupni volumen od 10,0 mL.

Uzete su u obzir preporučene tehnike za pipetiranje hlapljivih tekućina te su se sva četiri načina pripreme radnih otopina standarda pokazala prihvatljivima, a za daljnji rad odabran je četvrti način. Usporedba različitih načina pripreme otopina i razlog odabira četvrtog načina bit će objašnjeni u poglavlju 3.1.4. Pripravljeno je još jedno ponavljanje otopina 2-MOPITC-a te po dva ponavljanja otopina 3-MOPITC-a i 4-MOPITC-a, koncentracija 0,05 mg mL⁻¹ – 2,0 mg mL⁻¹ (50 µg mL⁻¹ – 2 000 µg mL⁻¹).

Nadalje su pripremljene otopine, tj. smjese 2-, 3- i 4-MOPITC-a, znatno nižih koncentracija. Za područje koncentracija 0,01 µg mL⁻¹ – 5,0 µg mL⁻¹ početna smjesa, koncentracije 5,0 µg mL⁻¹, pripremljena je od po 1,0 mL otopine svakog MOPITC-a, koncentracije 50 µg mL⁻¹, u odmjernoj tikvici od 10,0 mL. Otopine nižih koncentracija pripremljene su razrjeđenjem početne otopine izravno u bočice na ukupni volumen od 1,0 mL.

Otopine koncentracija nižih od 0,25 µg mL⁻¹ imale su prenizak odziv prema detektoru (omjer signala i šuma, engl. *signal to noise ratio*, S/N < 3)^[13] pa je kao novo područje koncentracija odabrano 0,25 µg mL⁻¹ – 20,0 µg mL⁻¹. Početna smjesa, koncentracije 20,0 µg mL⁻¹, pripremljena je od po 800 µL otopine svakog MOPITC-a,

koncentracije $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, u odmjernej tikvici od $10,0 \text{ mL}$. Otopine nižih koncentracija pripremljene su razrjeđenjem početne otopine izravno u bočice na ukupni volumen od $1,0 \text{ mL}$.

U konačnici za izradu krivulje umjeravanja odabrano je osam otopina u području koncentracija $2,5 \mu\text{g mL}^{-1} - 20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, a odabir najprikladnijeg koncentracijskog raspona bit će objašnjen u poglavlju 3.1.5. Pripremljena je početna smjesa, koncentracije $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ te je razrijeđena na $17,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, izravno u bočice na ukupni volumen od $1,0 \text{ mL}$, uz tri ponavljanja (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Prikaz svih pripremljenih otopina za GC-MS/MS mjerenja

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE

3.1.1. Spektri masa odabranih izotiocijanata

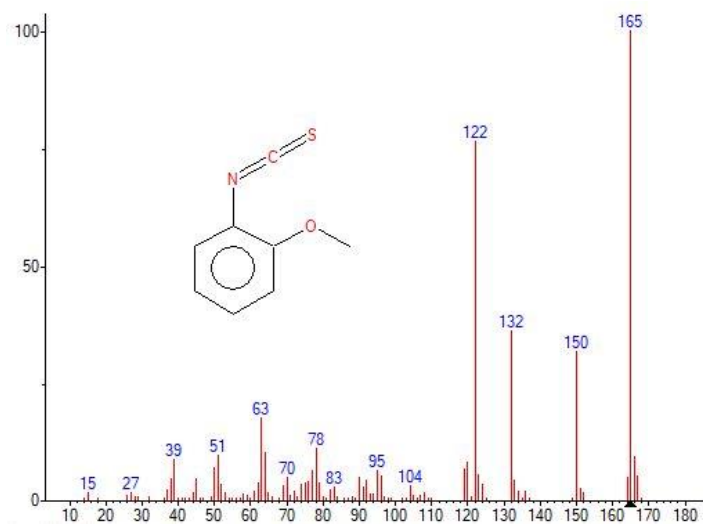
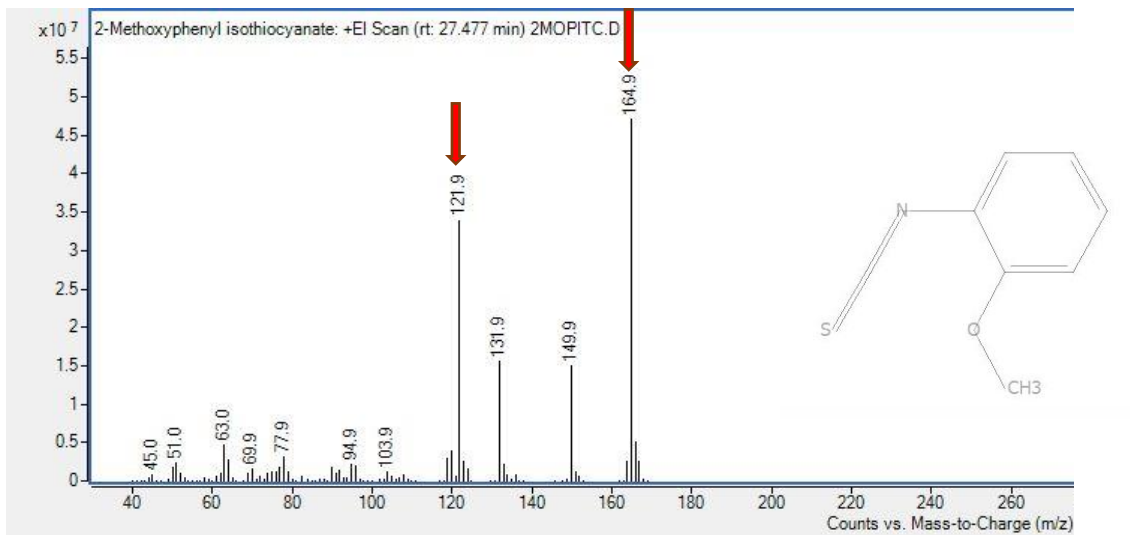
Odabrani izotiocijanati identificirani su usporedbom snimljenih spektara masa sa spektrima masa iz baza podataka. Slike 3.1., 3.2. i 3.3. prikazuju podudaranje eksperimentalnih i teorijskih spektara masa te potvrđuju da su odabrani spojevi: 2-metoksifenil-izotiocijanat (2-MOPITC), 3-metoksifenil-izotiocijanat (3-MOPITC) i 4-metoksifenil-izotiocijanat (4-MOPITC).

Ova tri spoja strukturni su izomeri iste molekulske formule (C_8H_7NOS , $M_r = 165,21$), a razlikuju se po položaju metoksi skupine ($-OCH_3$) na aromatskoj jezgri benzena (orto, meta i para u odnosu na $-N=C=S$ skupinu). Budući da su spojevi stabilizirani rezonancijom, signal molekuskog iona, $m/z = 165$, ujedno je i osnovni signal za sva tri spoja. Međutim, različit položaj supstituenta na prstenu utječe na cijepanje molekuskog iona pa se spektri masa ova tri izotiocijanata razlikuju s obzirom na prisutnost i intenzitet pojedinih fragmentnih iona. Za svaki izotiocijanat odabrani su karakteristični fragmentni ioni (kojima odgovaraju signali visokog intenziteta) koji će se koristiti u daljnjoj analizi.

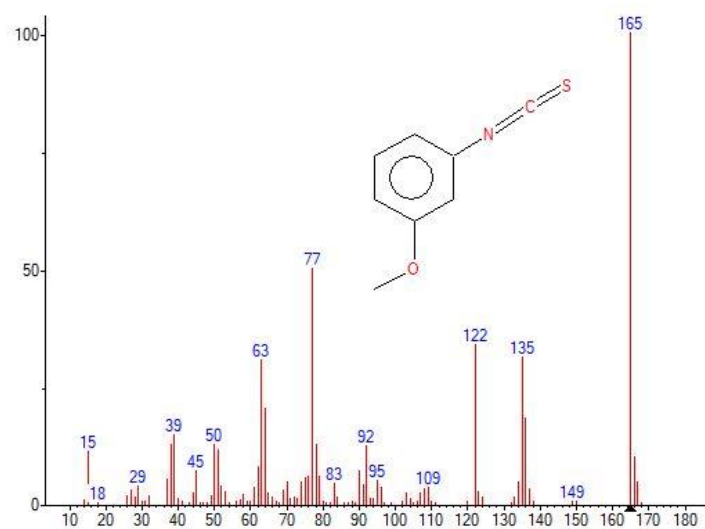
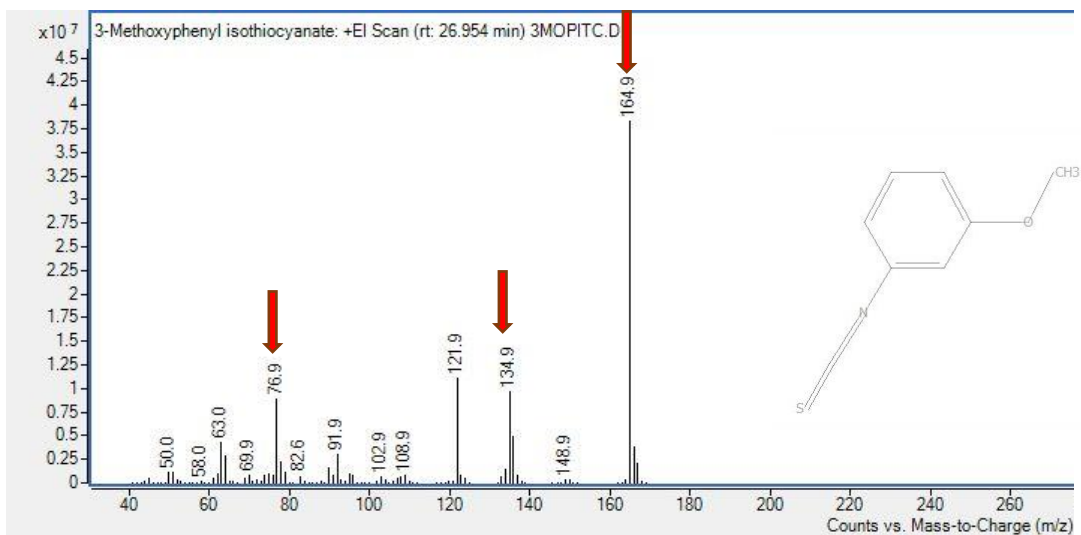
Osim molekuskog iona, $m/z = 165$ (za sva tri spoja), odabrani su:

- $m/z = 122$ (za 2-MOPITC),
- $m/z = 77$ i $m/z = 135$ (za 3-MOPITC),
- $m/z = 150$ (za 4-MOPITC).

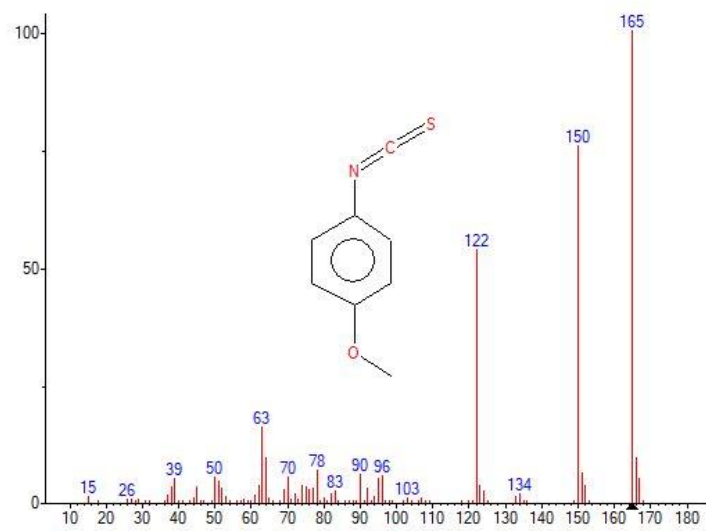
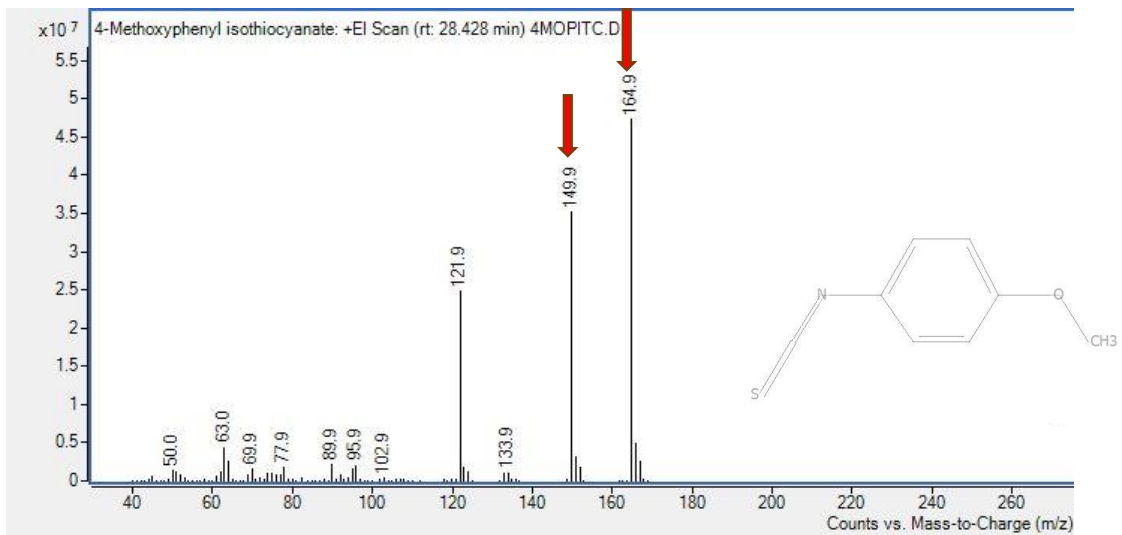
Signal molekuskog iona pri neparnoj m/z vrijednosti potvrđuje prisutnost dušika u molekulama, a signal odvojen za dvije m/z jedinice ($m/z = 167$), intenziteta 4 % u odnosu na intenzitet signala molekuskog iona, potvrđuje prisutnost sumpora u molekulama.



