

# Razvoj brze GC-MS/MS metode za određivanje jedanaest izotiocijanata i nitrila

---

Gusić Bikić, Klaudija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:410556>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-30**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**RAZVOJ BRZE GC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE  
JEDANAEST IZOTIOCIJANATA I NITRILA**

**DIPLOMSKI RAD**

**KLAUDIJA GUSIĆ BIKIĆ**

**Matični broj: 163**

**Split, listopad 2023.**

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

**RAZVOJ BRZE GC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE**  
**JEDANAEST IZOTIOCIJANATA I NITRILA**

**DIPLOMSKI RAD**

**KLAUDIJA GUSIĆ BIKIĆ**

**Matični broj: 163**

**Split, listopad 2023.**

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

**DEVELOPMENT OF RAPID GC-MS/MS METHOD FOR  
DETERMINATION OF ELEVEN ISOTHIOCYANATES AND  
NITRILES**

**DIPLOMA THESIS**

**KLAUDIJA GUSIĆ BIKIĆ**

**Parent number:163**

**Split, October 2023**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Diplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

### RAZVOJ BRZE GC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE JEDANAEST IZOTIOCIJANATA I NITRILA

Klaudija Gusić Bikić, 163

**Sažetak:** Izotocijanati i nitrili su razgradni produkti hidrolize glukozinolata, sekundarnih metabolita biljaka iz porodice kupusnjača. Izotocijanati pokazuju biološku aktivnost zbog čega se razvijaju analitičke metode za njihovo određivanje. U ovom diplomskom radu razvijena je brza metoda za određivanje 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotocijanata, izopropil-izotocijanata, alil-izotocijanata, benzil-izotocijanata, fenil-izotocijanata, 3-(metiltio)propil-izotocijanata, 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 i nitrila iz smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Za pripremu početnih otopina korišteni su komercijalno dostupni standardi navedenih izotocijanata i nitrila te heksan kao otapalo. Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom, u MRM načinu snimanja, korišten je za praćenje specifičnih reakcija prijelaza (kvantitativni i dva kvalitativna za svaki analit). Spektrometrija masa optimizirana je određivanjem energija sraza s dušikom za svaku specifičnu reakciju prijelaza. Plinska kromatografija optimizirana je promjenama temperaturnog programa. Za izradu krivulja umjeravanja odabran je raspon koncentracija od 0,0005 mg/mL do 0,5 mg/mL.

Ispitani parametri vrednovanja: točnost, ponovljivost, linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja pokazali su se zadovoljavajućima te je na taj način osigurana prikladnost brzog određivanja odabranih izotocijanata i nitrila u smjesi.

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

**Rad sadrži:** 54 stranica, 36 slika, 13 tablica, 23 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

|  |             |
|--|-------------|
| 1. prof. dr. sc. Ivica Blažević          | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Mario Nikola Mužek | član        |
| 3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul      | mentor      |

#### Datum obrane:

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Graduate study of Chemistry

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Supervisor:** Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD

### DEVELOPMENT OF RAPID GC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF ELEVEN ISOTHIOCYANATES AND NITRILES

Klaudija Gusić Bikić, 163

**Abstract:** Isothiocyanates and nitriles are degradation products of glucosinolate hydrolysis, secondary metabolites found in plants from cabbage family. Isothiocyanates exhibit biological activity, which is why analytical methods are being developed for their determination. In this thesis, a rapid method for the determination of 3-phenylpropanonitrile, 2-phenylethyl isothiocyanate, isopropyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, 3-(methylthio)propyl isothiocyanate, 2-methoxyphenyl isothiocyanate, 3-methoxyphenyl isothiocyanate, and 4-methoxyphenyl isothiocyanate was developed. A hyphenated technique gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was employed to separate the selected isothiocyanates and nitriles from the mixture and determine them qualitatively and quantitatively. Stock solutions were prepared from commercially available standards of these compounds using hexane as solvent. A triple quadrupole mass spectrometer, operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode, was used to monitor specific transition reactions (quantitative and two qualitative transitions for each analyte). Mass spectrometry was optimized by determining nitrogen collision energies for each specific transition reaction. Gas chromatography was optimized by changing the temperature programme. Calibration curve range from 0.0005 mg/mL to 0.5 mg/mL was selected. Evaluated validation parameters including accuracy, repeatability, linearity, limit of detection, and limit of quantification were found to be satisfactory, ensuring the suitability of the rapid determination of selected isothiocyanates and nitriles in the mixture.

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

**Thesis contains:** 54 pages, 36 images, 13 tables, 23 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Full Prof. Ivica Blažević, PhD       | chair person |
| 2. Assoc. Prof. Mario Nikola Mužek, PhD | member       |
| 3. Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD      | supervisor   |

#### Defence date:

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Franka Burčula i neposrednim vodstvom. Ane Vučak, mag.chem. u razdoblju od rujna do listopada 2023. godine*

*Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Franku Burčulu na pruženom znanju koje mi je bilo potrebno za izradu ovog diplomskog rada.*

*Posebna zahvala Ani Vučak, mag. chem., na trudu i pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Najveće hvala mojoj obitelji koja je bila uz mene u svim trenucima tijekom mog studiranja.*

*Mojim kolegama i prijateljima, hvala za sve zabavne trenutke!*

*Mom Anti, hvala što si nadahnuće, motivacija i bezuvjetna podrška.*

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



## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razvoj i optimizacija metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje fenilacetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-fenilet-il-izotiocijanata, izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata, fenil-izotiocijanata, 3-(metil-tio)propil-izotiocijanata, 2-metoksifenil-izotiocijanata, 3-metoksifenil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata korištenjem spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom.

Razvoj i optimizacija uključuju:

- Snimanje spektara masa odabranih izotiocijanata i nitrila te usporedbu istih s bazama podataka
- Odabir prekursora s najvećim odzivom prema detektoru i snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza s dušikom pri različitim energijama sraza (15 eV, 30 eV, 45 eV, 60 eV)
- Praćenje specifičnih reakcija prijelaza (engl. *Selected Reaction Monitoring* – SRM) pri trideset različitih energija sraza i odabir optimalnih vrijednosti
- Istovremeno praćenje više specifičnih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring* – MRM) pri optimalnim energijama sraza
- Snimanje pri različitim temperaturnim programima plinskog kromatografa i odabir optimalnih uvjeta
- Pripremanje radnih otopina standarda i odabir linearnog dinamičkog područja (LDP)
- Izradu krivulja umjeravanja

Vrednovanje ove analitičke metode uključuje:

- Ispitivanje specifičnosti, linearnosti, točnosti, preciznosti, ponovljivosti injektiranja
- Određivanje LDP-a, jednadžbe krivulje umjeravanja, koeficijenta determinacije  $R^2$
- Računanje granice dokazivanja i granice određivanja

## SAŽETAK

Izotiocijanati i nitrili su razgradni produkti hidrolize glukozinolata, sekundarnih metabolita biljaka iz porodice kupusnjača. Izotiocijanati pokazuju biološku aktivnost zbog čega se razvijaju analitičke metode za njihovo određivanje. U ovom diplomskom radu razvijena je brza metoda za određivanje 3-fenilpropanonitrila, 2-fenilet-ilizotiocijanata, izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata, fenil-izotiocijanata, 3-(metiltio)propil-izotiocijanata, 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 i nitrila iz smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Za pripremu početnih otopina korišteni su komercijalno dostupni standardi navedenih izotiocijanta i nitrila te heksan kao otapalo. Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom, u MRM načinu snimanja, korišten je za praćenje specifičnih reakcija prijelaza (kvantitativni i dva kvalitativna za svaki analit). Spektrometrija masa optimizirana je određivanjem energija sraza s dušikom za svaku specifičnu reakciju prijelaza. Plinska kromatografija optimizirana je promjenama temperaturnog programa. Za izradu krivulja umjeravanja odabran je raspon koncentracija od 0,0005 mg/mL do 0,5 mg/mL.

Ispitani parametri vrednovanja: točnost, ponovljivost, linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja pokazali su se zadovoljavajućima te je na taj način osigurana prikladnost brzog određivanja odabranih izotiocijanata i nitrila u smjesi.

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

## **ABSTRACT**

Isothiocyanates and nitriles are degradation products of glucosinolate hydrolysis, secondary metabolites found in plants from cabbage family. Isothiocyanates exhibit biological activity, which is why analytical methods are being developed for their determination. In this thesis, a rapid method for the determination of 3-phenylpropanonitrile, 2-phenylethyl isothiocyanate, isopropyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, 3-(methylthio)propyl isothiocyanate, 2-methoxyphenyl isothiocyanate, 3-methoxyphenyl isothiocyanate, and 4-methoxyphenyl isothiocyanate was developed. A hyphenated technique gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was employed to separate the selected isothiocyanates and nitriles from the mixture and determine them qualitatively and quantitatively. Stock solutions were prepared from commercially available standards of these compounds using hexane as solvent. A triple quadrupole mass spectrometer, operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode, was used to monitor specific transition reactions (quantitative and two qualitative transitions for each analyte). Mass spectrometry was optimized by determining nitrogen collision energies for each specific transition reaction. Gas chromatography was optimized by changing the temperature programme. Calibration curve range from 0.0005 mg/mL to 0.5 mg/mL was selected. Evaluated validation parameters including accuracy, repeatability, linearity, limit of detection, and limit of quantification were found to be satisfactory, ensuring the suitability of the rapid determination of selected isothiocyanates and nitriles in the mixture.

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

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| UVOD.....   | 1  |
| 1. OPĆI DIO.....  | 2  |
| 1.1. Glukozinolati.....   | 2  |
| 1.1.1. Izotiocijanati i nitrili.....  | 2  |
| 1.2. Kromatografija.....  | 3  |
| 1.2.1. Plinska kromatografija.....  | 4  |
| 1.3. Spektrometrija masa.....   | 8  |
| 1.3.1. Vrste ionizacije.....  | 10 |
| 1.3.2. Analizatori masa.....  | 10 |
| 1.3.3. Tandemska spektrometrija masa (MS/MS).....                                       | 12 |
| 1.4. Vrednovanje analitičke metode.....   | 13 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO.....   | 16 |
| 2.1. Korištene kemikalije i oprema.....   | 16 |
| 2.2. Identifikacija odabranih izotiocijanata i nitrila.....                             | 19 |
| 2.3. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona s inertnim plinom..... | 22 |
| 2.4. Praćenje specifičnih reakcija prijelaza.....                                       | 22 |
| 2.5. Optimizacija temperaturnog programa plinskog kromatografa.....                     | 23 |
| 2.6. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja.....                               | 24 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 29 |
| 3.1. Spektri masa odabranih izotiocijanata i nitrila.....                               | 29 |
| 3.2. Optimizacija energije sraza s inertnim plinom.....                                 | 34 |
| 3.3. Optimizacija plinske kromatografije.....   | 39 |
| 3.4. Odabir područja koncentracija otopina za izradu krivulja umjeravanja.....          | 44 |
| 3.4.1. Krivulje umjeravanja.....  | 46 |
| 3.5. Vrednovanje metode.....  | 47 |
| 3.5.1. Točnost.....   | 47 |
| 3.5.2. Ponovljivost injektiranja.....   | 48 |
| 3.5.3. Ponovljivost.....  | 50 |
| 3.5.4. Granica dokazivanja i granica određivanja.....                                   | 50 |
| ZAKLJUČAK.....  | 52 |
| LITERATURA.....   | 53 |

## UVOD

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka koje pripadaju porodici Brassicaceae. Ukoliko se ošteti tkivo biljke glukozinolati dolaze u kontakt s enzimom  $\beta$ -tioglukozid-glukohidrolazom zbog čega dolazi do njihove hidrolize. Ovisno o uvjetima hidrolize nastaju izotiocijanati, nitrili ili drugi razgradni produkti. Zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje postali su predmetom istraživanja s naglaskom na povezanost strukture molekule i njene biološke aktivnosti<sup>1</sup>.

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa, kao detektorom, tehnika je koja se koristi u identifikaciji i analizi različitih spojeva koji se nalaze u kompleksnim smjesama. Primjena joj je raširena u različitim granama znanosti. Koristi se u farmaceutici, analizi okoliša, petrokemiji, forenzici, u biološkim istraživanjima, kemiji materijala.

Cilj ovog diplomskog rada je razvoj i optimizacija metode koja bi u što kraćem vremenu korištenjem plinske kromatografije sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom, kao detektorom, omogućila razdvajanje i određivanje jedanaest (11) spojeva koji se nalaze u smjesi.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Glukozinolati

U zdravim biljkama kupusnjačama (brokula, cvjetača, kupus, prokulica), unutar vakuola nalaze se kemijski stabilni i biološki inertni spojevi glukozinolati. U citoplazmi se nalazi proteasom koji proizvodi  $\beta$ -tioglukozid-glukohidrolazu, enzim zadužen za njihovu razgradnju<sup>2</sup>. Oštećenjem tkiva biljke dolazi do djelovanja enzima na glukozinolate te se oslobađa glukoza, a zatim se s nestabilnog aglukona (tiohidroksimat-O-sulfonat) eliminira sulfat Lossenovom pregradnjom. Koji će produkti nastati ovisi o vrsti glukozinolata, dijelu biljke u kojem se oni nalaze, tretiranju biljke prije hidrolize te pH-vrijednosti i prisustvu iona željeza. Također, djelovanjem specifičnih proteina na glukozinolate s terminalnom dvostrukom vezom može doći do stvaranja epitionitrila<sup>3,4</sup>.

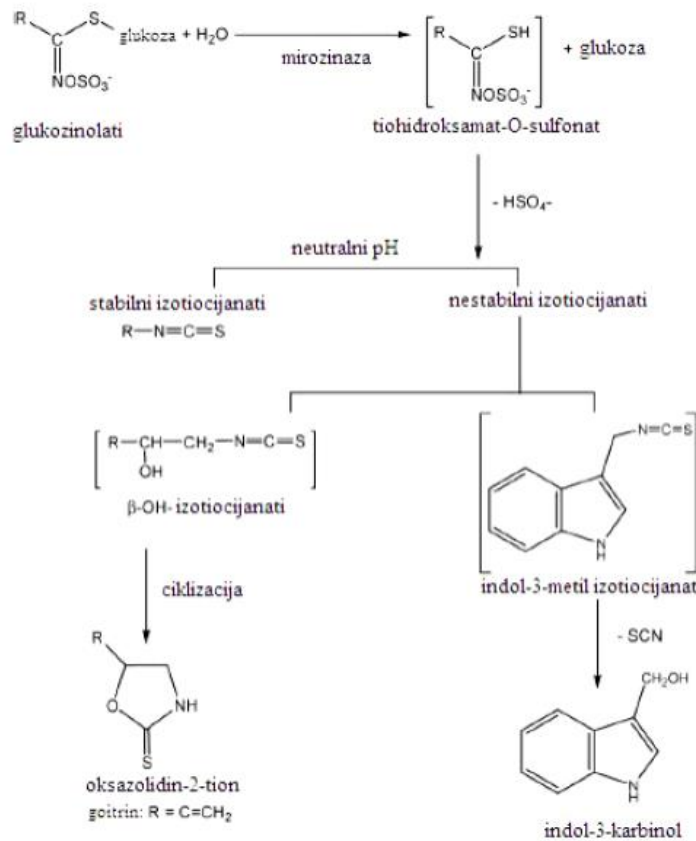
### 1.1.1. Izotiocijanati i nitrili

Izotiocijanati i nitrili prirodno se dobivaju katalitičkom reakcijom pomoću enzima  $\beta$ -tioglukozid-glukohidrolaza, trivijalnog imena mirozinaza. Karakteristično doprinose aromi povrća iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Formiranje izotiocijanata ili nitrila ovisi o različitim čimbenicima. Izotiocijanati obično nastaju pri neutralnim uvjetima (pH = 5 - 7), dok se nitrili uglavnom formiraju pri kiselim uvjetima hidrolize. Većina produkata hidrolize je stabilna, izuzev glukozinolata koji sadrže  $\beta$ -hidroksilirane bočne lance;  $\beta$ -hidroksi-izotiocijanat je nestabilan i spontano prelazi u oksazolidin-2-tion (goitrin). Indolni glukozinolati stvaraju nestabilne izotiocijanate koji se, nakon dodatne hidrolize i kondenzacije, formiraju u dimere, trimere i tetramere<sup>4</sup>

Prirodno dobiveni izotiocijanati pokazuju biološku aktivnost, primjerice antikancerogena svojstva pokazuju alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat, feniletil-izotiocijanat i sulforafan<sup>5</sup>.

