Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata i nitrila pomoću GC-MS/MS tehnike

Gusić, Klaudija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:167:100412

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH IZOTIOCIJANATA I NITRILA POMOĆU GC-MS/MS TEHNIKE

ZAVRŠNI RAD

KLAUDIJA GUSIĆ

Matični broj: 414

Split, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH IZOTIOCIJANATA I NITRILA POMOĆU GC-MS/MS TEHNIKE

ZAVRŠNI RAD

KLAUDIJA GUSIĆ

Matični broj: 414

Split, rujan 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

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

BACHELOR THESIS

KLAUDIJA GUSIĆ

Parent number: 414

Split, September 2021

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc.dr.sc. Franko Burčul

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH IZOTIOCIJANATA I NITRILA POMOĆU GC-MS/MS TEHNIKE

Klaudija Gusić, 414

Sažetak: Glukozinolati su fitokemikalije iz kojih hidrolizom nastaju lako hlapljivi spojevi izotiocijanati i nitrili koji zbog svoje iskazane biološke aktivnosti predstavljaju temu od interesa. Plinska kromatografija je često korištena analitička tehnika kojom se odjeljuju komponente iz uzorka. Kombinacijom plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa postoji mogućnost identifikacije i određivanja lako hlapljivih spojeva. Cilj ovog rada bio je izraditi metodu za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenilacetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotiocijanata i izopropil-izotiocijanata. Dobiveni rezultati pokazuju da su određivanje koncentracije i identifikacija odabrane komponente iz uzorka uspješne iz čega se može zaključiti da je metoda valjana.

Ključne riječi: plinska kromatografija, tandemska spektrometrija masa, nitrili, izotiocijanati

Rad sadrži: 34 stranica, 22 slike, 17 tablica, 15 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. doc. dr. sc. Franko Burčul - član-mentor

Datum obrane: 24. rujna 2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate Study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6.
Mentor: Assistant professor Franko Burčul, PhD

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

Klaudija Gusić, 414

Abstract: Glucosinolates are phytochemicals from which the easily volatile compounds isothiocyanates and nitriles are formed by hydrolysis which represent the topic of interest due to their biological activity. Gas chromatography is a widely used analytical technique that separates components from a sample. By combining gas chromatography with mass spectrometry, we have the ability to identify and quantify volatile compounds. The aim of this work was to develop a method for qualitative and quantitative analysis of phenylacetonitrile, 3-phenylpropanonitrile, 2-phenylethyl isothiocyanate and isopropyl isothiocyanate. The obtained results show that it is necessary to determine the concentrations and identify the selected components from the sample successfully from which it can be concluded that the method is valid.

Keywords: gas chromatography, tandem mass spectrometry, nitriles, isothiocyanates

Thesis contains: 34 pages, 22 figures, 17 tables, 15 references
Original in: Croatian

Defence committee:

1. Associate Professor Ivica Blažević, PhD - chair person
2. Assisstant Professor Lea Kukoč Modun, PhD - member
3. Assisstant Professor Franko Burčul, PhD - supervisor

Defence date: September 24th 2021.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, u razdoblju od travnja do rujna 2021. godine.

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

Zahvaljujem svim učiteljima, nastavnicima i profesorima koji su pomagali u gradnji mog znanja tijekom cjelokupnog obrazovanja.

Posebno zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na divnom pristupu, predanosti i trudu.

Hvala svim kolegama, a posebno Eleni, što su učinili moje studiranje zabavnim i bili uvijek spremni pomoći.

Svim mojim prijateljima, posebno Nini i Matei, hvala što ste mi primjerom pokazali kako se trud i rad isplate i što ste uvijek bili tu za mene kad je bilo teško.

Zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene.

Ante, hvala ti što se uvijek mogu bezrezervno osloniti na tebe i imam tvoju podršku u svemu.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada je razvoj i vrednovanje metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje fenilacetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotiocijanata i izopropil-izotiocijanata korištenjem plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa.

Razvoj metode uključuje:

1.Snimanje spektra masa standarda i usporedba s bazom podataka

2. Istovremeno praćenje više specifičnih prijelaza (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM) pri četiri različite energije sraza (5 eV, 15 eV, 30 ev, 45 eV)

3. Snimanje fragmenata koji nastaju nakon sraza početnog (odabranog) iona s inertnim plinom (engl. *Product ion scan*) i MRM (pri trideset različitih energija sraza)

4. Izrada krivulje umjeravanja

5. Određivanje koncentracije tvari iz realnog uzorka

Vrednovanje metode uključuje:

1. Analizu realnog uzorka

2. Ponovljivost injektiranja

SAŽETAK

Glukozinolati su fitokemikalije iz kojih hidrolizom nastaju lako hlapljivi spojevi izotiocijanati i nitrili koji zbog svoje iskazane biološke aktivnosti predstavljaju temu od interesa. Plinska kromatografija je često korištena analitička tehnika kojom se odjeljuju komponente iz uzorka. Kombinacijom plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa postoji mogućnost identifikacije i određivanja lako hlapljivih spojeva. Cilj ovog rada bio je izraditi metodu za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenilacetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotiocijanata i izopropil-izotiocijanata. Dobiveni rezultati pokazuju da su određivanje koncentracije i identifikacija odabrane komponente iz uzorka uspješne iz čega se može zaključiti da je metoda valjana.

Ključne riječi: plinska kromatografija, tandemska masena spektrometrija, nitrili, izotiocijanati

SUMMARY

Glucosinolates are phytochemicals from which the easily volatile compounds isothiocyanates and nitriles are formed by hydrolysis which represent the topic of interest due to their biological activity. Gas chromatography is a widely used analytical technique that separates components from a sample. By combining gas chromatography with mass spectrometry, we have the ability to identify and quantify volatile compounds. The aim of this work was to develop a method for qualitative and quantitative analysis of phenylacetonitrile, 3-phenylpropanonitrile, 2-phenylethyl isothiocyanate and isopropyl isothiocyanate. The obtained results show that it is necessary to determine the concentrations and identify the selected components from the sample successfully from which it can be concluded that the method is valid.

Keywords: gas chromatography, tandem mass spectrometry, nitriles, isothiocyanates

SADRŽAJ

UVOD ... 1
1. OPĆI DIO ... 2
1.1. Glukozinolati ... 2
1.1.1. Izotiocijanati i nitrili ... 4
1.2. Kromatografija ... 6
1.2.1.Podjela kromatografije ... 6
1.2.2. Plinska kromatografija ... 8
1.2.3. Kromatografski parametri ... 9
1.3. Spektrometrija masa ... 11
1.3.2. Princip rada spektrometra masa ... 12
1.3.3. Tandemski spektrometar masa (QQQ) ... 13
1.4. Vrednovanje analitičke metode ... 13
2. EKSPERIMENTALNI DIO ... 15
2.1. Korištene kemikalije i oprema ... 15
2.2. Priprema radnih otopina standarda ... 16
2.3. Identifikacija odabranih izotiocijanata i nitrila uporabom plinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa ... 17
2.4. Optimalni uvjeti instrumenata ... 17
2.5. Određivanje SRM prijelaza ... 18
3. REZULTATI I RASPRAVA ... 19
3.1. Spektri masa izotiocijanata i nitrila ... 19
3.2. Krivulje umjeravanja ... 21
3.3. Optimizacija parametara masenog spektrometra ... 25
3.4. Analiza realnog uzorka ... 29
3.5. Vrednovanje metode ... 30
4. ZAKLJUČAK ... 33
5. LITERATURA ... 34

UVOD

Glukozinolati su spojevi koji se nalaze unutar biljaka iz porodice kupusnjača, koje ljudima koriste kao hrana. Hidrolizom glukozinolata nastaju biološki aktivni produkti kao što su izotiocijanati i nitrili. Stoga je potrebno poznavati njihov točan sastav i količinu.

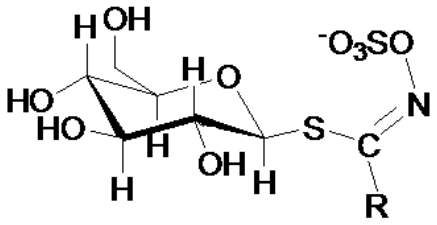
Plinska kromatografija vezana s tandemskom spektrometrijom masa jedna je od najraširenijih analitičkih tehnika. Analiza plinskom kromatografijom temelji se na razdvajanju komponenti iz uzorka na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava, koja spregnuta sa spektrometrijom masa i analizom dobivenih podataka daje važne informacije prilikom identifikacije i kvantifikacije odabrane komponente uzorka.

Cilj ovog rada je razviti metodu kojom bi se iz realnog uzorka mogla odrediti koncentracija određenog izotiocijanata ili nitrila pomoću plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa. U ovom radu koristi se trostruki kvadrupol, što omogućava snimanje specifičnih reakcija (prijelaza) nastajanja pojedinih fragmenata karakterističnih za pojedinu tvar kao te precizniju identifikaciju i određivanje koncentracije.