Slika 3.1. Usporedba eksperimentalno snimljenog spektra masa (gore) i spektra masa iz NIST baze podataka (dolje) za 2-MOPITC



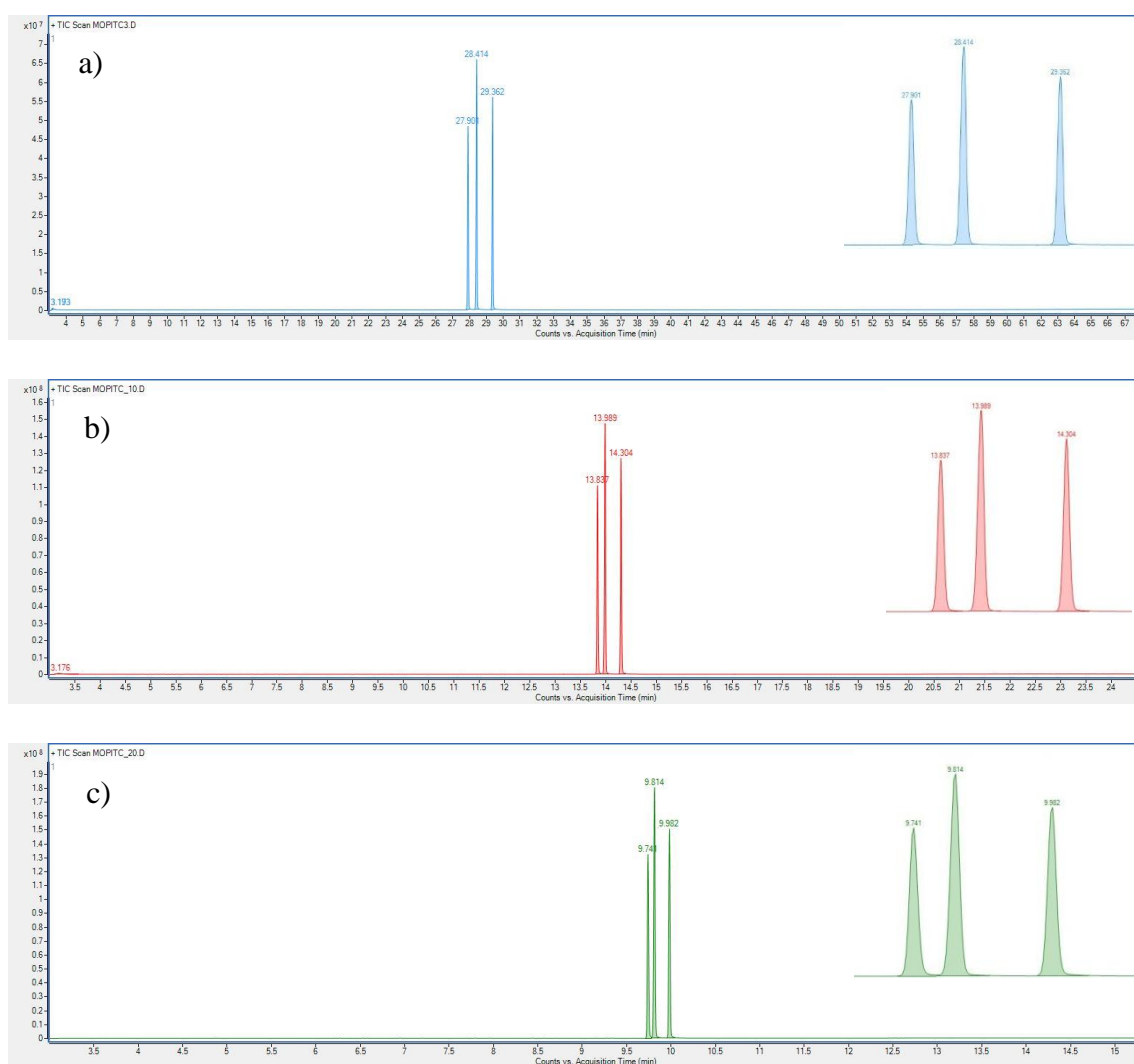
Slika 3.2. Usporedba eksperimentalno snimljenog spektra masa (gore) i spektra masa iz NIST baze podataka (dolje) za 3-MOPITC



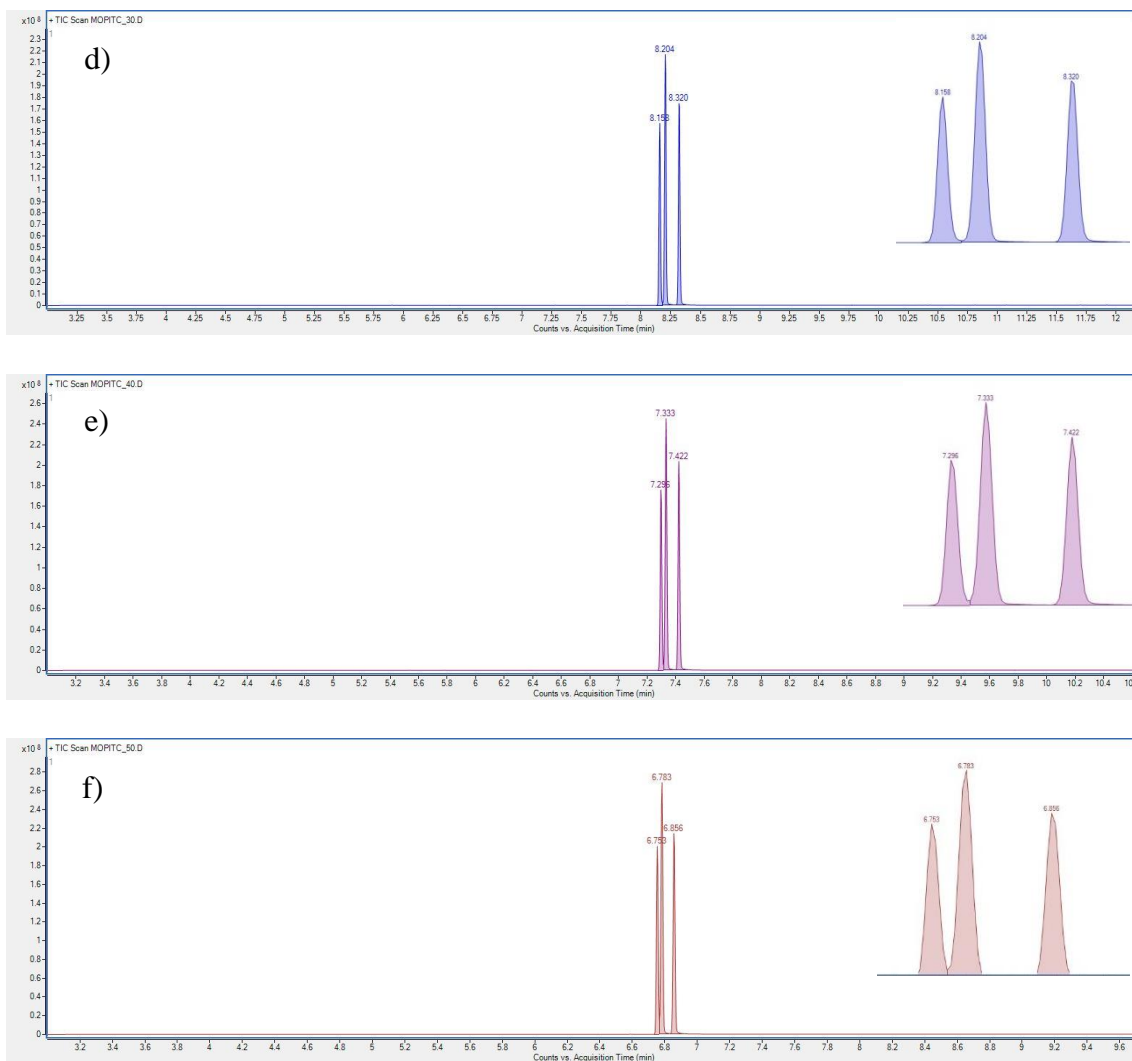
Slika 3.3. Usporedba eksperimentalno snimljenog spektra masa (gore) i spektra masa iz NIST baze podataka (dolje) za 4-MOPITC

3.1.2. Optimizacija plinske kromatografije promjenom brzine povećanja temperature

Cilj optimizacije plinske kromatografije je odabrati brzinu povećanja temperature peći koja omogućava razdvajanje komponenti smjese uz što kraće vrijeme trajanja analize. Na slici 3.4. prikazani su kromatogrami smjese 2-, 3- i 4-MOPITC-a pri šest različitih brzina povećanja temperature peći, dok su u tablici 3.1. vremena zadržavanja izražena u minutama.



Slika 3.4. Kromatogrami smjese 2-, 3- i 4-MOPITC pri: a) 3 °C min⁻¹, b) 10 °C min⁻¹ i c) 20 °C min⁻¹



Slika 3.4. (nastavak) Kromatogrami smjese 2-, 3- i 4-MOPITC pri: d) 30 °C min⁻¹, e) 40 °C min⁻¹ i f) 50 °C min⁻¹

Tablica 3.1. Vremena zadržavanja za sva tri spoja pri različitim brzinama povećanja temperature peći

Brzina povećanja temperature peći [°C min⁻¹]	3	10	20	30	40	50
Spoj	Vrijeme zadržavanja [min]					
2-MOPITC	28,414	13,989	9,814	8,204	7,333	6,783
3-MOPITC	27,901	13,837	9,741	8,158	7,296	6,753
4-MOPITC	29,362	14,304	9,982	8,320	7,422	6,856

Prvi s kolone eluira 3-MOPITC, dok se na koloni najdulje zadržava 4-MOPITC (koji ujedno ima i najviše vrelište). Iz kromatograma smjese 2-, 3- i 4-MOPITC-a (Slika 3.4.) vidljivo je da se 4-MOPITC može uspješno odijeliti iz smjese pri svih šest ispitivanih brzina povećanja temperature peći. Međutim, signali 2-MOPITC-a i 3-MOPITC-a preklapaju se kod većih brzina povećanja temperature peći.

Sposobnost kolone da razdvoji komponente smjese kvantitativno se može izraziti kao razlučivanje, R_S . R_S -vrijednost računa se prema izrazu (3) koji je opisan u poglavlju 1.2.2. Za računanje R_S -vrijednosti (Prilog 1.) korištena su vremena zadržavanja iz tablice 3.1., a širine osnovice kromatografske krivulje izmjerene su na slici 3.4. Kvantitativna mjera odjeljivanja 3-MOPITC-a i 2-MOPITC-a je $R_S(1)$, dok je kvantitativna mjera odjeljivanja 2-MOPITC-a i 4-MOPITC-a je $R_S(2)$.

Tablica 3.2. prikazuje kako veća brzina povećanja temperature peći skraćuje trajanje mjerenja, ali se smanjuje i sposobnost odjeljivanja komponenti smjese.

Tablica 3.2. Utjecaj promjene brzine povećanja temperature peći na vrijeme trajanja analize i sposobnost razdvajanja komponenti smjese

Brzina povećanja temperature peći [°C min ⁻¹]	Vrijeme trajanja mjerenja [min]	Razdvajanje komponenti smjese	
		$R_S(1)$	$R_S(2)$
3	68,0	4,10	7,58
10	24,6	2,71	5,63
20	15,3	2,35	5,42
30	12,2	1,02	2,58
40	10,65	0,97	2,34
50	9,72	0,91	2,21

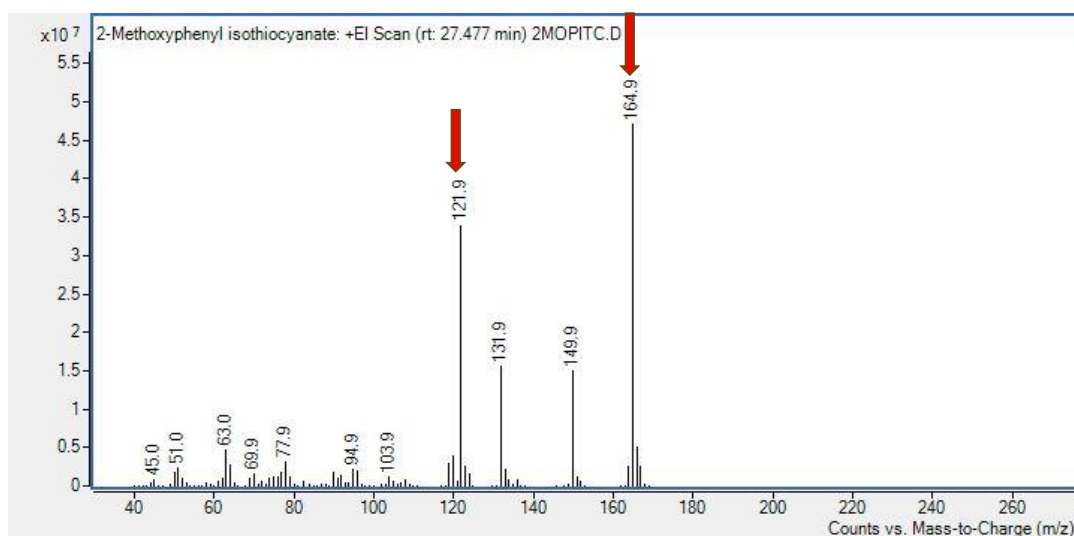
Odjeljivanje je najefikasnije pri brzini od 3 °C min⁻¹, ali je takva analiza izuzetno spora. Povećanjem brzine na 10 °C min⁻¹ osigurana je znatna ušteda vremena, a zadržana dobra sposobnost odjeljivanja. Kao optimalna vrijednost brzine odabrana je 20 °C min⁻¹, što osigurava prihvatljivo razdvajanje komponenti smjese ($R_S > 1,5$) u 15-ak minuta koliko traje mjerenje. Kod brzina od 30 °C min⁻¹, 40 °C min⁻¹ i

50 °C min⁻¹ odjeljivanje je upitno ($R_s(1) < 1,5$), a daljnje skraćivanje vremena mjerenja nije značajno. Izračunane vrijednosti $R_s(2) > 1,5$ potvrđuju uspješno odjeljivanje 4-MOPITC-a iz smjese pri svih šest ispitivanih brzina povećanja temperature peći.

