

# Kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata plinskom kromatografijom

---

**Kuzmanić, Branka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:982421>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Branka Kuzmanić**

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE  
ODABRANIH IZOTIOCIJANATA PLINSKOM  
KROMATOGRAFIJOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul**

**Split, listopad 2019.**

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

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Instrumente metode analize u farmaciji  
**Tema rada** je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Franko Burčul  
**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Franko Burčul

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH IZOTIOCIJANATA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

Branka Kuzmanić, broj indeksa: 125

**Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Razvoj i vrednovanje metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata primjenom plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor, FID.

**Materijali i metode:** Pripremljeno je 12 standardnih otopina izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata masenih koncentracija od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup> s diklormetanom kao otapalom koje su analizirane plinskom kromatografijom uz plamenoionizacijski detektor (GC-FID). Primijenjene su dvije metode u kojima se mijenjao temperaturni program peći u kojoj je smještena kolona i split omjer injektora, dok su ostali parametri bili konstantni. Korištena je kapilarna kolona s nepolarnom nepokretnom fazom. Kao pokretna faza se koristio helij, za sagorijevanje analita u detektoru su se koristili zrak i vodik, a dušik se koristio za ujednačavanje bazne linije.

**Rezultati:** Analizom je uočeno da brži temperaturni porast ne ometa razdvajanje komponenata uzoraka, a smanjenje split omjera metodu čini osjetljivijom prema nižim koncentracijama analita. Srednje vrijeme zadržavanja izopropil-izotiocijanata iznosi 5,505 min, alil-izotiocijanata 6,304 min, benzil-izotiocijanata 14,002 min, a 2-feniletil-izotiocijanata 15,300 min. Krivulja umjeravanja je konstruirana na najmanje 11 točaka za svaki od izotiocijanata te je podijeljena na dvije krivulje umjeravanja za dva područja koncentracija.

**Zaključci:** Plinska kromatografija uz plamenoionizacijski detektor je prihvatljiva tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje izotiocijanata. Razvijena metoda je primjenjiva za četiri odabrana izotiocijanata i područje masenih koncentracija koje obuhvaća tri reda veličine.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2016-06-1316.

**Ključne riječi:** izotiocijanati, plinska kromatografija, plamenoionizacijski detektor, krivulja umjeravanja

**Rad sadrži:** 68 stranica, 51 sliku, 8 tablica, 28 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član-mentor

Datum obrane: 16. listopada 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Instrumental methods of Analysis in Pharmacy  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14.  
**Mentor:** Franko Burčul, PhD, assistant prof.  
**Technical assistance:** Franko Burčul, PhD, assistant prof.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF SELECTED ISOTHIOCYANATES USING  
GAS CHROMATOGRAPHY  
Branka Kuzmanić, index number: 125

### Summary:

**Objectives:** Development and validation of the method for qualitative and quantitative determination of isopropyl-isothiocyanate, allyl-isothiocyanate, benzyl-isothiocyanate and 2-phenylethyl-isothiocyanate using gas chromatography with flame ionization detector, FID.

**Material and Methods:** 12 standard solutions of isopropyl-isothiocyanate, allyl-isothiocyanate, benzyl-isothiocyanate and 2-phenylethyl-isothiocyanate were dissolved in dichloromethane with mass concentrations from 0,01 mg mL<sup>-1</sup> to 10,00 mg mL<sup>-1</sup> and analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Two methods were applied in which column oven temperature rate and split ratio of the injector were altered, while other operation conditions were kept constant. A capillary column with non-polar stationary phase was used. Helium was the mobile phase, air and hydrogen were used for combustion in the detector and nitrogen was used as make up gas.

**Results:** The analysis found that faster temperature rise does not interfere with the separation of the sample components, and decrease in the split ratio makes method more sensitive to lower analyte concentrations. The mean retention time of isopropyl-isothiocyanate is 5,505 min, allyl-isothiocyanate 6,304 min, benzyl-isothiocyanate 14,002 min and 2-phenylethyl-isothiocyanate 15,300 min. A calibration curve is constructed of at least 11 points for each of the isothiocyanates and divided into two calibration curves for two concentration ranges.

**Conclusions:** Gas chromatography with flame ionization detector is a suitable technique for qualitative and quantitative determination of isothiocyanates. The developed method is applicable to four selected isothiocyanates and a range of mass concentrations that spans three orders of magnitude.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project IP-2016-06-1316.

**Key words:** isothiocyanates, gas chromatography, flame ionization detector, calibration curve

**Thesis contains:** 68 pages, 51 figures, 8 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

### Defence committee:

1. Olivera Politeo, PhD, associate prof. - chair person
2. Lea Kukoč Modun – PhD, assistant prof. - member
3. Franko Burčul - PhD- assistant prof. - supervisor

**Defence date:** October 16, 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

*Zahvaljujem se mentoru, doc. dr. sc. Franku Burčulu na posvećenom vremenu i trudu te svima koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim prijateljicama i prijateljima na svim zajedničkim trenucima.*

*Najveće hvala upućujem svojoj obitelji i dečku za bezuvjetnu ljubav i podršku.*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Izotiocijanati .....	2
1.1.1. Metabolizam i bioraspoloživost .....	3
1.1.2. Biološka aktivnost .....	3
1.1.3. Sigurnost.....	5
1.2. Kromatografija .....	6
1.2.1. Podjela kromatografije .....	6
1.2.2. Kromatografski parametri .....	7
1.2.3. Razvoj kromatografskih metoda.....	10
1.3. Plinska kromatografija.....	11
1.3.1. Injektori za GC .....	12
1.3.2. Kolone za GC .....	15
1.3.3. Detektori za GC.....	17
1.4. Vrednovanje analitičke metode .....	19
1.4.1. Linearno dinamičko područje.....	20
1.4.2. Granica dokazivanja i granica određivanja .....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Priprema standardnih otopina izotiocijanata .....	25
3.2. Priprema realnih uzoraka.....	27
3.3. Instrumenti.....	27
3.4. Radni uvjeti plinskog kromatografa .....	28
3.5. Plinovi.....	29
3.6. Injektor .....	29
3.7. Kolona .....	30
3.8. Detektor .....	30

3.9. Ostali instrumenti i pribor .....	30
4. REZULTATI .....	32
4.1. Metoda 1 .....	33
4.2. Metoda 2 .....	33
4.2.1. Izopropil-izotiocijanat .....	34
4.2.2. Alil-izotiocijanat .....	36
4.2.3. Benzil-izotiocijanat .....	38
4.2.4. 2-feniletil-izotiocijanat .....	40
4.3. Vrednovanje metode 2 .....	42
4.3.1. Vrednovanje metode 2 – izopropil-izotiocijanat .....	42
4.3.2. Vrednovanje metode 2 – alil-izotiocijanat .....	43
4.3.3. Vrednovanje metode 2 – benzil-izotiocijanat .....	44
4.3.4. Vrednovanje metode 2 – 2-feniletil-izotiocijanat .....	45
4.4. Analiza realnog uzorka .....	46
5. RASPRAVA .....	47
6. ZAKLJUČCI .....	57
7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....	59
8. SAŽETAK .....	63
9. SUMMARY .....	65
10. ŽIVOTOPIS .....	67

## **1. UVOD**

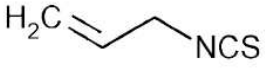
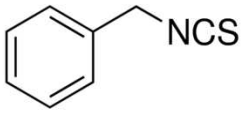
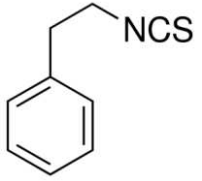
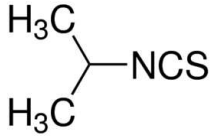


## 1.1. Izotiocijanati

Kupusnjače ili krstašice (lat. *Brassicaceae*), poput brokule, kelja i kupusa, bogat su izvor spojeva koji sadrže sumpor, glukozinolata. Kupusnjače sadrže razne glukozinolate, od kojih hidrolizom nastaju različiti biološki aktivni produkti izotiocijanati (1).

Za razliku od nekih drugih fitokemikalija, glukozinolati su prisutni u relativno visokim koncentracijama u najčešće konzumiranim vrstama kupusnjača. Iako su sastav i sadržaj glukozinolata u kupusnjačama relativno stabilni, oni ovise o rodu i vrsti te se mogu uvelike razlikovati ovisno o uvjetima uzgoja biljaka, uvjetima nakon žetve te o kulinarskoj obradi (1).

Tablica 1.1. Prehrambeni izvori odabranih izotiocijanata i njihovih glukozinolatnih prekursora (1)(2).

Izotiocijanat	Glukozinolat (prekursor)	Biljka
Alil-izotiocijanat (AITC) 	Sinigrin	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>Brassica alba</i> , <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> , <i>Brassica rapa</i>
Benzil-izotiocijanat (BITC) 	Glukotropeolin	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>Brassica junica</i>
2-fenilet-il-izotiocijanat (PEITC) 	Glukonasturcin	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> , <i>Brassica junica</i> , <i>Brassica nigra</i> , <i>Brassica campestris</i> , <i>Brassica rapa</i>
Izopropil-izotiocijanat (IPITC) 	Glukoputranjivin	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>Brassica rapa</i>

### **1.1.1. Metabolizam i bioraspoloživost**

Mirozinaza, enzim koji katalizira hidrolizu glukozinolata, je u netaknutoj biljnoj stanici odvojena od glukozinolata. Međutim, u oštećenoj biljnoj stanici, na primjer rezanjem, mirozinaza se oslobađa i hidrolizira glukozinolate do metabolita gorkog okusa i/ili oštrog mirisa (1).

Kad je mirozinazna aktivnost potpuno inhibirana, na primjer kuhanjem, crijevna mirozinaza omogućuje stvaranje različitih izotiocijanata, ovisno o pH-vrijednosti i prisutnim kofaktorima. Izotiocijanati, apsorbirani u proksimalnom dijelu debelog crijeva, se konjugiraju u jetri glutation-*S*-transferazom (GST), a potom metaboliziraju u putu merkapturinske kiseline (1).

### **1.1.2. Biološka aktivnost**

#### **Antioksidativno djelovanje**

Mnogi izotiocijanati induciraju ekspresiju antioksidativnih enzima aktiviranjem puta ovisnog o NRF2 (engl. *nuclear factor E2 related factor 2*). NRF2 je transkripcijski faktor koji se veže za KEAP1 (engl. *kelch like ECH associated protein 1*) u citosolu. KEAP1 reagira na signale oksidacijskog stresa ili kemijske induktore oslobađanjem NRF2. NRF2 se tada može premjestiti u jezgru i vezati za element odgovora na antioksidanse (engl. *antioxidant response element*, ARE) smješten u promotorima gena koji kodiraju antioksidacijske/detoksikacijske enzime. Geni ovisni o NRF2/ARE kodiraju nekoliko posrednika antioksidacijskog odgovora, uključujući glutation-*S*-transferazu (GST), tioredoksin, NAD(P)H kinon-oksido-reduktazu 1 (NQO-1) i hem-oksigenazu 1 (HO-1) (1).

Na brojnim životinjskim modelima se dokazalo da sulforafan, aktiviranjem puta ovisnog o NRF2/ARE, ostvaruje zaštitni učinak na mnoge organe i tkiva, kao što su bubrezi, jetra i vaskularni endotel (1).

#### **Protuupalno djelovanje**

Izotiocijanati značajno smanjuju nuklearnu translokaciju nuklearnog faktora pro-upalnog transkripcijskog faktora  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) u acinarnim stanicama gušterače, smanjujući ekspresiju NF- $\kappa$ B ciljnih gena koji kodiraju prouupalne posrednike, poput faktora nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ) i interleukina-6 (IL-6) (1).

Pokazano je da izotiocijanati sprječavaju razgradnju inhibitora NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), nuklearnu translokaciju NF- $\kappa$ B i transkripcijsku aktivnost NF- $\kappa$ B *in vitro* ili u uzgojenim stanicama, što sve može dovesti do smanjenja upalnih procesa (1).

### **Antikarcinogeno djelovanje**

Biotransformacija enzima ima važnu ulogu u metabolizmu i uklanjanju različitih kemikalija, uključujući lijekove, toksine i karcinogene tvari. Općenito, enzimi u prvoj fazi biotransformacije kataliziraju reakcije kojima se povećava reaktivnost hidrofobnih spojeva, pripremajući ih na reakcije druge faze biotransformacije. U drugoj fazi biotransformacije, enzimi kataliziraju reakcije kojima se povećava topljivost spojeva u vodi čime se olakšava njihova eliminacija iz organizma (1).

Da bi nastali aktivni onkogeni koji se mogu vezati za DNA i potaknuti mutacije, nekim protoonkogenima je potrebna biotransformacija enzimima faze I, kao što su enzimi iz obitelji citokroma P450 (CYP). Inhibicijom specifičnih CYP enzima uključenih u aktivaciju onkogeno sprječava se razvoj karcinoma. Na životinjskim modelima je dokazano da neki izotiocijanati, uključujući 2-fenilet-ilizotiocijanat i benzil-izotiocijanat, inhibiraju aktivaciju onkogeno CYP enzimima (1).

Enzimi faze II biotransformacije, GST, UDP-glukuronozil-transferaza (UGT), glutamat-cistein-ligaza i kinon-reduktaza, su važni u zaštiti DNA od oštećenja uzrokovanih onkogenima i reaktivnim spojevima kisika (ROS). Geni za navedene enzime sadrže ARE sekvencu na DNA, a njihovu transkripciju povećavaju izotiocijanati te, posljedično, povećavaju aktivnost enzima faze II biotransformacije (1).

Mnogi izotiocijanati, posebno alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat i 2-fenilet-ilizotiocijanat, induciraju zaustavljanje staničnog ciklusa u slučaju oštećenja DNA kako bi se omogućio njen popravak ili aktivirali putovi apoptoze. Na taj način se sprječava širenje mutacije koje dovode do razvoja karcinoma (1).