Citotoksičnost nitrila zanemariva je u usporedbi s izotiocijanatima. Prema trenutačnim rezultatima *in vitro* istraživanja nema naznaka da bi nitrili iz hrane mogli imati značajnu ulogu u prevenciji raka<sup>6</sup>.

Osim prirodnih izotiocijanata u istraživanjima se koriste i sintetizirani izotiocijanati s namjerom razumijevanja i povezivanja biološke aktivnosti sa strukturom.



Slika 1. Razgradni produkti glukozinolata<sup>4</sup>

## 1.2. Kromatografija

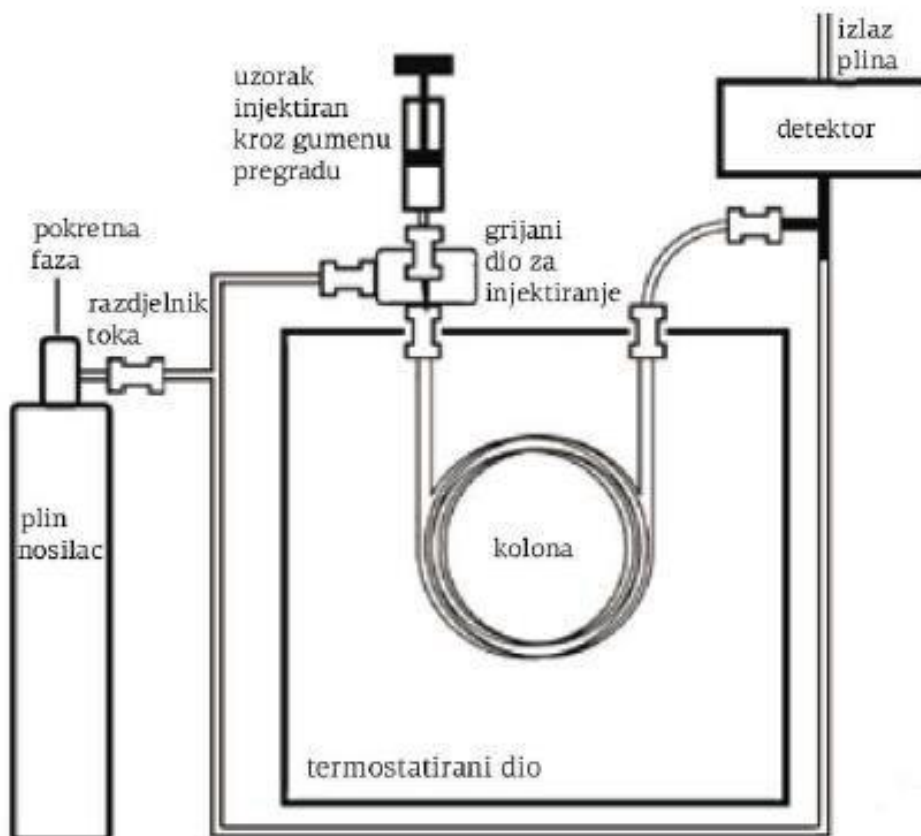
Kromatografija obuhvaća različite metode koje omogućuju razdvajanje, identifikaciju i određivanje blisko povezanih komponenti kompleksnih smjesa. Mnoge od ovih separacija su znatno otežane drugim metodama. U svim kromatografskim odjeljivanjima uzorak je otopljen u pokretnoj fazi, koja može biti plin, tekućina ili superkritična tekućina. Pokretna faza se zatim kreće kroz nepokretnu fazu koja može biti nanosena u tankom sloju na neki nosač ili u koloni. Odabiru se dvije faze tako da se komponente uzorka raspodijele između pokretne i nepokretne. Komponente koje su snažno zadržane od strane nepokretne faze polako se kreću s protokom pokretne faze. S

druge strane, komponente koje su slabo vezane za nepokretnu fazu putuju brzo. Zbog razlika u brzinama migracije, komponente uzorka se razdvajaju u diskretne zone, koje se mogu analizirati kvalitativno i kvantitativno<sup>7</sup>.

### **1.2.1. Plinska kromatografija**

James i Martin su 1952. godine predstavili plinsku kromatografiju (engl. *Gas Chromatography*, GC). Navedena tehnika se temelji na principu isparavanja uzorka u zagrijanom ulaznom dijelu ili injektoru plinskog kromatografa, nakon čega slijedi razdvajanje komponenata smjese u posebno pripremljenoj koloni. Ovom tehnikom mogu se analizirati samo spojevi koji se mogu ispariti bez razgradnje, poput većine otapala, pesticida, komponenata aroma, eteričnih ulja, goriva na bazi ugljikovodika i mnogih lijekova. Međutim, određene klase spojeva poput kiselina, aminokiselina, amina, amida, neisparljivih lijekova, šećera i steroida zahtijevaju derivatizaciju kako bi postali isparljivi. Uzorak se kroz punjenu kolonu prenosi pomoću inertnog plina. Razdvajanje komponenata odvija se putem raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Nakon što komponente izađu iz kolone dolaze do detektora<sup>8</sup>.





Slika 2. Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>9</sup>

### Automatski uzorkivač

Uzorci se automatski ubrizgavaju putem mehaničkih uređaja postavljenih na vrhu plinskih kromatografa. Ovi automatski uzorkivači simuliraju ljudski proces ubrizgavanja korištenjem šprice. Nakon ispiranja u otapalu šprica se ispiru otopinom koja će se injektirati i ubrizgavaju fiksni volumen u standardni ulaz plinskog kromatografa. Automatski uzorkivači sastoje se od nosača koji drži veliki broj uzoraka, standarda i otapala za ispiranje. Ovi se uzorci rotiraju u položaj ispod šprice kad god je potrebno. Automatski uzorkivači olakšavaju pokretanje mjerenja budući da analitičar ne mora biti prisutan između svakog ciklusa injektiranja. Ova vrsta uzorkivača pruža bolju preciznost od ručnog ubrizgavanja, obično s relativnom standardnom devijacijom (RSD) od 0,2%<sup>10</sup>.

## Injektori

Ako uzorak za plinsku kromatografiju nije u plinovitom stanju mora se prevesti u takvo stanje. Uplinjavanje se provodi u dijelu za injektiranje.

Za GC analizu koriste se pročišćena otapala koja sadrže analite od interesa. Unose se u injektor pomoću šprice namijenjene za upotrebu s plinskim kromatografima. Obično se ubrizga oko 1  $\mu\text{L}$  otopine. Postoje različite vrste injektora dizajnirane za plinske kromatografe. Za uzorke koji se analiziraju pomoću plinske kromatografije sa spektrometrom masa preporučuju se injektori prilagođeni za kapilarne kolone.

Najstariji i najčešće korišteni injektor za kapilarne kolone je grijani split/splitless injektor. Ovaj injektor može raditi u dva načina rada: djelomično injektiranje (engl. *split*) i potpuno injektiranje (engl. *splitless*). *Split* način rada koristi se za čiste uzorke (koji nisu otopljeni u otapalu) ili uzorke u kojima su analiti otopljeni u otapalu pri relativno visokim koncentracijama. U ovom načinu injektiranja uzorak se isparava u vrućem injektoru, a dio uzorka usmjerava se prema koloni. *Splitless* način rada koristi se za uzorke koji sadrže analite u tragovima, pa se cijeli uzorak isparava u vrućem injektoru i uvodi u kolonu. Odabir između *split* i *splitless* načina rada ovisi o koncentraciji analita u uzorku<sup>8</sup>.

## Kolone

U termostatiranoj peći nalaze se kolone unutar kojih se odjeljuju komponente uzorka. Razlikujemo punjene i kapilarne kolone.

Punjene kolone izrađene su od nehrđajućeg čelika i punjene nepokretnom fazom od dijatomejske zemlje prekrivene tankim slojem tekućine. Duljina im je do 3 metra, a promjer do 4 milimetra. Tekuća faza čini 3 % , 5% ili 10 % ukupne nepokretne faze<sup>10</sup>.

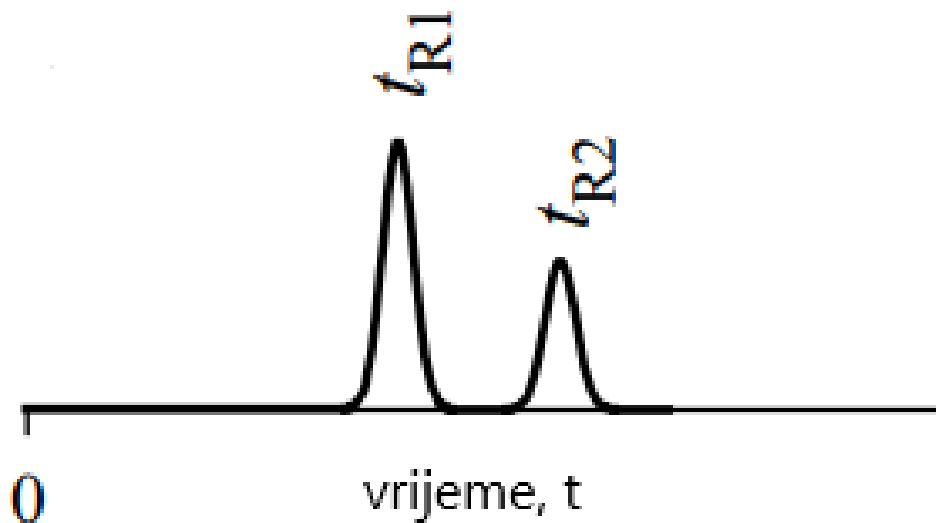
Kapilarne kolone jednostavne su kromatografske kolone kod kojih je unutarnji zid , stijenke prekriven tankim slojem nepokretne faze. Unutarnji promjer im je od 0,1 do 0,5 milimetara. Budući da je kolona otvorena, otpor protoku je nizak te su moguće velike duljine kolone, čak do 100 metara. Tipična duljina kolone je 30 metara i kao takve omogućuju učinkovite separacije kompleksnih smjesa. Kad se izrađuju od taljenog kvarca

mogu biti vrlo inertne. Postoje tri vrste kapilarnih kolona koje se razlikuju prema načinu na koji je nanjena nepokretna faza na unutarnju stijenku kolone.

- WCOT – kolona s unutarnjim slojem nepokretne faze
- SCOT – kolona s čvrstim nosačem obloženim tekućom nepokretnom fazom
- PLOT – kolona s čvrstim poroznim slojem polimera<sup>11</sup>.

## **Detektori**

Nakon prolaska kroz kolonu komponente uzorka zasebno dolaze na detektor. Detektor generira odgovor koji ukazuje na prisutnost komponente. Idealno, odgovor detektora na svaku tvar trebao bi biti proporcionalan količini ili koncentraciji te tvari. Način praćenja rezultata separacije je putem kromatograma, koji predstavlja grafički prikaz signala detektora u funkciji proteklog vremena nakon ubrizgavanja uzorka. Obično analiza kromatografije ne završava generiranjem kromatograma. Suvremeni kromatografski sustav može uključivati kromatograf i podsustav za analizu podataka. Sustav može kvantificirati i identificirati razdvojene signale te prikazati vrijeme zadržavanja, širinu, površinu, visinu, količinu, koncentraciju i druge informacije o svakom signalu<sup>12</sup>.



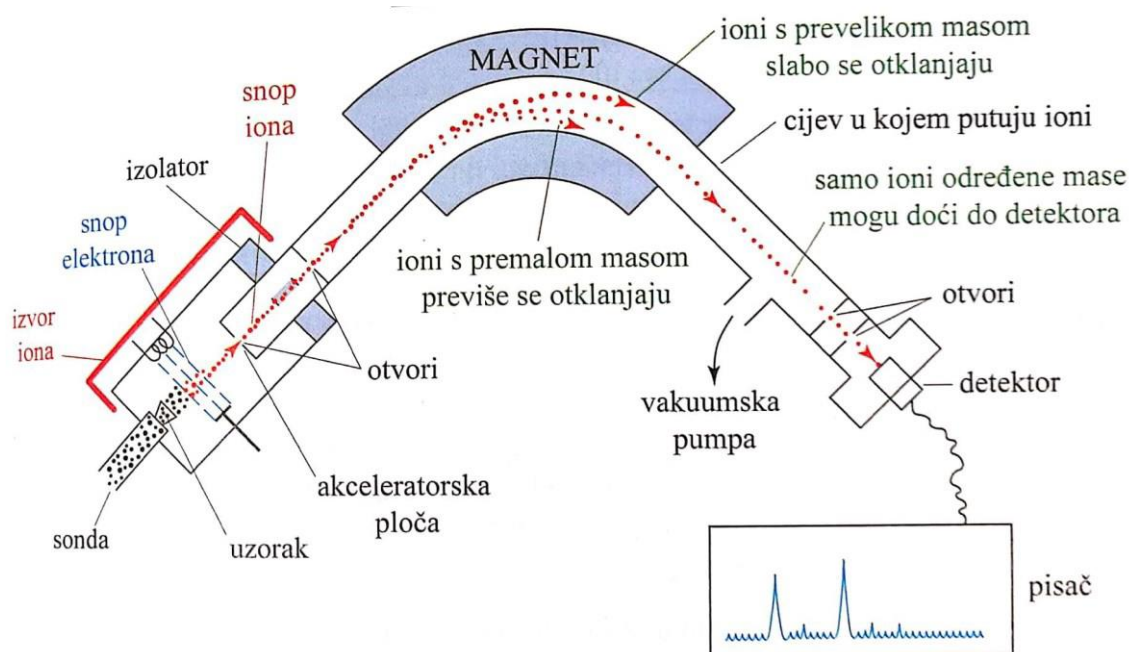
**Slika 3.** Kromatogram razdvajanja dvije komponente na koloni<sup>12</sup>

U plinskoj kromatografiji (GC) koristi se više od 60 različitih detektora, a većina je osmišljena specifično za ovu tehniku. Glavne iznimke su detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD) koji je već postojao kao analizator plina prije pojave GC-a, te spektrometar masa koji je prilagođen za prihvat velikih volumena i brze stope skeniranja potrebnih za GC signale. Uz spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS) najčešće korišteni detektor je plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector*, FID)<sup>10</sup>.

### 1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se često koristi u kombinaciji s drugim tehnikama kao što su UV/Vis, IR i NMR. Tumačenje kombiniranih spektralnih podataka često je dovoljno za utvrđivanje strukture nepoznatog spoja. Spektar masa nepoznatog organskog spoja može se također pretraživati računalno u velikoj knjižnici digitaliziranih spektara masa kako bi se utvrdio identitet strukture. Za razliku od nekih drugih instrumentalnih metoda, organski uzorci podvrgnuti analizi spektara mase prolaze kroz destruktivnu fragmentaciju. Unatoč tome, spektar masa se može dobiti s vrlo malo uzorka, čak i s količinom od samo nanograma. Stoga, ova tehnika ima prednost jer pruža

informacije o strukturi malih i vrijednih uzoraka. Spektrometrija masa, posebno kada se kombinira s plinskom kromatografijom, izvrsna je i vrlo pouzdana tehnika za kvantitativnu analizu i strukturnu identifikaciju mješavina uzoraka<sup>13</sup>.