3.1.3. Optimizacija energije sraza s dušikom

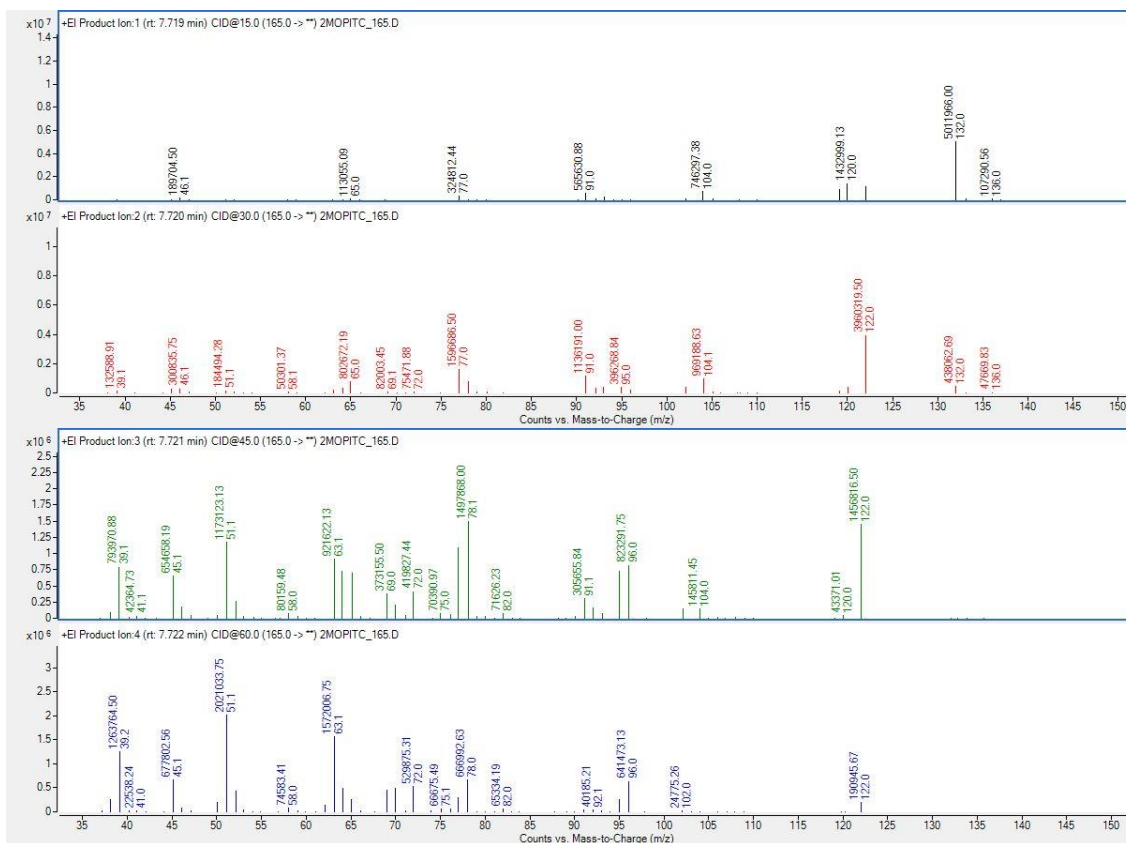
Na primjeru 2-MOPITC-a prikazan je postupak optimizacije spektrometrije masa promjenom energije sraza s dušikom te postupak određivanja kvantitativnog i kvalitativnih prijelaza.

Uvidom u spektar masa 2-MOPITC-a (Slika 3.5.) odabrani su: molekularni ion $m/z = 165$ i fragmentni ion $m/z = 122$.



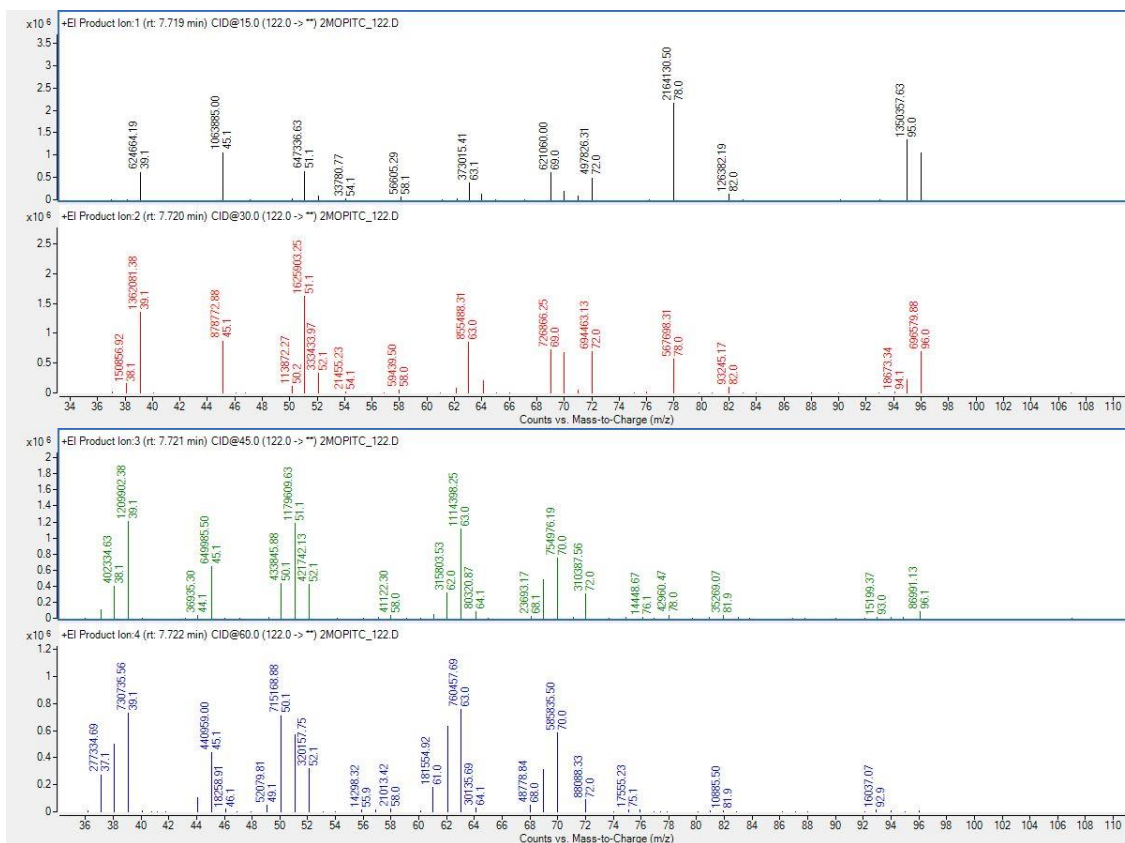
Slika 3.5. Spektar masa 2-MOPITC-a

Za svaki od odabranih iona snimljeni su spektri koji nastaju nakon kolizije s dušikom pri četiri različite energije sraza (Slike 3.6. i 3.7.).



Slika 3.6. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona $m/z = 165$ s dušikom pri 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV

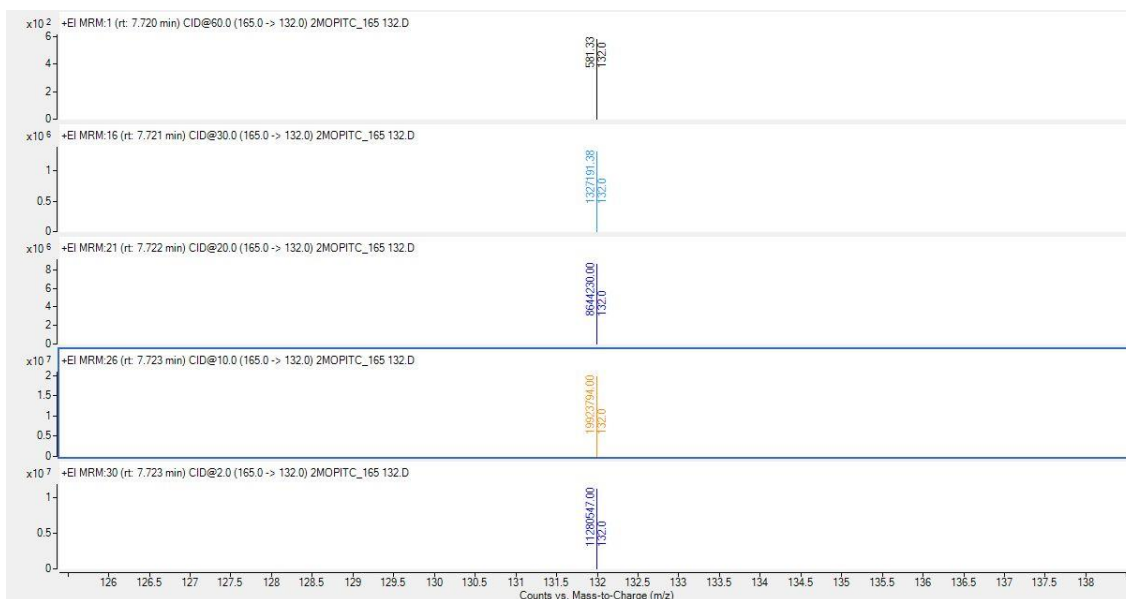
Uvidom u spektre pri različitim energijama sraza u konačnici su kao produkti disocijacije odabrani ioni $m/z = 132$ i $m/z = 122$ (Slika 3.6.). Na taj način dobivene su dvije specifične reakcije prijelaza (m/z): $165 \rightarrow 132$ i $165 \rightarrow 122$.



Slika 3.7. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona $m/z = 122$ s dušikom pri 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV

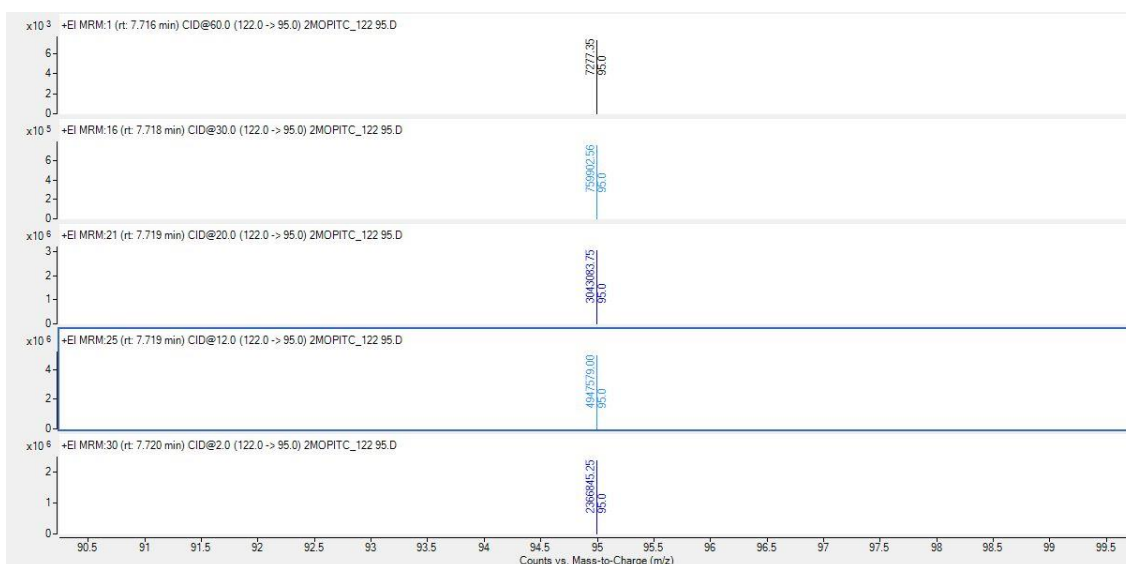
Uvidom u spektre pri četiri različite energije sraza odabrani su ioni $m/z = 95$ i $m/z = 78$ (Slika 3.7.) te su dobivene specifične reakcije prijelaza (m/z): $122 \rightarrow 95$ i $122 \rightarrow 78$.