### **Antibakterijsko djelovanje**

Infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* povezana je s razvojem peptičkog ulkusa i raka želuca. U epruveti i kulturi tkiva, pročišćeni sulforafan inhibira rast i ubija višestruke sojeve *H. pylori*, uključujući sojeve otporne na antibiotike. U životinjskom modelu infekcije *H. pylori*, primjenom sulforafana tijekom 5 dana iskorijenila se *H. pylori* s 8 od 11

ksenografta ljudskog želučanog tkiva implantiranih u imunokompromitirane miševe. Međutim, primjena 56 g/dan klica brokule bogatih glukorafaninom tijekom tjedan dana kod pacijenata s gastritisom, dovela je do iskorijenjenja *H. pylori* kod 3 od 9 ispitanika. Potrebna su daljnja istraživanja kojima će se utvrditi učinak izotiocijanata na *H. pylori* (1).

### **1.1.3. Sigurnost**

#### **Nuspojave**

Nisu zabilježeni ozbiljni štetni učinci izotiocijanata na ljude. Većina studija na životinjama otkrila je da izotiocijanati inhibiraju razvoj raka kada se daju prije kemijskog karcinogena. Međutim, otkriveno je da vrlo visoki unos 2-feniletil-izotiocijanata ili benzil-izotiocijanata (25 do 250 puta veći unos od prosječnog) povezan s razvojem karcinoma mokraćnog mjehura kod štakora kad se primjenjuje nakon kemijskog karcinogena. Važnost ovih nalaza kod ljudi nije jasna s obzirom da je utvrđeno da se konzumacijom kupusnjača smanjuje rizik razvoja karcinoma mokraćnog mjehura kod muškaraca (1).

#### **Trudnoća i dojenje**

Iako se zna da visoki prehrambeni unosi glukozinolata iz kupusnjača imaju štetne učinke tijekom trudnoće i dojenja, ne postoje podaci o sigurnosti pročišćenih izotiocijanata ili dodataka koji sadrže visoke doze glukozinolata ili izotiocijanata tijekom trudnoće ili dojenja kod ljudi (1).

#### **Interakcije lijekova**

Nije poznato da izotiocijanati stupaju u interakciju s bilo kojim lijekom. Međutim, mogućnost da izotiocijanati inhibiraju različite izoforme enzima citokrom P450 (CYP) povećava mogućnost interakcije s lijekovima koji su supstrati tih istih enzima. Izotiocijanati mogu povećati osjetljivost stanica raka na antikarcinogene lijekove i/ili povećati citotoksičnost lijeka, kao što je prikazano *in vitro* i na životinjskim modelima. Ipak, ove potencijalne koristi izotiocijanata u terapiji karcinoma nisu ispitivane kliničkim ispitivanjima (1).

## 1.2. Kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma*; boja *graphein*; pisati) je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese s obzirom na njihovu različitu raspodjelu između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) (3). Uz odjeljivanje, primjenom odgovarajućeg detektora, moguće je i određivanje te naknadna identifikacija analita (4). Zbog različitih fizikalno-kemijskih karakteristika analita, oni se razlikuju u svojoj sposobnosti da se vežu za nepokretnu i pokretnu fazu. Zbog razlika u afinitetu prema nepokretnoj fazi, analiti pokazuju različitu pokretljivost u kromatografskom sustavu što rezultira njihovim razdvajanjem (5).

### 1.2.1. Podjela kromatografije

Kromatografske tehnike se dijele prema različitim kriterijima. S obzirom na način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze, razlikuju se kolonska i plošna kromatografija. U kolonskoj kromatografiji nepokretna faza se nalazi u uskoj koloni kroz koju, pod utjecajem gravitacije ili primijenjenog tlaka, prolazi pokretna faza. Ona različitim brzinama raznosi pojedine komponente uzorka, što čini osnovu njihovog odjeljivanja. Nepokretnu fazu čine čvrste čestice, odnosno tanak sloj tekućine koji se nanosi na stijenk u kolone ili na čvrste čestice (3). One su najčešće od silikagela ili aluminij (III) oksida. Potrebna količina čvrstih čestica ovisi o njihovoj veličini i uniformnosti. Omjer između težine nepokretne faze, odnosno silikagela i težine suhe smjese analita je u rasponu od 20:1 do 100:1, ovisno o međusobnoj razlici vremena elucije analita (6). Uzorak se dodaje na vrh kolone u vremenu  $t_0$ . On može biti u čvrstom ili tekućem stanju, ali ako je u čvrstom stanju, uzorak mora biti topljiv u pokretnoj fazi. Dodavanjem pokretne faze koja eluira uzorak, uz postojanje dovoljne razlike afiniteta komponenata uzorka prema nepokretnoj fazi, postiže se vidljivo odjeljivanje komponenata. Kad se sve komponente uzorka ne mogu eluirati samo jednom pokretnom fazom, dodaje se druga pokretna faza ili pokretna faza koja je smjesa otapala kako bi se eluirale sve komponente (3).

Plošna kromatografija je vrsta kromatografije u kojoj je nepokretna faza kromatografski papir ili sloj sorbensa nanesen na čvrst nosač (7). Stoga razlikujemo papirnu i tankoslojnu kromatografiju. Odjeljivanje se postiže na način da se papir ili pločica s malim volumenom uzorka uroni u otapalo, pokretnu fazu, koje putuje poroznim sorbensom, nepokretnom fazom, pod utjecajem kapilarnih sila noseći sa sobom komponente uzorka različitim brzinama (3). Ova vrsta kromatografije rjeđe se upotrebljava jer se smatra manje

djelotvornom tehnikom, ali je korisna za brzu procjenu postojanja nečistoća, odnosno za određivanje čistoće uzorka (8).

Prema agregatnom stanju pokretne faze, kromatografske se tehnike mogu podijeliti na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju. Kod plinske kromatografije pokretna faza je inertan plin, najčešće vodik, dušik ili helij, kod tekućinske kromatografije je to tekućina male viskoznosti, a kod fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima pokretna faza je gusti plin iznad svoje kritične temperature i tlaka (3).

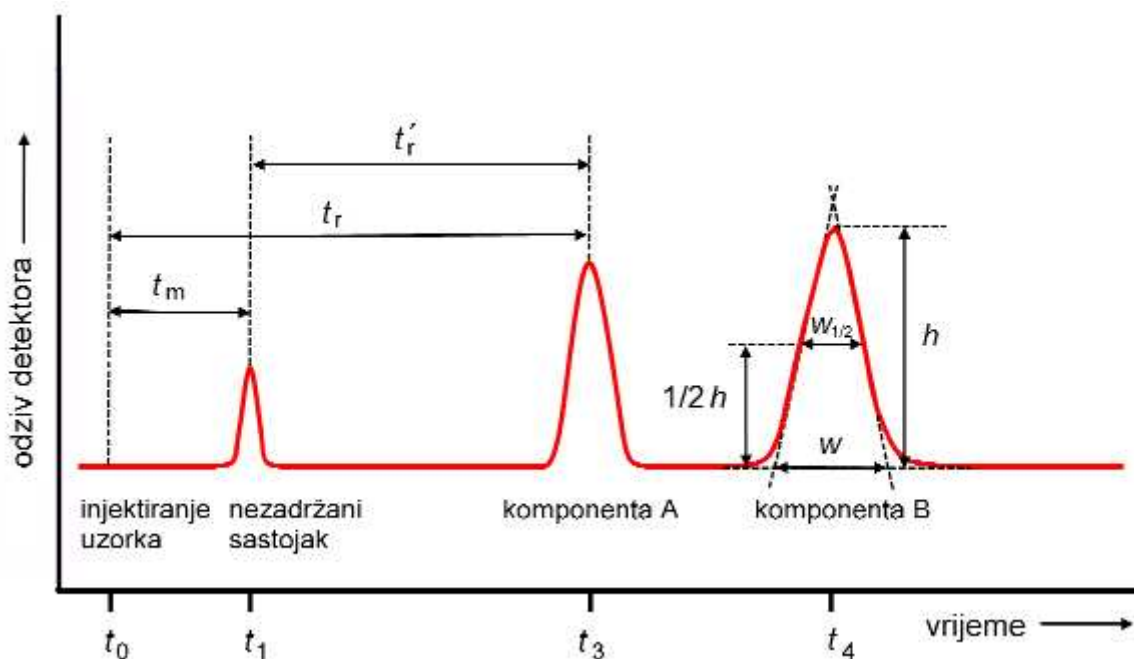
Kromatografske tehnike se mogu podijeliti i s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze. Tako razlikujemo razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, kromatografiju isključenjem i kromatografiju ionskom izmjenom (3).

Tablica 1.2. Kromatografske tehnike s obzirom na prirodu ravnoteže i mehanizme odjeljivanja (3).

<b>Kromatografska tehnika</b>	<b>Mehanizam odjeljivanja</b>
Razdjelna kromatografija	Razlika u polarnosti pokretne i nepokretne faze.
Adsorpcijska kromatografija	Različita adsorpcija sastojaka uzorka za površinu čvrstog adsorbensa
Afinitetna kromatografija	Specifične interakcije molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze
Kromatografija isključenjem	Razlika u veličini i obliku molekula
Kromatografija ionskom izmjenom	Razlika u afinitetu uzorka prema nepokretnoj fazi (najčešće ionskoj smoli)

### **1.2.2. Kromatografski parametri**

Kromatogram je grafički prikaz odnosa koncentracije analita u eluatu prema volumenu eluata ili vremenu (7). On je koristan za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj pika na vremenskoj osi se koristi za identifikaciju analita, a iz površine ispod pika se može odrediti koncentracija analita (3).



Slika 1.1. Shematski prikaz kromatograma uzorka s dvije komponente.  $t_m$  predstavlja zadržano vrijeme;  $t_r$  ukupno vrijeme zadržavanja;  $t_r'$  prilagođeno vrijeme zadržavanja;  $h$  visinu kromatografske krivulje;  $1/2h$  polovinu visine kromatografske krivulje;  $w$  širinu kromatografske krivulje u osnovici;  $w_{1/2}$  širinu kromatografske krivulje u polovici visine (3).

Najvažniji kromatografski parametar za kvalitativnu analizu je vrijeme zadržavanja. Ukupno vrijeme zadržavanja,  $t_r$ , je karakteristično za svaku komponentu, a predstavlja vrijeme koje je potrebno od injektiranja uzorka na kolonu do njenog maksimalnog odziva. Zadržano vrijeme,  $t_m$ , je vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti pokretne faze za prolazak kroz kolonu. Ono se koristi za izračunavanje prilagođenog vremena zadržavanja,  $t_r'$ , parametra koji predstavlja vrijeme koje je potrebno razmatranoj komponenti uzorka za dolazak do detektora nakon što je nezadržani sastojak stigao na detektor. Često se koristi umjesto ukupnog vremena zadržavanja, a izračunava se kao razlika ukupnog vremena zadržavanja i zadržanog vremena (3):

$$t_r' = t_r - t_m$$

Omjer raspodjele ili koeficijent raspodjele predstavlja konstantu ravnoteže,  $K$ , reakcije pri kojoj dolazi do različite raspodjele analiziranih sastojaka između pokretne i nepokretne faze te se definira kao omjer koncentracije sastojka u nepokretnoj fazi,  $c_s$ , i koncentracije sastojka u pokretnoj fazi,  $c_M$ , (3):

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

Teorijski tavan je virtualan pojam koji predstavlja uspostavljanje ravnoteže analita između pokretne i nepokretne faze. Brojem teorijskih tavana se opisuje djelotvornost kromatografske kolone:

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

gdje  $N$  predstavlja broj teorijskih tavana,  $L$  duljinu kolone, a  $H$  visinu teorijskih tavana. Broj teorijskih tavana za različite analite, na istoj kromatografskoj koloni može biti različit. Uz veći broj teorijskih tavana, odnosno manju visinu tavana, kromatografska krivulja je uža, a djelotvornost kolone veća. Također, visina i broj tavana se mogu izračunati iz kromatograma, uz poznatu duljinu kolone. Visina tavana se dobije iz sljedeće formule:

$$H = \frac{L \times w^2}{16 \times t_r^2}$$

gdje  $w$  predstavlja širinu pika u osnovici. Broj teorijskih tavana se može dobiti iz sljedeće dvije formule:

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

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{w_{1/2}}\right)^2$$

gdje  $w_{1/2}$  predstavlja širinu pika u polovici visine (3).

Razlučivanje,  $R_s$ , je kvantitativna mjera odjeljivanja kromatografskih krivulja dviju komponenti te se može izračunati sljedećom formulom:

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

gdje B predstavlja duže zadržavanu komponentu. Veći  $R_s$  predstavlja uspješnije odjeljivanje komponenata, a za kvalitativnu analizu je potrebno da bude veći od 1,5. Razlučivanje se može povećati povećanjem razlike u vremenima zadržavanja, odnosno smanjenjem širine pikova (3).



### 1.2.3. Razvoj kromatografskih metoda

Prije razvoja metode treba prikupiti informacije o uzorku kao što su kemijske strukture komponenata uzorka, UV spektar, očekivana koncentracija analita. Također, definiraju se ciljevi analize kao što su provođenje kvalitativne ili kvantitativne analize, zahtjevi za vrednovanje metode, trajanje analize. Pritom se u obzir uzima očekivani broj uzoraka u analizi te dostupnost opreme kao što su kolone, detektori, mogućnost gradijentnog eluiranja. Postavljeni ciljevi se mogu ostvariti odabirom odgovarajućih kromatografskih parametara (9).

Većina uzoraka zahtijeva pripremu prije unošenja u kromatografski sustav što može uključivati razrjeđivanje, prilagođavanje pH-vrijednosti, otapanje krutog uzorka i sl. Ponekad je potrebno uzorak koncentrirati, ukloniti interferencije ili pojedine komponente koje bi mogle oštetiti kromatografsku kolonu. Zbog svega navedenog je važno poznavanje prirode ispitivanog uzorka i vjerojatnih koncentracija analita (9).