**Slika 4.** Shematski prikaz rada spektrometra masa<sup>14</sup>

U klasičnom postupku spektrometrije masa, uzorak se uparava unutar zagrijane komore u visokom vakuumu. Nadalje, takav uzorak ulazi u ionizacijsku komoru gdje se bombardira snopom visokoenergetskih elektrona. Većina spektrometara mase radi s energijom od 70 eV. Energija bombardirajućih elektrona mnogo je veća od ionizacijskog potencijala organskih molekula. Ta velika razlika u energiji nužna je kako bi se proizveli ioni. Bombardiranje elektronima dovodi do razaranja molekula, stvarajući različite fragmentirane ione. Pozitivno nabijeni fragmenti izbacuju se iz ionizacijske komore prema akceleratornoj ploči. Velika razlika u potencijalu na akceleratornoj ploči povećava brzinu pozitivno nabijenih iona. Nakon ubrzavanja stvara se jednoličan tok iona koji ulazi u magnetsko polje. Gibanje pozitivno nabijenih fragmenata u magnetskom

polju ovisi o njihovom omjeru mase i naboja. Početni tok iona razdvaja se pod utjecajem magnetnog polja na više ionskih tokova kod kojih se u svakom toku nalaze fragmenti s identičnim omjerima mase i naboja ( $m/z$ ) te tako odlaze na analizator koji ima ulogu mjerenja omjera mase i naboja. Rezultat je spektar koji se sastoji od različitih vertikalnih linija, prikazanih s odgovarajućim vrijednostima omjera mase i naboja  $m/z$  i inteziteta. U određenom smislu, spektar masa može se smatrati „otiskom prsta” molekule. Drugim riječima, ako su dva spektra mase identična i dobivena pod istim uvjetima koristeći isti instrument, to može biti dokaz identičnih spojeva ili blisko povezanih izomera<sup>13</sup>.

### 1.3.1. Vrste ionizacije

Odabir ionizacijske metode ovisi o svojstvima analita, kao što su hlapljivost, molekulska masa, termička stabilnost te složenost matrice u kojoj se analit nalazi. Uobičajene metode ionizacije mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije: one koje zahtijevaju uzorak u plinovitoj fazi prije ionizacije i one koje mogu ionizirati uzorke niske hlapljivosti i visoke molekulske mase.

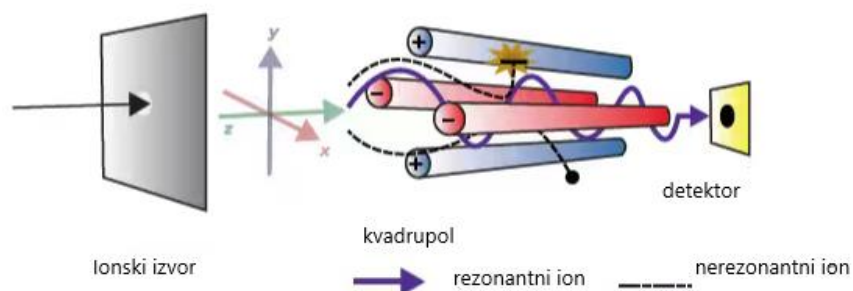
Prva kategorija obuhvaća metode poput elektronske ionizacije (EI) i kemijske ionizacije (CI) koje su široko prihvaćene zbog njihove česte uporabe u GC/MS sustavima. Drugi tipovi ionizacije mogu se dalje podijeliti na one koje koriste otopine uzorka (npr. ionizacija elektroraspršenjem, i dr.) i one koje se temelje na suvremenim tehnikama desorpcije i ionizacije uzorka s čvrstog supstrata (kao što su matricom potpomognuta laser desorpcija/ionizacija)<sup>15</sup>.

### 1.3.2. Analizatori masa

Postojeći analizatori masa klasificiraju se prema načinu dovođenja iona do analizatora. Razlikujemo dva načina, kontinuirani i pulsirajući. Kod kontinuiranog postoji neprekidno dovođenje iona na analizator, dok kod pulsirajućeg načina ioni dolaze samo

u određenim vremenskim intervalima. Osim pojedinačnih analizatora mase, postoje tandemski/hibridni uređaji, poznati kao MS/MS sustavi. Pojedinačni analizatori mase poput magnetskog sektorskog analizatora, kvadrupolnog analizatora i analizatora vremena leta često su korišteni za mjerenje organskih spojeva<sup>16</sup>.

### Kvadrupolni analizator



**Slika 5.** Shematski prikaz gibanja iona od ionskog izvora kroz kvadrupol do detektora<sup>16</sup>

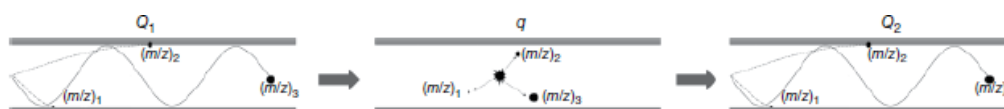
U ovom analizatoru, kontinuirani ionski izvor ubrzava ione u smjeru  $z$ -osi pomoću slabe napetosti. Zatim ioni ulaze u kvadrupol kroz malu rupu. Primjenom odgovarajuće kombinacije izmjenične istosmjerne napetosti na pojedine elektrode kvadrupola, stvara se oscilirajuće električno polje unutar kvadrupola. Ioni koji imaju određeni omjer  $m/z$  održavaju stabilne oscilacije i prolaze kroz kvadrupol do detektora, dok ostali ioni s drugim omjerima  $m/z$  postaju nestabilni i ne dolaze do detektora. Ova metoda rada omogućuje stvaranje spektra masa za širok raspon iona, čime se dobivaju važni podaci o masi i kemijskim svojstvima analita<sup>16</sup>.

### 1.3.3. Tandemska spektrometrija masa (MS/MS)

S obzirom da svaki analizator masa ima svoje prednosti i ograničenja ulaže se napor da se iskoriste prednosti analizatora izbjegavajući mane kako bismo dobili bolju osjetljivost, bolju selektivnost i preciznije mjerenje mase.

#### Trostruki kvadrupol (QqQ)

Kvadrupoli imaju mogućnost odabrati ione određenog omjera mase i naboja. Kombinirajući više kvadrupola nastao je tandemski analizator masa trostruki kvadrupol (QqQ)<sup>15</sup>.



**Slika 6.** Shema trostrukog kvadrupola; Q = analizator masa, q = kolizijska ćelija<sup>15</sup>

Kod analize iona produkta u prvom kvadrupolu  $Q_1$  se odabire ion određene vrijednosti  $m/z$ , koji disocira u kolizijskoj ćeliji  $q$  prilikom sudara s kolizijskim plinom. Nastali produkti se analiziraju u trećem kvadrupolu  $Q_3$ . Moguće je analizirati i ion prekursor tako da se u  $Q_3$  odabire ion određene vrijednosti  $m/z$ , dok se u  $Q_1$  detektiraju svi ioni koji, disocijacijom u kolizijskoj ćeliji, rezultiraju odabranim ionom. Kod analize neutralnog gubitka u  $Q_1$  se snima ion ( $m/z = x$ ), dok se u  $Q_3$  snima ion ( $m/z = x - a$ ) umanjen zbog gubitka neutralne molekule nakon kolizijski inducirane disocijacije. Osim toga, trostrukim kvadrupolom mogu se pratiti i specifične reakcije prijelaza. U  $Q_1$  se odabire ion prekursor, dok se u  $Q_3$  odabire samo traženi ion produkt koji nastaje nakon sudara s kolizijskim plinom<sup>17</sup>.



## **1.4. Vrednovanje analitičke metode**

Cilj vrednovanja analitičke metode je pokazati da je ta metoda prikladna. Analitička metoda treba jasno odražavati svoj cilj, što će utjecati na karakteristike validacije koje treba procijeniti. Tipične karakteristike koje treba razmotriti uključuju točnost, preciznost, ponovljivost, srednju preciznost, specifičnost, granicu detekcije, granicu kvantifikacije, linearnost, raspon. Robusnost se također može uzeti u obzir<sup>18</sup>.

### **Analitička procedura**

Analitička procedura odnosi se na način izvođenja analize. Trebala bi detaljno opisati korake potrebne za izvođenje svakog analitičkog testa. To može uključivati, ali nije ograničeno na: uzorak, referentni standard i pripremu reagensa, uporabu aparature, izradu krivulje umjeravanja, primjenu formula za izračunavanje, itd.

### **Specifičnost**

Specifičnost je sposobnost jednoznačne procjene analita u prisutnosti komponenata za koje se očekuju da budu prisutne. Obično uključuje nečistoće, produkte degradacije, matricu, itd. Nedostatak specifičnosti pojedine analitičke procedure može se nadoknaditi drugim potpornim analitičkim metodama.

### **Preciznost**

Preciznost analitičke metode izražava stupanj raspršenosti između niza mjerenja dobivenih iz višestrukog uzorkovanja istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može razmatrati na tri razine: ponovljivost, srednja preciznost i reproducibilnost (obnovljivost):

- Ponovljivost izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala. Ponovljivost se također naziva intra-ispitna preciznost.
- Srednja preciznost izražava varijacije unutar laboratorija: različiti dani, različiti analitičari, različita oprema, itd.
- Reproducibilnost izražava preciznost između laboratorija

Preciznost treba ispitivati pomoću homogenih i autentičnih uzoraka. Međutim, ako nije moguće dobiti homogeni uzorak, može se ispitivati pomoću umjetno

pripremljenih uzoraka ili otopine uzorka. Preciznost analitičke procedure obično se izražava kao varijanca, standardna devijacija ili koeficijent varijacije niza mjerenja.

### **Granica dokazivanja**

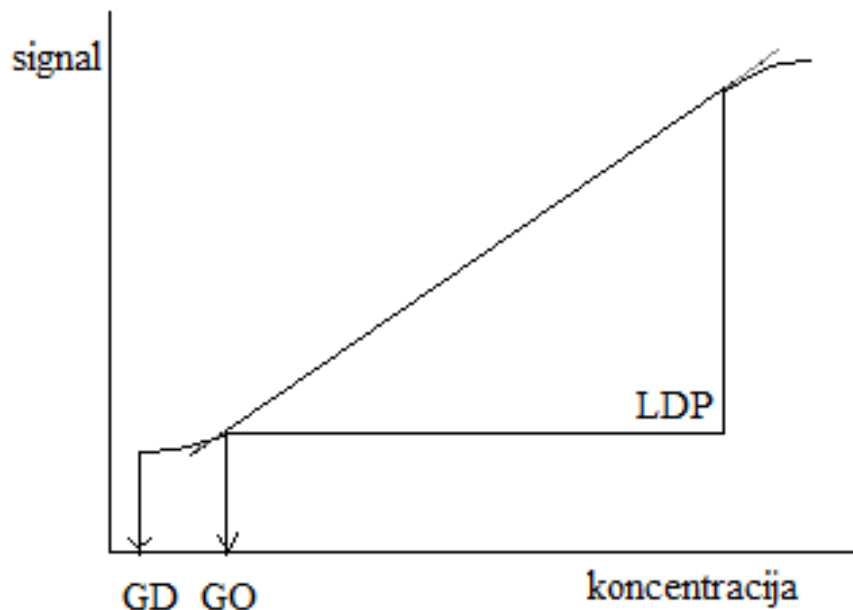
Granica dokazivanja pojedine analitičke metode je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno kvantitativno izmjeriti kao točna vrijednost.

### **Granica određivanja**

Granica određivanja pojedine analitičke metode je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću. Granica kvantifikacije je parametar kvantitativnih ispitivanja niskih razina spojeva u uzorcima, posebno za određivanje nečistoća i/ili produkata degradacije

### **Linearnost**

Linearnost analitičke metode je karakteristika (unutar određenog raspona) koja ukazuje na signal izravno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku<sup>18</sup>.



**Slika 7.** Grafički prikaz linearno dinamičkog područja (LDP), granica dokazivanja (GD), granice određivanja (GO)<sup>19</sup>

Linearno dinamičko područje (LDP) predstavlja područje koncentracija u kojem signal raste linearno s porastom koncentracije<sup>19</sup>.

### **Raspon**

Raspon analitičke metode je interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku (uključujući ove koncentracije) za koji je dokazano da analitička procedura ima odgovarajući nivo preciznosti, točnosti i linearnosti.

### **Robusnost**

Robusnost analitičke procedure je mjera njenog kapaciteta da ostane nepromijenjena zbog malih, ali namjernih varijacija u parametrima metode i pruža naznaku njene pouzdanosti tijekom normalne uporabe<sup>18</sup>.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

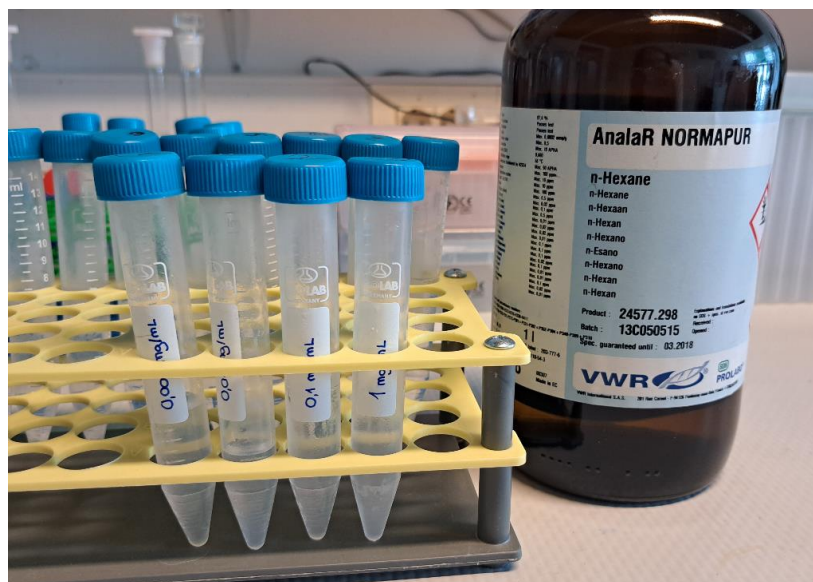
### 2.1. Korištene kemikalije i oprema

**Tablica 1.** Skraćenice koje se u daljnjem tekstu koriste umjesto punog naziva kemijskog spoja

| Puni naziv kemikalije             | Skraćenica |
|-----------------------------------|------------|
| fenilacetonitril                  | PhAN       |
| 3-fenilpropanonitril              | 3-PhPN     |
| 2-fenilet-il-izotiocijanat        | 2-PhEITC   |
| izopropil-izotiocijanat           | IPITC      |
| alil-izotiocijanat                | AITC       |
| benzil-izotiocijanat              | BzITC      |
| fenil-izotiocijanat               | PhITC      |
| 3-(metil-tio)propil-izotiocijanat | 3-(MT)PITC |
| 2-metoksifenil-izotiocijanat      | 2-MOPhITC  |
| 3-metoksifenil-izotiocijanat      | 3-MOPhITC  |
| 4-metoksifenil-izotiocijanat      | 4-MOPhITC  |



Slika 8. Standardi korišteni za pripremu otopina



Slika 9. Otopine pripremljene od prethodnih standarda u heksanu

**Tablica 2. Korištene kemikalije**

| Skraćenica | Sažeta strukturna formula | CAS broj  | Relativna molekulska masa | Proizvođač    | Čistoća       |
|------------|---------------------------|-----------|---------------------------|---------------|---------------|
| PhAN       | $C_6H_5CH_2CN$            | 645-59-0  | 117,15                    | Sigma-Aldrich | 98%           |
| 3-PhPN     | $C_6H_5CH_2CH_2CN$        | 140-29-4  | 131,17                    | Sigma-Aldrich | 99%           |
| 2-PhEITC   | $C_6H_5CH_2CH_2NCS$       | 2257-09-2 | 163,24                    | Sigma-Aldrich | $\geq 99\%$   |
| IPITC      | $(CH_3)_2CHNCS$           | 2253-73-8 | 101,17                    | Alfa Aesar    | 97%           |
| AITC       | $CH_2CHCH_2NCS$           | 57-06-7   | 99,15                     | Sigma-Aldrich | $\geq 93\%$   |
| BzITC      | $C_6H_5CH_2NCS$           | 622-78-6  | 149,21                    | Sigma-Aldrich | 98%           |
| PhITC      | $C_6H_5NCS$               | 103-72-0  | 13519                     | Sigma-Aldrich | 98%           |
| 3-(MT)PITC | $CH_3SCH_2CH_2CH_2NCS$    | 505-79-3  | 147,26                    | Sigma-Aldrich | $\geq 98\%$   |
| 2-MOPhITC  | $CH_3OC_6H_4NCS$          | 3288-04-8 | 165,21                    | Sigma-Aldrich | 98 %          |
| 3-MOPhITC  |                           | 3125-64-2 |                           |               |               |
| 4-MOPhITC  |                           | 2284-20-0 |                           |               |               |
| heksan     | $CH_3(CH_2)_4CH_3$        | 110-54-3  | 86,18                     | BDH Prolabo   | $\geq 97,6\%$ |