Svaka specifična reakcija prijelaza praćena je pri 30 različitih energija sraza s dušikom i za svaki prijelaz dobiveno je 30 MS/MS spektara. Spektri su za svaki prijelaz pregledani kako bi se odabralo pri kojoj je energiji sraza odziv detektora za taj prijelaz najveći. Na primjeru prijelaza (m/z): $165 \rightarrow 132$ i $122 \rightarrow 95$ prikazano je odabranih pet MS/MS spektara među kojima je i onaj s najvećim odzivom prema detektoru, snimljen pri energiji sraza koja je optimalna za praćenje te reakcije prijelaza (Slike 3.8. i 3.9.).



Slika 3.8. Prijelaz m/z 165 \rightarrow 132 prikazan pri 2 eV, 10 eV, 20 eV, 30 eV i 60 eV

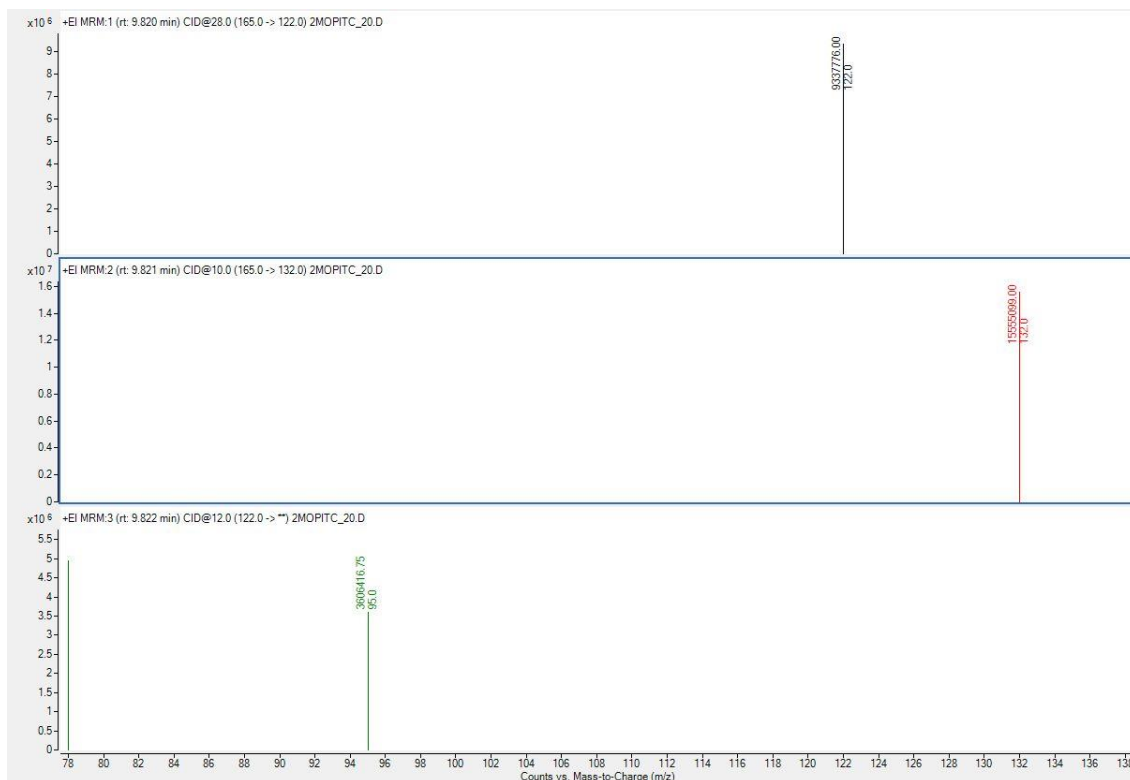
Najveći odziv detektora za prijelaz m/z 165 \rightarrow 132 dobiven je pri energiji sraza 10 eV.



Slika 3.9. Prijelaz m/z 122 \rightarrow 95 prikazan pri 2 eV, 12 eV, 20 eV, 30 eV i 60 eV

Najveći odziv detektora za prijelaz m/z 122 \rightarrow 95 dobiven je pri energiji sraza 12 eV.

Nakon što je za svaki prijelaz optimizirana energija sraza s dušikom, istovremeno su praćene specifične reakcije prijelaza 2-MOPITC-a (Slika 3.10.).



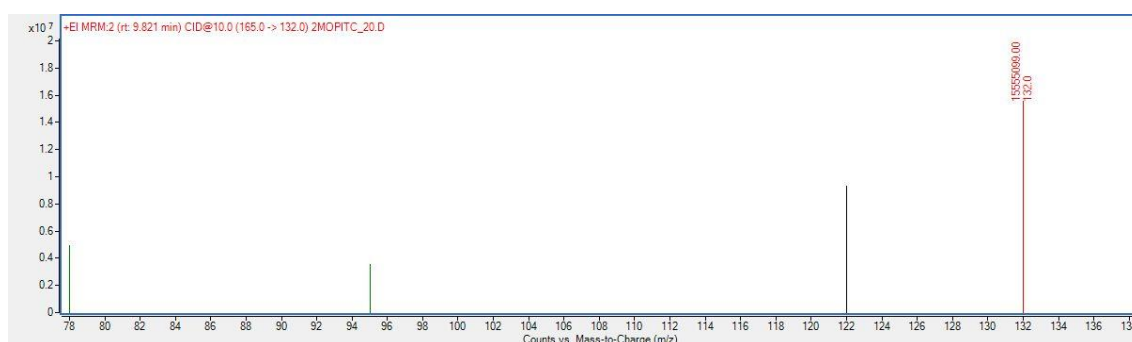
Slika 3.10. Istovremeno praćenje specifičnih reakcija prijelaza 2-MOPITC-a pri optimiziranim energijama sraza s dušikom

Najveći odziv prema detektoru ima prijelaz m/z 165 \rightarrow 132 pri 10 eV te je on korišten kao kvantitativni. Kvalitativni prijelazi (m/z): 165 \rightarrow 122 pri 28 eV, 122 \rightarrow 95 pri 12 eV i 122 \rightarrow 78 pri 12 eV korišteni su za potvrdu identifikacije 2-MOPITC-a.

U tablici 3.3. prikazane su specifične reakcije prijelaza 2-MOPITC-a čiji je postupak određivanja i optimizacije detaljno objašnjen, a na slici 3.11. je zajednički prikaz odziva detektora za te prijelaze.

Tablica 3.3. Specifične reakcije prijelaza 2-MOPITC-a

2-metoksifenil-izotiocijanat			
Početni ion <i>m/z</i>	Specifična reakcija prijelaza	Optimizirana energija sraza	Vrsta prijelaza
165	165 → 132	10 eV	kvantitativni
	165 → 122	28 eV	kvalitativni
122	122 → 95	12 eV	kvalitativni
	122 → 78	12 eV	kvalitativni

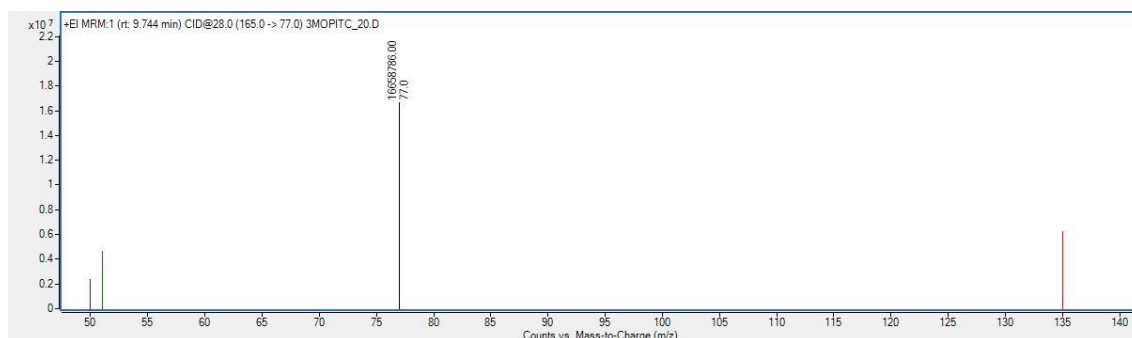


Slika 3.11. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze 2-MOPITC-a

Na isti način određene su specifične reakcije prijelaza, optimizirane energije sraza s dušikom te odabrani kvantitativni i kvalitativni prijelazi za druga dva spoja. Rezultati za 3-MOPITC i 4-MOPITC prikazani su u obliku tablice (Tablice 3.4. i 3.5.) te su za oba spoja prikazani odzivi detektora za odabrane prijelaze (Slike 3.12. i 3.13.).

Tablica 3.4. Specifične reakcije prijelaza 3-MOPITC-a

3-metoksifenil-izotiocijanat			
Početni ion <i>m/z</i>	Specifična reakcija prijelaza	Optimizirana energija sraza	Vrsta prijelaza
165	165 → 135	14 eV	kvalitativni
	165 → 77	28 eV	kvantitativni
135	135 → 77	14 eV	kvalitativni
	135 → 51	40 eV	slab odziv
77	77 → 51	18 eV	kvalitativni
	77 → 50	44 eV	slab odziv

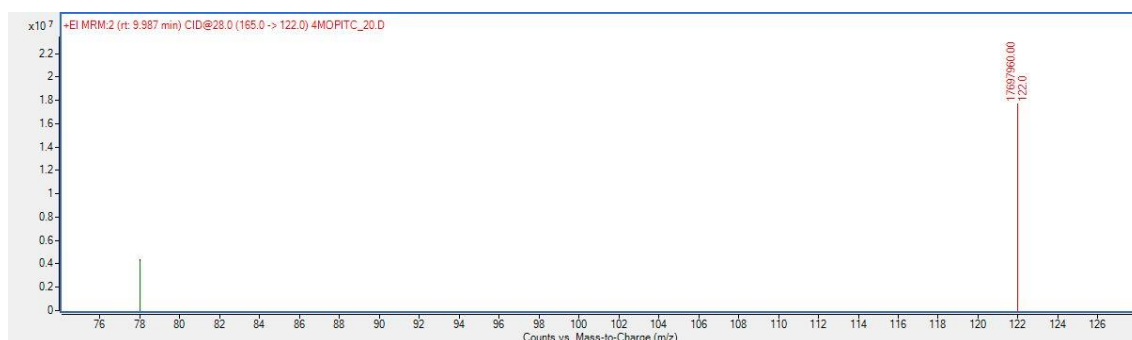


Slika 3.12. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze 3-MOPITC-a

Najveći odziv prema detektoru ima prijelaz m/z 165 → 77 pri 28 eV koji se koristi kao kvantitativni, dok su ostali prijelazi s relevantnim odzivom služe za potvrdu identifikacije 3-MOPITC-a.

Tablica 3.5. Specifične reakcije prijelaza 4-MOPITC-a

4-metoksifenil-izotiocijanat			
Početni ion <i>m/z</i>	Specifična reakcija prijelaza	Optimizirana energija sraza	Vrsta prijelaza
165	165 → 122	28 eV	kvantitativni
	165 → 78	42 eV	kvalitativni
150	150 → 122	12 eV	kvalitativni
	150 → 78	26 eV	kvalitativni



Slika 3.13. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze 4-MOPITC-a

Za kvantifikaciju 4-MOPITC-a odabran je prijelaz m/z 165 → 122 pri 28 eV koji ima najveći odziv prema detektoru dok su ostali prijelazi kvalitativni, odnosno potvrdni.

U analizi smjese za svaki spoj korišteni su jedan kvantitativni i dva kvalitativna prijelaza. Za 2-MOPITC prijelaz m/z 122 → 78 pri 12 eV nije korišten u daljnjim mjerenjima (ista optimalna energija sraza kao za prijelaz m/z 122 → 95 te isti ion produkt kao kod jednog od prijelaza 4-MOPITC-a). Prijelazi (m/z): 77 → 51 pri 18 eV (za 3-MOPITC) i 150 → 78 pri 26 eV (za 4-MOPITC) eliminirani su zbog slabog odziva prema detektoru kod otopina nižih koncentracija.

3.1.4. Odabir optimalnog načina pripreme radnih otopina standarda

Na primjeru 2-MOPITC-a (osam koncentracijskih razina u području $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ – $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) istražena su četiri načina pripreme otopina. U tablici 3.6. iskazane su točnosti svake koncentracijske razine za različite načine rada. Također, za sva četiri načina rada dobivena je zadovoljavajuća linearnost krivulje umjeravanja.

Najmanja analitička pogreška dobivana je kod pripreme otopina dodavanjem odgovarajućeg volumena standarda izravno na analitičkoj vagi i računanjem točne masene koncentracije na temelju odvage. Međutim, na ovaj način ne mogu se pripremiti otopine koncentracija nižih od $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Kod pripreme otopina nižih koncentracija, vaganjem je uvijek pripremana početna otopina koja je korištena za razrjeđenja na željene koncentracije.

Iako se za pipetiranje hlapljivih tekućina preporuča korištenje pipeta na principu pozitivno istisnutog volumena ili tehnika obrnutog pipetiranja, iz tablice je vidljivo da je u tim slučajevima dobivena veća analitička pogreška za niže koncentracijske razine. Stoga je klasična tehnika pipetiranja mehaničkim pipetama odabrana za daljnji rad.