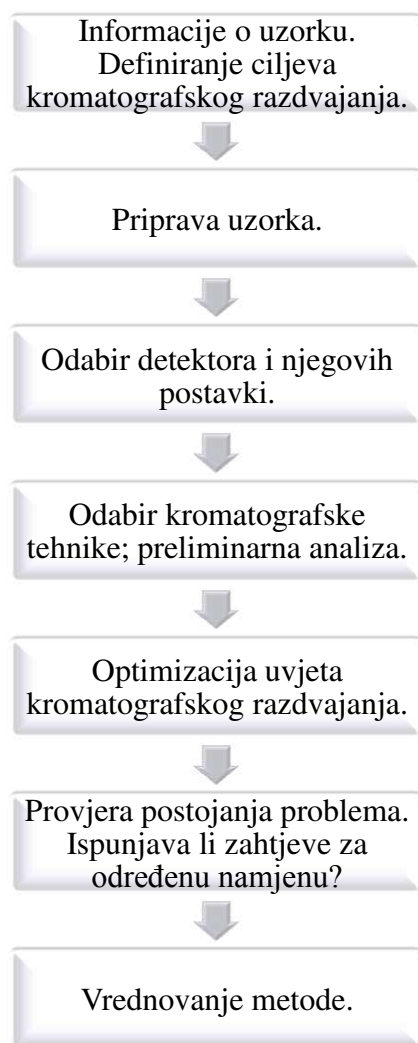
Zatim slijedi odabir detektora koji se bira ovisno o komponentama koje se određuju i njihovim kemijskim svojstvima (9).

Kromatografska tehnika se odabire na osnovu informacija o uzorku i ciljevima kromatografskog razdvajanja. Za preliminarnu analizu se odabire kolona (dimenzije, veličina čestica, nepokretna faza), pokretna faza, protok pokretne faze, volumen injektiranja, temperatura (9).

Potom slijedi optimizacija uvjeta, odnosno promjena pojedinih uvjeta kako bi se postiglo što bolje razdvajanje komponenti. Optimiziranje uvjeta razdvajanja se provodi metodom pokušaja i pogrešaka ili pomoću računalnih simulacija. Ovaj korak se smatra najduljim i najskupljim u razvoju metode (9).

Na kraju se provjerava ponovljivost metode i zadovoljavanje postavljenih zahtjeva. Također, utvrđuje se postoje li problemi koji bi mogli smetati tijekom rutinskog rada. Ako se radi o kvantitativnoj metodi, radi se krivulja umjeravanja te vrednovanje metode (9).

Razvoj kromatografskih metoda se najčešće provodi prema shemi prikazanoj na slici 1.2.

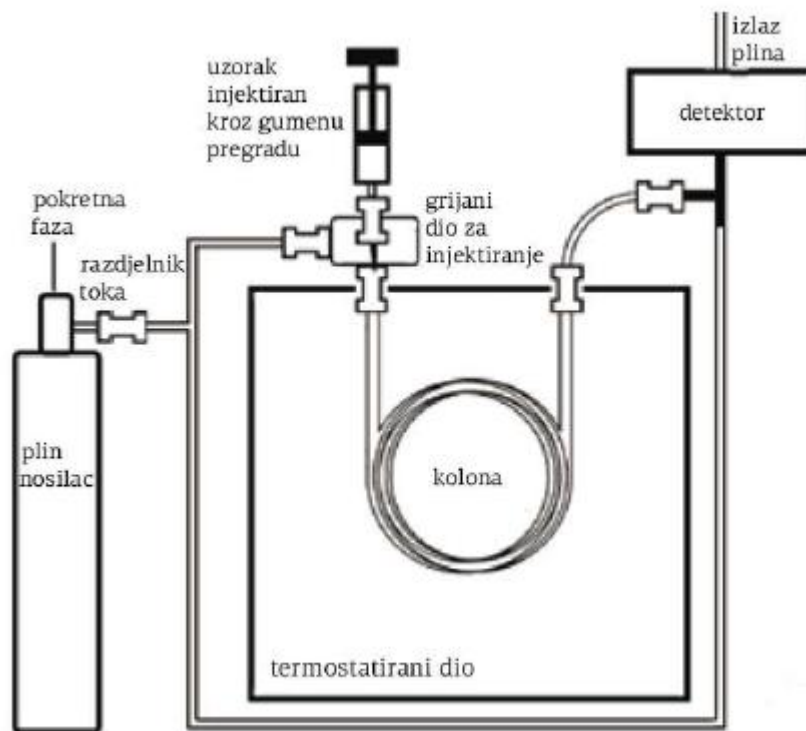


Slika 1.2. Shematski prikaz razvoja kromatografskih metoda (9).

### 1.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je jednostavna i vrlo osjetljiva tehnika za razdvajanje analita vrlo niskih koncentracija (10). Primjenjiva je samo za analite koji su pri temperaturi razdvajanja u plinovitom stanju te stabilni (5). Ovu tehniku su prvi predstavili James i Martin 1952. godine. Osnovni princip rada plinske kromatografije uključuje isparavanje uzorka u zagrijanom dijelu za injektiranje, nakon čega slijedi razdvajanje komponenata smjese na koloni (11). Tehnika se može primijeniti na većinu otapala i pesticida, brojne aromatske spojeve, eterična ulja, ugljikovodična goriva i mnoge lijekove. Kiseline, aminokiseline, amini, amidi, nehlapljivi lijekovi, saharidi i steroidi spadaju u složenije spojeve koji zahtijevaju derivatizaciju kako bi im se povećala isparljivost (11).

Pokretnu fazu plinske kromatografije čini plin nosilac, obično vodik, dušik ili helij, koji prenosi uzorak od injektora, kroz kolonu, do detektora. Nepokretna faza može biti u tekućem ili čvrstom agregatnom stanju, a uzorak u tekućem ili plinovitom te se injektira kroz gumenu pregradu. Ako se radi o uzorku u tekućem stanju, on se u grijanom dijelu za injektiranje prevodi u plinovito agregatno stanje. Zatim uzorak, zajedno s pokretnom fazom, prolazi kroz kolonu zadanom brzinom protoka, pri čemu se komponente razdvajaju, do detektora koji je spojen na računalo na kojem se prikazuje kromatogram (12).



Slika 1.3. Shematski prikaz plinskog kromatografa (3).

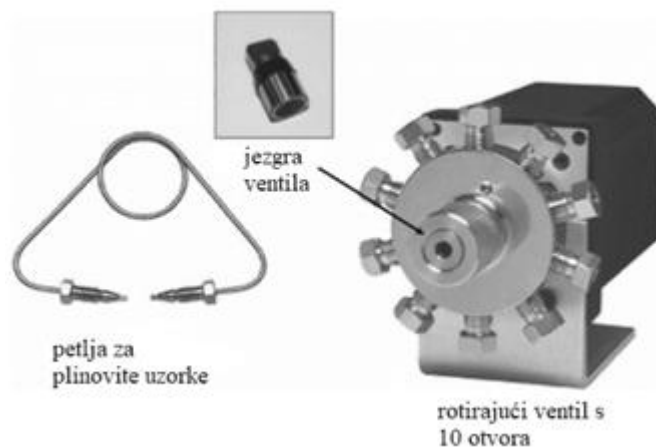
### 1.3.1. Injektori za GC

Injektor se koristi za unošenje uzorka u kolonu. Pri injektiranju je važno izbjeći raspršivanje uzorka kako bi se dobili jasni i oštri signali (pikovi) zabilježeni na detektoru (11). Isporuka uzorka u kolonu mora biti kontrolirana, reproducibilna i brza. Reproducibilnost se postiže minimalnim promjenama tlaka i protoka (13).

#### Plinoviti uzorci

Uzorak u plinovitom stanju se može uvesti u injektor plinski nepropusnom špricom ili kroz rotirajući ventil za unošenje plinovitog uzorka u plin nosilac (slika 1.4). Ventil za

unošenje plinovitog uzorka se postavlja na vrh instrumenta u termostatiranom prostoru. Obično se koriste ventili s 4 – 10 otvora. Često se dodaje i petlja za plinovite uzorke koja uvodi uzorak na početak kolone. Uglavnom se koriste petlje od 0,5 mL, 1 mL i 2 mL (11).

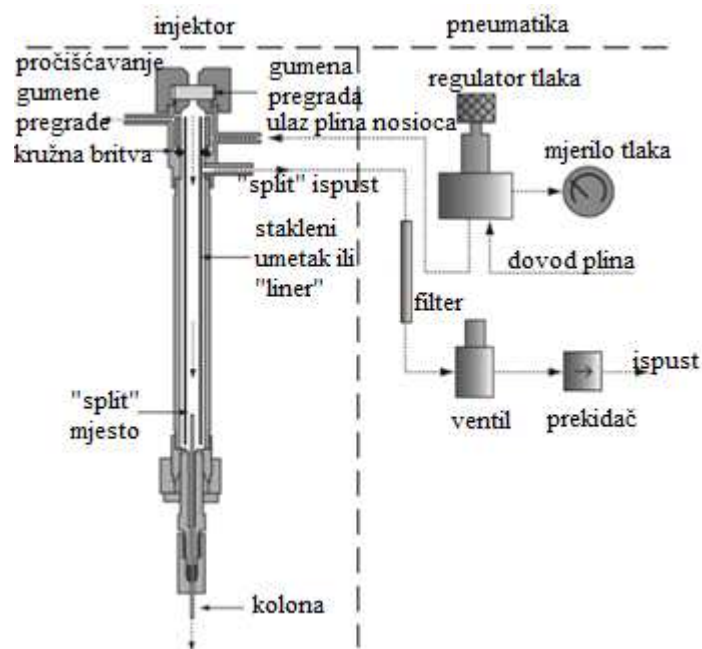


Slika 1.4. Rotirajući ventil za unošenje plinovitog uzorka s 10 otvora i petlja za plinovite uzorke. Jezgra ventila se nalazi u unutrašnjosti i rotira se kako bi promijenila smjer protoka u ventilu. Petlja za plinovite uzorke se može ugraditi na ventil, a služi za prijenos određene količine plina na kolonu (11).

### Tekući uzorci

*Split/splitless* injektori se koriste za tekuće uzorke i jedni su od najčešće korištenih injektora za kapilarne kolone. Injektor se nalazi u termostatiranoj komori na temperaturi 50°C većoj od vrelišta najslabije hlapljive komponente uzorka kako bi se osiguralo isparavanje cijelog uzorka. Injektira se obično 1  $\mu$ L uzorka špricom kroz gumenu pregradu (engl. *septum*) koja se nalazi na samom vrhu injektora. Gumena pregrada onemogućava izlazak uzorka i plina nosioca iz termostatirane komore (11).

Ovisno o pretpostavljenoj koncentraciji analita, bira se *split* ili *splitless* način rada. Ako se radi o uzorku u kojem je koncentracija analita veća od 100  $\mu$ g/mL, preporučuje se *split* način rada pri čemu se unosi samo jedan dio uzorka (0,5–5 %), dok se ostatak ispušta. Uobičajeni *split* omjeri su između 10:1 i 400:1. Ako se pak radi o nižim koncentracijama analita, preporuka je raditi u *splitless* načinu rada kako bi se čitav uzorak analizirao (11).



Slika 1.5. Shematski prikaz poprečnog presjeka *split/splitless* injektora (11).

### Automatski uzorkivač

Automatski uzorkivači (engl. *autosampler*) omogućavaju injektiranje određenog volumena uzorka pri zadanoj brzini injektiranja čime se postiže brže i preciznije injektiranje u odnosu na ručno te time i veća reproducibilnost mjerenja. S obzirom na mogućnost programiranja, analitičaru se na ovaj način pojednostavljuje postupak jer nema obvezu ručnog injektiranja u određeno vrijeme (11).



Slika 1.6. Automatski uzorkivač Agilent 7683 (14).

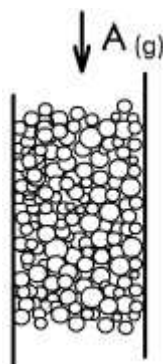
### 1.3.2. Kolone za GC

Kod plinske kromatografije, razdvajanje se postiže u koloni s nepokretnom fazom. Komponente s manjim afinitetom prema nepokretnoj fazi se eluiraju brže, a one s većim afinitetom se eluiraju sporije. Temperatura peći u kojoj se nalazi kolona obično raste 4 – 20 °C po minuti kako bi se postiglo otpuštanje jače zadržanih komponenti. Kolone mogu biti punjene i kapilarne (11).

#### Punjene kolone

Punjene kolone (eng. *packed columns*) mogu biti od bakra, aluminijske, nehrđajućeg čelika ili stakla koji se pune dijametrom zemljom ili staklenim kuglicama kao inertnim nosačem. Na inertni nosač se nanosi polimer visokog vrelišta, odnosno nepokretna faza. Ovakve kolone se koriste kad je uzorak u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju. S druge strane, ako se radi o plinovitim ili lako hlapljivim uzorcima, kao nepokretna faza se mogu koristiti male čestice čvrstog polimera ili molekulska sita, odnosno materijal s porama definiranih dimenzija (11).

Punjene kolone su obično dugačke 1 - 3 m, a unutarnji promjer im je između 2 i 4 mm (15). Imaju veći kapacitet uzorka u odnosu na kapilarne kolone (5). Da bi plin nosilac uspješno prolazio kroz punjenu kolonu, potrebna je primjena visokog potisnog tlaka (11).

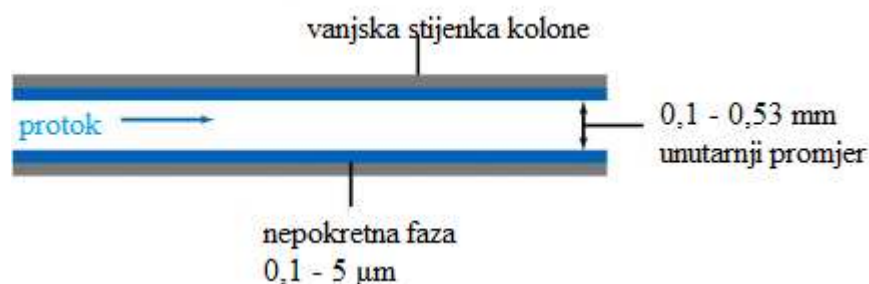


Slika 1.7. Uvećani segment punjene kolone.