1. OPĆI DIO

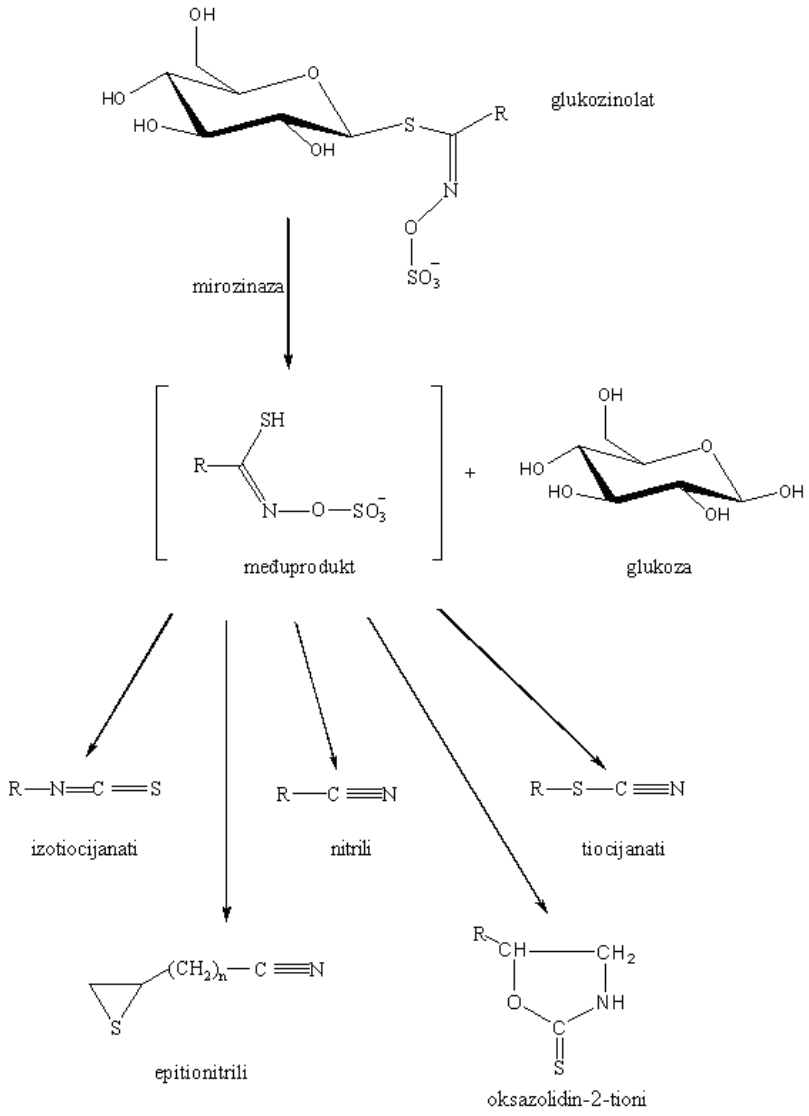
1.1. Glukozinolati

Glukozinolati su fitokemikalije koje se pretežno nalaze u biljkama iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Djelovanjem enzima mirozinaze dolazi do hidrolize glukozinolata pri čemu nastaju izotiocijanati, nitrili ili drugi produkti.[1]
Kemijska struktura glukozinolata sadržava *β*-D-tioglukozidni dio i sulfatnu skupinu koji su preko C=N skupine vezani na ostatak molekule (sulfonirani oksim) te sadrži varijabilni bočni lanca R.[2]



Slika 1. Opća struktura glukozinolata[3]

Biološka aktivnost produkata hidrolize glukozinolata i njihova strukturna raznolikost ovisi o bočnom lancu (R), koji po svojoj strukturi može biti alifatski, arilalkilni i indolni. Zanimljivi su zbog svojih antifugalnih, antibakterijskih i citotoksičnih svojstava, ali i zbog specifičnih aroma.[3]



Slika 2. Hidroliza glukozinolata[3]

1.1.1. Izotiocijanati i nitrili

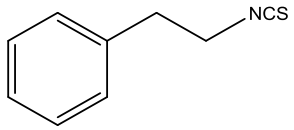
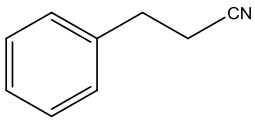
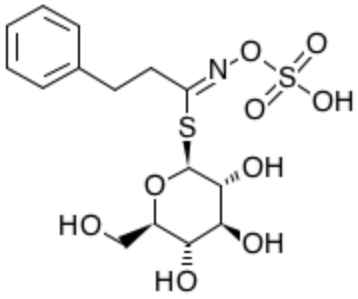
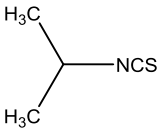
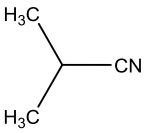
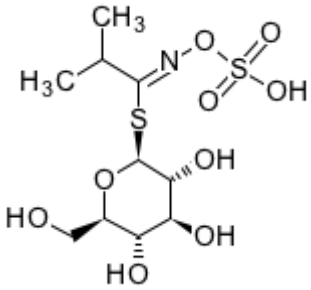
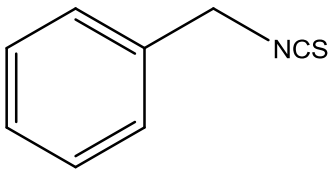
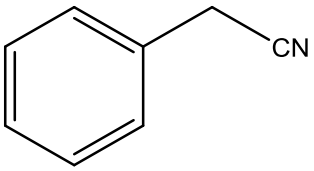
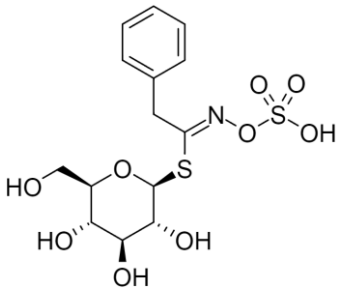
Izotiocijanati (ITC; R-N=C=S) su hlapljivi spojevi jakog mirisa i okusa. Produkti su hidrolize glukozinolata te imaju biološku aktivnost.

Konzumiranjem svježeg povrća se najlakše apsorbiraju u organizmu. Termičkom obradom hrane u kojoj se nalaze glukozinolati dolazi do inhibicije mirozinazne aktivnosti stoga za nastajanje izotiocijanata u crijevima može biti odgovorna tzv. crijevna mirozinaza. Tako stvoreni izotiocijanati vežu se na glutation pomoću glutation-*S*-transferaze te se potom metaboliziraju do merkaptanske kiseline. [3,4]

Povećani unos kupusnjača može se povezati sa smanjenim rizikom od karcinoma kod ljudi, međutim nije potvrđeno da se nužno radi o izotiocijanatima. Također, neki radovi su pokazali antibakterijsku aktivnost kod infekcije sa *Helicobacter pylori*. Postoji i određena protuupalna aktivnost izotiocijanata. Naime, sulforafan i 2-feniletil-izotiocijanat smanjuju izlučivanje upalnih signalnih molekula iz leukocita čime dolazi do smanjenja vezanja protuupalnog transkripcijskog faktora NF-κB za DNA. Kod povećanog unosa kupusnjača nisu poznate smetnje kod ljudi nastale zbog povećane količine izotiocijanata. [5]

Nitrili (R-C≡N), produkti su hidrolize glukozinolata koji nastaju gubitkom sumpora i glukoze, a uvjeti pri kojima lakše nastaju nitrili podrazumijevaju pH vrijednost nižu od 4, ali i prisustvo tiolnih spojeva i Fe^{2+} iona dodatno pospješuje njihov nastanak.

Tablica 1. Prehrambeni izvori odabranih izotiocijanata, nitrila i njihovih prekursora glukozinolata [4]

Izotiocijanat i nitril	Glukozinolat (prekursor)	Biljka
 2-feniletil-izotiocijanat  3-fenilpropanonitril	 Glukonasturcin	*Brassica oleracea* var. *Capitata*, *B. oleracea* var. *Botrytis*, *B. junica*, *B. nigra*, *B. camperstris*, *B. rapa*
 izopropil-izotiocijanat  2-metilpropanonitril	 Glukoputranjivin	*Sisymbrium officinale, Lunaria annua*
 benzil-izotiocijanat  fenilacetonitril	 Glukotropeolin	*Lepidium sativum*, *Tropaeolum majus, Carica papaya*

1.2. Kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma*; boja *graphein*; pisati) je jedna od najraširenijih analitičkih tehnika, a zasniva se na odjeljivanju komponenata smjese na osnovi njihove različite raspodjele između dviju faza, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Pokretna faza je nosilac komponenti uzorka koje zbog različitih fizikalno-kemijskih karakteristika imaju različit afinitet vezanja za stacionarnu fazu, čime im se razlikuje vrijeme prolaska kroz kolonu pa dolazi do odjeljivanja komponenti. [6]

1.2.1. Podjela kromatografije

Postoji više podjela kromatografskih tehnika i to: s obzirom na ostvarivanje kontakta među fazama, obzirom na agregatno stanje pokretne faze te obzirom na prirodu ravnoteže među fazama.

Prema ostvarivanju kontakta među fazama razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju. U plošnoj kromatografiji nepokretna faza je kromatografski papir ili sloj sorbensa nanesen na čvrsti nosač prilikom čega razlikujemo papirnu i tankoslojnu kromatografiju. Kako bi se provelo odjeljivanje papir ili pločicu s nanesenim malim volumenom uzorka uroni se u otapalo te se pod utjecajem kapilarnih sila komponente uzorka nose i razdvajaju na temelju različitog afiniteta prema nepokretnoj fazi. Plošna kromatografija se koristi pri brzoj procjeni nečistoća unutar nekog uzorka. Kolonska kromatografija je vrsta kromatografije u kojoj je nepokretna faza nanesena u uskoj koloni kroz koju prolazi pokretna faza pod utjecajem primijenjenog tlaka ili gravitacije.[6,7]

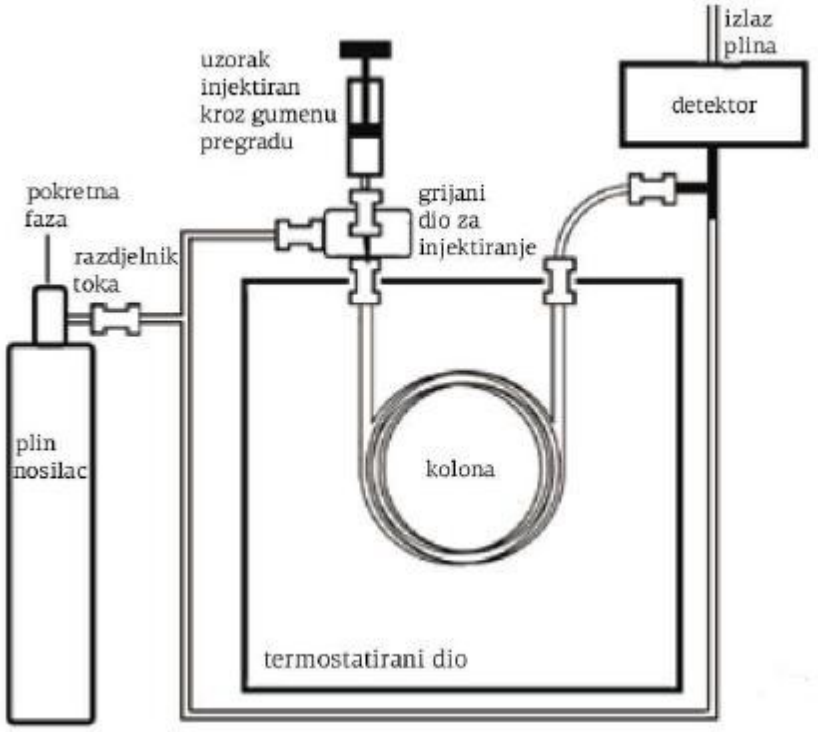
Kromatografiju također možemo podijeliti i prema agregatnom stanju pokretne faze. Dijelimo je tako na plinsku, kod koje je pokretna faza inertan plin, tekućinsku pri kojoj se koristi tekućina male viskoznosti i fluidnu čija se pokretna faza nalazi u superkritičnim uvjetima.