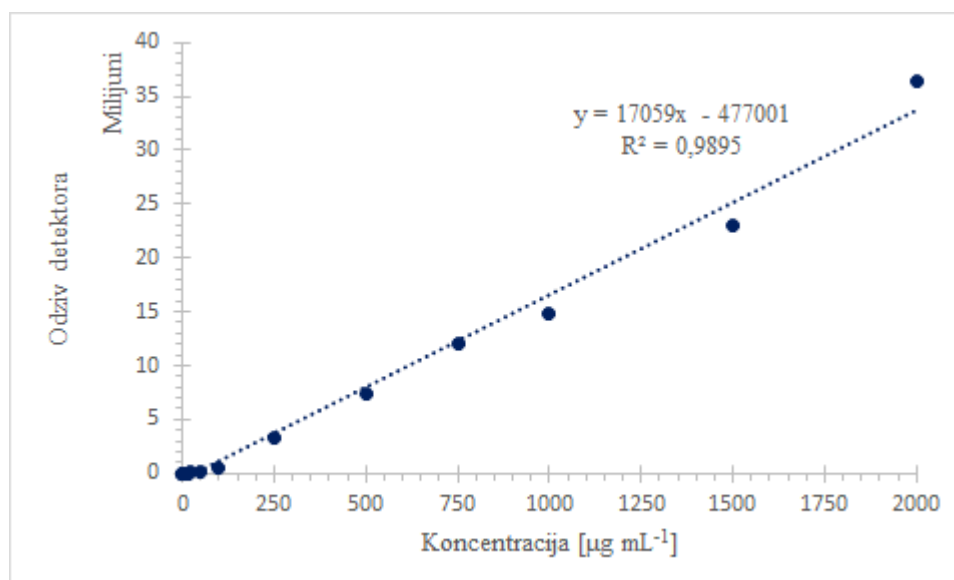
Tablica 3.6. Usporedba točnosti (iskoristivost u %) i linearnosti za različite načine pripreme radnih otopina 2-MOPITC-a

Koncentracijska razina (mg mL^{-1})	Vaganje	Pos-D pipete	Obrnuto pipetiranje	Klasično pipetiranje
1 (0,05)	100,3	268,6	153,6	117,8
2 (0,10)	86,2	152,6	109,3	82,0
3 (0,25)	116,1	101,3	92,4	98,9
4 (0,50)	100,8	96,2	99,6	99,6
5 (0,75)	92,8	102,4	104,7	105,5
6 (1,00)	104,6	93,4	102,6	96,3
7 (1,50)	100,6	92,4	99,1	97,6
8 (2,00)	98,5	99,9	94,4	114,7
Linearnost	0,9976	0,9945	0,9974	0,992

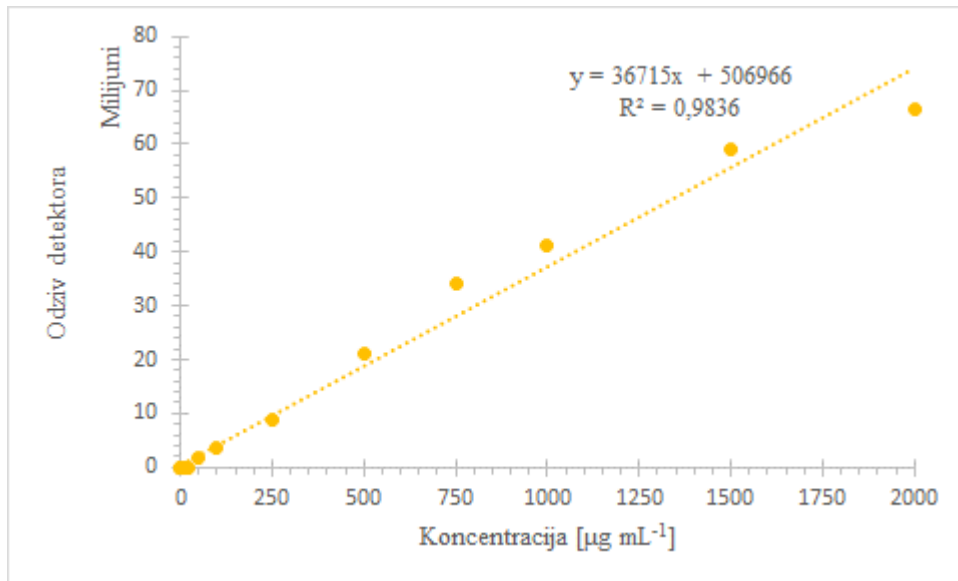
3.1.5. Odabir područja koncentracija otopina za izradu krivulja umjeravanja

Za izradu krivulja umjeravanja pripremane su otopine koncentracije $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $2\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$, tj. uzet je širok raspon koncentracija kroz čak pet redova veličine. Međutim, za otopine koncentracija nižih od $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ instrument ne može dati pouzdanu kvantitativnu informaciju budući da se nalaze ispod granice određivanja (eksperimentalno dosegnuta granica određivanja). Nadalje, za otopine koncentracija nižih od $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nije zadovoljen parametar vrednovanja točnost pa je kao najniža koncentracijska razina odabrano $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

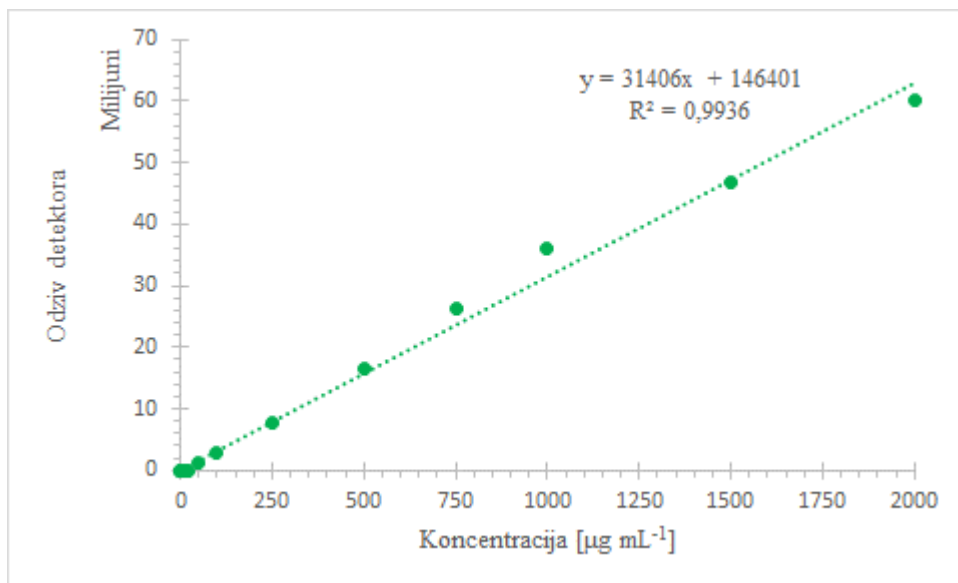
Na temelju krivulje umjeravanja za širok raspon koncentracija, vidljivo je da pri koncentracijama višim od $1\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dolazi do značajnog odstupanja od linearnosti. Na slikama 3.14., 3.15. i 3.16. prikazane su krivulje umjeravanja 2-, 3- i 4-MOPITC-a za širok raspon koncentracija.



Slika 3.14. Krivulja umjeravanja 2-MOPITC-a za širok raspon koncentracija

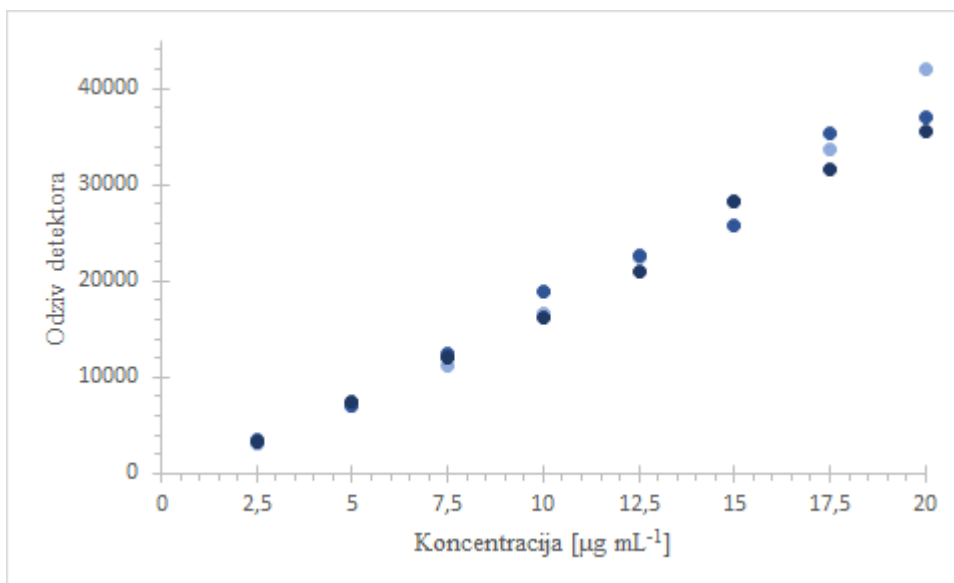


Slika 3.15. Krivulja umjeravanja 3-MOPITC-a za širok raspon koncentracija

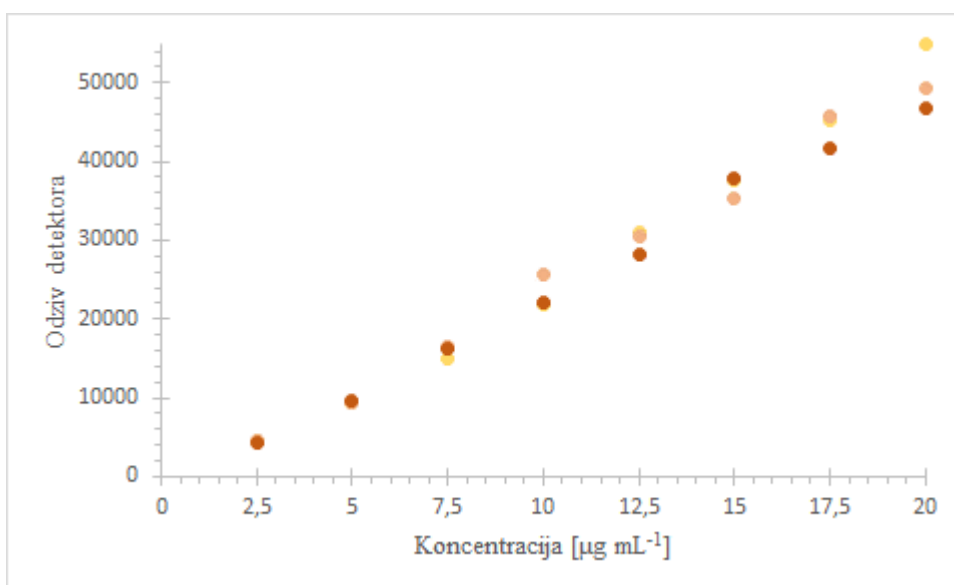


Slika 3.16. Krivulja umjeravanja 4-MOPITC-a za širok raspon koncentracija

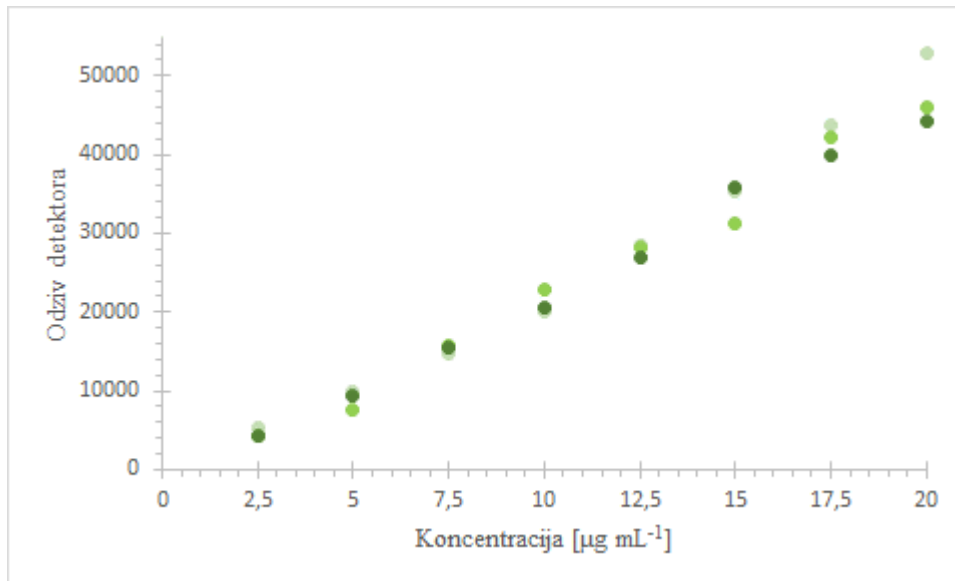
Ako se usporede rezultati tri ponavljanja izrade krivulja umjeravanja, može se uočiti da se povišenjem koncentracije povećava i standardno odstupanje rezultata, što se naziva heteroskedastičnost. Koncentracijski raspon potrebno je suziti na područje u kojem je osigurana zadovoljavajuća homoskedastičnost, odnosno povišenjem koncentracije standardno odstupanje rezultata mora biti konstantno.^[14]