#### Kapilarne kolone

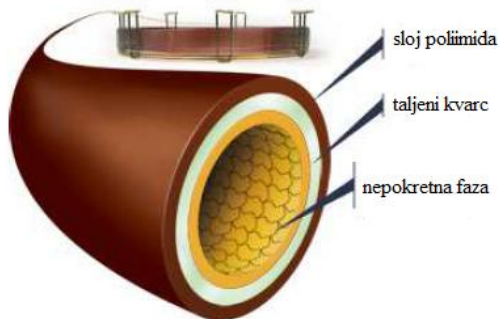
Kapilarne kolone (engl. *capillary/open-tubular columns*) su otvorene kapilare duljine 5 – 60 m, a unutarnji promjer im je između 0,1 i 0,53 mm. Debljina filma tekuće nepokretne

faze je najčešće 0,1 – 5  $\mu\text{m}$  (15). S obzirom na izvedbu nepokretne faze, razlikuje se više vrsta kapilarnih kolona (11).



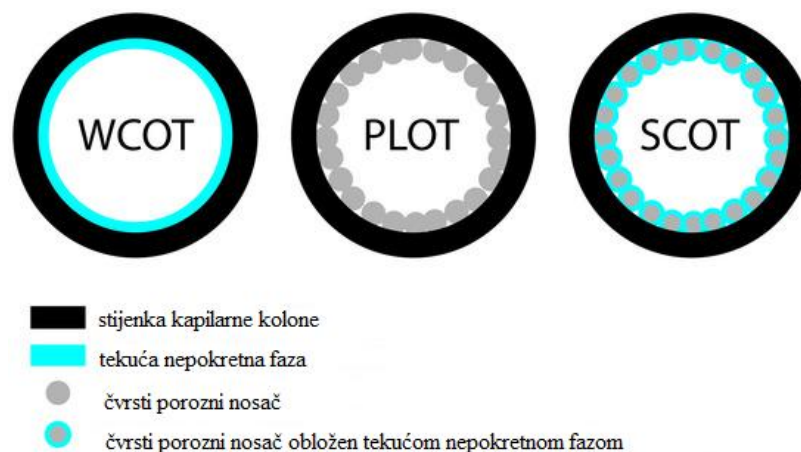
Slika 1.8. Uvećani segment kapilarne kolone.

Kapilarne kolone s obloženom stijenkom (engl. *Wall-coated open-tubular column*, WCOT) su najstarije kapilarne kolone. Kolone se izrađuju od taljenog kvarca, odnosno silicijevog (IV) oksida visoke čistoće obloženog slojem poliimida. Na taj način se postiže veća mehanička izdržljivost i elastičnost kolone. Unutarnja površina se oblaže slojem tekuće nepokretne faze koja mora biti stabilna na visokim temperaturama i imati visoko vrelište (11).



Slika 1.9. Uvećani segment WCOT kolone od taljenog kvarca.

Kod kapilarnih kolona s poroznim slojem (engl. *Porous-layer open-tubular column*, PLOT) nepokretna faza je čvrsti porozni sloj polimera, čime se postiže veća dodirna površina s analitom. Kod kapilarnih kolona s obloženim nosačima (engl. *Support-coated open-tubular column*, SCOT) na unutarnju stijenkku kolone se nanosi čvrsti inertni nosač u obliku sitnih čestica, a na njega tekuća nepokretna faza. Na ovaj način se također povećava dodirna površina s analitom u odnosu na ranije izvedbe kapilarnih kolona (11).



Slika 1.10. Shematski prikaz WCOT, PLOT i SCOT kolone (16).

### 1.3.3. Detektori za GC

Nakon prolaska eluata kroz kolonu, on dolazi do detektora gdje se signalizira prolazak pojedine komponente uzorka te se signal šalje računalu. Pritom se stvara graf intenziteta signala u ovisnosti o vremenu analize, odnosno kromatogram. Osnovni kriterij odabira detektora su njegova osjetljivost i selektivnost. Osjetljivost detektora predstavlja najmanju količinu analita koja se može detektirati, a selektivnost razliku između odziva detektora za različite analite u istoj koncentraciji (5).

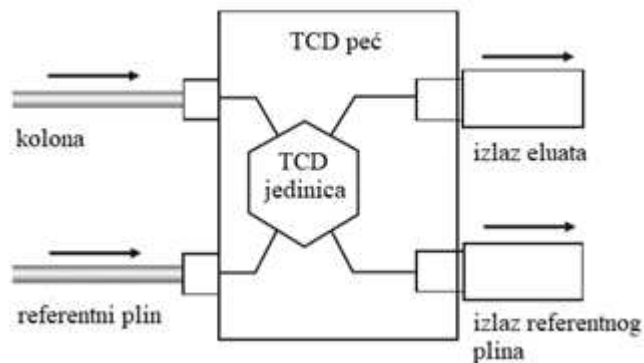
Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD), plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame ionization detector*, FID) i detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron capture detector*, ECD) spadaju u skupinu kvantitativnih detektora koji detektiraju prisutnost eluirane komponente uzorka i njenu količinu. Identifikacija pojedinih komponenti se ostvaruje neizravno preko specifičnog vremena zadržavanja (13). Maseni spektrometar (engl. *Mass spectrometer*, MS) i infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transformation infrared spectrophotometer*, FTIR) su vrlo selektivni kvalitativni detektori koji mogu izravno identificirati komponente uzorka (5)(15).

#### Detektor toplinske vodljivosti

Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD) (slika 1.11) je univerzalan detektor koji može otkriti sve spojeve koji prođu kroz kolonu plinskog kromatografa. Sastoji se od TCD jedinice s dva ulaza plina nositelja. Eluat iz kolone protječe kroz jedan ulaz, a drugi ulaz je referentni te je povezan s izvorom čistog plina nositelja.



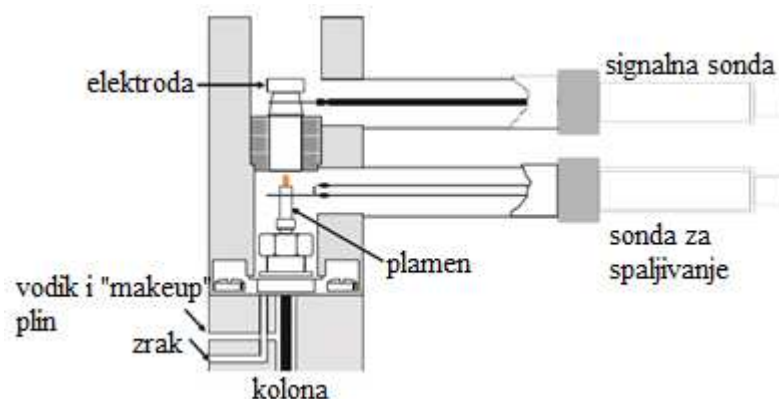
Unutar TCD jedinice nalazi se most koji je okružen s četiri niti. Eluat s kolone prolazi preko dvije niti, a s referentne strane preko niti prolazi čisti plin nositelj. Kad čisti plin nositelj prolazi kroz obje strane, otpor je jednak i nema signala. Međutim, kad spojevi s različitom toplinskom vodljivošću eluiraju i prolaze kroz niti na strani uzorka, dolazi do promjene u brzini provođenja topline, te posljedično do promjene otpora i temperature detektora. Pritom dolazi do odziva signala koji je proporcionalan razlici toplinske vodljivosti između analita i plina nositelja te količini analita. Tijekom analize ne dolazi do destrukcije analita te se on može proslijediti na drugi detektor (11).



Slika 1.11. Shematski prikaz detektora toplinske vodljivosti (11).

### Plamenoionizacijski detektor

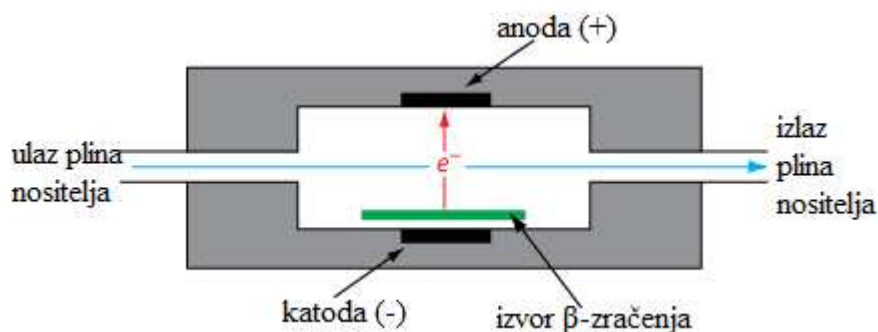
Plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame ionization detector*, FID) (slika 1.12) je jedan od najčešće korištenih detektora kod plinske kromatografije, a detektira ugljik – vodik (C-H) veze. Za održavanje plamena potrebni su mu zrak i vodik u omjeru zrak:vodik 10:1. Analit koji se eluira sagorijeva u struji navedenih plinova stvarajući ionske međuspojeve i elektrone pri čemu nastaje električni signal koji se detektira pomoću sabirne elektrode. Elektroni nastali pri sagorijevanju uzrokuju struju koja prolazi između vrha plamena i elektrode, a pojačavanjem strujnog toka nastaje signal. FID ima široko područje linearnog odziva od oko 7 redova veličine (11).



Slika 1.12. Shematski prikaz plamenoionizacijskog detektora (11).

### Detektor apsorpcije elektrona

Detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron capture detector*, ECD) (slika 1.13) ima vrlo nisku granicu detekcije za elektrofilne analite. Sadrži radioaktivnu foliju, obično  $^{63}\text{Ni}$ , koja emitira  $\beta$ -čestice i koristi se za ionizaciju eluata. Kad na detektor dolazi samo plin nositelj, elektroni migriraju do anode i stvara se stalna struja. U trenutku kad eluira spoj koji može uhvatiti elektrone, struja se smanjuje jer se nastali negativni ioni kreću sporije od elektrona. Izmjereni signal predstavlja gubitak električne struje. Nedostatak ECD-a je uzak raspon linearnog odziva ( $10^3 - 10^4$ ) te ograničena vrsta uzoraka pogodnih za detekciju (11).



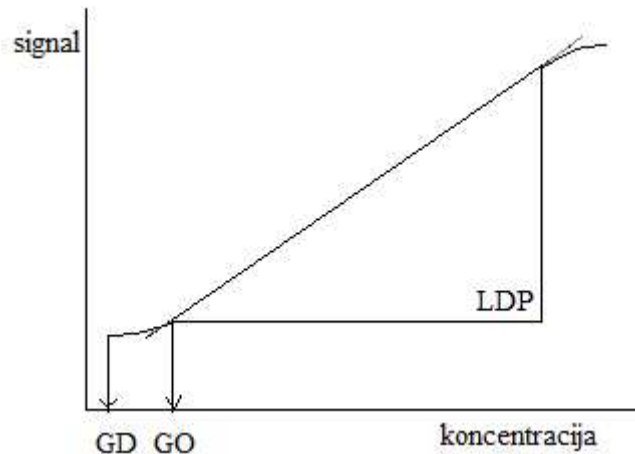
Slika 1.13. Shematski prikaz detektora apsorpcije elektrona (17).

### 1.4. Vrednovanje analitičke metode

Vrednovanje analitičke metode je proces prikupljanja i dokumentiranja podataka kojima se potvrđuje da je navedena analitička metoda prikladna za svoju namjeravanju primjenu (18). Kao najvažniji parametri vrednovanja se navode točnost, preciznost, specifičnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearno dinamičko područje te robusnost. Ovisno o metodi, nije uvijek potrebno ispitati sve parametre (19).

### 1.4.1. Linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje, LDP, je područje u kojem signal raste linearno s koncentracijom. U kromatografiji se grafički prikazuje pravcem umjeravanja ovisnosti površine ispod kromatografske krivulje o koncentraciji analita (20).



Slika 1.14. Prikaz linearnog dinamičkog područja. *GD* predstavlja granicu dokazivanja; *GO* granicu određivanja; *LDP* linearno dinamičko područje.

### 1.4.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *Limit of quantitation*, LOQ) su ključni parametri kojima se opisuje učinkovitost analitičke metode pri ispitivanju analita niskih koncentracija (21). Granica dokazivanja je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti primijenjenom metodom. Granica određivanja je najmanja koncentracija analita koja se može odrediti s prihvatljivom preciznošću i točnošću primjenom određene metode (22).

U uzorku mora postojati dovoljna koncentracija analita da nastane analitički signal koji se pouzdano može razlikovati od analitičkog šuma (22).

Za jedan od prihvaćenih i najčešće korištenih modela računanja granice dokazivanja i granice određivanja koristi se krivulja umjeravanja i standardno odstupanje. Stoga se LOD i LOQ mogu izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

gdje  $S$  predstavlja nagib krivulje umjeravanja, a  $\sigma$  standardno odstupanje koja može biti izražena kao standardno odstupanje bazne linije, rezidualna standardno odstupanje pravca regresije, standardno odstupanje  $y$ -odsječka pravca regresije ili  $S_{y/x}$  (standardna pogreška procjene) (19)(22).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

- Razvoj i optimizacija metode određivanja odabranih izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata, 2-feniletil-izotiocijanata i izopropil-izotiocijanata, plinskom kromatografijom.
- Optimizacija brzine porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona.
- Određivanje linearnog dinamičkog područja, jednadžbe regresijskog pravca, koeficijenta linearne regresije i računanje granice dokazivanja i granice određivanja.
- Metodu, razvijenu na standardima odabranih izotiocijanata, primijeniti na određivanje analita u realnim uzorcima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

U istraživanju je korištena tehnika plinske kromatografije za analizu odabranih izotiocijanata.

### 3.1. Priprema standardnih otopina izotiocijanata

Za sve standardne otopine su prvo pripravljene otopine masene koncentracije 10,00 mg mL<sup>-1</sup> dodavanjem odvagane mase navedenog standarda i izračunatog volumena diklormetana kao otapala, kako je prikazano u tablici 3.1. Iz početne otopine su daljnjim razrjeđivanjem dobivene otopine različitih masenih koncentracija, prikazanih u tablici 3.2., za izradu krivulje umjeravanja. Za pripremu standardanih otopina alil-izotiocijanata je korišten W203408-SAMPLE-K tvrtke Sigma-Aldrich, za benzil-izotiocijanat je korišten 252492-5G tvrtke Sigma-Aldrich, 2-feniletil-izotiocijanat W401404-SAMPLE-K tvrtke Sigma-Aldrich, a za pripremu izopropil-izotiocijanata je korišten A11641.06 tvrtke Alfa Aesar (slika 3.1.).