Popis korištene opreme:

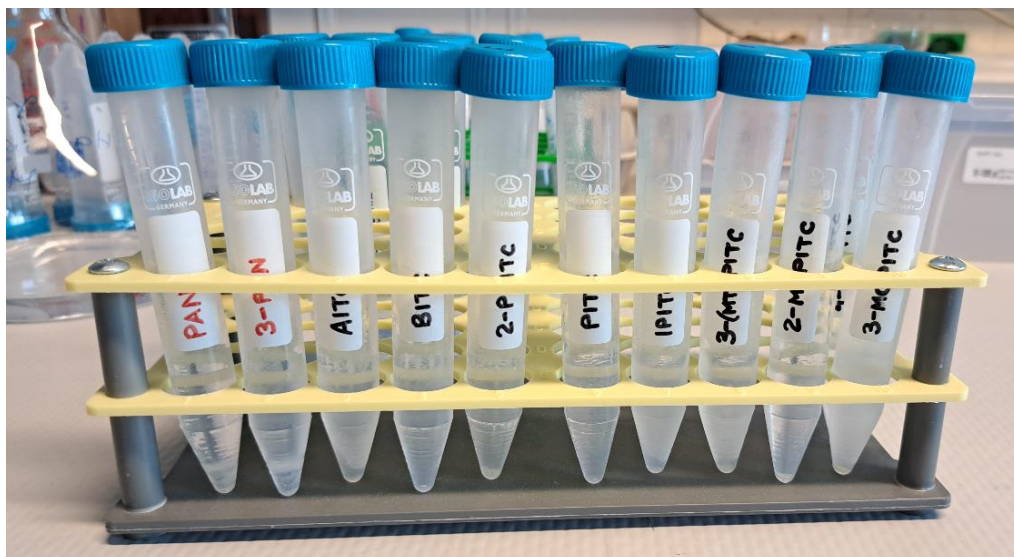
- analitička vaga: AT261 DR (Mettler Toledo, SAD)
- mehaničke pipete: Tacta (Sartorius, Njemačka)
- automatski uzorkivač: 7693A Autosampler (Agilent Technologies, SAD)
- plinski kromatograf: 8890 GC System (Agilent Technologies, SAD)
- kolona: HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m (Agilent Technologies,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



**Slika 10.** Plinski kromatograf sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom i automatskim uzorkivačem 8890 GC-7000D GC/TQ (Agilent Technologies, SAD)

## **2.2. Identifikacija odabranih izotiocijanata i nitrila**

Otapanjem 200  $\mu\text{L}$  pojedinog standarda u heksanu u odmjerne tikvici od 10 mL pripremljene su početne otopine. Početne otopine su dalje korištene za pripremu početne smjese svih 11 izotiocijanata i nitrila pri čemu je koncentracija svakog od tih spojeva u smjesi jednaka i iznosi 1,0 mg/mL. U tablici 3. prikazane su početne masene koncentracije i pripadajući volumeni početnih otopina pojedinačnih standarda potrebni za pripremu početne smjese. Početna smjesa otopina pripremljena je u odmjerne tikvici od 10 mL uz nadopunu heksanom do oznake.



**Slika 11.** Pripremljene početne otopine standarda

**Tablica 3.** Početne masene koncentracije i uzeti volumeni početnih otopina pojedinačnih standarda otopinama za pripremu početne smjese masenih koncentracija

| Naziv      | $\gamma_l$ (mg/mL ) | $V_l$ ( $\mu$ L) |
|------------|---------------------|------------------|
| PhAN       | 20,48               | 488              |
| 3-PhPN     | 20,18               | 469              |
| 2-PhEITC   | 21,95               | 456              |
| IPITC      | 18,51               | 540              |
| AITC       | 20,38               | 491              |
| BzITC      | 22,46               | 445              |
| PhITC      | 23,22               | 431              |
| 3-(MT)PITC | 22,30               | 448              |
| 2-MOPhITC  | 23,69               | 422              |
| 3-MOPhITC  | 23,62               | 423              |
| 4-MOPhITC  | 23,69               | 422              |



Uzorak početne smjese u kojoj je otopljeno 11 izotiocijanata i nitrila injektiran je automatskim uzorkivačem u plinski kromatograf spregnut s tandemskim spektrometrom masa (GC-MS/MS). Analizator masa je trostruki kvadrupol (QqQ). Snimanje fragmentnih iona odvijalo se u prvom kvadrupolu, dok su kolizijska ćelija i treći kvadrupol propustili ione do detektora. Metoda koju je razvio R. P. Adams za analizu komponenti eteričnih ulja je modificirana i korištena za analizu<sup>20</sup>.

Radni uvjeti plinskog kromatografa:

- plin nosioc: helij
- protok plina nosioca: 1 mL/min
- 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
- 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, cilj je izbjegavanje preopterećenja ionskog izvora prilikom ionizacije velike količine otapala koje se eluira iz kolone u tom vremenskom periodu.
- raspon  $m/z$  : 40 – 450.

Kromatogram bilježi 11 odvojenih signala koji predstavljaju 11 spojeva u pripremljenim otopinama. Za svaki signal snimljen je i spektar masa koji je uspoređen s bazama podataka Wiley i NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology*) čime su identificirani i potvrđeni odabrani izotiocijanati i nitrili za daljnju analizu.

### **2.3. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza odabranog iona s inertnim plinom**

Za spojeve fenil-izotiocijanat i 3-(metiltio)propil-izotiocijanat izabrani su signali s najvećim odzivom prema detektoru. Oni su ujedno prekursori koji se podvrgavaju disocijaciji. Disocijacija iona prekursora potaknuta je namjernim sudarom s neutralnim molekulama inertnog plina dušika dok su prolazili kroz spektrometar masa. Prvi kvadrupol spektrometra masa propušta samo odabrani ion prekursor, koji nakon sraza s dušikom disocira unutar kolizijske ćelije. Treći kvadrupol bilježi sve ione koji su rezultat te disocijacije (engl. *Full Scan Product Ion*). Fragmentni ioni koji nastaju nakon sraza početnog iona s dušikom bilježeni su pri četiri različite energije sraza: 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV. Analizom spektara masa snimljenih pri različitim energijama sraza s dušikom identificirani su produkti s najvećim odzivom prema detektoru.

### **2.4. Praćenje specifičnih reakcija prijelaza**

U analizi spojeva, specifične reakcije prijelaza prate se kroz nekoliko koraka. Prvi kvadrupol spektrometra masa propušta odabrani ion prekursor do kolizijske ćeliju gdje dolazi do disocijacije nakon sraza s dušikom. Zatim, treći kvadrupol propušta samo odabrani ion produkt prema detektoru (engl. *Multiple/Selected Reaction Monitoring*, MRM/SRM).

Ove specifične reakcije prate se pri 30 različitih energija sudara s dušikom, počevši od 2 eV i povećavajući energiju u koracima od 2 eV sve do 60 eV. Cilj je pronaći optimalnu energiju sudara s dušikom za svaku reakciju prijelaza, onu energiju kod koje detektor pokazuje najjači odziv za određenu fragmentaciju.

Zatim, istovremeno se prate različite specifične reakcije prijelaza pri optimalnim energijama sudara s dušikom (MRM). Pregledavajući spektre masa za svaki spoj, identificira se prijelaz koji pokazuje najveći odziv prema detektoru. Taj prijelaz se uzima kao kvantitativni prijelaz, dok se ostali prijelazi s relevantnim odzivom koriste kao kvalitativni prijelazi ili potvrdni prijelazi.

U konačnici, za svaki spoj odabrana su tri prijelaza: kvantitativni i barem dva kvalitativna, što je u skladu sa smjernicama koje zahtijevaju upotrebu najmanje jednog potvrdnog prijelaza u praksi.

Na isti su način odabrani ioni prekursori, ioni produkti, kvantitativni prijelaz te potvrdni prijelazi kao i optimalne energije sraza za te prijelaze spojeva:

- fenil-acetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotiocijanata, izopropil-izotiocijanata<sup>21</sup>
- alil-izotiocijanata<sup>1</sup>
- benzil-izotiocijanata<sup>22</sup>
- 2-metoksifenil-izotiocijanata, 3-metoksifenil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata<sup>23</sup>

## 2.5. Optimizacija temperaturnog programa plinskog kromatografa

Početna smjesa 11 spojeva jednakih koncentracija (1 mg/mL) je razrijeđena (0,1 mg/mL) te analizirana na GC-MS/MS-u. Napolarna 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, korištena je za odjeljivanje izotiocijanata i nitrila iz smjese. Ova kolona može se koristiti u temperaturnom rasponu od – 60 °C do 325/350 °C.

Za odabir optimalnog temperaturnog programa plinskog kromatografa ispitane su analize različite početne temperature peći, različite brzine povećanja temperature te različita izotermna zadržavanja. Također, reducirana je odgoda snimanja (engl. *Solvent delay*) na 2,5 minute.

Temperaturni program plinskog kromatografa:

- Početna temperatura peći: 70 °C
- Izotermno zadržavanje 1: 2 min
- Brzina povećanja temperature do 135°C: 120 °C/min
- Izotermno zadržavanje 2: 1 min
- Brzina povećanja temperature do 140 °C: 5 °C/min
- Izotermno zadržavanje 3: 1 min
- Brzina povećanja temperature do konačne temperature: 120 °C/min
- Konačna temperatura peći: 246 °C
- Izotermno zadržavanje 4 : 1 min

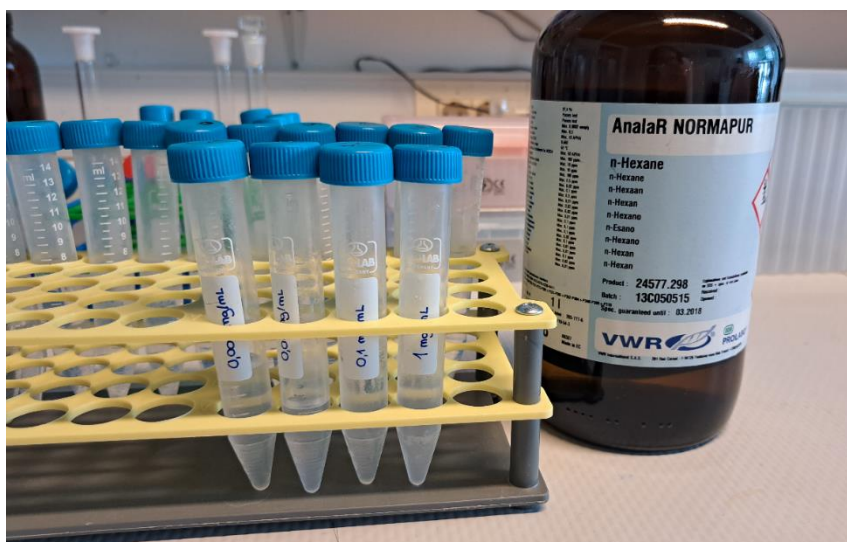
## **2.6. Priprema otopina za izradu krivulja umjeravanja**

Kako bi se odredilo područje koncentracija u kojem signal raste linearno s porastom koncentracije pripremljene su otopine u četiri reda veličine. Iz početnih otopina pojedinačnih standarda u odmjernoj tikvici od 10 mL pripremljena je otopina koja predstavlja smjesu svih 11 izotiocijanata i nitrila u skladu s tablicom 4 pri čemu je koncentracija svakog spoja u smjesi 1,0 mg/mL . Pripremljena početna smjesa potom se razrjeđivala na željene koncentracije u rasponu koncentracija od 0,0001 mg/mL do 1,0 mg/mL. i to direktno u bočice na ukupni volumen od 1 mL i sve to uz nadopunu heksanom kao otapalom.



**Slika 12.** Mehaničke pipete Tacta (Sartorius, Njemačka)

Područje koncentracija u kojem signal raste linearno s porastom koncentracije različito je za različite spojeve. Koncentracije niže od 0,0005 mg/mL i više od 0,50 mg/mL nemaju signal linearan s koncentracijom ni za jedan spoj, stoga su za izradu krivulja umjeravanja pripremljene otopine u koncentracijskom području od 0,0005 mg/mL do 0,5 mg/mL.

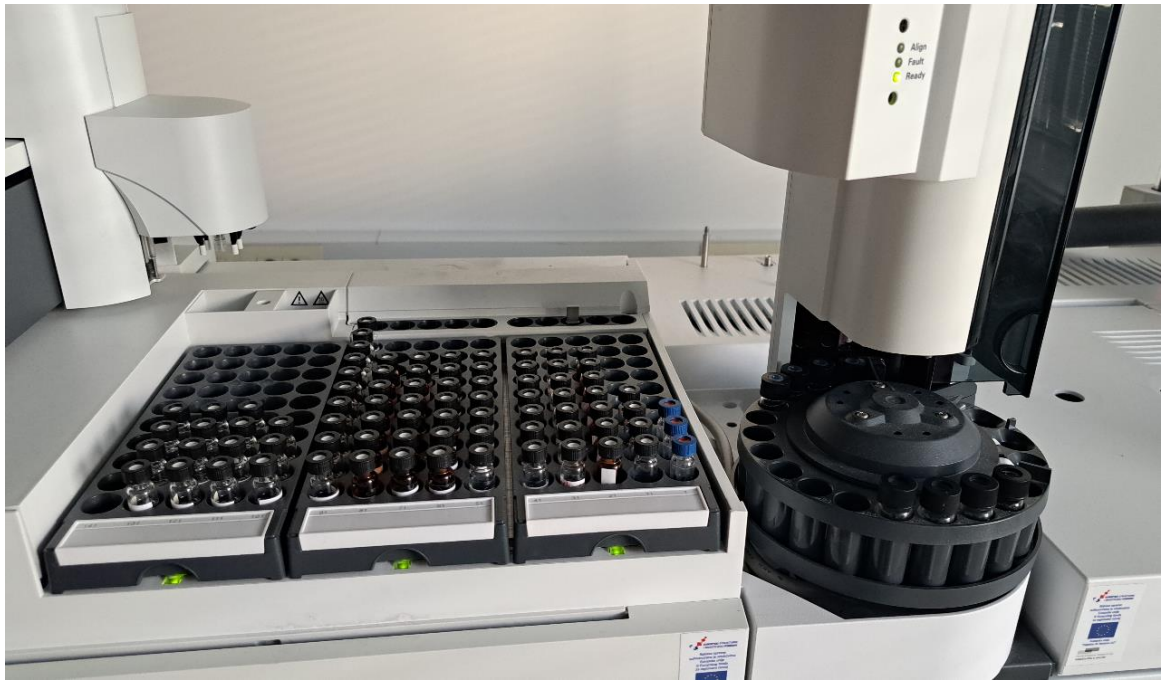


**Slika 13.** Smjese 11 spojeva različitih koncentracija (navedi koje) koje su korištene za daljnja razrijeđenja

Za izradu krivulja umjeravanja pripremljene su otopine koncentracija 1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL i 0,001 mg/mL. U tablici 4. prikazano je koje su od ovih otopina korištene za krivulje umjeravanja. Kako bi se dobilo više točaka za krivulje umjeravanja pripremljene su dodatne otopine razrjeđivanjem gore navedenih kako je to opisano u tablici 4. Radi uštede otapala te su otopine pripremljene direktno u bočice uz nadopunu heksanom na ukupan volumen od 1 mL.