Slika 3.17. Odstupanje od homoskedastičnosti za 2-MOPITC



Slika 3.18. Odstupanje od homoskedastičnosti za 3-MOPITC



Slika 3.19. Odstupanje od homoskedastičnosti za 4-MOPITC

Na slikama 3.17., 3.18. i 3.19. vidljivo je prihvatljivo odstupanje od homoskedastičnosti s ciljem zadržavanja viših koncentracijskih razina. Kao najviša koncentracijska razina odabrano je $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, što je prihvatljivo budući da se ne očekuje visoka koncentracija ovih analita u realnom uzorku. Napravljena je paralela s hlapljivim kemikalijama koje se smatraju alergenima i drugim tvarima čija je koncentracija u kozmetičkim pripravcima regulirana. Prema EU uredbi 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima prisutnost ovih tvari mora biti navedena na popisu sastojaka ako je koncentracija viša od 0,001 % ($0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$) za proizvode koji se nanose na kožu bez ispiranja, odnosno 0,01 % ($0,1 \mu\text{g mg}^{-1}$) za proizvode koji se ispiru s kože.^[22]

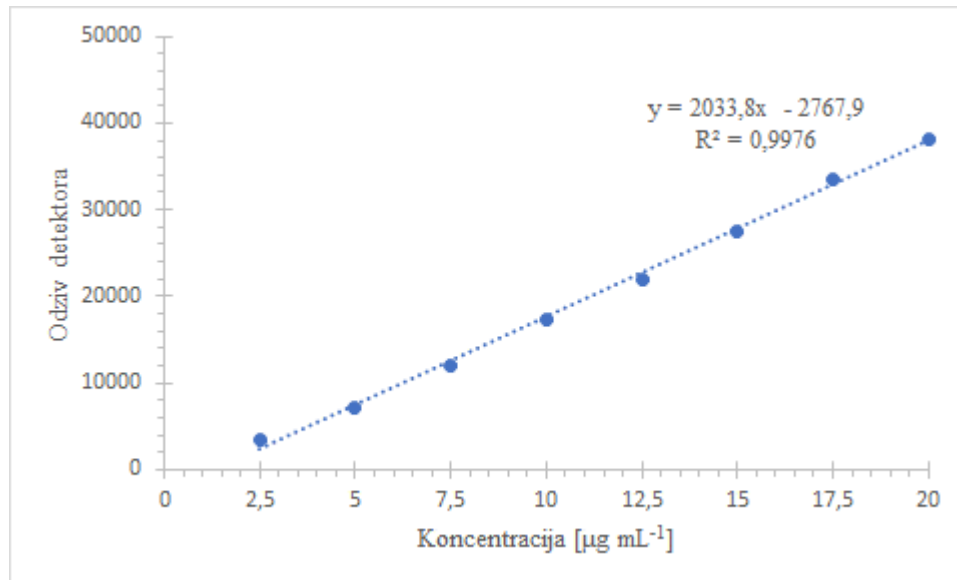
3.1.6. Krivulje umjeravanja

Krivulje umjeravanja izrađene su na temelju radnih otopina koje sadrže sva tri standarda, odnosno riječ je o smjesama jednakih koncentracija 2-, 3- i 4-MOPITC-a. Pripremljeno je osam otopina kao osam koncentracijskih razina ravnomjerno raspoređenih u rasponu $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Radne otopine standarda pripremljene su tri puta te je svakoj koncentracijskoj razini pridružena srednja vrijednost odziva izračunana iz tri mjerena odziva detektora.

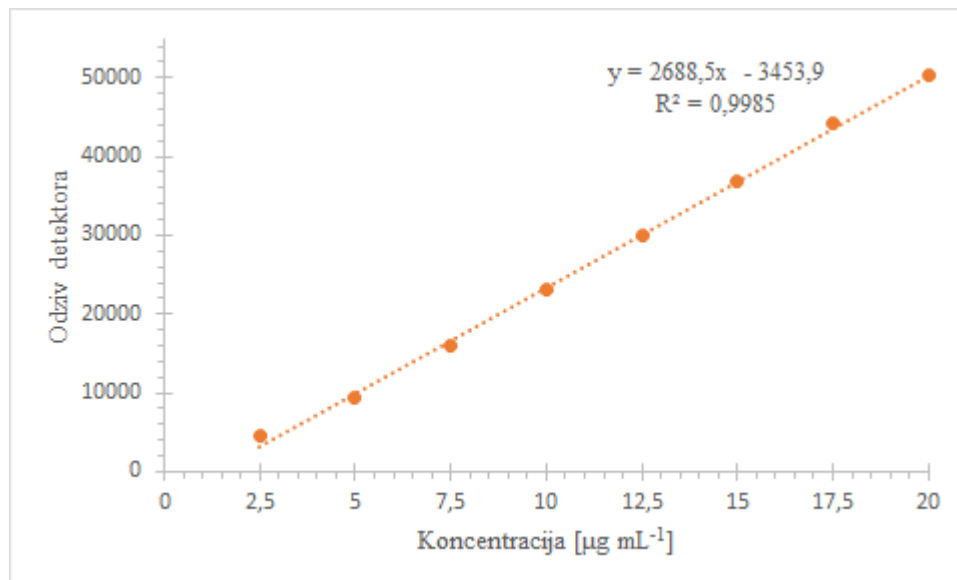
Tablica 3.7. Koncentracije i odgovarajući odzivi detektora za sva tri izotiocijanata

Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
	Odzivi detektora	Srednji odziv	Odzivi detektora	Srednji odziv	Odzivi detektora	Srednji odziv
2,5	3 176,750 3 485,608 3 375,891	3 346,083	4 573,881 4 552,403 4 188,792	4 438,358	5 217,952 4 228,916 4 413,864	4 620,244
5,0	7 117,446 7 115,772 7 371,988	7 201,736	9 415,610 9 384,471 9 651,571	9 483,884	9 962,832 7 712,684 9 477,480	9 050,999
7,5	11 235,08 12 359,27 12 062,78	11 885,71	15 086,49 16 440,86 16 197,41	15 908,25	14 793,56 15 770,02 15 435,98	15 333,19
10,0	16 553,99 18 919,71 16 303,05	17 258,92	21 795,44 25 586,99 22 085,85	23 156,09	20 106,55 22 793,36 20 653,80	21 184,57
12,5	22 421,02 22 633,80 21 040,22	22 031,68	30 916,78 30 614,84 28 123,74	29 885,12	28 374,29 28 177,45 26 999,45	27 850,40
15,0	28 199,12 25 870,64 28 211,82	27 427,19	37 708,14 35 206,68 37 852,74	36 922,52	35 435,94 31 355,95 35 847,24	34 213,04
17,5	33 688,80 35 336,35 31 641,47	33 555,54	45 336,16 45 781,33 41 607,07	44 241,52	43 723,46 42 306,25 39 827,36	41 952,36
20,0	41 916,91 37 098,36 35 567,55	38 194,27	54 969,06 49 231,74 46 697,72	50 299,51	52 791,61 46 111,86 44 296,34	47 733,27

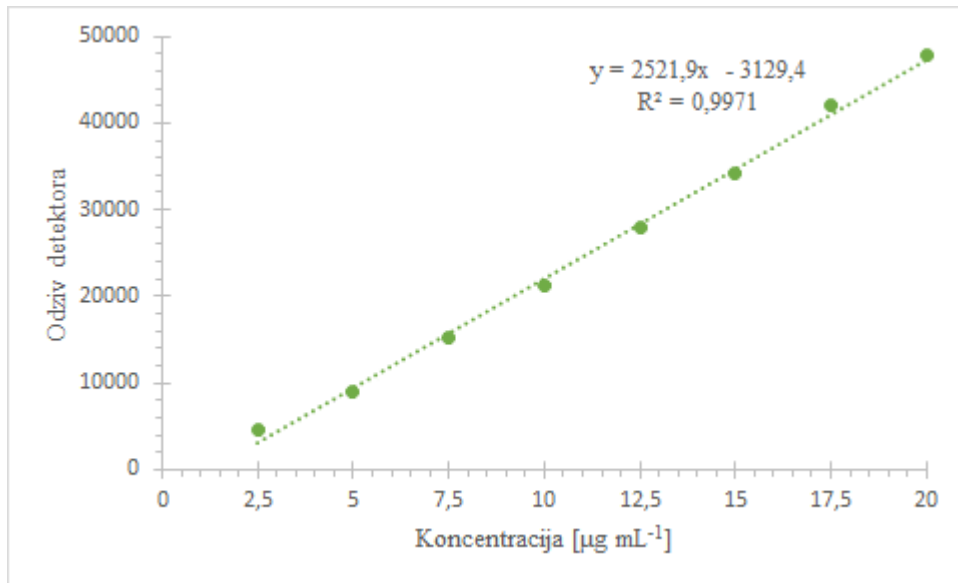
Na temelju podataka iz tablice 3.7. napravljen je grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji za sva tri izotiocijanata. Krivulje umjeravanja prikazane su na slikama 3.20., 3.21. i 3.22.



Slika 3.20. Krivulja umjeravanja za 2-MOPITC



Slika 3.21. Krivulja umjeravanja za 3-MOPITC



Slika 3.22. Krivulja umjeravanja za 4-MOPITC

3.2. VREDNOVANJE METODE

3.2.1. Točnost

Točnost metode vrednovana je usporedbom očekivane i računski dobivene koncentracije za sva tri izotiocijanata te je izražena kao iskoristivost (%). Iskoristivost je praćena duž cijelog raspona umjeravanja, uz tri ponavljanja za svaku koncentracijsku razinu. Za svaku koncentracijsku razinu dobivene su ponovljive iskoristivosti, a u tablici 3.8. prikazana je srednja vrijednost. Iako nije definiran jedinstven kriterij, zadovoljavajućim se smatra raspon iskoristivosti 80 % – 120 %.^[13,14] Vidljivo je da se iskoristivost za sva tri izotiocijanata kreće u zadovoljavajućem rasponu (92,4 % – 112,1 %).

Tablica 3.8. Točnost i iskoristivost za sva tri izotiocijanata

Očekivano [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
	Računski [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Iskoristivost (%)	Računski [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Iskoristivost (%)	Računski [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Iskoristivost (%)
2,5	2,7634	110,5	2,7479	109,9	2,8031	112,1
5,0	4,7150	94,3	4,6670	93,3	4,6180	92,4
7,5	7,0858	94,5	7,1105	94,8	7,1912	95,9
10,0	9,8055	98,1	9,8671	98,7	9,5880	95,9
12,5	12,2214	97,8	12,4265	99,4	12,3183	98,5
15,0	14,9524	99,7	15,1031	100,7	14,9245	99,5
17,5	18,0543	103,1	17,8869	102,2	18,0945	103,4
20,0	20,4023	102,0	20,1910	101,0	20,4624	102,3

3.2.2. Preciznost

Preciznost metode vrednovana je kroz preciznost instrumenta, ponovljivost i srednju preciznost.

Preciznost injektiranja

Preciznost instrumenta iskazana je kao preciznost injektiranja, a ispitana je na način da se otopina smjese sva tri izotiocijanata, koncentracije $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, injektirala u instrument šest puta. Za svako injektiranje na temelju odziva detektora izračunana je koncentracija pomoću krivulje umjeravanja. Zatim je izračunano relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation, RSD*) izračunanih koncentracija. Rezultati (*RSD* %) za sva tri izotiocijanata dani su u tablici 3.9.

Tablica 3.9. Preciznost injektiranja za sva tri izotiocijanata

Injektiranje	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]		
	2-MOPITC	3-MOPITC	4-MOPITC
1	4,6314	5,0641	5,4177
2	4,4813	5,2193	5,5903
3	4,6546	5,5125	5,6622
4	4,6853	5,5712	5,3626
5	4,2833	5,0611	5,0827
6	4,3060	5,0929	5,2036
<i>RSD</i> (%)	3,97	4,41	4,11

Ponovljivost

Ponovljivost metode ispitana je usporedbom rezultata tri ponavljanja pripreme otopina za izradu krivulja umjeravanja provedenih na isti način. Izračunano je relativno standardno odstupanje za svaku koncentracijsku razinu te združeno relativno standardno

odstupanje svih koncentracijskih razina^[14] za svaki tri izotiocijanata te su rezultati dani u tablici 3.10. U prilogu 2. prikazan je izračun združenog relativnog standardnog odstupanja na primjeru 2-MOPITC-a.

Tablica 3.10. Ponovljivost metode za sva tri izotiocijanata

2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)
2,6777	2,87	2,7995	3,00	3,0480	7,68
2,8340		2,7913		2,6429	
2,7785		2,6530		2,7186	
4,6723	1,58	4,6410	1,19	4,9915	10,50
4,6715		4,6292		4,0698	
4,8012		4,7308		4,7927	
6,7565	4,16	6,7979	3,86	6,9702	2,83
7,3255		7,3130		7,3701	
7,1755		7,2204		7,2333	
9,4487	7,45	9,3496	8,13	9,1464	6,07
10,6462		10,7917		10,2469	
9,3217		9,4601		9,3705	
12,4184	3,58	12,8189	4,69	12,5329	2,47
12,5261		12,7040		12,4523	
11,7195		11,7566		11,9698	
15,3431	4,56	15,4019	3,75	15,4254	6,81
14,1645		14,4505		13,7542	
15,3495		15,4569		15,5938	
18,1218	5,19	18,3032	4,87	18,8200	4,46
18,9557		18,4725		18,2395	
17,0855		16,8849		17,2241	
22,2865	8,22	21,9670	7,98	22,5343	8,96
19,8476		19,7849		19,7983	
19,0727		18,8211		19,0546	
	5,14		5,18		6,77

Srednja preciznost

Dodatno je ispitana srednja preciznost tako što je drugi analitičar na isti način pripremio otopine za izradu krivulja umjeravanja. Uspoređene su vrijednosti mjerene koncentracije, izračunano je relativno standardno odstupanje za svaku koncentracijsku razinu te združeno relativno standardno odstupanje svih koncentracijskih razina^[14] za sva tri izotiocijanata te su rezultati dani u tablici 3.11.