Tablica 3.1. Prikaz pripreme početne standardne otopine odabranih izotiocijanata masene koncentracije 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

<b>Izotiocijanat</b>	<b>Masa izotiocijanata (mg)</b>	<b>Volumen diklormetana (mL)</b>
<b>Alil-izotiocijanat</b>	11,3	1,130
<b>Benzil-izotiocijanat</b>	18,6	1,860
<b>2-feniletil-izotiocijanat</b>	17,8	1,780
<b>Izopropil-izotiocijanat</b>	11,0	1,100

Tablica 3.2. Prikaz pripreme standardnih otopina odabranih izotiocijanata masenih koncentracija od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.  $\gamma_1$  (izotiocijanata) = 10,00 mg mL<sup>-1</sup>;  $\gamma_2$  (izotiocijanata) = 0,10 mg mL<sup>-1</sup>.

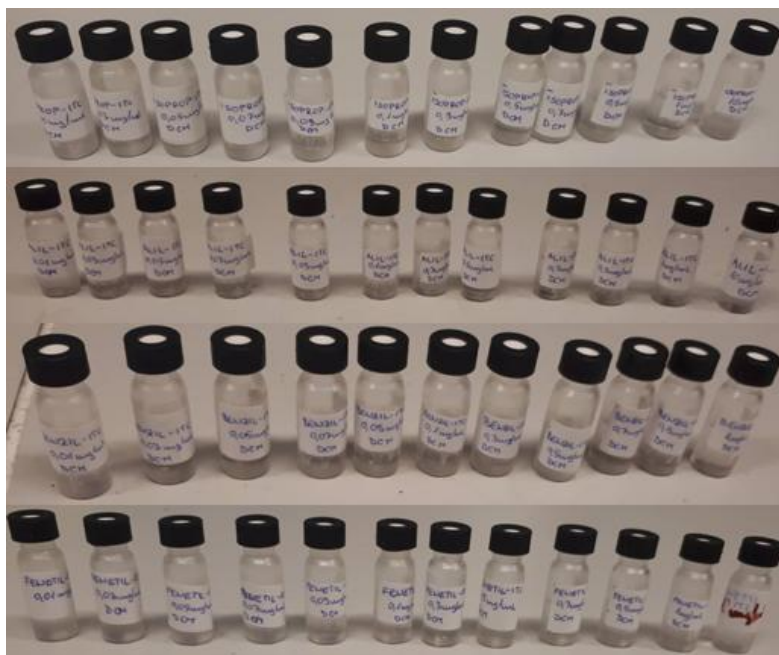
<b>Masena koncentracija (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volumen <math>\gamma_1</math> (mL)</b>	<b>Volumen diklormetana (mL)</b>	<b>Ukupni volumen (mL)</b>
10,00	1,000 $\gamma_1$	0,000	1,000
1,00	0,100 $\gamma_1$	0,900	1,000



0,90	0,090 $\gamma_1$	0,910	1,000
0,70	0,070 $\gamma_1$	0,930	1,000
0,50	0,050 $\gamma_1$	0,950	1,000
0,30	0,030 $\gamma_1$	0,970	1,000
0,10	0,045 $\gamma_1$	4,455	4,500
0,09	0,900 $\gamma_2$	0,100	1,000
0,07	0,700 $\gamma_2$	0,300	1,000
0,05	0,500 $\gamma_2$	0,500	1,000
0,03	0,300 $\gamma_2$	0,700	1,000
0,01	0,100 $\gamma_2$	0,900	1,000



Slika 3.1. Prikaz Alfa Aesar izopropil-izotiocijanata i Sigma-Aldrich benzil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata korištenih za pripremu standardnih otopina navedenih izotiocijanata.



Slika 3.2. Prikaz pripremljenih standardnih otopina izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata.

### 3.2. Priprema realnih uzoraka

Kao realni uzorak korišten je benzil-izotiocijanat pomiješan s probavnim enzimima u svrhu simulacije probave, odnosno ispitivanja utjecaja probavnih enzima na koncentraciju benzil-izotiocijanata, pripremljen u svrhu provođenja drugog istraživanja. Razvijena metoda je korištena da bi se odredio preostali benzil-izotiocijanat nakon izlaganja probavnim enzimima.

### 3.3. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- plinski kromatograf: Agilent Technologies 7890A
- generator vodika: Precision Hydrogen 200 cc, peak Scientific
- uzorkivač: automatski uzorkivač Agilent Technologies 7683B
- injektor: *split/splitless* injektor
- kolona: Agilent HP-5 19091J-413
- detektor: FID detektor
- računalo



Slika 3.3. Instrumenti korišteni tijekom istraživanja. S lijeva na desno: računalo, generator vodika, plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem.

### 3.4. Radni uvjeti plinskog kromatografa

Tijekom istraživanja se mijenjala brzina porasta temperature peći u kojoj se nalazi kolona te *split*, dok su ostali radni uvjeti bili nepromijenjeni. U metodi 1, inicijalno razvijenoj za kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena (23), a primijenjenoj za određivanje odabranih izotiocijanata, *split* omjer je bio 1:100, a u metodi 2 1:50.

Tablica 3.3. Prikaz temperaturnog programa peći korištenog u metodi 1 (23).

Početna vrijednost temperature (°C)	Konačna vrijednost temperature (°C)	Brzina porasta temperature (°C min <sup>-1</sup> )	Trajanje (min)
60	60	/	3,00
60	150	7	12,86
150	150	/	1,00
150	246	50	1,92
246	246	/	5,00
			Ukupno: 23,78

Tablica 3.4. Prikaz temperaturnog programa peći korištenog u metodi 2.

Početna vrijednost temperature (°C)	Konačna vrijednost temperature (°C)	Brzina porasta temperature (°C min <sup>-1</sup> )	Trajanje (min)
60	60	/	3,00
60	246	10	18,60
246	246	/	5,00
			Ukupno: 26,60

### 3.5. Plinovi

Kao pokretna faza koristio se helij (čistoće 5,0 – 99,999%, Messer, Omiš). Za održavanje plamena koji sagorijeva analit u detektoru su se koristili sintetski zrak (Messer, Omiš) i vodik dobiven u generatoru vodika. Dušik (čistoće 5,0 – 99,999%, Messer, Omiš) se koristio kao „*make up*“ plin koji služi za ujednačavanje bazne linije. U tablici 3.5. prikazane su brzine protoka korištenih plinova.

Tablica 3.5. Prikaz brzina protoka korištenih plinova.

Plin	Brzina protoka (mL min <sup>-1</sup> )
Helij	1,0
Zrak	400,0
Vodik	30,0
Dušik	25,0

### 3.6. Injektor

Uzorci su injektirani u volumenu od 1 µL automatskim uzorkivačem koji ima volumen šprice od 10 µL. Prije samog injektiranja, injektor se, prema zadanom programu navedenom u tablici 3.6., ispire u otapalu i uzorku koji se ispuštaju u otpad. Potom se injektor kondicionira kako bi se potisnuli mjehurići zraka i zasitile stijenske uzorkom. Nakon svakog injektiranja uzorka, injektor se ispire čistim otapalom kako bi se očistio od zaostalog uzorka.

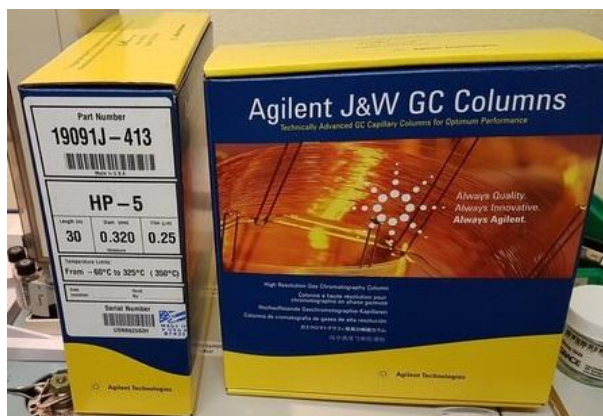
Tablica 3.6. Tablični prikaz programa ispiranja šprice.

	Prije injektiranja	Poslije injektiranja	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Ispiranje otapalom	3	5	8
Ispiranje uzorkom	3	/	3
Kondicioniranje	5	/	/

Zadana temperatura injektora je bila  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uzorci su injektirani u *split* načinu rada u omjeru 50:1. Ukupni protok kroz grijani ulaz je bio  $54\text{ mL min}^{-1}$ . Za čišćenje gumene pregrade se koristio protok od  $3\text{ mL min}^{-1}$ .

### 3.7. Kolona

Korištena je kapilarna kolona Agilent HP-5 19091J-413 (slika 3.4.) unutarnjeg promjera  $0,32\text{ mm}$ , duljine  $30\text{ m}$  i debljine nepokretne faze  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ . Napolarna nepokretna faza sastoji se od mješavine fenilpolisiloksana i metilpolisiloksana u omjeru 5:95. Korištena kolona ima temperaturni raspon rada od  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $325/350\text{ }^{\circ}\text{C}$  (24).



Slika 3.4. Slika korištene kapilarne kolone Agilent HP-5 19091J-413 (25).

### 3.8. Detektor

Korišten je plamenoionizacijski detektor, FID, zagrijan na temperaturu od  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a signal je očitavan frekvencijom od  $50\text{ Hz}$ .

### 3.9. Ostali instrumenti i pribor

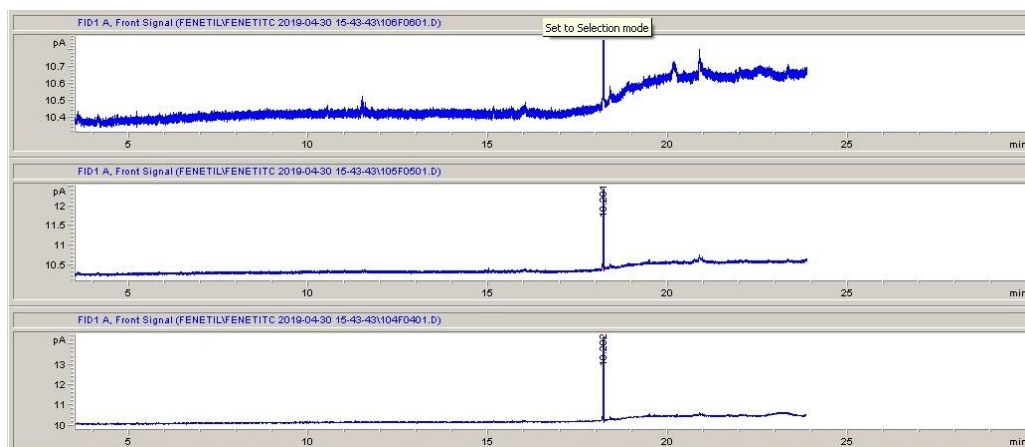
- automatska pipeta  $10 - 100\text{ }\mu\text{L}$  (Rainin, Mettler Toledo)

- automatska pipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (Rainin, Mettler Toledo)
- nastavci za automatske pipete (Rainin, Mettler Toledo)
- bočice za uzorke od 2 mL i 10 mL

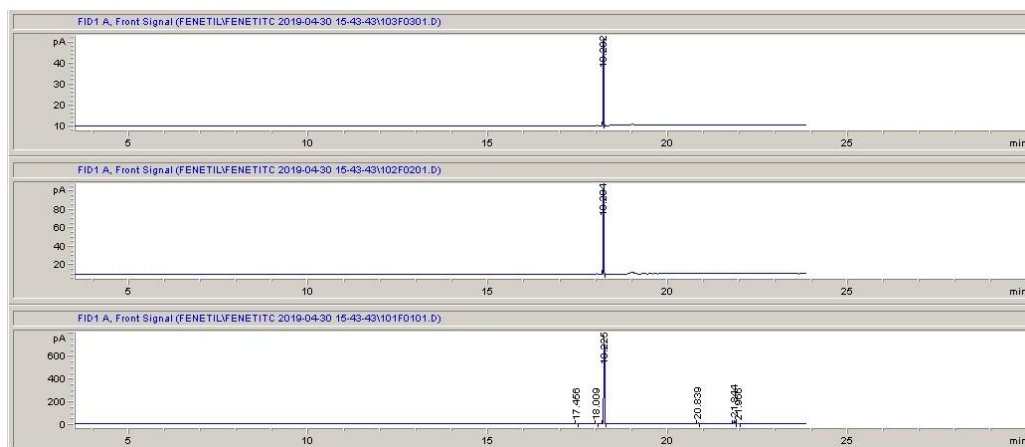
#### **4. RESULTATI**

#### 4.1. Metoda 1

Metoda 1 započinje temperaturom od 60 °C na kojoj se zadržava 3 minute. Nakon toga temperatura raste brzinom 7 °C min<sup>-1</sup> do 150 °C. Na temperaturi od 150 °C se zadržava 1 minutu, te raste brzinom 50 °C min<sup>-1</sup> do 246 °C na kojoj se zadržava 5 minuta (tablica 3.3.). Ova metoda traje 23 minute i 47 sekundi, a *split* omjer je 100:1 (23). Metodom 1 su analizirane standardne otopine 6 koncentracija 2-feniletil-izotiocijanata.