Također, kromatografiju dijelimo i prema fizikalnom procesu koji se odvija tijekom razdvajanja tvari, pa tako razlikujemo adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, ionsko izmjenjivačku kromatografiju te kromatografiju isključenjem.[6]

- **Adsorpcijska kromatografija** je metoda pri kojoj je nepokretna faza krutina a pokretna faza može biti plin ili tekućina a proces koji se odvija između stacionarne i mobilne faze je različita adsorpcija između uzoraka i nepokretne faze pa se na temelju toga odjeljuju.
- **Afinitetna kromatografija** je takva da je njezin mehanizam odjeljivanja temeljen na specifičnim interakcijama molekula iz uzorka s ligandom vezanim na stacionarnoj fazi.
- **Razdjelna kromatografija** se temelji na razlici polarnosti između stacionarne i mobilne faze te se dijeli na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Pri čemu su i nepokretna i pokretna faza tekućina (kod tekućinske kromatografije) ili kombinacija plin /tekućina (kod plinske kromatografije). Najčešće je korištena tekućinska kromatografija je kromatografija obrnutih faza.
- **Kromatografija ionske izmjene** temelji se na razlici u afinitetu uzorka prema nepokretnoj fazi zbog različitih naboja. Nepokretna faza obično je ionska smola, odnosno polimerni ionski izmjenjivač.
- **Kromatografija isključenjem** temelji se na razdvajanju čestica na osnovu njihove različite veličine, odnosno mase i volumena. Nepokretna faza je molekulsko sito.[6,7]

1.2.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) temelji se na razlici adsorpcije između komponenti uzorka koji mora biti lako hlapljiv. Naime, pokretna faza je plin, a nepokretna faza je čvrsta tvar (adsorpcijska kromatografija) ili tekućina (razdjelna kromatografija). Obzirom na to da je većina tvari jakih aroma lako hlapljiva, plinska kromatografija se preferira kao tehnika za analizu, što vrijedi i za odabrane izotiocijanate i nitrile. Analiti moraju biti stabilni pri temperaturi razdvajanja, što predstavlja ograničenje tehnike, odnosno smanjuje se broj mogućih analita za analizu.[8]

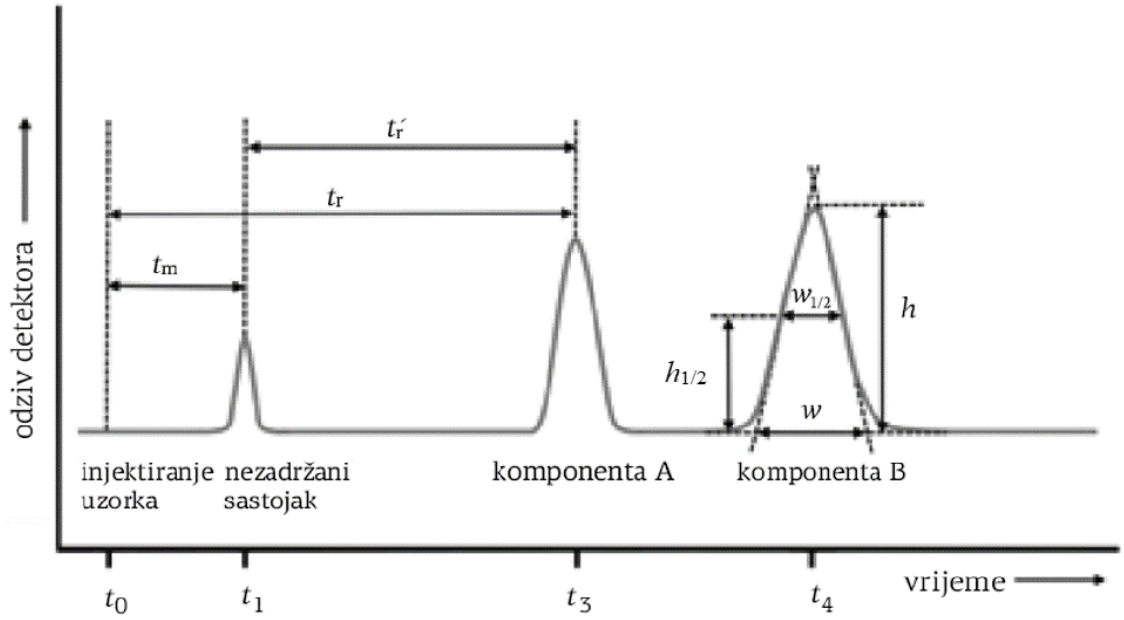


Slika 3. Shematski prikaz plinskog kromatografa[6]

U grijanom dijelu za injektiranje dolazi do isparavanja uzorka. Tako uzorak, s plinom nosiocem koji je najčešće helij, ulazi u kolonu koja se nalazi u termostatiranom dijelu. U koloni dolazi do razdvajanja komponenti uzorka te tako odlaze do detektora, a cijeli instrument je spojen na računalo. Na računalu se prikazuje kromatogram. [9]

1.2.3. Kromatografski parametri

Kromatogram je grafički prikaz mjerenja na kojem su prikazani pikovi, odnosno krivulje koje pokazuju odnos koncentracije analita u vremenu. Položaj pika može se koristiti za kvalitativnu analizu (ukupno vrijeme zadržavanja), dok se površina ispod pika koristi za kvantitativnu analizu. [10]



Slika 4. Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima[6]

Kako se uvjeti kromatografske metode, kao što su temperatura, volumen injektiranja, tlak mogu mijenjati to značajno može utjecati na rezultate. Uobičajeni kromatogram, prikazan na slici 4. sadrži:

- t_m - zadržano vrijeme
- t_r - ukupno vrijeme zadržavanja
- t_r' - prilagođeno vrijeme zadržavanja
- h - visina kromatografske krivulje
- $^1/_2$h – polovina visine kromatografske krivulje
- w – širina kromatografske krivulje u osnovici
- $w_{1/2}$ – širina kromatografske krivulje u polovici visine[6]

Najvažniji podatak za kvalitativnu analizu je vrijeme zadržavanja. Svaka komponenta ima svoje specifično ukupno vrijeme zadržavanja t_r koje predstavlja vremensko razdoblje od injektiranja uzorka do dolaska do detektora. Prilagođeno vrijeme zadržavanja t_r' predstavlja razliku ukupnog vremena zadržavanja t_r i zadržanog vremena t_m i koristi se umjesto ukupnog vremena zadržavanja[6]:

$$t_r' = t_r - t_m$$

Obzirom da vrijeme zadržavanja ovisi o uvjetima kromatografske metode kao što su dimenzija kolone, brzina protoka, tlak, postoji izraz koji preciznije mjeri zadržavanje komponenata, a to je faktor zadržavanja k'. Faktor zadržavanja ili retencije pokazuje vrijeme zadržavanja neke komponente na koloni, stoga što je faktor zadržavanja veći, komponenta će duže biti vezana za kolonu:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m}$$

Razdvajanje dviju komponenti u analizi biti će moguće ako je omjer njihovih faktora zadržavanja između 1 i 5, što se naziva faktorom odjeljivanja:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$$

Djelotvornost kromatografske kolone opisujemo brojem teorijskih tavana, *N*, koji predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze:

$$N = \frac{L}{H}$$

- *N* – broj teorijskih tavana
- *H* – visina teorijskih tavana
- *L* – duljina kolone

Djelotvornost kolone je to veća što je veći broj teorijskih tavana, što rezultira užom kromatografskom krivuljom. Broj teorijskih tavana također se može izračunati prema formuli:

$$N = 16 \times (\frac{t_r}{w})^2$$

Razlučivanje (engl. *resolution*, R_S) predstavlja mjeru odjeljivanja susjednih pikova kromatograma i računa se prema formuli:

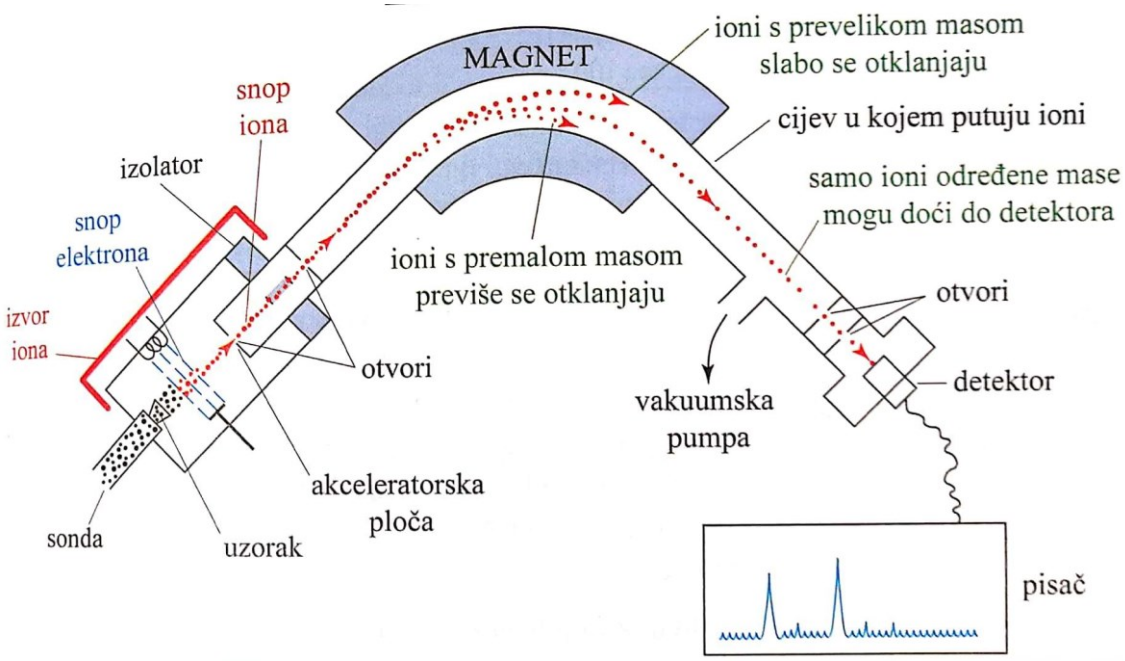
$$R_S = \frac{2 \times \{(t_r)_B - (t_r)_A\}}{w_A + w_B}$$

Što je R_S veći, odjeljivanje komponenata je uspješnije. Vrijednost razlučivanja poželjna za bolju kvantitativnu analizu je veća od 1,5. [6]

1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je široko prihvaćena destruktivna tehnika koja radi na principu bombardiranja molekula elektronima, čime se molekule uništavaju pri čemu nastaju njihovi fragmenti. Fragmenti putuju u ionskom obliku u visokom vakuumu spektrometra masa do detektora gdje se razvrstavaju prema omjeru mase i naboja te se bilježi zastupljenost tih iona. Zastupljenost je prikazana u tablici kao histogram i prikazana je kao postotak od najvećeg signala kojeg se naziva i osnovni signal. S osnovnim signalom se uspoređuje zastupljenost ostalih fragmenata. Za većinu spojeva vidljiv je i signal molekulskog iona čija vrijednost omjera mase i naboja m/z odgovara molekulskoj masi tih spojeva. Njihova vrijednost je obično najveća. Kombinacija spektrometrije masa s plinskom kromatografijom za analizu smjese spojeva često se koristi jer je na taj način omogućeno razdvajanje komponenata smjese te njihova identifikacija. [11]

1.3.2. Princip rada spektrometra masa



Slika 5. Shema masenog spektrometra[11]

Maseni spektrometar se sastoji od nekoliko osnovnih dijelova:

- sustav za uvođenje uzorka
- izvor ionizacije
- maseni analizator
- detektor
- računalo.

Kako bi se neki uzorak mogao analizirati mora se prevesti u ionski oblik kako bi se pod utjecajem elektrostatskog i magnetskog polja mogao kretati unutar uređaja. Nakon unošenja uzorka u uređaj dolazi do bombardiranja uzorka snopom elektrona. Tako elektron sudarom s neutralnom česticom, molekulom, izbija elektron iz molekule i nastaje kation:

$$e^- + M \rightarrow [M]^{+}_{\cdot} + 2e^-$$

Osim ionizacije, sudarom elektrona i neutralne molekule dolazi do cijepanja molekule na fragmente. Fragmenti su ioni manje molekulske mase. Smjesa iona koja

nastane fragmentiranjem ubrzava se i prolazi kroz magnetsko polje. Djelovanjem magnetskog polja dolazi do otklanjanja putanja iona na temelju njihovih različitih masa odnosno omjera mase i naboja *m/z*. Pri određenoj jakosti magnetskog polja točno određeni *m/z* "otklanja" se u analizatoru masa i odlazi do detektora. Promjenom jakosti magnetskog polja omogućava se snimanje svih omjera mase i naboja i dolaskom na detektor dobivamo informaciju na računalu o zastupljenosti pojedinog fragmenta. [11,12]

1.3.3. Tandemski spektrometar masa (QQQ)

Analizatori masa imaju ulogu mjerenja omjera mase i naboja iona te njihovog odjeljivanja. Kvadrupolni analizator građen je od četiri metalna štapa, odnosno elektrode, koji su postavljeni paralelno, tako da se među njima nalazi slobodan prostor kojim putuju nabijene čestice kad su elektrode nabijene.

Trostruki kvadrupol (QQQ) odnosno tandemska kombinacija dva kvadrupolna analizatora daju detaljnije informacije o fragmentima. Naime, u prvom analizatoru masa dolazi do fragmentiranja i analize pa se potom prekursor ion, odnosno ion točno određene mase i naboja odvodi u kolizijsku ćeliju u kojoj dolazi do novog bombardiranja (argonom). Potom nastaju novi fragmenti koji se analiziraju u idućem analizatoru masa te odlaze na detektor.[13]

1.4. Vrednovanje analitičke metode

U procjeni kompetencije neke metode kako bi se ona mogla koristiti u svrhu analize potrebno je zadovoljiti određene kriterije koji su objavljeni od strane Međunarodne konferencije o harmonizaciji:

- **obnovljivost** – preciznost između rezultata više laboratorija
- **specifičnost** – mogućnost određivanja točno određenog analita u prisustvu drugih komponenti
- **granica dokazivanja** – najmanja količina analita koja se može dokazati primijenjenom metodom
- **granica određivanja** – najmanja količina analita koja se može odrediti primijenjenom metodom

- **linearnost** – područje u kojem signal raste proporcionalno s koncentracijom analita
- **raspon** – područje između minimalne i maksimalne koncentracije analita pri kojoj metoda zadovoljava preciznost, linearnost i točnost
- **osjetljivost –** nagib kalibracijske krivulje, mala promjena u koncentraciji analita uzrokovat će značajne promjene signala. [14]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištene kemikalije i oprema

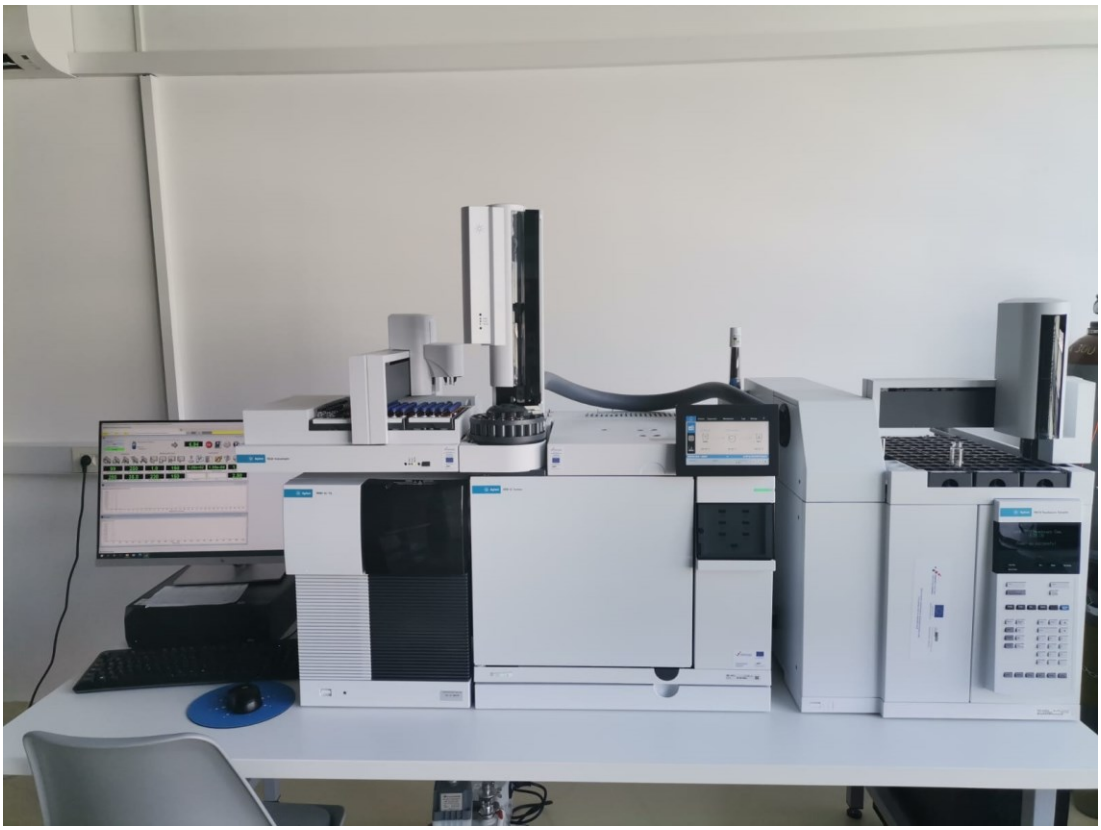
Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Naziv	**Molekulska formula**	**CAS broj**	**Molarna masa**	**Proizvođač***
fenilacetonitril	$C_6H_5CH_2CN$	645-59-0	117.15	SigmaAldrich
3-fenilpropanonitril	$C_6H_5CH_2CH_2CN$	140-29-4	131.17	SigmaAldrich
2-feniletil-izotiocijanat	$C_6H_5CH_2CH_2NCS$	2257-09-2	163.24	SigmaAldrich
izopropil-izotiocijanat	$(CH_3)_2CHNCS$	2253-73-8	101.17	SigmaAldrich
metanol	CH_3OH	67-56-1	32.04	Honeywell

*Njemačka

Popis korištenih uređaja i instrumenata:

- Analitička vaga AT261 DR (Mettler Toledo, Švicarska)
- Tacta mehaničke pipete (Sartorius, Njemačka)
- GC-MS: 8890 GC System, 7000D GC/TQ (Agilent, CA, SAD)
- Kolona HP-5MS (30m x 0,25mm, 0,25μm debljina nepokretne faze, Agilent, CA, SAD)



Slika 6. Plinski kromatograf s tandemskim spektrometrom masa

2.2. Priprema radnih otopina standarda

Obzirom da su ispitivane kemikalije lako hlapljive tvari postoji problem pripreme otopine uzoraka za analizu kako bi analitička pogreška bila što manja. Problem je riješen sljedećim postupkom rada: odmjerna tikvica napunjena je otapalom metanolom gotovo do oznake te ostavljena otvorena zbog ujednačavanja tlakova kako bi došlo do minimalnog gubitka tijekom vaganja standarda. U tako pripremljene odmjerne tikvice, izravno na vagi, dodavani su standardi. Vaganje standarda s metanolom davalo je razliku tako da metanol zarobi standard koji prilikom dodavanja u otapalo padne na dno odmjerne tikvice zbog veće gustoće i nema gubitka uslijed njegovog hlapljenja. U protivnom bi, prilikom vaganja samih standarda, zbog njihove hlapljivosti moglo doći do većih gubitaka.[15]. Pripravljene su otopine standarda fenilacetonitrila, 3-fenilpropanonitrila, 2-feniletil-izotiocijanata i izopropil-izotiocijanata u koncentracijama 10 μg/mL.

2.3. Identifikacija odabranih izotiocijanata i nitrila uporabom plinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa

Uzorci su injektirani samouzorkivačem u plinski kromatograf spregnut s tandemskim spektrometrom masa. Snimanjem odgovarajućih spektara masa odabranih izotiocijanata i nitrila te usporedbom rezultata s Wiley i NIST bazama podataka identificirani su i potvrđeni odabrani spojevi. Ujedno je to bio i prvi korak prema određivanju karakterističnih fragmenata koji su korišteni za kasnije analize.

2.4. Optimalni uvjeti instrumenata

U tablici 3. dani su optimalni uvjeti instrumenta koji su korišteni kao zajednički za sva mjerenja.

Tablica 3. Prikaz radnih uvjeta u korištenim instrumentima

Vrijeme mjerenja	24,6 min
Početna temperatura pećnice	60 ˚C
Vrijeme zadržavanja 1	3 min
Povećanje radne temperature	10 ˚C/min
Konačna vrijednost radne temperature	246 ˚C
Vrijeme zadržavanja 2	3 min
Vrijeme u ravnoteži	0,5 min
Kolona	HP-5MS (30 m x 250 μm x 0,25 μm)
Protok	1 mL/min
Detektor	Trostruki kvadrupol (QQQ)
Tip snimanja detektorom	SRM i MRM - praćenje jednog ili više specifičnih prijelaza

2.5. Određivanje SRM prijelaza

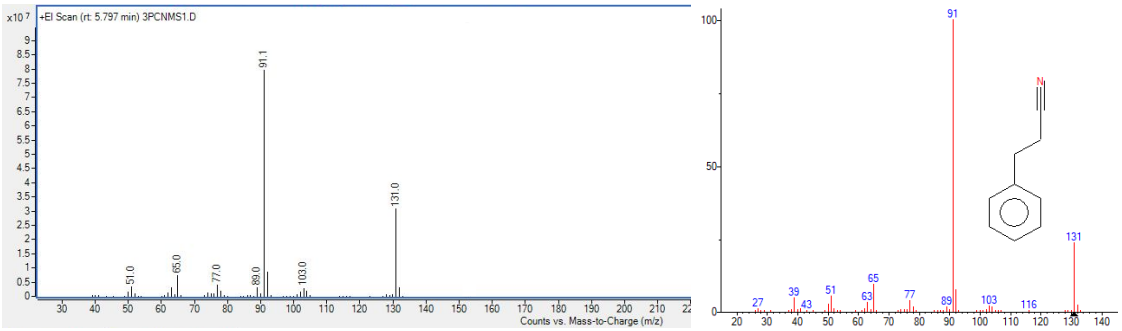
Optimizacijom uvjeta masenog detektora postiže se bolja osjetljivost. Mijenjanjem energije sraza dušika (5 eV, 15 eV, 30 eV i 45 eV) tražene su specifične reakcije prijelaza odnosno fragmentiaranja (engl. *Single Reaction Monitoring*, SRM) s najvećim odzivom prema detektoru.

Potom se radila analiza trostrukim kvadrupolom. Naime, fragmenti s najvećim odzivom podvrgnuti su udarima pri 30 različitih energija sraza dušika te su snimani isključivo njihovi prijelazi. Za svaki pojedini spoj tražena su barem tri takva prijelaza gdje je jedan sa najvećim odzivom prema detektoru korišten kao kvantitativni prijelaz, a ostali su korišteni kao kvalitativni ili potvrdni. Ovako odabrani prijelazi kod snimanja realnog uzorka služe za potvrdu, ali i određivanje koncentracije određene komponente kada će se koristiti način praćenja više različitih specifičnih reakcija istovremeno (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM).

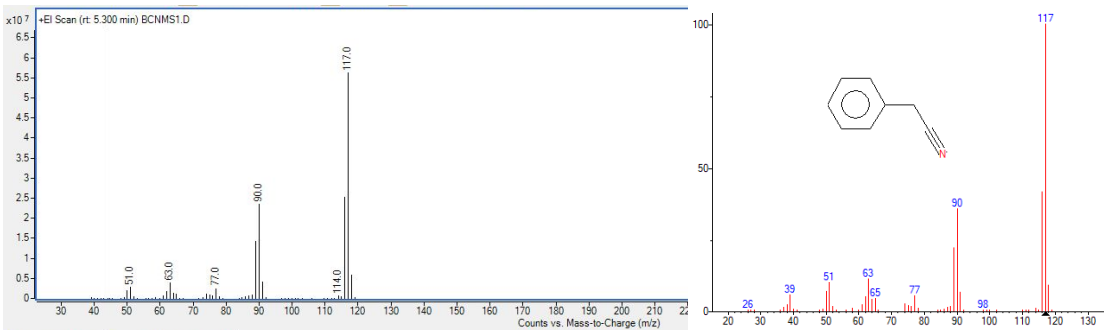
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Spektri masa izotiocijanata i nitrila

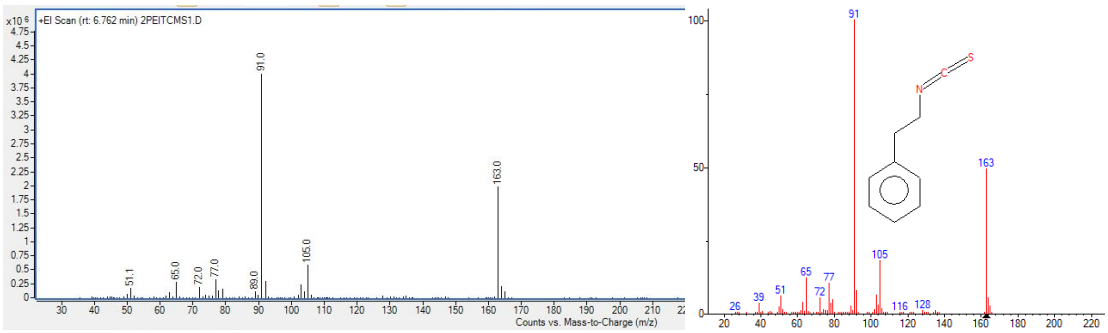
Na slikama 7-10 prikazani su spektri masa odabranih izotiocijanata i nitrila te usporedba s Wiley i NIST bazama podataka.



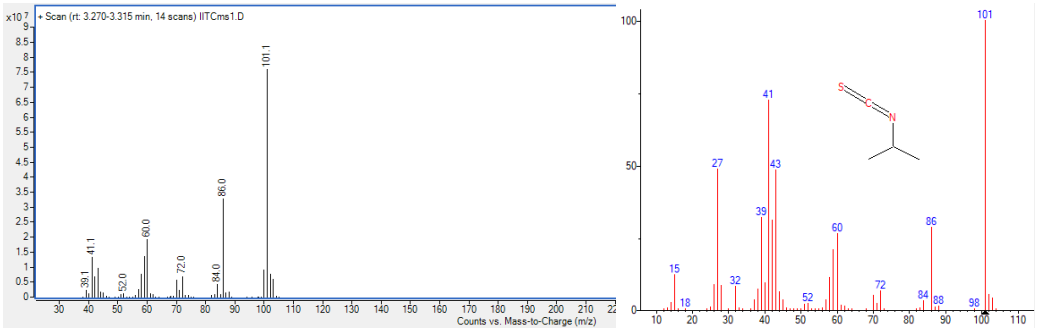
Slika 7. Maseni spektar 3-fenilpropanonitrila (lijevo) i usporedba s bazom podataka (desno)



Slika 8. Maseni spektar fenilacetonitrila (lijevo) i usporedba s bazom podataka (desno)



Slika 9. Maseni spektar 2-feniletil-izotiocijanata (lijevo) i usporedba s bazom podataka (desno)