Tablica 3.11. Srednja preciznost (drugi analitičar) za sva tri izotiocijanata

2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)	Mjerena koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	RSD (%)
2,7785 3,7985	22,59	2,6530 2,5159	3,29	2,7186 4,2021	29,49
4,8012 5,1480	3,49	4,7308 4,0875	10,18	4,7927 4,7847	2,51
7,1756 7,2679	2,29	7,2204 6,6753	5,88	7,2333 7,5396	2,24
9,3217 8,4375	8,47	9,4601 8,0117	11,23	9,3705 8,6093	7,47
11,7195 12,3521	3,40	11,7566 12,3454	3,22	11,9698 12,4656	2,41
15,3495 15,0947	1,19	15,4569 14,9443	1,86	15,5938 14,8640	2,56
17,0855 16,0384	4,46	16,8849 16,2461	3,72	17,2241 15,7883	5,46
19,0727 20,1373	2,93	18,8211 20,1944	3,78	19,0546 20,1309	2,98
	8,95		6,29		11,11

3.2.3. Specifičnost

Specifičnost metode osigurana je korištenjem spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom, odnosno MRM načinom snimanja. Za svaki izotiocijanat praćene su barem tri specifične reakcije prijelaza na način da prvi kvadrupol propušta samo odabrani ion prekursor, a nakon sraza s dušikom u kolizijskoj ćeliji, treći kvadrupol snima samo odabrani ion produkt.^[12] Specifičnost je dodatno osigurana tako što je svaka reakcija prijelaza praćena pri točno određenoj (za taj prijelaz optimalnoj) energiji sraza s dušikom.

Tehnikom GC-MS/MS moguće pojedinačno određivanje 2-, 3- i 4-MOPITC-a u smjesi, iako se radi o strukturnim izomerima. Čak ako ih GC ne uspije odijeliti, uz pomoć MS/MS detektora mogu se uspješno kvantificirati. Štoviše ako se cijepaju na iste fragmente, čak i ako imaju iste reakcije prijelaza, razlikuju se po energijama sraza pri kojima ti prijelazi imaju maksimalan odziv prema detektoru. Potencijalno interferirajuće vrste, koje mogu biti prisutne u uzorku, automatski su eliminirane korištenjem MRM načina snimanja MS/MS detektora.^[17]

3.2.4. Linearnost

Linearnost metode potvrđena je koeficijentom determinacije (R^2) čije su vrijednosti za sva tri spoja prikazane u tablici 3.12.

Tablica 3.12. Usporedba linearnosti za 2-, 3- i 4-MOPITC

Spoj	<i>N</i>	Nagib (a)	Odsječak (b)	R^2
2-MOPITC	8	2 033,8	-2 767,9	0,9976
3-MOPITC	8	2 688,5	-3 453,9	0,9985
4-MOPITC	8	2 521,9	-3 129,4	0,9971

Budući da nagib linearnog dijela krivulje umjeravanja predstavlja osjetljivost, može se zaključiti da je razvijena metoda najosjetljivija prema 3-MOPITC-u, a najmanje osjetljiva prema 2-MOPITC-u.

Kod izrade krivulje umjeravanja korištena su različita područja koncentracija, a kao optimalan raspon odabrano je $2,5 \mu\text{g mL}^{-1} - 20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pravac obuhvaća osam ravnomjerno raspoređenih točaka ($N = 8$), a umjeravanje je ponovljeno tri puta. Kod svakog ponavljanja ($N = 8$), kao i kod umjeravanja koje obuhvaća sva ponavljanja ($N = 24$) ostvaren je $R^2 \geq 0,99$ za određivanje pojedinačnog izotiocijanata u smjesi.

3.2.5. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja i granica određivanja ključni su parametri učinkovitosti metode pri ispitivanju analita niskih koncentracija. U uzorku mora postojati dovoljna količina analita kako bi nastao signal koji se može pouzdano razlikovati od šuma.^[15] Prema ICH smjernicama, kriterij odnosa signala i šuma za granicu dokazivanja je 3, a za granicu određivanja 10.^[13]

Tablica 3.13. Odzivi detektora dobiveni uzastopnim injektiranjem iste otopine izotiocijanata koncentracije $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Injektiranje	2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
	Odziv	S/N	Odziv	S/N	Odziv	S/N
1	6 651,6	146,18	12 849	181,77	10 534	196,73
2	6 346,2	94,91	10 578	192,20	8 446,9	106,80
3	6 698,8	171,87	11 367	136,45	11 150	172,41
4	6 761,1	72,87	11 524	194,79	10 395	130,60
5	5 943,5	75,54	10 153	134,90	9 688,9	196,89
6	5 989,7	182,32	10 238	167,68	9 993,7	149,71
Srednja vrijednost	6 398	123,95	11 118	167,97	10 035	158,86
RSD (%)	5,69		9,19		9,20	

Ista otopina poznate niske koncentracije injektirana je šest puta te je mjereno odziv detektora (površina). Spektrometar masa također daje vrijednost S/N, tj. omjer visine signala i visine šuma. Iz odnosa signala i šuma (Tablica 3.13.) izračunane su granice dokazivanja (engl. *limit of detection*, LoD) i granice određivanja (engl. *limit of quantification*, LoQ) za sva tri izotiocijanata te su dobiveni slijedeći rezultati:

- LoD = 0,082 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LoQ = 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za 2-MOPITC
- LoD = 0,024 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LoQ = 0,079 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za 3- MOPITC
- LoD = 0,058 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LoQ = 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za 4- MOPITC.

Izračunane granice dokazivanja i granice određivanja podudaraju se s eksperimentalnim pretpostavkama (Poglavlje 3.1.5.).

3.2.6. Stabilnost

Stabilnost analita u odabranom otapalu ispituje se ostavljanjem pripremljene otopine tijekom određenog perioda. Prvi dan analizira se svježa otopine, a kroz ostale dane ponavlja se analiza odstajale otopine. Stabilnost se, za svaki dan analize, izražava kao omjer koncentracija odstajale i svježe otopine.^[14]

U tablici 3.14. prikazana je usporedba točnosti analize svježe pripremljenih otopina i otopina koje su analizirane nakon što su odstajale tri dana u hladnjaku. Kod interpretacije rezultata treba uzeti u obzir da su svježa i odstajala otopine zasebno pripremane pa, osim stabilnosti analita u heksanu, na rezultat utječe i preciznost pripremanja otopina. Ipak za sva tri izotiocijanata, točnost je u oba slučaja zadovoljavajuća (80 % – 120 %)^[14] što znači da se radne otopine mogu koristiti najmanje tri dana.

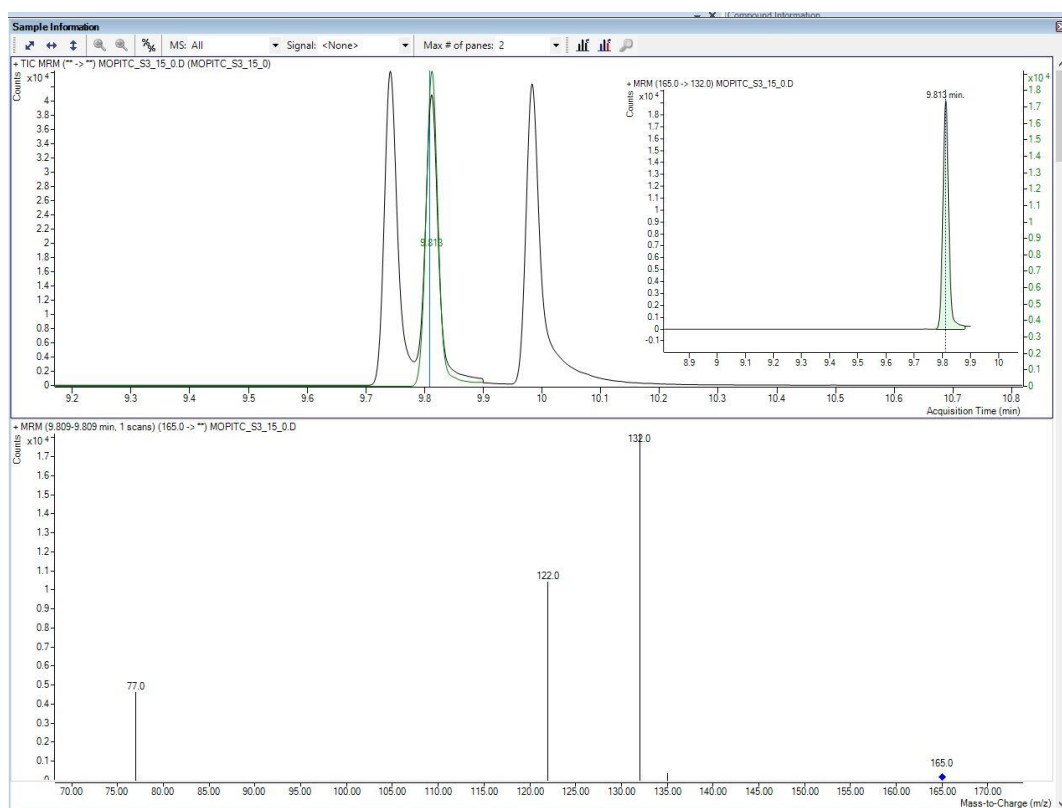
Tablica 3.14. Usporedba točnosti analize (iskoristivost u %) svježe pripremljenih otopina i otopina koje su odstajale tri dana

Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	2-MOPITC		3-MOPITC		4-MOPITC	
	svježa	3 dana	svježa	3 dana	svježa	3 dana
2,5	111,1	107,1	106,1	112,0	108,7	121,9
5,0	96,0	93,4	94,6	92,8	95,9	99,8
7,5	95,7	90,1	96,3	90,6	96,4	92,9
10,0	93,2	94,5	94,6	93,5	93,7	91,5
12,5	93,8	99,3	94,1	102,6	95,8	100,3
15,0	102,3	102,3	103,0	102,7	104,0	102,8
17,5	97,6	103,6	96,5	104,6	98,4	107,5
20,0	95,4	111,4	94,1	109,8	95,3	112,7

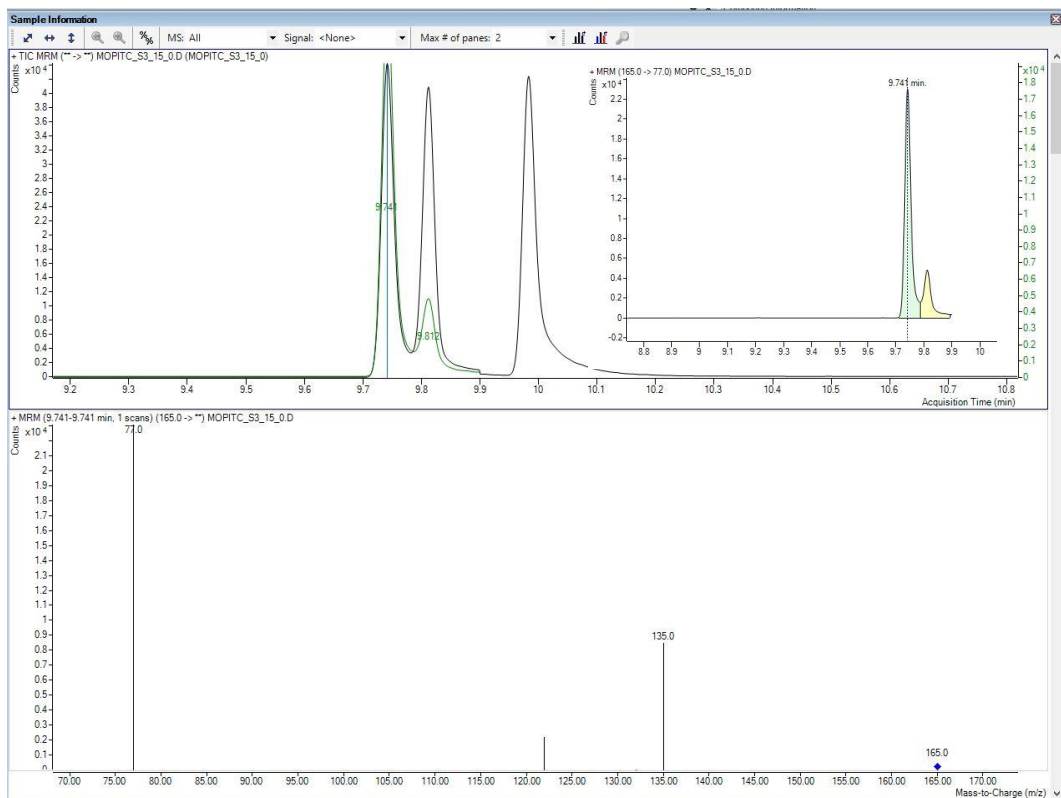
3.2.7. Analiza sintetskog uzorka

Prikladnost razvijene metode za pojedinačno određivanje 2-, 3- i 4-MOPITC-a u smjesi potvrđena je analizom sintetskog uzorka poznate koncentracije. Uzorak je pripremljen otapanjem standarda sva tri izotiocijanata u otapalu heksanu, a masena koncentracija pojedinog analita je $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uzorak je potom injektiran u GC-MS/MS te analiziran u MRM načinu snimanja.