Slika 4.1. Kromatogrami standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup> i 0,10 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.2. Kromatogrami standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 1,00 mg mL<sup>-1</sup> i 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

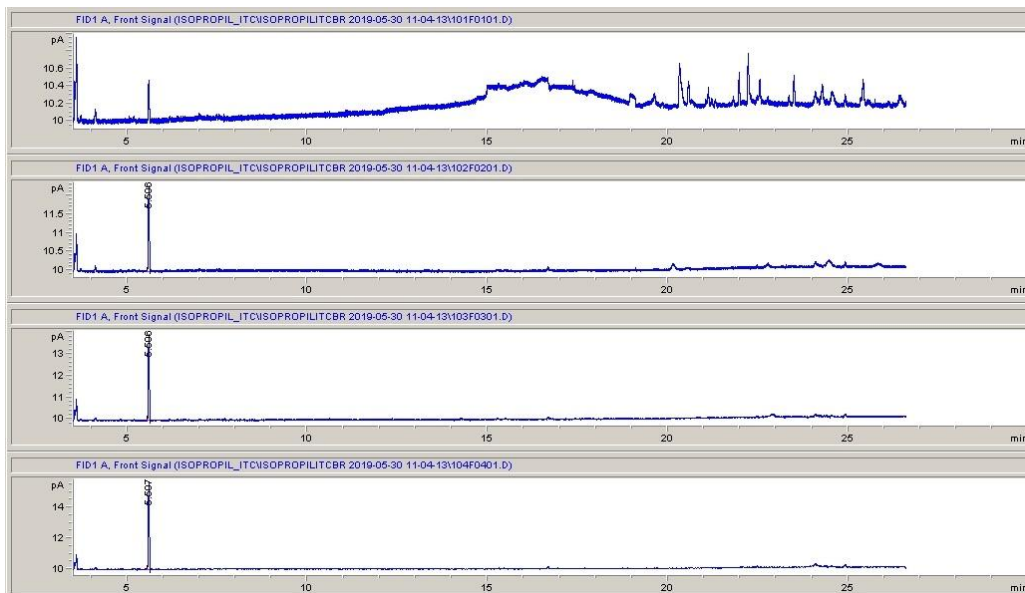
#### 4.2. Metoda 2

Metoda 2 započinje temperaturom od 60 °C na kojoj se zadržava 3 minute. Nakon toga temperatura raste brzinom 10 °C min<sup>-1</sup> do 246 °C na kojoj se zadržava 5 minuta (tablica 3.4.). Ova metoda traje 26 minuta i 36 sekundi, a *split* omjer je 50:1. Metodom 2 su



analizirane standardne otopine 12 koncentracija izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata.

#### 4.2.1. Izopropil-izotiocijanat



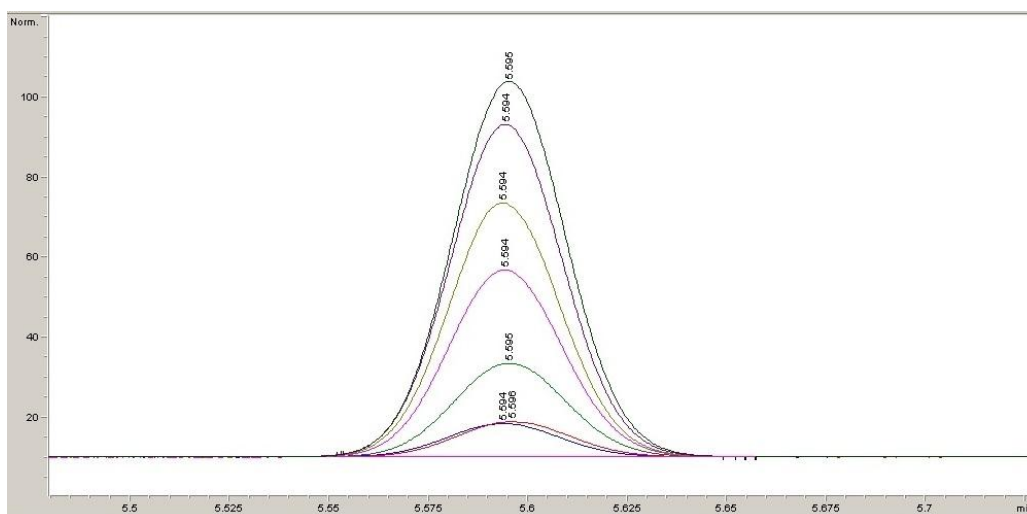
Slika 4.3. Kromatogrami standardnih otopina izopropil-izotiocijanata koncentracija  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ .



Slika 4.4. Kromatogrami standardnih otopina izopropil-izotiocijanata koncentracija  $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ .

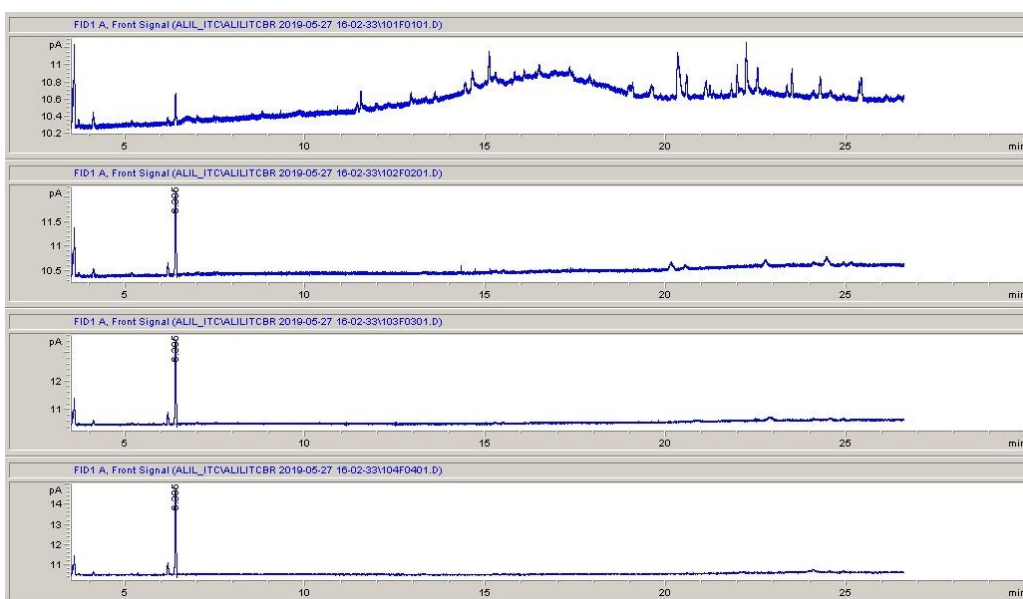


Slika 4.5. Kromatogrami standardnih otopina izopropil-izotiocijanata koncentracija 0,70 mg mL<sup>-1</sup>, 0,90 mg mL<sup>-1</sup>, 1,00 mg mL<sup>-1</sup> i 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.6. Zajednički prikaz kromatograma analiziranih standardnih otopina izopropil-izotiocijanata koncentracija 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 0,70 mg mL<sup>-1</sup>, 0,90 mg mL<sup>-1</sup> i 1,00 mg mL<sup>-1</sup>.

## 4.2.2. Alil-izotiocijanat



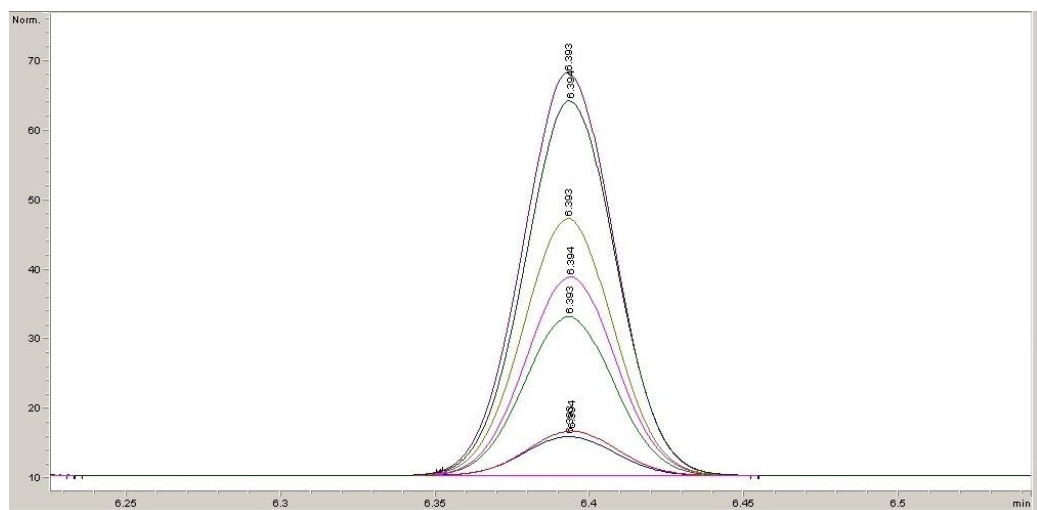
Slika 4.7. Kromatogrami standardnih otopina alil-izotiocijanata koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,03 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup> i 0,07 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.8. Kromatogrami standardnih otopina alil-izotiocijanata koncentracija 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup> i 0,50 mg mL<sup>-1</sup>.

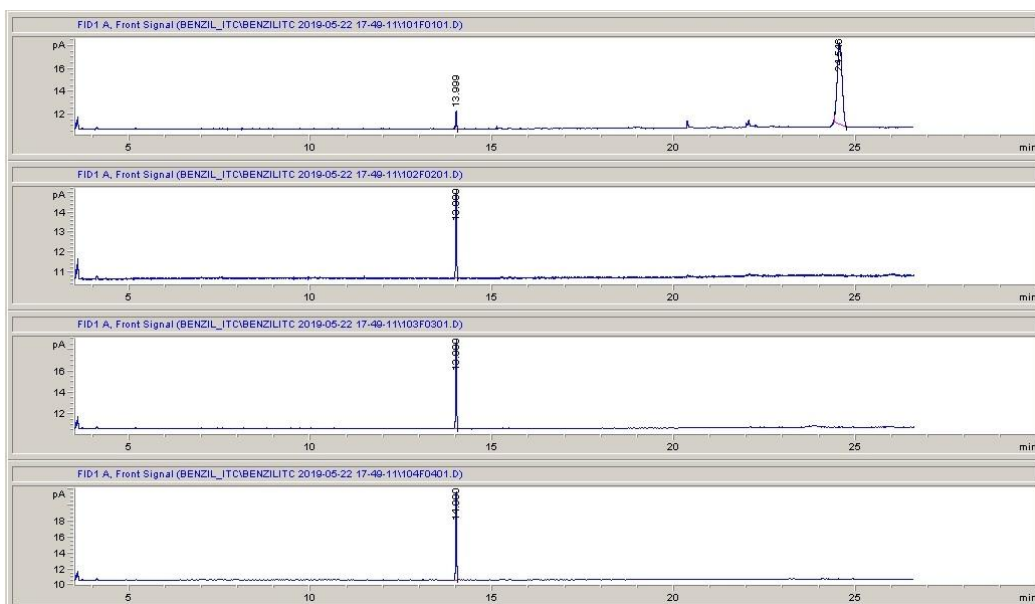


Slika 4.9. Kromatogrami standardnih otopina alil-izotiocijanata koncentracija  $0,70 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $10,00 \text{ mg mL}^{-1}$ .



Slika 4.10. Zajednički prikaz kromatograma analiziranih standardnih otopina alil-izotiocijanata koncentracija  $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,70 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ .

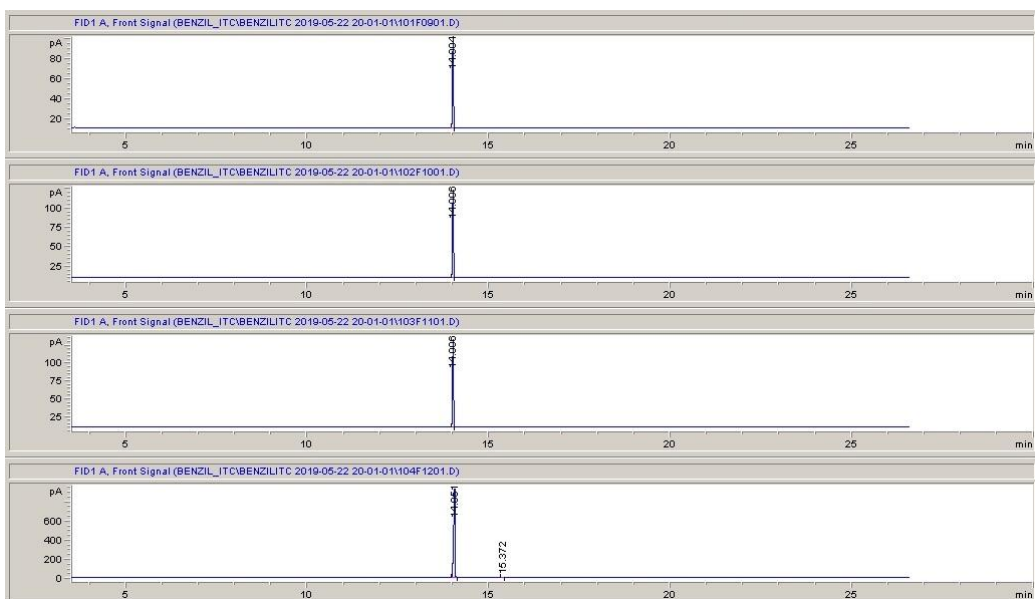
### 4.2.3. Benzil-izotiocijanat



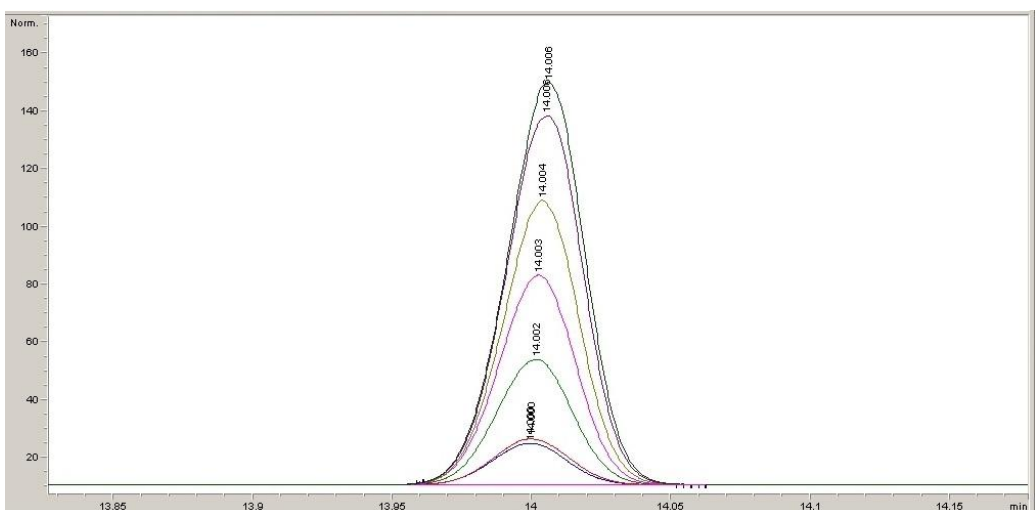
Slika 4.11. Kromatogrami standardnih otopina benzil-izotiocijanata koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,03 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup> i 0,07 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.12. Kromatogrami standardnih otopina benzil-izotiocijanata koncentracija 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup> i 0,50 mg mL<sup>-1</sup>.