**Tablica 4.** Koncentracije otopina za izradu krivulja umjeravanja

| <b>Koncentracije početnih smjesa</b> | <b>Koncentracije otopina za izradu krivulja umjeravanja/(mg/mL)</b> |
|--------------------------------------|---|
| 1,0 mg/mL                            | 0,50  |
|                                      | 0,25  |
| 0,1 mg/mL                            | 0,10  |
|                                      | 0,075   |
|                                      | 0,05  |
|                                      | 0,025   |
| 0,001 mg/mL                          | 0,01  |
|                                      | 0,0075  |
|                                      | 0,005   |
|                                      | 0,0025  |
| 0,0001 mg/mL                         | 0,001   |
|                                      | 0,00075   |
|                                      | 0,0005  |



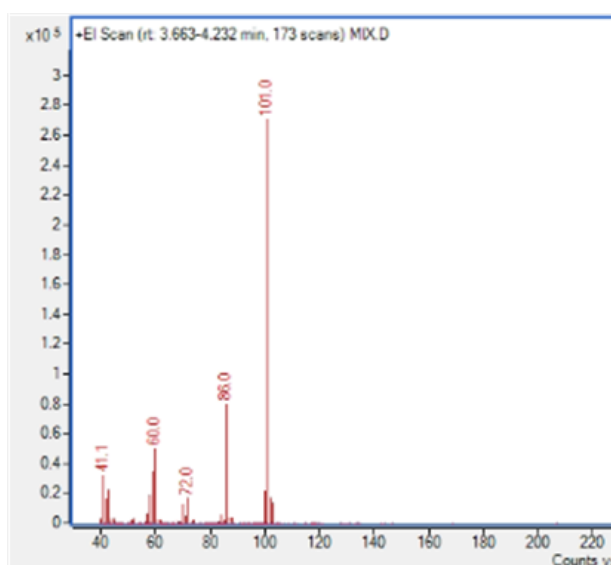
**Slika 14.** Prikaz svih pripremljenih otopina za GC-MS/MS mjerenja



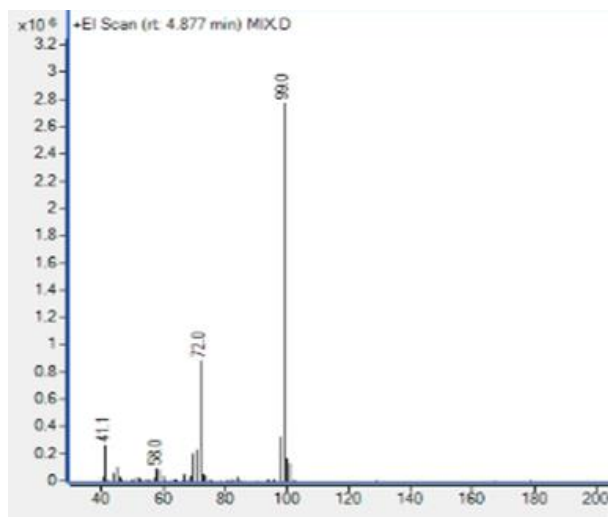
### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Spektri masa odabranih izotiocijanata i nitrila

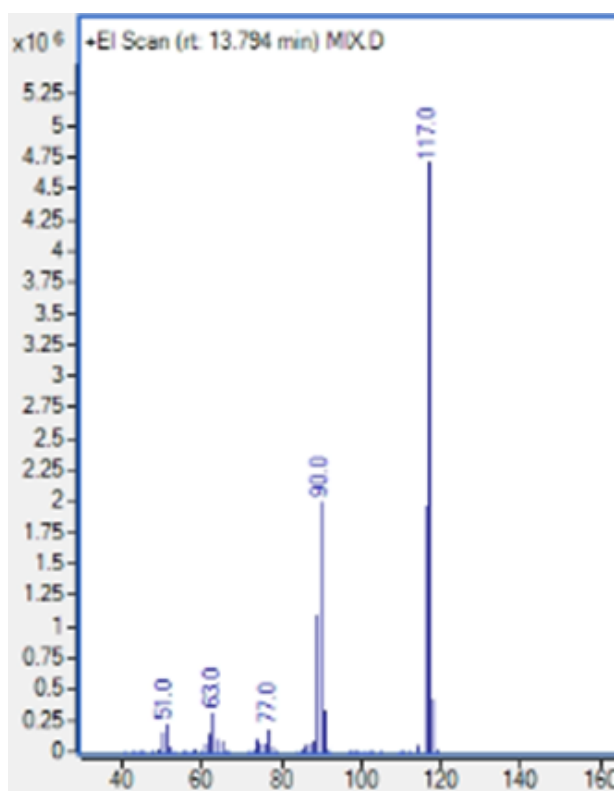
Korišteni standardi snimljeni su i uspoređeni sa spektrima masa iz baza podataka te prikazani na slikama u nastavku.



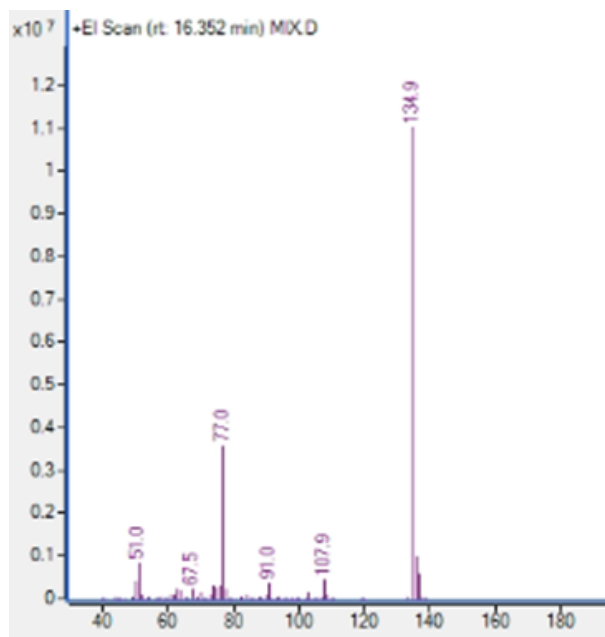
**Slika 15.** Spektar masa izopropil-izotiocijanata



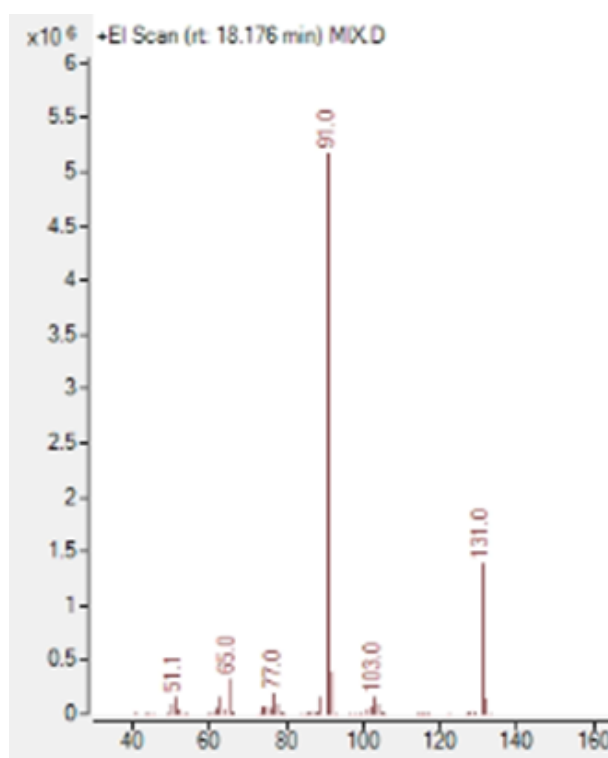
**Slika 16.** Spektar masa alil-izotiocijanata



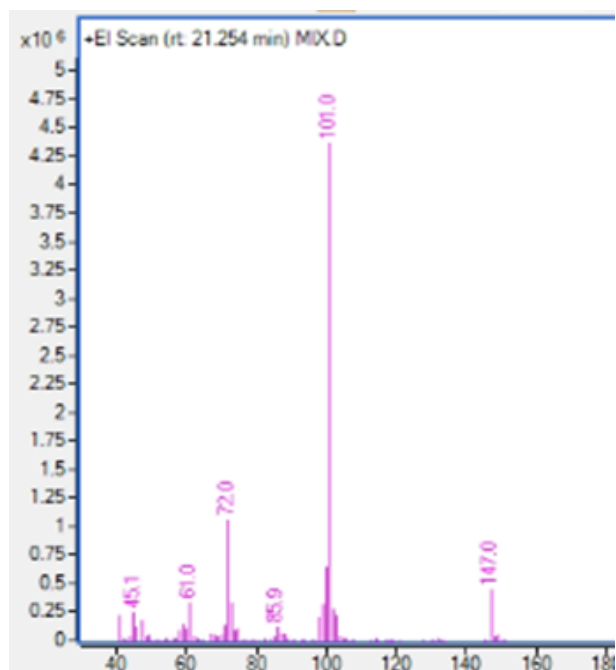
**Slika 17.** Spektar masa fenil-acetonitrila



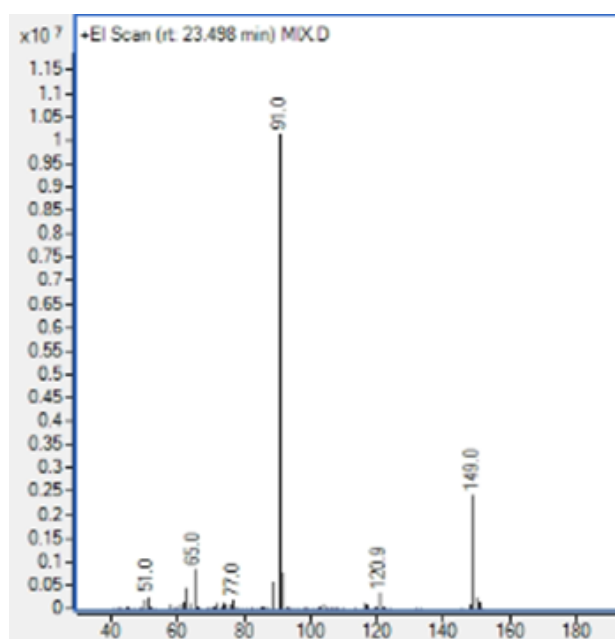
**Slika 18.** Spektar masa fenil-izotiocijanata



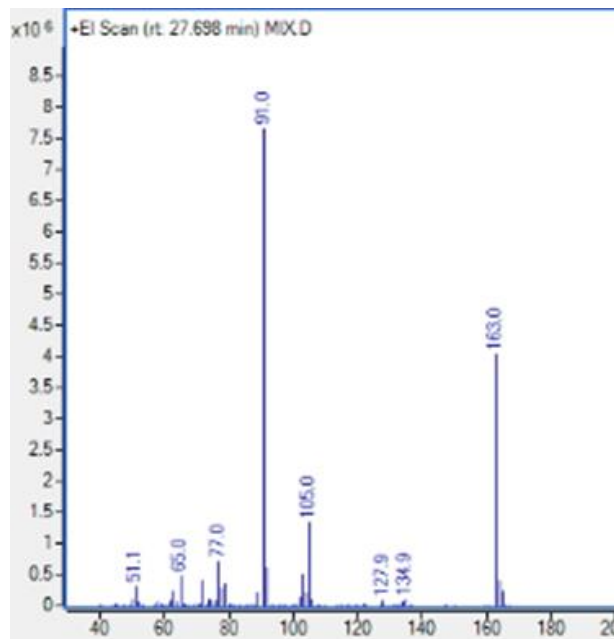
**Slika 19.** Spektar masa 3-fenilpropanonitrila



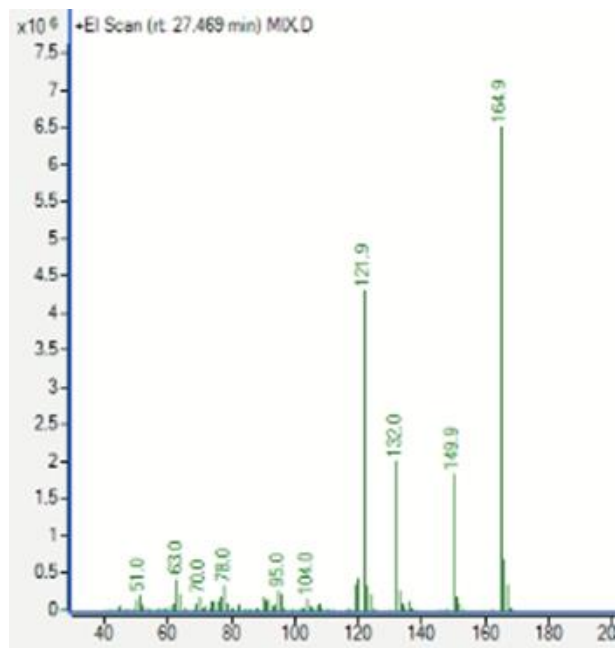
Slika 20. Spektar masa 3-(metiltio)propil-izotiocijanata



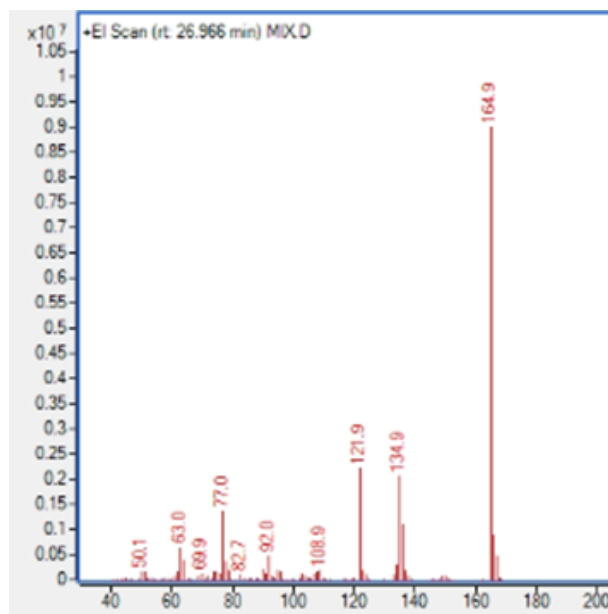
Slika 21. Spektar masa benzil-izotiocijanata



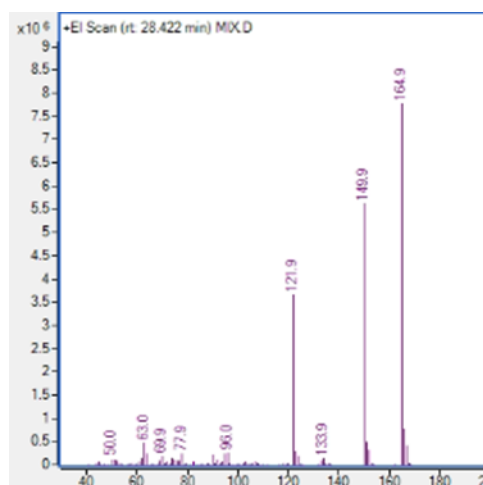
**Slika 22.** Spektar masa 2-feniletilizotiocijanata