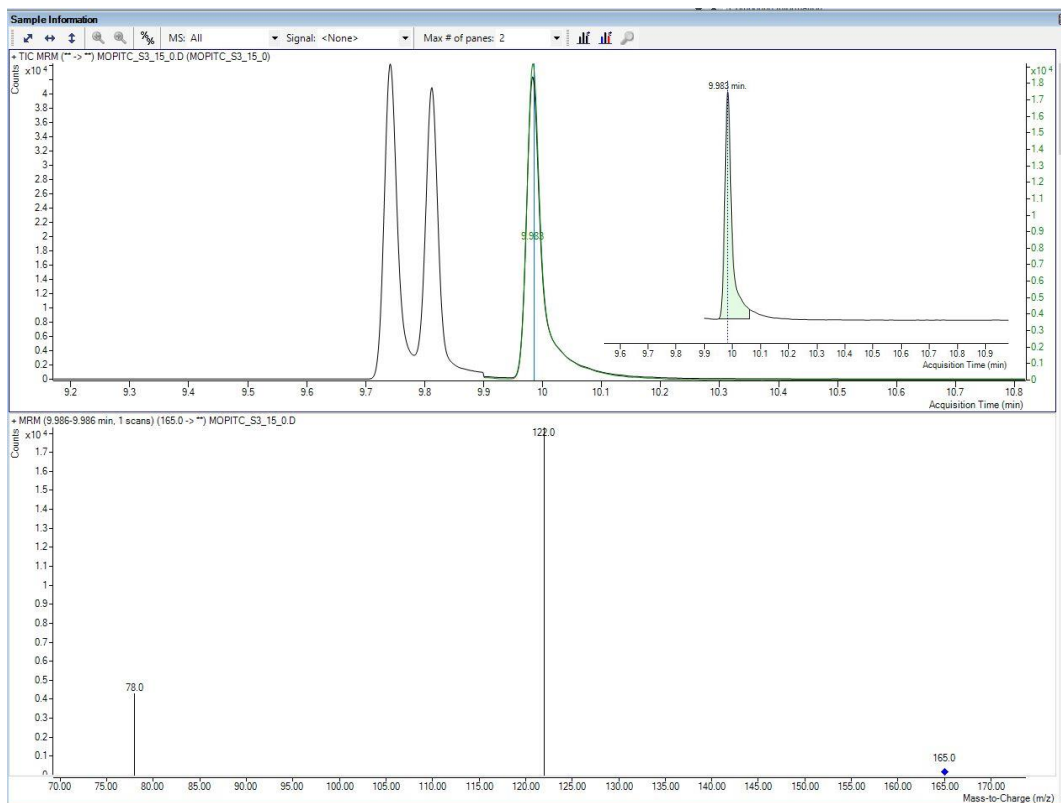
Na slikama 3.23., 3.24. i 3.25. za sva tri izotiocijanata prikazani su snimljeni kromatogrami te odzivi detektora za odabrane prijelaze (kvantitativni i dva kvalitativna).



Slika 3.23. Prikaz snimljenih kromatograma i MS/MS spektra za 2-MOPITC



Slika 3.24. Prikaz snimljenih kromatograma i MS/MS spektara za 3-MOPITC



Slika 3.25. Prikaz snimljenih kromatograma i MS/MS spektara za 4-MOPITC

Iz mjerenog odziva detektora za kvantitativni prijelaz, pomoću krivulje umjeravanja, tj. preko jednadžbe pravca, izračunana je koncentracija pojedinog izotiocijanta u smjesi te su rezultati prikazani u tablici 3.15.

Tablica 3.15. Prikaz rezultata određivanja izotiocijanata u sintetskom uzorku

Spoj	Vrijeme zadržavanja [min]	Odziv detektora	Koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
2-MOPITC	9,813	28 205	15,2289
3-MOPITC	9,741	37 133	15,0964
4-MOPITC	9,983	34 653	14,9816

ZAKLJUČAK

Plinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa prikladna je tehnika za odjeljivanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata.

Razvijena je metoda kojom se uspješno mogu istovremeno identificirati i kvantificirati 2-metoksifenil-izotiocijanat, 3-metoksifenil-izotiocijanat i 4-metoksifenil-izotiocijanat. Iako se radi o strukturnim izomerima, spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom, u MRM načinu snimanja, omogućava specifično određivanje ovih analita u smjesi.

Plinska kromatografija optimizirana je promjenom brzine povećanja radne temperature. Kao optimalna vrijednost odabrano je $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, što osigurava prihvatljivo razdvajanje 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotiocijanata ($R_s > 1,5$) u 15-ak minuta koliko traje analiza.

Spektrometrija masa optimizirana je promjenom energije sraza s dušikom. Za svaki izotiocijanat praćene su po tri specifične reakcije prijelaza pri optimiziranoj energiji sraza. Prijelaz koji ima najveći odziv prema detektoru je kvantitativni prijelaz, dok druga dva kvalitativna prijelaza služe za potvrdu identifikacije.

Kod odabira optimalnog načina pripreme radnih otopina standarda, uzete su u obzir preporuke za pipetiranje hlapljivih tekućina. Istražena su četiri načina pripreme otopina, različitim pipetama i tehnikama pipetiranja. Sva četiri načina pokazala su se prihvatljivima, a za daljnji rad odabrana je klasična tehnika pipetiranja mehaničkim pipetama.

Uspoređena su i različita područja koncentracija otopina za izradu krivulja umjeravanja s ciljem odabira adekvatnog raspona. Razvijena je metoda primjenjiva za područje masenih koncentracija $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1} - 20,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, koje se smatra prikladnim s obzirom na očekivanu količinu ovih analita u realnom uzorku. Krivulje umjeravanja za svaki izotiocijanat sadrže po osam točaka (koncentracijskih razina) ravnomjerno raspoređenih u ovom rasponu.

Razvijena metoda zadovoljava ispitane parametre vrednovanja čime je dokazana njena prikladnost za pojedinačno određivanje 2-, 3- i 4-metoksifenil-izotiocijanta unutar smjese. Linearnost ovisnosti odziva detektora o koncentraciji analita za sva tri spoja

potvrđena je dobrim koeficijentom determinacije (R^2). Točnost je izražena kao iskoristivost metode i za sva tri spoja kreće se u zadovoljavajućem rasponu. Preciznost je vrednovana na tri razine, kao preciznost injektiranja, ponovljivost i srednja preciznost, te su dobivene prihvatljive vrijednosti relativnog standardnog odstupanja.

Razvijena metoda uspješno je primijenjena u analizi sintetskog uzorka poznate koncentracije. Korištena tehnika može poslužiti kao cjenovno povoljnija i ekološki prihvatljivija alternativa tekućinskoj kromatografiji spregnutoj s tandemskom spektrometrijom masa. Također, postoji mogućnost proširivanja metode na druge izotiocijanate i njihovo pojedinačno određivanje u smjesi.

LITERATURA

- [1.] I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, C. E. Olsen, M. Burow, P. Rollin, N. Agerbrik, *Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants*, *Phytochemistry*, **2020**, *169*, 112100
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
- [2.] M. Zekić, *Glukoziolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, **2013**, str. 1-42.
- [3.] I. Jerković, *Kemija aroma*, Interna skripta Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, **2011**, str. 86-9.
- [4.] J. Higdon, V. J. Drake, B. Delage, *Isothiocyanates*, Oregon State University: The Linus Pauling Institute, **2017**, URL: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates> (9.3.2022.)
- [5.] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, **2016**, str. 19-22.; 630-59.
- [6.] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, F. Burčul, *Instrumentne metode analize*, Interna skripta Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, **2019**
- [7.] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, **1999**, str. 674-88.
- [8.] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis, 7th ed.* W. H. Freeman and Company, New York, **2007**, str. 528-51.
- [9.] *Fundamental of Gas Chromatography*, Manual G1176-90000, *1st ed.* Agilent Technologies Inc. USA, **2002**, URL: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1176-90000_034327.pdf (13.3.2022.)
- [10.] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications, 3rd ed.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2007**, str. 15-170.; 189-95.

- [11.] J. H. Gross, *Mass spectrometry: a textbook, 3rd ed.* Springer International Publishing AG, Cham, **2017**, str. 8-31.; 151-277.; 539-68.
- [12.] URL: https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan_types.pdf, (3.3.2022.)
- [13.] ICH Harmonised tripartite guideline, *Validation of analytical procedure: Text and methodology Q2 (R1)*, **2005**
- [14.] I. Leito, R. Rebane, H. Evard, K. Herodes, K. Kipper, *LC-MS Method validation*, University of Tartu, URL: https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/ (5.3.2022.)
- [15.] A. Shrivastava, V. B. Gupta, *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*, *Chron. Young Sci.* **2011**, 2(1): 21-5. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- [16.] R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, ed. 4.1*, **2017**, str. 4.
- [17.] M. K. Woźniak, L. Banaszkiwicz, M. Wiergowski, E. Tomczak, M. Kata, B. Szpiech, J. Namieśnik, M. Biziuk, *Development and validation of a GC-MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood*, *Forensic Toxicol.* **2020**, 38: 42-58. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00485-y>
- [18.] Ł. Paprotny, A. Celejewska, M. Frajgerg, D. Wianowska, *Development and validation of GC-MS/MS method useful in diagnosing intestinal dysbiosis*, *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1130-1131: 121822 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121822>
- [19.] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexane>, (12.2.2022.)
- [20.] URL: <https://www.sartorius.com/resource/blob/1085646/d4bf11ef41cbbc9c7ebdcc88ecea4846/how-to-pipette-challenging-liquids-application-guide-en-l-sa-1--data.pdf>, (12.2.2022.)
- [21.] URL: <https://www.mt.com/vn/en/home/products/pipettes/rainin-pipettes/specialty-pipettes/posd-positive-displacement-pipette.html> (12.2.2022.)

- [22.] Uredba (EZ) br. 1223/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 30. studenog 2009. o kozmetičkim proizvodima (preinaka), URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=SL> (citirano 24.4.2022.)

PRILOZI

Prilog 1. Razlučivanje

A - 2-MOPITC								$R_s = \frac{2 \times \{t_r(A) - t_r(B)\}}{w_A + w_B}$
B - 3-MOPITC								
°C/min	$t_R(A)/min$	$t_R(B)/min$	w_A/min	w_B/min			$R_s(1)$	
3	28,414	27,901	0,125	0,125			4,104	
10	13,989	13,837	0,056	0,056			2,714286	
20	9,814	9,741	0,031	0,031			2,354839	
30	8,204	8,158	0,045	0,045			1,022222	
40	7,333	7,296	0,038	0,038			0,973684	
50	6,783	6,753	0,033	0,033			0,909091	

A - 4-MOPITC								$R_s = \frac{2 \times \{t_r(A) - t_r(B)\}}{w_A + w_B}$
B - 2-MOPITC								
°C/min	$t_R(A)/min$	$t_R(B)/min$	w_A/min	w_B/min			$R_s(2)$	
3	29,362	28,414	0,125	0,125			7,584	
10	14,304	13,989	0,056	0,056			5,625	
20	9,982	9,814	0,031	0,031			5,419355	
30	8,32	8,204	0,045	0,045			2,577778	
40	7,422	7,333	0,038	0,038			2,342105	
50	6,856	6,783	0,033	0,033			2,212121	

Prilog 2. Računanje relativnog standardnog odstupanja za svaku koncentracijsku razinu i združenog relativnog standardnog odstupanja svih koncentracijskih razina

$\gamma/\mu\text{g mL}^{-1}$	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
$\gamma_1/\mu\text{g mL}^{-1}$	2,677675	4,67231	6,756503	9,44874	12,41842	15,34308	18,12175	22,28652
$\gamma_2/\mu\text{g mL}^{-1}$	2,834008	4,671463	7,325531	10,64618	12,52612	14,16448	18,95568	19,84755
$\gamma_3/\mu\text{g mL}^{-1}$	2,778473	4,80115	7,175455	9,321725	11,71951	15,34951	17,08547	19,07271
$\gamma/\mu\text{g mL}^{-1}$	2,763385	4,714975	7,08583	9,805549	12,22135	14,95236	18,0543	20,40226
<i>s</i>	0,079251	0,074632	0,294911	0,730775	0,437931	0,682325	0,93693	1,677177
RSD	0,028679	0,015829	0,04162	0,074527	0,035833	0,045633	0,051895	0,082205
RSD (%)	2,867887	1,582861	4,161988	7,452671	3,583326	4,563327	5,189513	8,220547
združeno standardno odstupanje^[14]								
$s_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$								
<i>n-1</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
(n-1)*s²	0,012561	0,01114	0,173945	1,068065	0,383567	0,931135	1,755677	5,625845
	0,789063	s(pooled)						
združeno relativno standardno odstupanje^[14]								
$RSD_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RSD_1^2 + (n_2 - 1)RSD_2^2 + \dots + (n_k - 1)RSD_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}}$								
(n-1)*RSD²	0,001645	0,000501	0,003464	0,011108	0,002568	0,004165	0,005386	0,013515
	0,05145	RSD (pooled)						
	5,144989	RSD (pooled)/%						

Prikazan je izračun ponovljivosti metode za određivanje 2-metoksifenil-izotiocijanata. Analogno se računa ponovljivost metode za određivanje 3-MOPITC-a i 4-MOPITC-a te srednja preciznost metode za određivanja sva tri izotiocijanata.