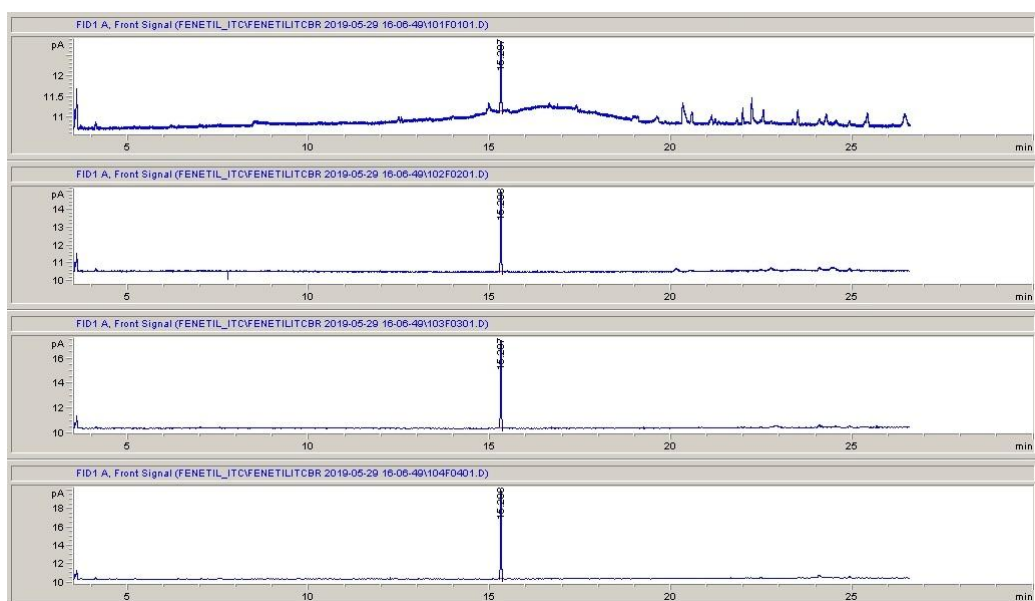


Slika 4.13. Kromatogrami standardnih otopina benzil-izotiocijanata koncentracija  $0,70 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $10,00 \text{ mg mL}^{-1}$ .



Slika 4.14. Zajednički prikaz kromatograma analiziranih standardnih otopina benzil-izotiocijanata koncentracija  $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,70 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### 4.2.4. 2-feniletil-izotiocijanat



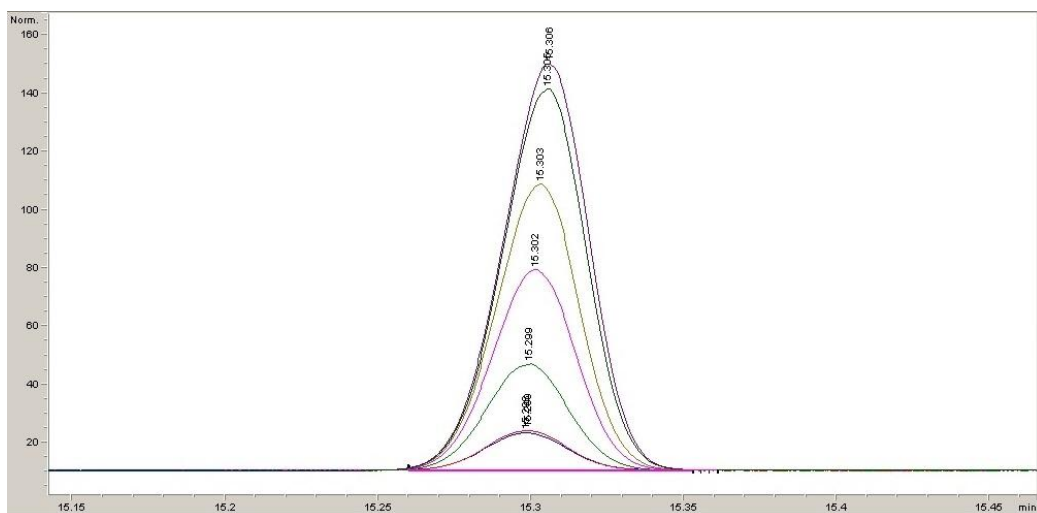
Slika 4.15. Kromatogrami standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,03 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup> i 0,07 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.16. Kromatogrami standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup> i 0,50 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.17. Kromatogrami standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,70 mg mL<sup>-1</sup>, 0,90 mg mL<sup>-1</sup>, 1,00 mg mL<sup>-1</sup> i 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.18. Zajednički prikaz kromatograma analiziranih standardnih otopina 2-feniletil-izotiocijanata koncentracija 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 0,70 mg mL<sup>-1</sup>, 0,90 mg mL<sup>-1</sup> i 1,00 mg mL<sup>-1</sup>.

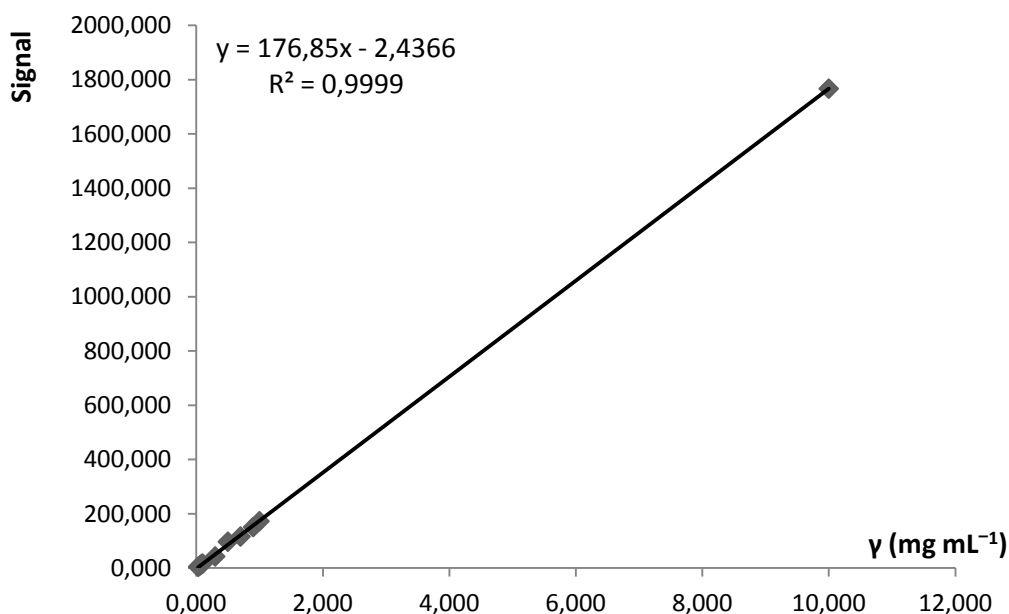


### 4.3. Vrednovanje metode 2

U svrhu vrednovanja metode 2, određeno je linearno dinamičko područje, granica dokazivanja i granica određivanja za svaki od četiri analizirana izotiocijanata.

#### 4.3.1. Vrednovanje metode 2 – izopropil-izotiocijanat

Područje linearnog odziva signala, vidljivo iz krivulje umjeravanja (slika 4.19.), obuhvaća masene koncentracije izopropil-izotiocijanata od 0,03 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.



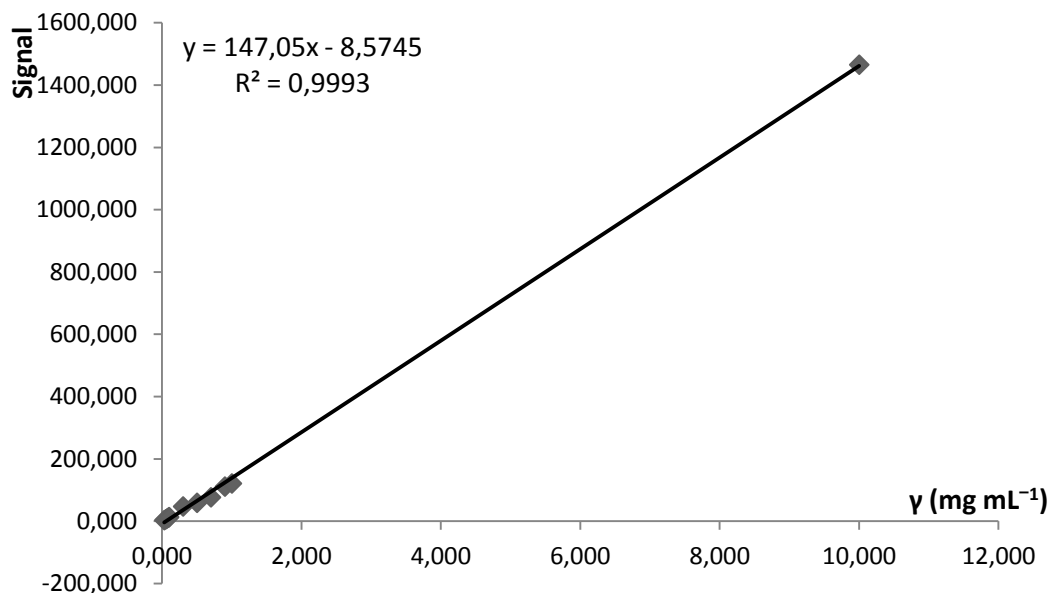
Slika 4.19. Krivulja umjeravanja za određivanje izopropil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,03 mg mL<sup>-1</sup> do 10 mg mL<sup>-1</sup>.

U jednadžbi pravca  $y = 176,85x - 2,4366$ ,  $y$  predstavlja površinu ispod kromatografske krivulje, a  $x$  masenu koncentraciju izopropil-izotiocijanata. Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9999.

Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,066205, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 176,85. Iz navedenih podataka, a prema ranije navedenoj formuli, izračunate su granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00123 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00374 mg mL<sup>-1</sup> što je 10 puta niža koncentracija od određene najniže točke linearnog dinamičkog područja, LDP.

### 4.3.2. Vrednovanje metode 2 – alil-izotiocijanat

Područje linearnog odziva signala, vidljivo iz krivulje umjeravanja (slika 4.20.), obuhvaća masene koncentracije alil-izotiocijanata od 0,03 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.



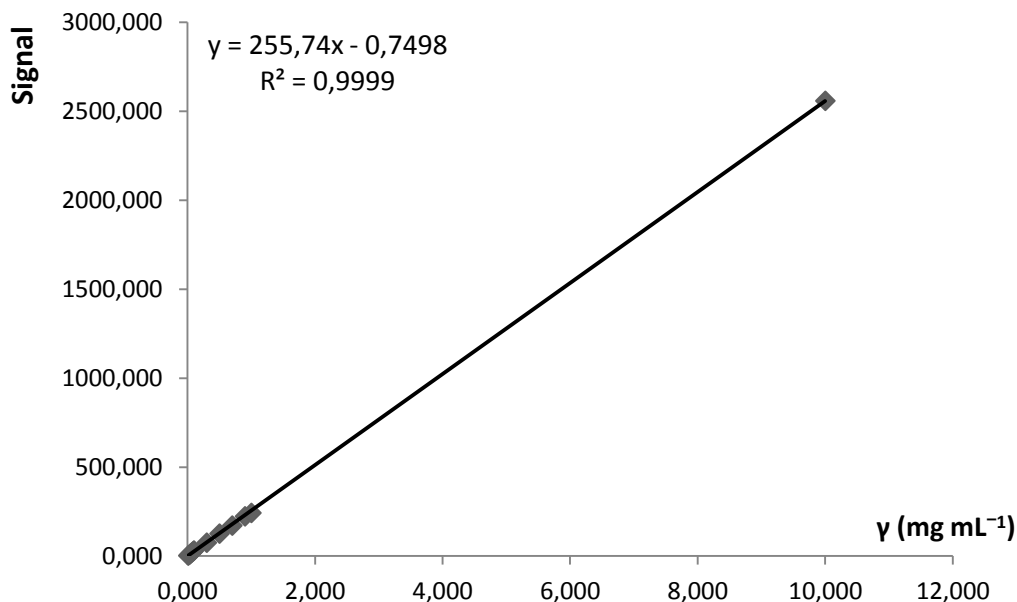
Slika 4.20. Krivulja umjeravanja za određivanje alil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,03 mg mL<sup>-1</sup> do 10 mg mL<sup>-1</sup>.

U jednadžbi pravca  $y = 147,05x - 8,5745$ ,  $y$  predstavlja površinu ispod kromatografske krivulje, a  $x$  masenu koncentraciju alil-izotiocijanata. Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9993.

Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,076313, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 147,05. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00171 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00519 mg mL<sup>-1</sup>.

### 4.3.3. Vrednovanje metode 2 – benzil-izotiocijanat

Područje linearnog odziva signala, vidljivo iz krivulje umjeravanja (slika 4.21.), obuhvaća masene koncentracije benzil-izotiocijanata od  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $10,00 \text{ mg mL}^{-1}$ .