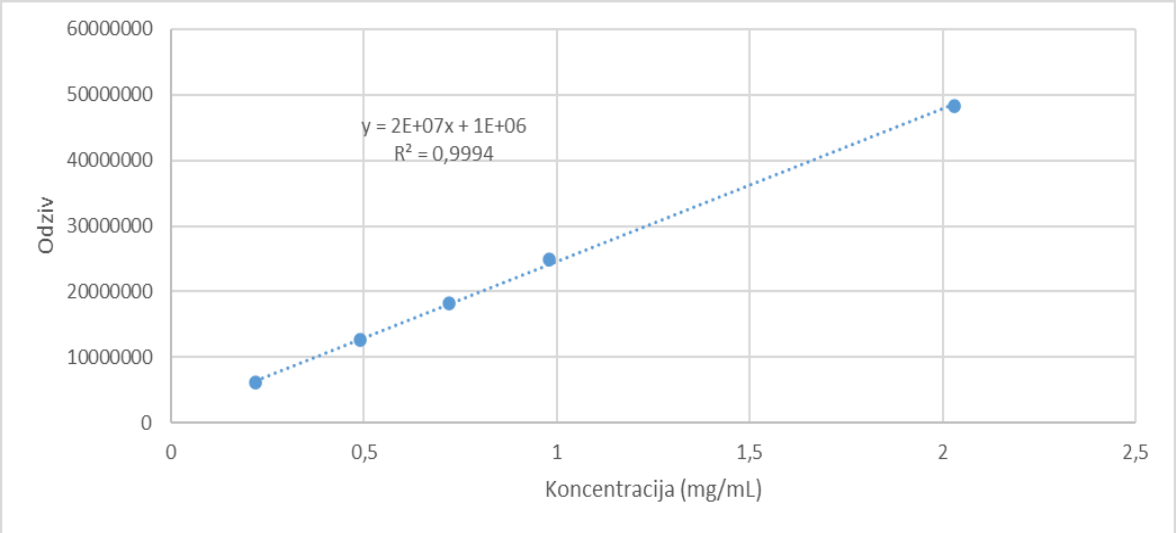
Slika 10. Maseni spektar izopropil-izotiocijanata(lijevo) i usporedba s bazom podataka (desno)

3.2. Krivulje umjeravanja

Pripremljene su otopine standarda masenih koncentracija od 0,05 mg/mL do 2,5 mg/mL te su izrađene krivulje umjeravanja. U tablicama 4-7 prikazani su podaci iz kojih su se konstruirale krivulje umjeravanja, prikazane na slikama 11-14.

Tablica 4. Koncentracije 3-fenilpropanonitrila s pridruženim odzivima detektora

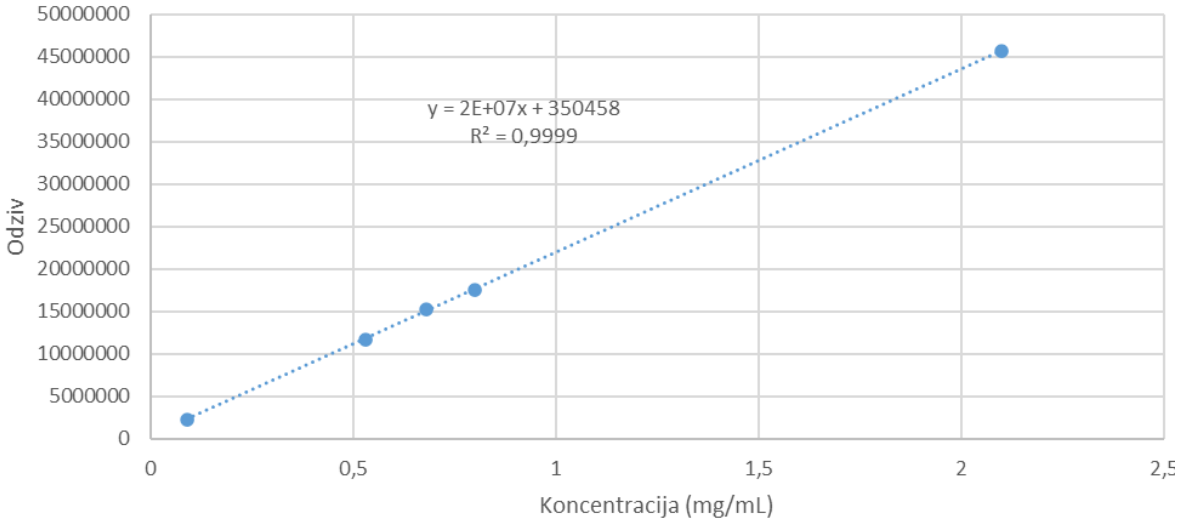
3-fenilpropanonitril	
Koncentracija (mg/mL)	Odziv
0,22	6194714
0,49	12672995
0,72	18278082
0,898	24828535
2,03	48237739



Slika 11. Grafički prikaz detektora o koncentraciji 3-fenilpropanonitrila

Tablica 5. Koncentracije fenilacetonitrila s pridruženim odzivima detektora

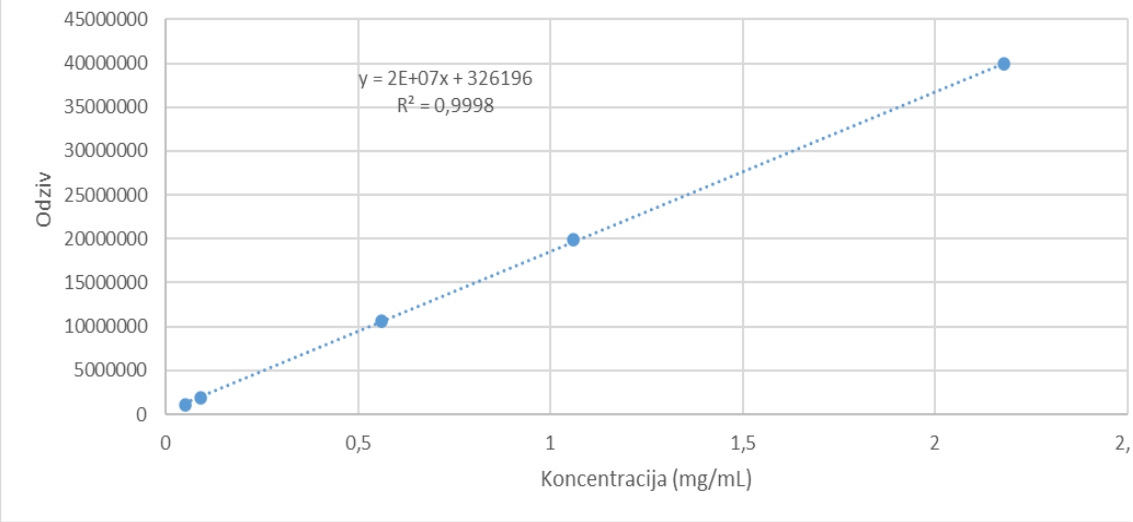
fenilacetonitril	
Koncentracija (mg/mL)	Odziv
0,09	2269747
0,53	11682808
0,68	15244650
0,8	17549271
2,1	45664607



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti detektora o koncentraciji fenilacetonitrila

Tablica 6. Koncentracije 2-feniletil-izotiocijanata s pridruženim odzivima detektora

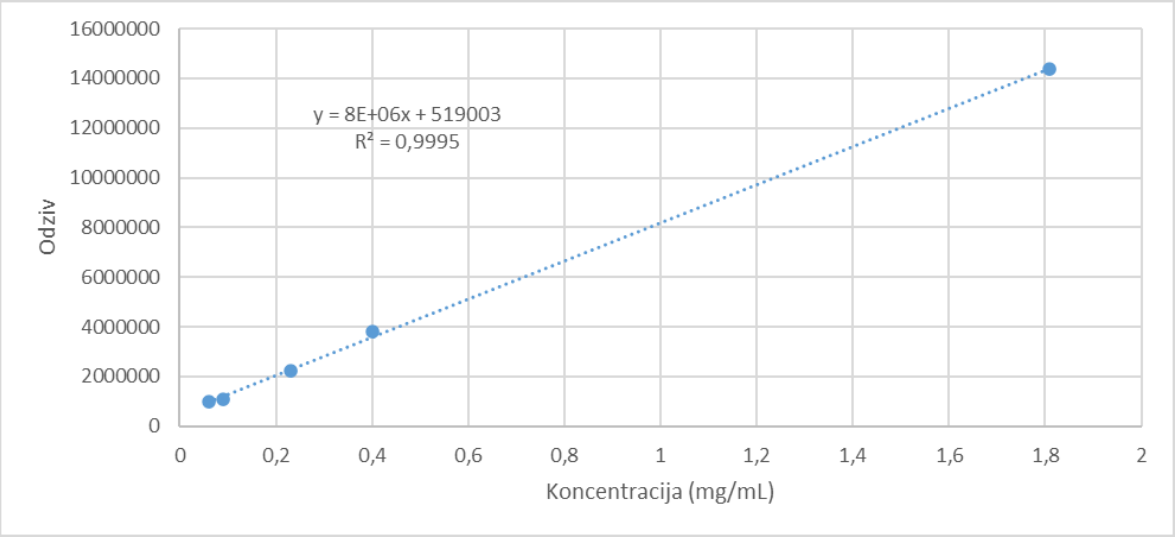
2-feniletil-izotiocijanat	
Koncentracija (mg/mL)	Odziv
0,05	1094754
0,09	1846822
0,056	10655113
1,06	19966467
2,18	39883494



Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti detektora o koncentraciji 2-feniletil-izotiocijanata

Tablica 7. Koncentracije izopropil-izotiocijanata s pridruženim odzivima detektora

izopropil-izotiocijanat	
Koncentracija (mg/mL)	Odziv
0,006	995269
0,009	1087534
0,23	2216554
0,4	3787465
1,81	14365152



Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji izopropil-izotiocijanata

Iz prikazanih krivulja umjeravanja može se vidjeti da je korelacijski koeficijent slaganja R^2 za sva četiri spoja >0,999 i to: 0,9994 za 3-fenilpropanonitril, 0,9999 za fenilacetonitrol, 0,9998 za 2-feniletil-izotiocijanat te 0,9995 za izopropil-izotiocijanat. Ovakavi rezultati ukazuju na vrlo dobru linearnost u ovisnosti signala (odziva detektora) o koncentraciji analita.