**Slika 23.** Spektar masa 2-metoksifenil-izotiocijanata



Slika 24. Spektar masa 3-metoksifenil-izotiocijanata

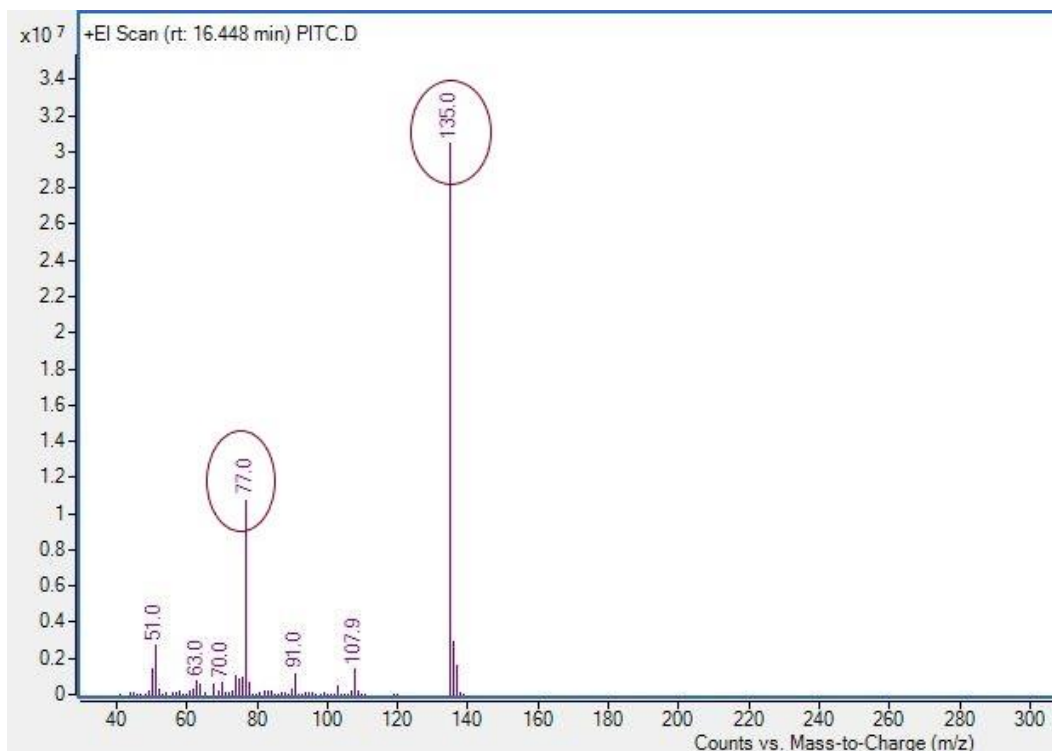


Slika 25. Spektar masa 4-metoksifenil-izotiocijanata

### 3.2. Optimizacija energije sraza s inernim plinom

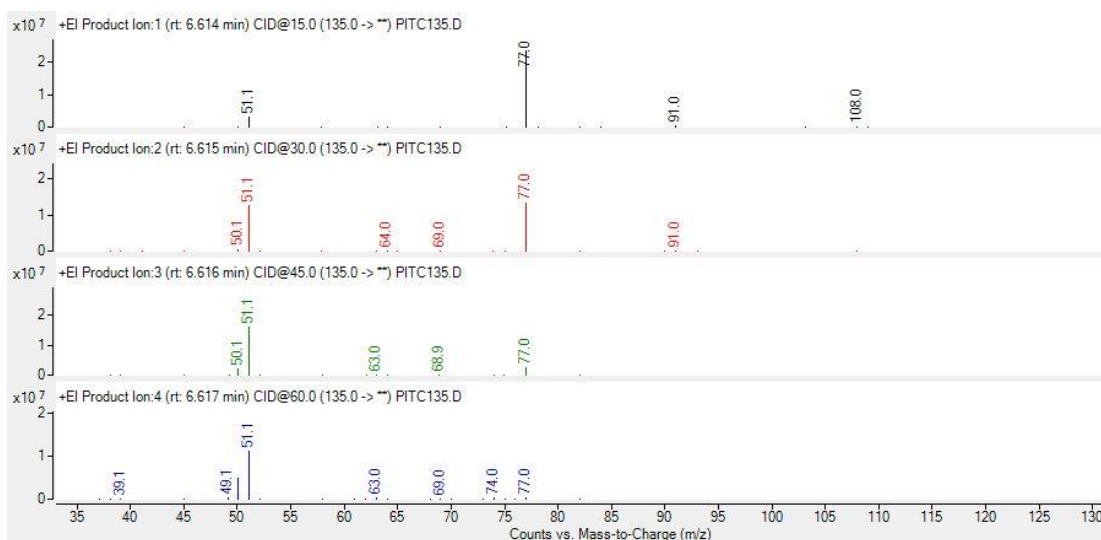
Prikazan je postupak optimizacije spektrometrije masa na primjeru fenil-izotiocijanata, uključujući optimizaciju energije sraza s inernim plinom dušikom te određivanje kvantitativnog i kvalitativnih prijelaza. Iz masenog spektra izdvojeni su ioni s najvećim odzivom (Slika 26.):

- Molekulski i osnovni  $m/z = 135$
- $m/z = 77$



**Slika 26.** Spektar masa PhITC-a s istaknutim fragmentima

Odabrani fragmenti s najvećim odzivom prema detektoru, podvrgavaju se koliziji s inertnim plinom pri četiri različite energije sraza (15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV).



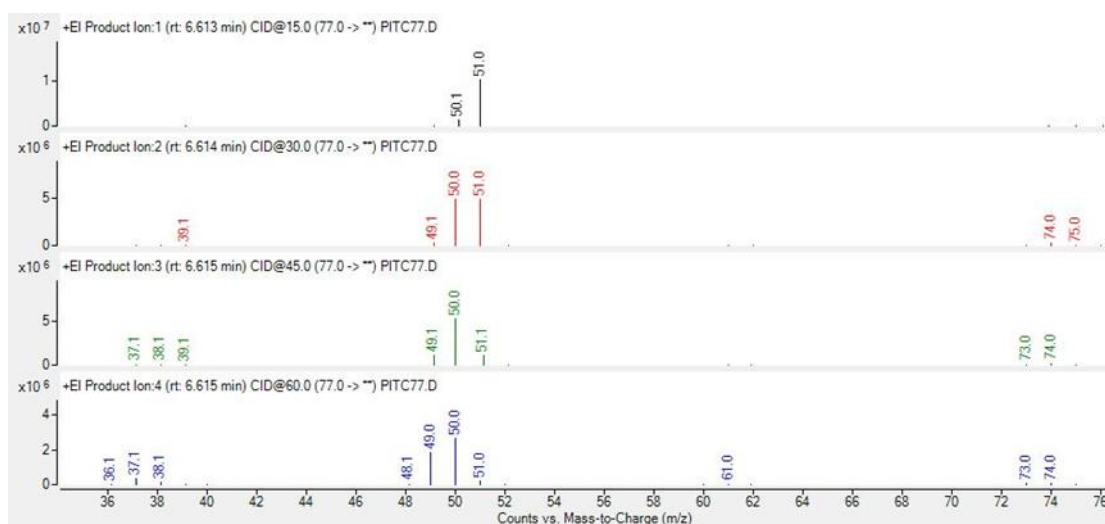
**Slika 27.** Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza iona  $m/z = 135$  s inertnim plinom pri 15 eV, 30 eV, 45 eV i 60 eV (odozgo prema dolje)

Proučavanjem spektara pri različitim energijama sraza može se primijetiti da najveći odziv prema detektoru imaju ioni  $m/z = 77$  i  $m/z = 51$  (Slika 27.). S obzirom na to, specifične reakcije prijelaza biti će :

- ( $m/z$ ): 135  $\rightarrow$ 77
- ( $m/z$ ): 135  $\rightarrow$ 51

Na isti način određene su specifične reakcije prijelaza za fragment  $m/z = 77$  (Slika 28.):

- ( $m/z$ ): 77  $\rightarrow$ 51
- ( $m/z$ ): 77  $\rightarrow$ 50.

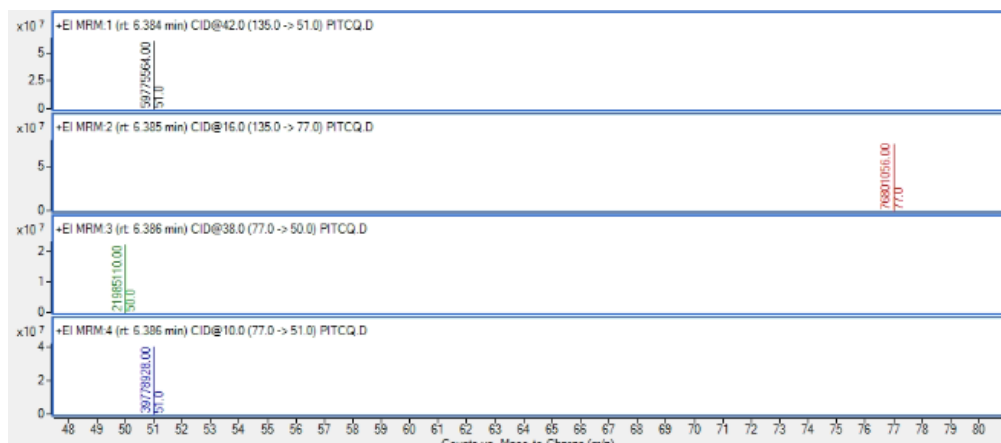


**Slika 28.** Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza iona  $m/z = 77$  s inertnim plinom pri različitim energijama sraza

Za svaki od četiri odabrana prijelaza istovremeno su provedene kolizije pri 30 različitim energijama sraza s inertnim plinom dušikom. Mijenjale su se energije sraza od 2 eV do 60 eV pri čemu je dobiveno 30 MS/MS spektara. Odabrani su spektri pri energijama sraza na kojima detektor ima najveći odziv za pojedini prijelaz.

Specifična reakcija prijelaza ( $m/z$ ) 135 $\rightarrow$ 77 pri energiji sraza 16 eV daje najveći odziv te se smatra kvantitativnim prijelazom za PhITC. Prijelazi ( $m/z$ ): 135 $\rightarrow$ 51 pri 42 eV, 77 $\rightarrow$ 51 pri 10 eV i 77 $\rightarrow$ 50 pri energiji sraza 38 eV smatraju se kvalitativnim odnosno potvrdnim prijelazima (Slika 29.).





**Slika 29.** MRM specifičnih reakcija prijelaza PhITC-a pri optimiziranim energijama sraza s inernim plinom

**Tablica 5.** Specifične reakcije prijelaza fenil-izotiocijanata

| PhITC | SRM prijelazi | Energija sraza | Vrsta prijelaza |
|-------|---------------|----------------|-----------------|
|       | 135→77        | 16 eV          | kvantitativni   |
|       | 135→51        | 42 eV          | kvalitativni    |
|       | 77→51         | 10 eV          | kvalitativni    |
|       | 77→50         | 38 eV          | kvalitativni    |

Jednakim postupkom dobivene su specifične reakcije prijelaza, pripadajućih optimiziranih energija sraza s inernim plinom i odabrani kvalitativni i kvantitativni prijelazi za 3-(MT)PITC. Rezultati ovog spoja su prikazani u tablici 6.

**Tablica 6.** Specifične reakcije prijelaza 3-(metiltio)propil-izotiocijanata

| 3-(MT)PITC | SRM prijelazi | Energija sraza | Vrsta prijelaza |
|------------|---------------|----------------|-----------------|
|            | 101→100       | 8 eV           | kvantitativni   |
|            | 101→67        | 26 eV          | kvalitativni    |
|            | 72→71         | 8 eV           | kvalitativni    |
|            | 72→45         | 16 eV          | kvalitativni    |

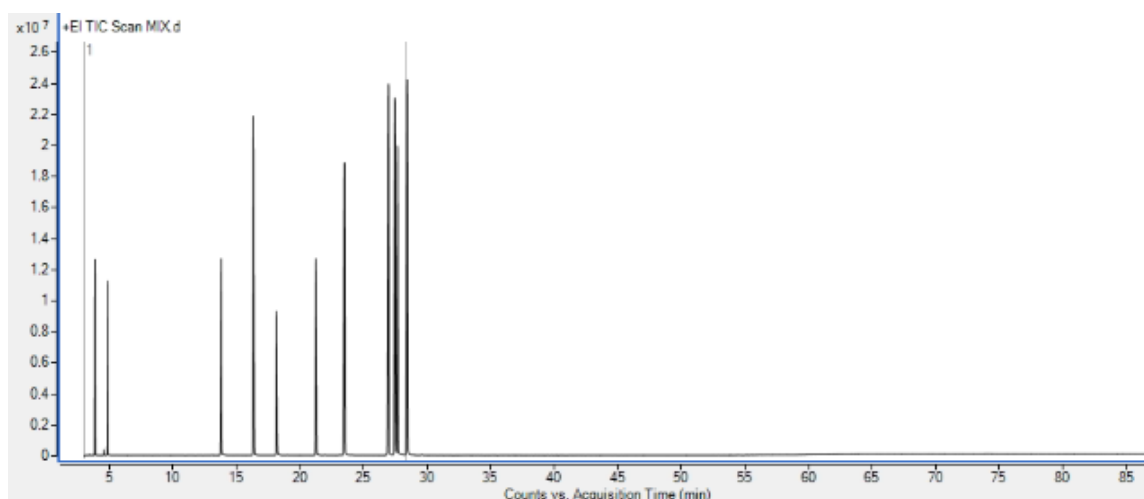
Prijelazi preostalih 9 spojeva preuzeti su iz literature te su prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Specifične reakcije prijelaza preostalih spojeva iz literature<sup>1,21,22,23</sup>.

| SPOJ             | SRM prijelazi  | Energija sraza/(eV) | Vrsta prijelaza      |
|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
| <b>PhAN</b>      | <b>117→89</b>  | <b>28</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 117→63         | 50                  | kvalitativni         |
|                  | 90→89          | 10                  | kvalitativni         |
|                  | 90→63          | 30                  | kvalitativni         |
| <b>3-PhPN</b>    | 131→91         | 6                   | kvalitativni         |
|                  | 131→65         | 38                  | kvalitativni         |
|                  | <b>91→65</b>   | <b>18</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 91→39          | 36                  | kvalitativni         |
| <b>2-PhEITC</b>  | 163→105        | 2                   | kvalitativni         |
|                  | 163→91         | 22                  | kvalitativni         |
|                  | <b>91→65</b>   | <b>16</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 91→39          | 34                  | kvalitativni         |
| <b>IPITC</b>     | 101→60         | 2                   | kvalitativni         |
|                  | <b>101→43</b>  | <b>6</b>            | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 86→60          | 10                  | kvalitativni         |
| <b>AITC</b>      | <b>99→41</b>   | <b>10</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 99→72          | 4                   | kvalitativni         |
|                  | 72→45          | 24                  | kvalitativni         |
|                  | 72→71          | 12                  | kvalitativni         |
| <b>BzITC</b>     | <b>149→91</b>  | <b>8</b>            | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 149→65         | 40                  | kvalitativni         |
|                  | 91→39          | 36                  | kvalitativni         |
|                  | 91→65          | 18                  | kvalitativni         |
| <b>2-MOPhITC</b> | <b>165→132</b> | <b>10</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 165→122        | 28                  | kvalitativni         |
|                  | 122→95         | 12                  | kvalitativni         |
| <b>3-MOPhITC</b> | 165→135        | 14                  | kvalitativni         |
|                  | <b>165→77</b>  | <b>28</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 135→77         | 14                  | kvalitativni         |
|                  | 135→51         | 40                  | kvalitativni         |
| <b>4-MOPhITC</b> | <b>165→122</b> | <b>28</b>           | <b>kvantitativni</b> |
|                  | 165→78         | 42                  | kvalitativni         |
|                  | 150→122        | 12                  | kvalitativni         |

### 3.3. Optimizacija plinske kromatografije

Cilj optimizacije je postizanje što kraćeg vremena trajanja mjerenja uz temperaturni program koji omogućava razdvajanje komponenata.



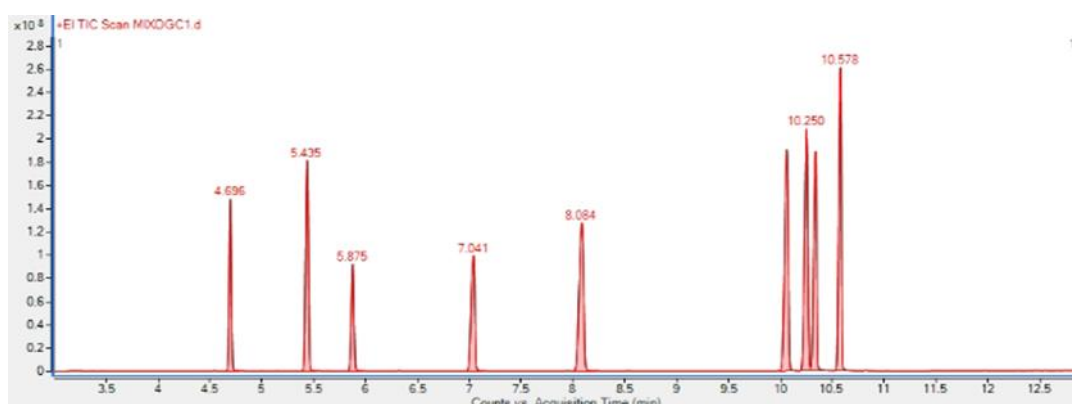
**Slika 30.** Plinski kromatogram modificirane metode po R. P. Adams-u

Na slici 30. prikazan je kromatogram, smjese 11 izotiocijanata i nitrila radnim uvjetima prikazanim u eksperimentalnom dijelu. Može se primijetiti da svi spojevi izlaze u prvih 30 minuta, dok temperatura peći po spomenutom temperaturnom programu dosegne 140 °C. Dakle, nakon postizanja temperature od 140 °C može se naglo povećavati temperaturu do konačne temperature peći od 246 °C kako bi mjerenje trajalo kraće, a izotermno zadržavanje temperature 246 °C skraćeno je s 25 minuta na 1 minutu.