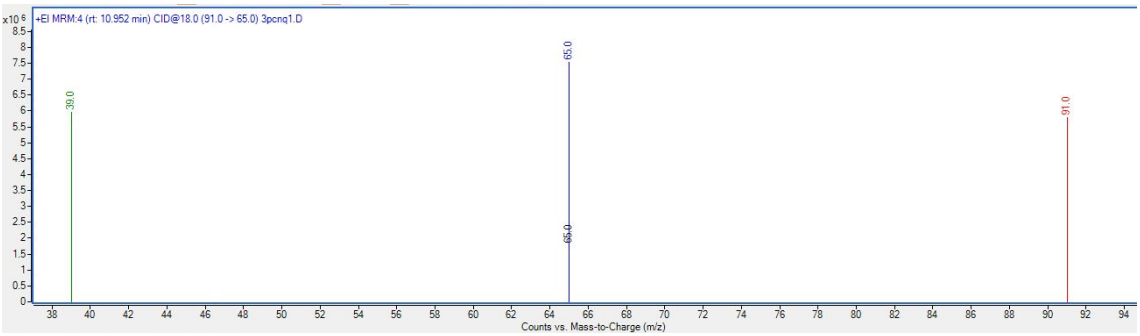
3.3. Optimizacija parametara masenog spektrometra

Kod 3-fenilpropanitrila primjećeni su najveći odzivi kod molekulskog 131 m/z, i osnovnog fragmenta 91 m/z. Navedeni fragmenti su bombardirani varirajući energiju sraza s dušikom (30 različitih energija) te je praćeno pri kojoj će se energiji dobiti najveći odziv detektora za svaki specifični prijelaz. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 8. Od ta četiri prijelaza najveći odziv prema detektoru ima prijelaz 91→65 m/z pri energiji sraza 18 eV. Obzirom na taj rezultat, prijelaz 91→65 se uzima kao kvantitativni za daljnju analizu, a ostala tri navedena će nam dati potvrdu identifikacije.

Tablica 8. Prikaz fragmentiranja 3-fenilpropanonitrila pri različitim energijama sraza

3-fenilpropanonitril	**SRM prijelazi**	**Energija sraza**	**Vrsta prijelaza**
	131→91	6 eV	kvalitativni
	131→65	38 eV	kvalitativni
	91→65	18 eV	**kvantitativni**
	91→39	36 eV	kvalitativni

SRM – specifični prijelazi (engl. *Single Reaction Monitoring*)



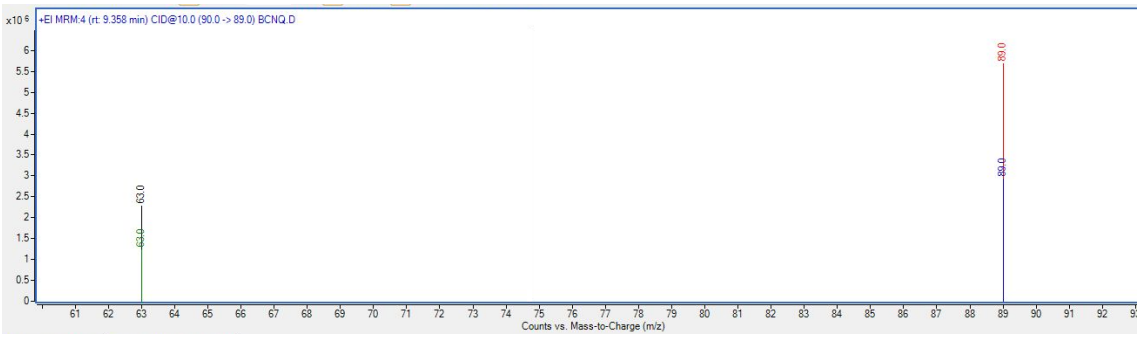
Slika 15. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze iz tablice 8

Postupak koji je proveden kod 3-fenilpropanonitrila ponovljen je i kod fenilacetonitrila. U tablici 9. prikazani su prijelazi s najvećim odzivima prema detektoru.

Tablica 9. Prikaz fragmentiranja fenilacetonitrila pri različitim energijama sraza

fenilacetonitril	**Fragmentiranje**	**Energija sraza**	**Najveći odziv prema detektoru**
	117→89	28 eV	**kvantitativni**
	117→63	50 eV	Kvalitativni
	90→89	10 eV	kvalitativni
	90→63	30 eV	kvalitativni

SRM – specifični prijelazi (engl. *Single Reaction Monitoring*)



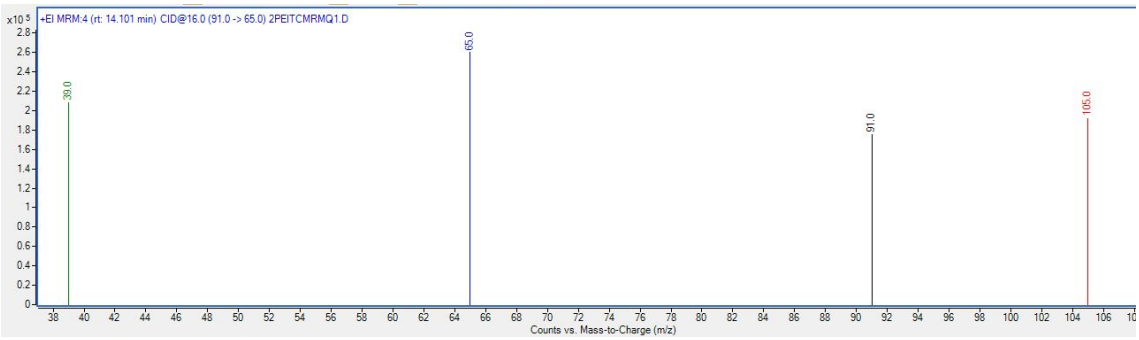
Slika 16. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze iz tablice 9

Na isti način izvedeno je snimanje 2-feniletil-izotiocijanata. U tablici 10. prikazani su prijelazi s najvećim odzivima prema detektoru.

Tablica 10. Prikaz fragmentiranja 2-feniletil-izotiocijanata pri različitim energijama sraza

2-feniletil-izotiocijanat	Fragmentiranje	Energija sraza	Najveći odziv prema detektoru
	163→105	2 eV	kvalitativni
	163→91	22 eV	kvalitativni
	91→65	16 eV	**kvantitativni**
	91→39	39 eV	kvalitativni

SRM – specifični prijelazi (engl. *Single Reaction Monitoring*)

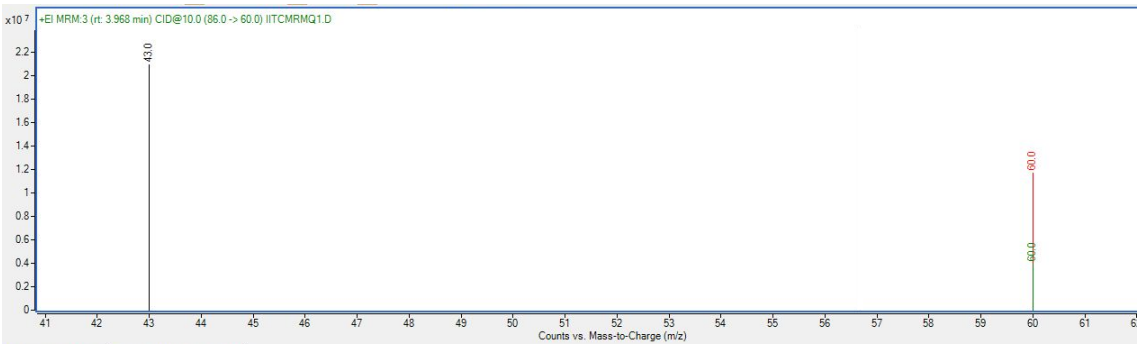


Slika 17. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze iz tablice 10

Prateći zadatak rada, na potpuno isti način izvedena je analiza izopropil-izotiocijanata. U ovom slučaju odabrana su tri prijelaza od značaja za razliku od dosadašnjih, tako se sva tri pika koriste kao identifikacijski pikovi prilikom snimanja realnog uzorka, a prijelaz 101→43 pri 6 eV koji pokazuje najveći odziv prema detektoru koristi se kao kvantitativni.

Tablica 11. Prikaz fragmentiranja izopropil-izotiocijanata pri različitim energijama sraza

izopropil-izotiocijanat	Fragmentiranje	Energija sraza	Najveći odziv prema detektoru
	101→60	2 eV	kvalitativni
	101→43	6 eV	**kvantitativni**
	86→60	10 eV	kvalitativni



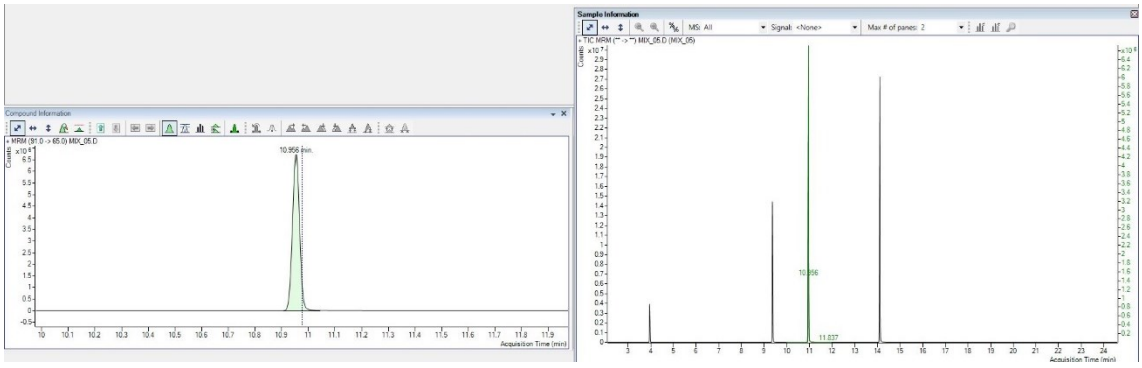
Slika 18. Prikaz odziva detektora za odabrane prijelaze iz tablice 11