Praznina između drugog i trećeg signala značajno je velika i usporava mjerenje. Povećanjem brzine povećanja temperature skraćuje se vrijeme između izlaska druge i treće komponente. To se odnosi i na komponente čiji su signali između trećeg i petog signala. Posljednja četiri signala nalaze se blizu, stoga od 130 °C do 140 °C nema potrebe za veliko povećanje brzine rasta temperature.

Temperaturni program prve optimizacije GC parametara:

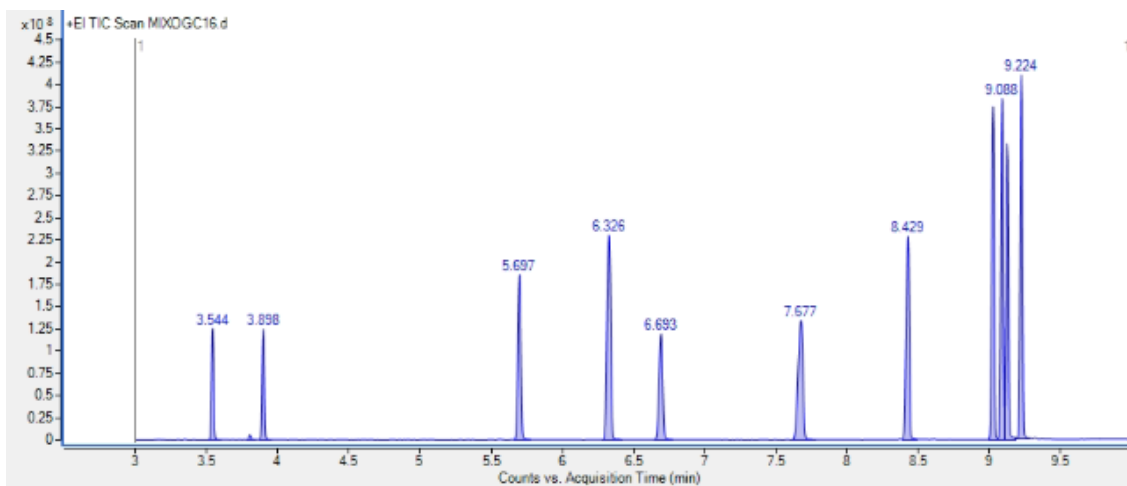
- Početna temperatura peći: 60 °C
- Izotermno zadržavanje 1: 1 min
- Brzina povećanja temperature do 130°C: 40°C/min
- Izotermno zadržavanje 2: 1 min
- Brzina povećanja temperature do 140°C: 2°C/min
- Izotermno zadržavanje 3: 1 min
- Brzina povećanja temperature do konačne temperature (246 °C): 50°C/min
- Izotermno zadržavanje na konačnoj temperaturi: 1 min



**Slika 31.** Kromatogram prve optimizacije GC parametara

Na slici 31. nalazi se 9 signala, koji predstavljaju 9 spojeva iz smjese. Zbog smanjenog zadržavanja na početnoj temperaturi peći na 1 minutu prve dvije komponente eluirale su kolone tijekom odgode snimanja detektora.

Vrijeme trajanja opisane metode je 12,9 minuta. Posljednje dvije minute na kromatogramu nema signala, što znači da se brzina povećavanja temperature od 140 °C do konačne temperature od 246 °C može povećati kako bi se metoda dodatno skratila.



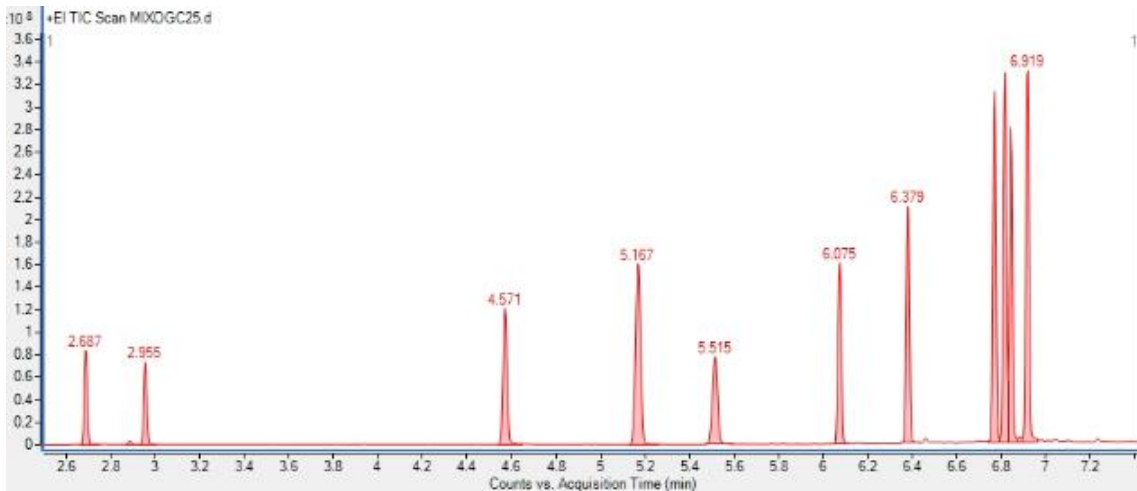
**Slika 32.** Kromatogram druge optimizacije GC parametara

Temperaturni program druge optimizacije GC parametara:

- Početna temperatura peći: 60 °C
- Izotermno zadržavanje 1: 3 min
- Brzina povećanja temperature do 135 °C: 120 °C/min
- Izotermno zadržavanje 2: 1 min
- Brzina povećanja temperature do 140 °C: 2 °C/min
- Izotermno zadržavanje 3: 1 min
- Brzina povećanja temperature do konačne temperature (246 °C): 120 °C/min
- Izotermno zadržavanje 4: 1 min

Na kromatogramu su vidljivi signali svih spojeva nakon što je izotermno zadržavanje na početnoj temperaturi peći od 60 °C vraćeno na 3 min. Brzina povećanja temperature do 135 °C i nakon 140 °C iznosi 120 °C/min, to je maksimalna vrijednost koju uređaj dopušta, stoga se razmaci između prvih 7 signala ne mogu više smanjiti. Potencijalno se metoda može proširiti na više od 11 spojeva čiji se signali mogu naći u tim dijelovima kromatograma. Ovako podešena metoda skraćuje mjerenje na 10 minuta, odnosno 7 minuta ako se u obzir uzme odgoda snimanja koja je postavljena u svrhu izbjegavanja preopterećenja ionskog izvora velikom količinom heksana koji eluira s kolone na početku analize.

U konačnici je odgoda snimanja detektora smanjena na 2,5 min (dovoljno za heksan), a kako bi se prvo vrijeme zadržavanja moglo smanjiti na 2 min, a da prva dva signala budu vidljiva na kromatogramu. Također, početna temperatura peći u posljednjoj optimizaciji je 70 °C.



**Slika 33.** Kromatogram treće optimizacije GC parametara

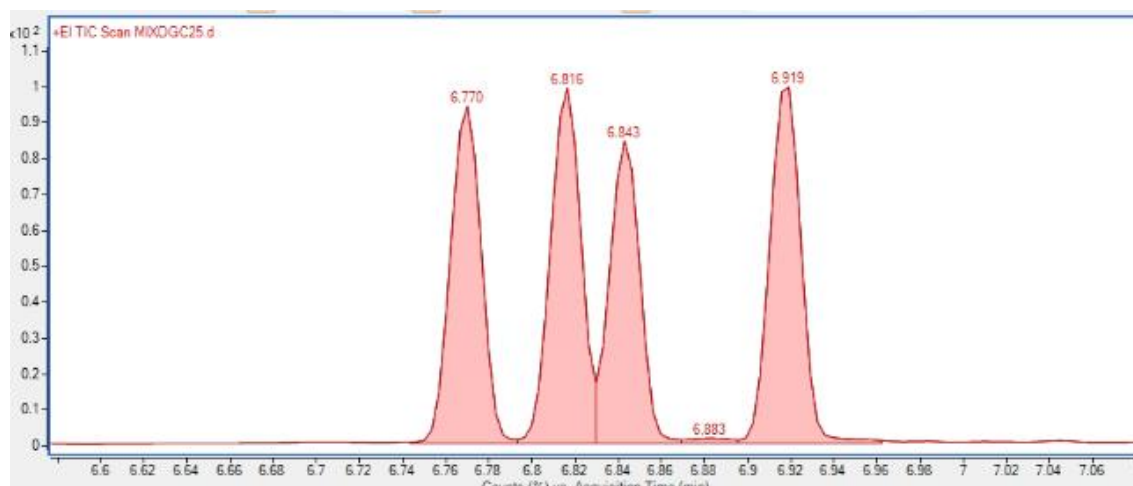
Temperaturni program treće optimizacije GC parametara:

- Početna temperatura peći: 70 °C
- Izotermno zadržavanje 1: 2 min
- Brzina povećanja temperature do 135 °C: 120 °C/min
- Izotermno zadržavanje 2: 1 min
- Brzina povećanja temperature do 140 °C: 5 °C/min
- Izotermno zadržavanje 3: 1 min
- Brzina povećanja temperature do konačne temperature (246 °C): 120 °C/min
- Izotermno zadržavanje 4: 1 min
- Vrijeme odgode snimanja detektora: 2,5 min

Trećom optimizacijom metoda je skraćena na 7,4 minute, a signali svih 11 izotiocijana i nitrila eluiraju s kolone tijekom 5 minuta pri retencijskim vremenima prikazanim u tablici 8.

**Tablica 8.** Prikaz vremena zadržavanja komponente u koloni

| SPOJ       | RT/min |
|------------|--------|
| IPITC      | 2,69   |
| AITC       | 2,99   |
| PhAN       | 4,57   |
| PhITC      | 5,17   |
| 3-PhPN     | 5,52   |
| 3-(MT)PITC | 6,08   |
| BzITC      | 6,38   |
| 3-MOPhITC  | 6,77   |
| 2-MOPhITC  | 6,82   |
| 2-PhEITC   | 6,84   |
| 4-MOPhITC  | 6,92   |

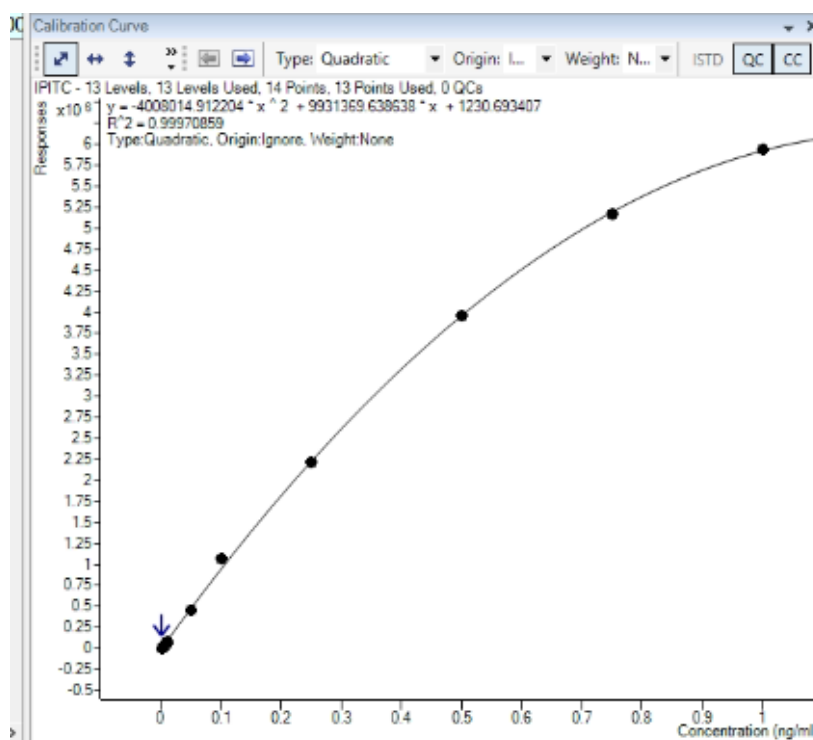


**Slika 34.** Uvećani prikaz razdvajanja posljednja četiri signala

Na slici 34. prikazano je upitno kromatografsko odjeljivanje komponenti 3-metoksifenil-izotiocijanata, 2-metoksifenil-izotiocijanata, 2-feniletil-izotiocijanata i 4-metoksifenil-izotiocijanata. Budući da je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom, svaki je izotiocijanat i nitril, osim retencijskim vremenom, definiran specifičnim reakcijama prijelaza pri optimiziranim energijama sraza. Kvantitativni prijelaz te barem dva potvrdna prijelaza garancija su uspješnog kvalitativnog i kvantitativnog određivanja spojeva od interesa. Stoga je najkraća metoda, bez straha od loše razlučivosti, odabrana te će služiti za daljnju analizu

### 3.4. Odabir područja koncentracija otopina za izradu krivulja umjeravanja

Pripremljene su otopine koncentracija u rasponu četiri reda veličine, na način koji je opisan u eksperimentalnom dijelu. Dobivene krivulje umjeravanja kroz četiri reda veličine imaju oblik kvadratne funkcije.



**Slika 35.** Prikaz krivulje umjeravanja izopropil-izotiocijanata u koncentracijskom području od 0,0001 mg/mL do 1,0 mg/mL



Na temelju krivulja umjeravanja komponenti u širokom koncentracijskom području uočljivo je da linearno dinamičko područje varira ovisno o spoju. Najniža koncentracija neke komponente koja ulazi u LDP je 0,0005 mg/mL, a najviša koncentracija neke komponente koja ulazi u LDP je 0,50 mg/mL.

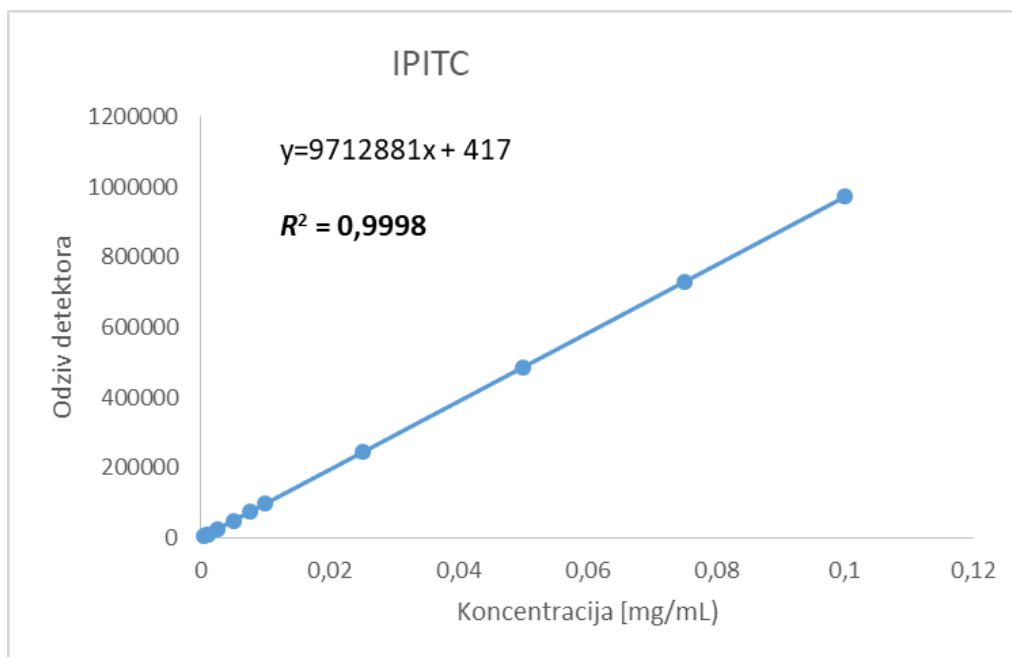
U tom koncentracijskom području pripremljene su otopine za izradu krivulja umjeravanja kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu.

### 3.4.1. Krivulje umjeravanja

Krivulje umjeravanja izrađene su na temelju otopina u području koncentracija od 0,0005 mg/mL do 0,50 mg/mL. Za svaki izotiocijanat i nitril odabrano je područje koncentracija u kojem signal raste linearno s porastom koncentracija, a ovisnost signala o koncentraciji prikazana je tablično za sve spojeve i grafički za izopropil-izotiocijanat..

**Tablica 9.** Tablični prikaz relevantnih podataka za izradu krivulje umjeravanja.

| Skraćenica | Koncentracijski raspon / (mg/mL) | broj točaka | $R^2$  | Jednadžba pravca        |
|------------|----------------------------------|-------------|--------|-------------------------|
| IPITC      | 0,0005-0,10                      | 11          | 0,9998 | $y = 9712881x + 417$    |
| AITC       | 0,00075-0,10                     | 10          | 0,9996 | $y = 8342606x - 1962$   |
| PhAN       | 0,005-0,25                       | 8           | 0,9999 | $y = 11348147x - 18194$ |
| PhITC      | 0,0025-0,25                      | 9           | 0,9998 | $y = 41349197x - 38550$ |
| 3-PhPN     | 0,005-0,50                       | 9           | 0,9998 | $y = 10182305x - 19685$ |
| 3-(MT)PITC | 0,005-0,25                       | 8           | 0,9996 | $y = 16639259x - 43358$ |
| BzITC      | 0,005-0,25                       | 8           | 0,9992 | $y = 21813691x - 614$   |
| 3-MOPhITC  | 0,00075-0,25                     | 11          | 0,9992 | $y = 31082527x - 10999$ |
| 2-MOPhITC  | 0,00075-0,10                     | 10          | 0,9983 | $y = 15708059x - 7539$  |
| 2-PhEITC   | 0,0025-0,10                      | 8           | 0,9994 | $y = 22874241x - 15268$ |
| 4-MOPhITC  | 0,00075-0,10                     | 10          | 0,9995 | $y = 27183848x - 10970$ |



**Slika 36.** Krivulja umjeravanja izopropil-izotiocijanata

### 3.5. Vrednovanje metode

#### 3.5.1. Točnost

Točnost metode procijenjena je usporedbom očekivanih koncentracija s onima koje su izračunate iz jednadžbe pravca. Raspon točnosti smatra se zadovoljavajućim ako se nalazi u području 80 % -120 %. U tablici 10 navedeni su rasponi točnosti za 11 izotiocijanata i nitrila. Kod benzil-izotiocijanata najniža vrijednost točnosti iznosi 79,61 %, što je malo odstupanje od 80 % stoga je ova vrijednost prihvaćena. Kod 3-metoksifenil-izotiocijanata iznosi 75,59 %, što također nije veliko odstupanje, a kako se odnosi na koncentraciju 0,0025 mg/mL, što nije najniža koncentracija, može se pripisati pogreški analitičara. Može se stoga reći da se točnost kreće u zadovoljavajućem rasponu

**Tablica 10.** Rasponi točnosti za jedanaest izotiocijanata i nitrila dobiveni usporedbom očekivanih koncentracija s izračunatima iz jednadžbe pravca

| Skraćenica | Raspon točnosti /(%) |
|------------|----------------------|
| IPITC      | 85,77-110,39         |
| AITC       | 81,54-130,76         |
| PhAN       | 93,16-114,24         |
| PhITC      | 92,41-105,17         |
| 3-PhPN     | 90,50-115,90         |
| 3-(MT)PITC | 87,76-114,28         |
| BzITC      | 79,61-104,87         |
| 3-MOPhITC  | 75,59-105,49         |
| 2-MOPhITC  | 82,42-120,18         |
| 2-PhEITC   | 95,09-108,67         |
| 4-MOPhITC  | 91,12-118,66         |

### 3.5.2. Ponovljivost injektiranja

Ponovljivost injektiranja odnosi se na sposobnost metode da proizvede konzistentne rezultate pri višestrukim uzastopnim injekcijama istog uzorka. Ova karakteristika mjeri koliko je precizna i pouzdana metoda analize, uzimajući u obzir varijacije koje mogu nastati zbog procesa uzorkovanja, rukovanja uzorcima ili instrumentalnih varijacija. Visoka ponovljivost injektiranja ukazuje na stabilnost metode i pouzdane rezultate tijekom više mjerenja istog uzorka. Ponovljivost injektiranja ispitana je na način da se otopina smjese 11 izotiocijanata i nitrila, koncentracije 0,01 mg/mL injektirala pet puta u instrument. Relativno standardno odstupanje prikazano je za svaki spoj u tablici 11. Rezultati su zadovoljavajući jer je maksimalna vrijednost relativne standarde devijacije 7,27 %.

**Tablica 11.** Ponovljivost injektiranja za 11 izotiocijanata i nitrila

| <b>Skraćenica</b> | <b>RSD(%)</b> |
|-------------------|---------------|
| IPITC             | 5,44          |
| AITC              | 6,89          |
| PhAN              | 6,06          |
| PhITC             | 4,66          |
| 3-PhPN            | 6,12          |
| 3-(MT)PITC        | 4,50          |
| BzITC             | 4,71          |
| 3-MOPhITC         | 4,59          |
| 2-MOPhITC         | 7,27          |
| 2-PhEITC          | 4,80          |
| 4-MOPhITC         | 3,74          |

### 3.5.3. Ponovljivost

Provedena je provjera ponovljivosti određene metode. Ova provjera je obuhvatila usporedbu rezultata tri različita ponavljanja postupka pripreme otopina, koje su zatim korištene za izradu krivulja umjeravanja. Za ispitivanje ponovljivosti metode korištene su koncentracije: 0,001 mg/mL, 0,0075 mg/mL i 0,1 mg/mL. Izračunato je relativno standardno odstupanje za svaku razinu koncentracije koja je korištena u eksperimentu. Relativno standardno odstupanje je mjera raspršenosti podataka u odnosu na srednju vrijednost i koristi se kao pokazatelj preciznosti eksperimentalnih rezultata. Osim toga, izračunato je i združeno relativno standardno odstupanje koje predstavlja mjeru raspršenosti podataka za sve koncentracijske razine koje su korištene. Za vrijednost koncentracije 0,1 mg/mL relativna standardna devijacija ima zadovoljavajući rezultat za sve spojeve. Naime, vrijednosti se nalaze unutar 10 %. Kod koncentracije 0,001 % najveća vrijednost RSD-a je 11,63 %, a kod koncentracije 0,0075 % je 12,02 % što se može smatrati donekle prihvatljivim rezultatom.

**Tablica 12.** Relativno standardno odstupanje ponovljivosti metode za tri injektiranja pri tri različite koncentracije

| Skraćenica | RSD (%) za koncentraciju 0,001 mg/mL | RSD (%) za koncentraciju 0,0075 mg/mL | RSD (%) za koncentraciju 0,1 mg/mL |
|------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| IPITC      | 4,70                                 | 3,50                                  | 6,87                               |
| AITC       | 8,89                                 | 2,54                                  | 6,55                               |
| PhAN       | 1,63                                 | 1,56                                  | 3,85                               |
| PhITC      | 5,57                                 | 2,03                                  | 4,25                               |
| 3-PhPN     | 4,48                                 | 2,30                                  | 2,66                               |
| 3-(MT)PITC | 4,59                                 | 3,48                                  | 3,78                               |
| BzITC      | 8,01                                 | 4,22                                  | 2,99                               |
| 3-MOPhITC  | 11,63                                | 3,72                                  | 2,92                               |
| 2-MOPhITC  | 8,25                                 | 12,02                                 | 6,41                               |
| 2-PhEITC   | 10,16                                | 3,24                                  | 6,04                               |
| 4-MOPhITC  | 9,04                                 | 1,63                                  | 5,94                               |

### 3.5.4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja i granica određivanja su ključni pokazatelji učinkovitosti metode kada se ispituju analitičke tvari s niskim koncentracijama. U uzorku mora biti

prisutna dovoljna količina analita kako bi se proizveo signal koji se može pouzdano razlikovati od pozadinskog šuma. Granica određivanja, s druge strane, predstavlja nižu granicu koncentracije analita koju je moguće pouzdano kvantificirati i razlikovati od pozadinskog šuma<sup>18</sup>.

Otopina poznate niske koncentracije ubrizgana je pet puta, a bilježen je odziv detektora (u obliku površine signala). Spektrometar mase također pruža vrijednost omjera signala i šuma (S/N), koja označava visinu signala u odnosu na pozadinski šum. Prema ICH smjernicama, kriterij odnosa signala i šuma za granicu dokazivanja je 3, a za granicu određivanja 10. Na temelju ovog omjera signala i šuma, izračunate su granice dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granice određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) za odabrane izotiocijanate i nitrile. Za 2-PhEITC i 2-MOPhITC instrument nije dao potrebnu S/N vrijednost pa nije bilo moguće na ovaj način odrediti LOD i LOQ

**Tablica 13.** Izračunate vrijednosti LOD i LOQ

|                   | <b>LOD/(ppm)</b> | <b>LOQ/(ppm)</b> |
|-------------------|------------------|------------------|
| <b>IPITC</b>      | 0,003129         | 0,010429         |
| <b>AITC</b>       | 0,010252         | 0,034175         |
| <b>PhAN</b>       | 0,017682         | 0,058940         |
| <b>PhITC</b>      | 0,0088996        | 0,029652         |
| <b>3-PhPN</b>     | 0,066299         | 0,220998         |
| <b>3-(MT)PITC</b> | 0,00016          | 0,000533         |
| <b>BzITC</b>      | 0,005638         | 0,018794         |
| <b>3-MOPhITC</b>  | 0,001014         | 0,003378         |
| <b>2-MOPhITC</b>  | /                | /                |
| <b>2-PhEITC</b>   | /                | /                |
| <b>4-MOPhITC</b>  | 0,003205         | 0,010684         |

## ZAKLJUČAK

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa prikladna je tehnika za brzo kvalitativno i kvantitativno određivanje izabranih 11 izotiocijanata i nitrila.

Razvijenom metodom mogu se u manje od 5 minuta, koliko traje mjerenje, uspješno odrediti fenilacetonitril, 3-fenilpropanonitril, 2-feniletil-izotiocijanat, izopropil-izotiocijanat, alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat, fenil-izotiocijanat, 3-(metiltio)propil-izotiocijanat, 2-metoksifenil-izotiocijanat, 3-metoksifenil-izotiocijanat i 4-metoksifenil-izotiocijanat. Pojedinačno određivanje ovih izotiocijanata i nitrila omogućeno je pomoću praćenja specifičnih reakcija prijelaza pri optimalnim energijama sraza fragmenta i inertnog plina. Za svaki spoj određen je kvantitativni prijelaz i barem još dva potvrdna.

Plinska kromatografija optimizirana je odabirom temperaturnog programa termostatirane peći u kojoj se nalazi kolona koji će omogućiti prihvatljivo odjeljivanje 11 analita u što kraćem vremenu. Ubrzavanje temperaturnog programa postignuto je skraćivanjem vremena zadržavanja na određenoj temperaturi, maksimalnom brzinom povećanja temperature peći, a sve to u intervalima koji pogoduju uspješnosti odjeljivanja spojeva od interesa. Optimizirana metoda za određivanje 11 izotiocijanata i nitrila traje 7,43 minute uključujući neophodnu odgodu snimanja od 2,5 minuta.

Ispitane su krivulje umjeravanja koncentracijskog raspona kroz četiri reda veličine i dobivena je krivulja oblika kvadratne funkcije za svih 11 izotiocijanata i nitrila. Na temelju krivulja umjeravanja kroz četiri reda veličine odabrana su područja u kojem signal raste linearno s porastom koncentracije. Pripremljene su otopine koncentracija u rasponu od 0,0005 mg/mL do 0,5 mg/mL i napravljene su krivulje umjeravanja. Iz prikazanih krivulja umjeravanja može se vidjeti da je korelacijski koeficijent slaganja  $R^2$  za spojeve veći od 0,999. Ovakvi rezultati ukazuju na vrlo dobru linearnost u ovisnosti signala (odziva detektora) o koncentraciji analita. Krivulje umjeravanja se razlikuju u području koncentracija, početnoj i konačnoj točki, ovisno o spoju.

Razvijena metoda uspješno zadovoljava parametre vrednovanja, stoga korištena tehnika može poslužiti za brzo određivanje velikog broja uzoraka odabranih izotiocijanata i nitrila. Također, postoji mogućnost proširivanja metode na druge izotiocijanate i nitrile.



## LITERATURA

1. *I. Vrca, J. Šćurla, N. Kević, F. Burču, V. Čikeš Čulić, I. Bočina, I. Blažević, A. Bratanić, T. Bilušić*, Influence of isolation techniques on the composition of glucosinolate breakdown products, their antiproliferative activity and gastrointestinal stability of allyl isothiocyanate, *Eur. Food Res. Technol.* (2021), doi: [10.1007/s00217-021-03903-x](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03903-x)
2. *F.S. Hanschen, E. Lamy, M. Schreiner, S. Rohn*, Reactivity and Stability of Glucosinolates and Their Breakdown Products in Foods, *Angew. Chem., Int. Ed.*, (2014) 11430 – 11450, doi: [10.1002/anie.201402639](https://doi.org/10.1002/anie.201402639)
3. *Y. Zhang, C. Jiang, S. Huang, J. Sun, S. Z. Nishanbaev, M. J. Benito, Y. Wu*, Effects of Polyphenols and Glucosinolates in Broccoli Extract on Human Gut Microorganisms Based on Simulation In Vitro, *ACS Omega* (2022) 45096–45106, doi: [10.1021/acsomega.2c05523](https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05523)
4. *M. Kopjar, D. Šubarić, V. Piližota*, GLUKOZINOLATI: BIODOSTUPNOST I UTJECAJ NA ZDRAVLJE LJUDI, *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* (2012) 22-35, URL: <https://hrcak.srce.hr/87442>
5. URL:<https://pi.oregonstate.edu/mic/dietaryfactors/phytochemicals/isothiocyanates>. (21.10.2023.)
6. *F. Kupke, C. Herz, F. S. Hanschen, S. Platz, G. A. Odongo, S. Helming, M. M. Bartolome Rodriguez, M. Schreiner, S. Rohn, E. Lamy*, Cytotoxic and genotoxic potential of food-borne nitriles in a liver in vitro model, *Sci. Rep.* **6** (2016.), doi: [10.1038/srep37631](https://doi.org/10.1038/srep37631)
7. *D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch*, Principles of Instrumental Analysis, 7th ed. Cengage Learning, 2016.
8. *O. D. Sparkman, Z.E. Penton, F. G. Kitson*, Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide, 2nd Academic Press, 2011.
9. *L. K. Modun, Nj. Radić*, Uvod u analitičku kemiju, Zagreb: Školska knjiga, 2016.
10. *H. M. McNair, J. M. Miller, N. H. Snow*, BASIC GAS CHROMATOGRAPHY, Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc, 2008
11. URL:[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1176-90000\\_034327.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1176-90000_034327.pdf) , (21.10.2023.)
12. *L. M. Blumberg*, Temperature-Programmed Gas Chromatography, Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2010.
13. *J. M. Thompson*, Mass Spectrometry, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2018.

14. *L. Wade*, Organska kemija, Zagreb: Školska knjiga, 2017.
15. *I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi*, Quantitative Applications of Mass Spectrometry, The Atrium, Southern Gate, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.
16. [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html). (21.10.2023.)
17. *V. S. E. de Hoffmann*, Mass spectrometry: principles and applications, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
18. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> , (22.10.2023.)
19. *L. Kukoč Modun, F. Burčul, Nj. Radić*, Instrumentne metode analize, Interna skripta Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, (2019.)
20. *R. P. Adams*, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th, 2017.
21. *K. Gusić*, Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata i nitrila pomoću GC-MS/MS tehnike, u Diplomski rad, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, (2021.), URL: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:100412>
22. *I. Vrca, F. Burčul, I. Blažević, A. Bratanić, T. Bilušić*, Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum Majus* L. Altum using in vitro and ex vivo digestion methods, Croat. J. Food Sci. Technol. (2021), doi: [10.17508/CJFST.2021.13.2.04](https://doi.org/10.17508/CJFST.2021.13.2.04)
23. *A. Vučak*, Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata spregnutom tehnikom GC-MS/MS, Diplomski rad, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, (2022.), URL: [urn:nbn:hr:167:038349](https://urn.nbn:hr:167:038349)