3.4. Analiza realnog uzorka

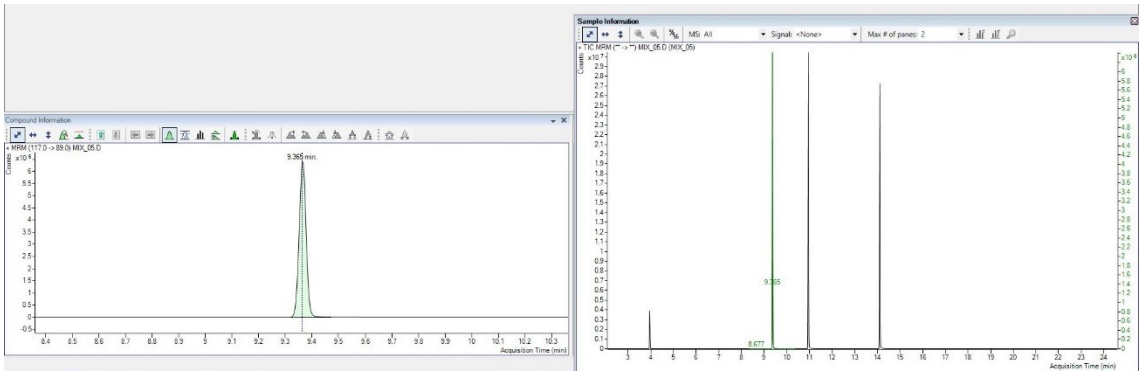
Nakon što su određeni kvalitativni i kvantitativni pikovi za svaku od komponenti pomoću realnog uzorka ispitana je valjanost razvijene metode analize.

Tablica 12. Prikaz rezultata mjerenja odabranih izotiocijanata i nitrila iz realnog uzorka

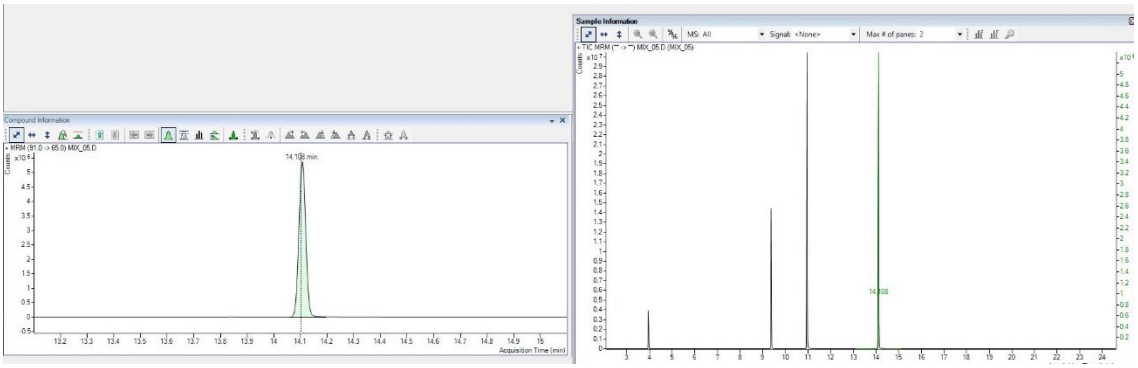
Injektiranje	Koncentracija (mg/mL)	Odziv	S/N
fenilacetonitril	0,5253	11689607	23054,65
2-feniletil-izotiocijanat	0,5151	9714837	22158,04
3-fenilpropanonitril	0,4786	12548851	21604,09
izopropil-izotiocijanat	0,4709	4129046	19274,61



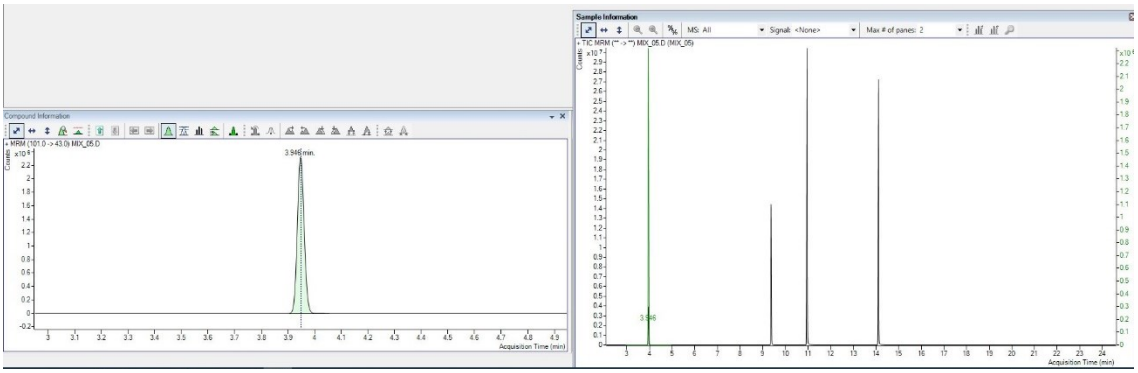
Slika 19. Prikaz rezultata mjerenja 3-fenilpropanonitrila iz realnog uzorka



Slika 20. Prikaz rezultata mjerenja fenilacetonitrila iz realnog uzorka



Slika 21. Prikaz rezultata mjerenja 2-feniletil-izotiocijanata iz realnog uzorka



Slika 22. Prikaz rezultata mjerenja izopropil-izotiocijanata iz realnog uzorka

3.5. Vrednovanje metode

- **Specifičnost –** kombinacijom plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa uočava se da je svaki spoj karakteriziran s barem tri SRM-a (specifična prijelaza) i time je potvrđena i specifičnost metode.
- **Linearnost –** Korelacijskim koeficijentom R^2 koji iznosi > 0.999 za sva četiri odabrana spoja može se potvrditi vrlo dobru linearnost.
- **Točnost i iskoristivost –** usporedbom računskih i mjerenih koncentracija potvrđena je točnost metode i izračunana iskoristivost te se podatci nalaze u tablicama 13-16.

Tablica 13. Točnost i iskoristivost 3-fenilpropanonitrila

Početna koncentracija (mg/mL)	Mjerena koncentracija (mg/mL)	Iskoristivost
0,22	0,2047	99,930
0,49	0,4840	99,988
0,72	0,0726	100,008
0,98	1,0081	100,029
2,03	2,0175	99,994

Tablica 14. Točnost i iskoristivost fenilacetonitrila

Početna koncentracija (mg/mL)	Mjerena koncentracija (mg/mL)	Iskoristivost
0,09	0,0889	99,988
0,53	0,525	99,991
0,68	0,6900	100,015
0,8	0,7968	99,996
2,1	2,0993	99,999

Tablica 15. Točnost i iskoristivost 2-feniletil-izotiocijanata

Početna koncentracija (mg/mL)	Mjerena koncentracija (mg/mL)	Iskoristivost
0,05	0,0422	99,844
0,09	0,0834	99,927
0,56	0,5667	100,012
1,06	1,0775	100,017
2,18	2,1702	99,996

Tablica 16. Točnost i iskoristivost izopropil-izotiocijanata

Početna koncentracija (mg/mL)	Mjerena koncentracija (mg/mL)	Iskoristivost
0,06	0,0621	100,035
0,09	0,0742	99,824
0,23	0,2214	99,963
0,4	0,4263	100,066
1,81	1,8060	99,998

- **Preciznost** - Ispitana je na način da se jedan uzorak 2-feniletil-izotiocijanata injektirao 6 puta zaredom na isti način.

Tablica 17. Preciznost injektiranja 2-feniletil-izotiocijanata

Injektiranje	Sadržaj (%)
1	97,08
2	98,76
3	100,60
4	100,76
5	101,60
6	101,21
RSD	1,73

4. ZAKLJUČAK

Plinska kromatografija spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa je odgovarajuća tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata i nitrila. Razvijenom metodom uspješno se kvalitativno i kvantitativno mogu iz realnog uzorka odrediti 3-fenilpropanonitril, fenilacetonitril, 2-feniletil-izotiocijanat i izopropil-izotiocijanat. Metoda je primjenjiva za područje masenih koncentracija koje obuhvaća dva reda veličine, a krivulje umjeravanja napravljene na minimalno 5 točaka imaju korelacijski koeficijent slaganja R^2 za sva četiri spoja >0,999 što pokazuje vrlo dobru linearnost u ovisnosti signala o koncentraciji analita.

5. LITERATURA

[1.] I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, C. E. Olsen, M. Burowe. P. Rollin, N. Agerbirk, *Phytochemistry* **2020**, *169*, 112100.

[2.] M. Kopjar, D.Šubarić, V. Piližota, *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku,* **2012,** 1.

[3.] M. Zekić, *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae,* Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, **2013**.

[4.] B. Kuzmanić, *Kvallitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata plinskom kromatografijom*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Medicinski fakultet Split, **2019**.

[5.] M, Župić, *Citotoksično djelovanje izotiocijanata iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom,* Kemijsko-tehnološki fakultet, Medicinski fakultet Diplomski rad, Split, **2017**.

[6.] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, **2016**.

[7.] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Choruch, *Fundamentals of Analytical Chemistry,* **2014**.

[8.] T. Cserháti, *Springer,* **2010,** 1.

[9.] O.D. Sparkman, Z. Penton, F. Kitson, *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide,* Elsevier, Oxford, **2011**.

[10.] URL: https://www.waters.com/waters/en_US/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?locale=en_US&cid=134803614 (15.09.2021.)

[11.] L.G. Wade, *Organska kemija,* Školska knjiga, Zagreb, **2017**.

[12.] M. Smoluch, G. Grasso, P. Suder, J. Silberring, *Mass Spectrometry: An Applied Approach,* John Wiley & Sons Inc., **2019**.

[13.] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina fluminensis,* **2009***, 45,* 3.

[14.] T. Marković, *Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa,* Diplomski rad, Kemijsko tehnološki fakultet, Medicinski fakultet, Split, **2019**.

[15.] SW-846 Test Method 8260B: Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), United States Enviromental Protection Agency, SAD, **1996**.