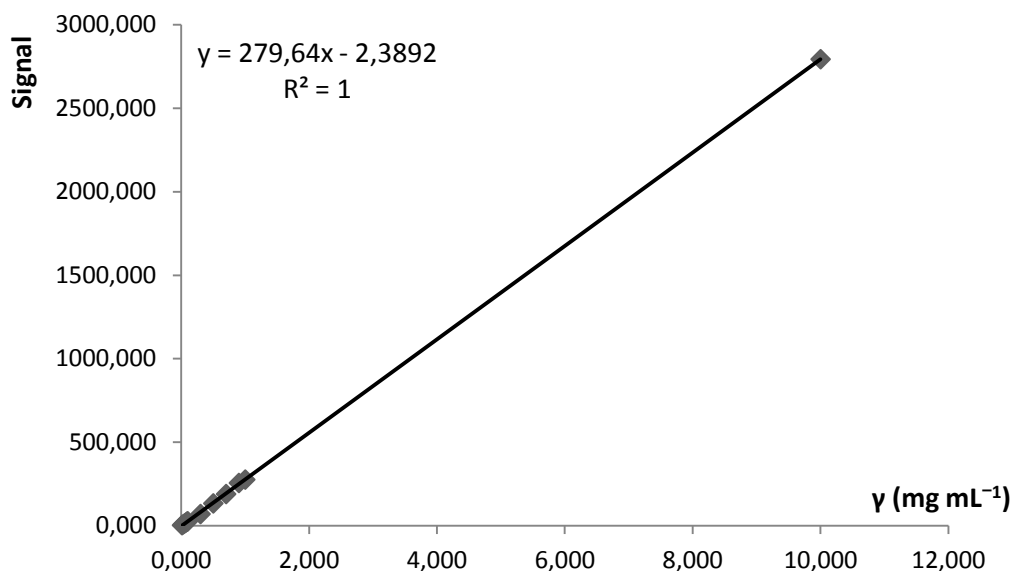
Slika 4.21. Krivulja umjeravanja za određivanje benzil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ .

U jednadžbi pravca  $y = 255,74x - 0,7498$ ,  $y$  predstavlja površinu ispod kromatografske krivulje, a  $x$  masenu koncentraciju alil-izotiocijanata. Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9999.

Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,082203, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 255,74. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi  $0,00106 \text{ mg mL}^{-1}$ , a granica određivanja, LOQ, je  $0,00321 \text{ mg mL}^{-1}$  što je 3 puta niža koncentracija od određene najniže točke linearnog dinamičkog područja, LDP.

#### 4.3.4. Vrednovanje metode 2 – 2-fenilet-il-izotiocijanat

Područje linearnog odziva signala, vidljivo iz krivulje umjeravanja (slika 4.22.), obuhvaća masene koncentracije 2-fenilet-il-izotiocijanata od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.



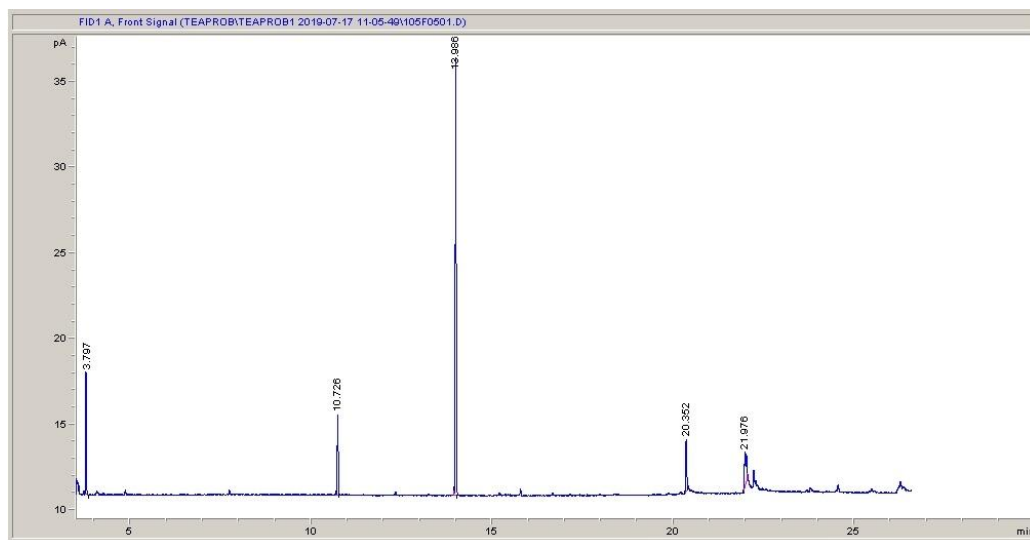
Slika 4.22. Krivulja umjeravanja za određivanje 2-fenilet-il-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 10 mg mL<sup>-1</sup>.

U jednadžbi pravca  $y = 279,64x - 2,3892$ ,  $y$  predstavlja površinu ispod kromatografske krivulje, a  $x$  masenu koncentraciju 2-fenilet-il-izotiocijanata. Koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 1.

Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,157098, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 279,64. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00185 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00562 mg mL<sup>-1</sup> što je 2 puta niža koncentracija od određene najniže točke linearnog dinamičkog područja, LDP.

#### 4.4. Analiza realnog uzorka

Da bi se ispitala primjenjivost metode 2, analiziran je uzorak benzil-izotiocijanata pomiješan s probavnim enzimima u svrhu simulacije probave.



Slika 4.23. Kromatogram uzorka benzil-izotiocijanata pomiješanog s probavnim enzimima.

Iz kromatograma (slika 4.23.) je vidljiv pik u vremenu 13,986 min što ukazuje na prisutnost benzil-izotiocijanata u uzorku.



Cilj rada je bio razviti i optimizirati metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje četiri odabrana izotiocijanata, izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata, primjenom plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor, FID.

Plinska kromatografija je najčešće korištena tehnika za određivanje izotiocijanata. Primjenom plinske kromatografije se mogu postići granice dokazivanja izotiocijanata reda veličine  $10^{-6}$  ( $\mu\text{g}$ ) čime se ne mogu kvantificirati niske koncentracije izotiocijanata kakve su uglavnom prisutne u krvi ili urinu. Usprkos ovom ograničenju, plinska kromatografija se i dalje koristi za analizu uzoraka s višim koncentracijama izotiocijanata kao što su uzorci biljnog podrijetla (26).

Metoda 1, primarno razvijena za određivanje limonena, primijenjena je za određivanje 2-feniletil-izotiocijanata kako bi se utvrdila njena primjenjivost na izotiocijanatima. Početna temperatura je bila  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  te je zadržana 3 minute. Nakon toga temperatura raste brzinom od  $7\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na temperaturi od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  se zadržava 1 minutu te raste brzinom od  $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do konačne temperature od  $246\text{ }^{\circ}\text{C}$  na kojoj se zadržava 5 minuta (tablica 3.3.). Ova metoda traje 23 minute i 47 sekundi, a *split* omjer je bio 100:1 (23). Ovom metodom su analizirane standardne otopine 2-feniletil-izotiocijanata masenih koncentracija  $0,01\text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,05\text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,10\text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,50\text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1,00\text{ mg mL}^{-1}$  i  $10,00\text{ mg mL}^{-1}$ . Iz dobivenih kromatograma izračunato je srednje vrijeme zadržavanja 2-feniletil-izotiocijanata koje iznosi 18,202 min.

Promjenom temperaturnog programa i *split* omjera, razvijena je metoda 2. Jednako kao i metoda 1, započinje temperaturom od  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  na kojoj se zadržava 3 minute. Zatim porastom temperature brzinom od  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  dolazi se do iste konačne temperature od  $246^{\circ}\text{C}$  na kojoj se također zadržava 5 minuta (tablica 3.4.). Nova metoda traje 26 minuta i 36 sekundi. S obzirom da se najbolje izdvajanje analita postiže pri porastu temperature brzinom  $4 - 20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , promijenjen je temperaturni program te je brzina porasta temperature konstantna i iznosi  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (11). S ciljem razvoja metode koja će postizati bolje razdvajanje komponenata u realnim uzrocima i biti osjetljiva na što niže koncentracije analita, postavljen je ovakav ujednačeniji temperaturni program usprkos tome što traje 2 minute i 49 sekundi duže u odnosu na metodu 1 te zahtijeva zanemarivo veću potrošnju plinova.

Iako se većim *split* omjerom postiže bolja zaštita kolone, u svrhu postizanja niže granice dokazivanja je smanjen i iznosi 50:1 (27).

Metoda 2 je razvijena i primjenjiva za četiri izotiocijanata: izopropil-izotiocijanat, alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat i 2-feniletil-izotiocijanat. Za svaki od navedenih je pripremljeno i analizirano 12 standardnih otopina masenih koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,03 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, 0,07 mg mL<sup>-1</sup>, 0,09 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 0,70 mg mL<sup>-1</sup>, 0,90 mg mL<sup>-1</sup>, 1,00 mg mL<sup>-1</sup> i 10,00 mg mL<sup>-1</sup>. Na ovaj način se obuhvaća široko područje koncentracija od tri reda veličine, od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>. Analizom standardnih otopina vidljiva su vremena zadržavanja pojedinih izotiocijanata: izopropil-izotiocijanat ima srednje vrijeme zadržavanja 5,505 min, alil-izotiocijanat 6,304 min, benzil-izotiocijanat 14,002 min, a 2-feniletil-izotiocijanat 15,300 min.

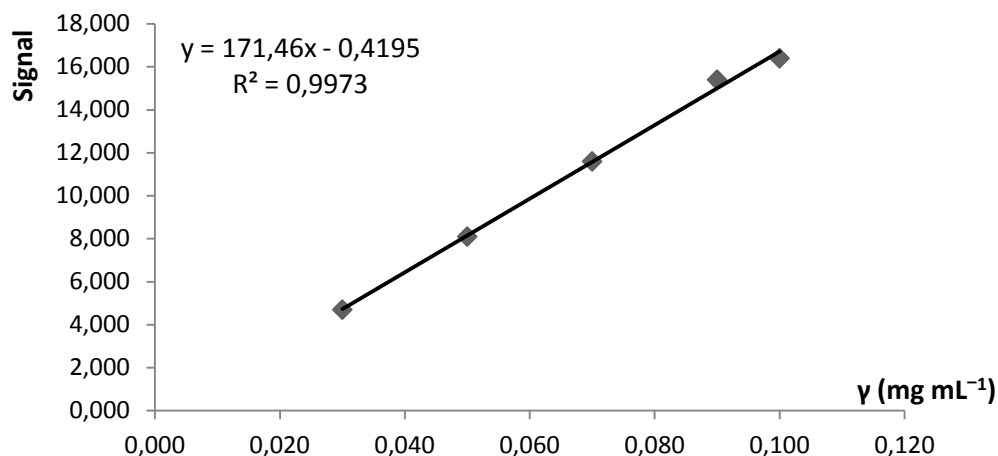
Usporedbom vremena zadržavanja 2-feniletil-izotiocijanata u metodi 1 i metodi 2, vidljivo je da je ono kraće u metodi 2 zbog bržeg temperaturnog porasta u prvom dijelu metode kada izlaze svi analizirani izotiocijanati. Analizom realnog uzorka benzil-izotiocijanata se može pretpostaviti da ovakav brži temperaturni porast ne ometa odjeljivanje komponenata uzorka.

Kromatogrami dobiveni analizom uzoraka su bili potrebni za očitavanje intenziteta signala, odnosno površine ispod kromatografske krivulje, pri pripadajućim koncentracijama analita. Dobiveni podaci su korišteni za izradu krivulje umjeravanja, te računanje granice dokazivanja, LOD, i granice određivanja, LOQ, za svaki analizirani izotiocijanat (slike 4.19., 4.20., 4.21. i 4.22.).

S obzirom da ranije prikazane krivulje umjeravanja obuhvaćaju široki raspon koncentracija, s ciljem smanjenja pogrešaka pri provedbi metode, svaka od njih je podijeljena na dvije krivulje umjeravanja. Jedna krivulja umjeravanja obuhvaća niže koncentracije odabranih izotiocijanata, od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, a druga obuhvaća masene koncentracije od 0,10 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>. Pri radu ovom metodom preporučuje se koristiti krivulje umjeravanja za niži raspon koncentracija te pripadajuće jednadžbe pravca.

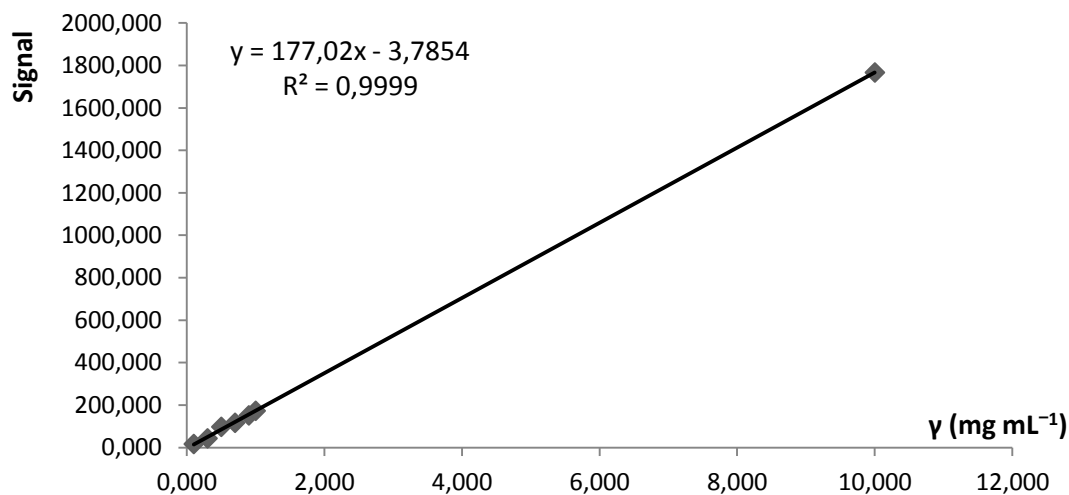


### Izopropil-izotiocijanat



Slika 5.1. Krivulja umjeravanja za određivanje izopropil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,03 mg mL<sup>-1</sup> do 0,10 mg mL<sup>-1</sup>.

Jednadžba pravca za određivanje izopropil-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,03 mg mL<sup>-1</sup> – 0,10 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 171,46x - 0,4195$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9973 (slika 5.1.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,066205, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 171,46. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00127 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00386 mg mL<sup>-1</sup>.

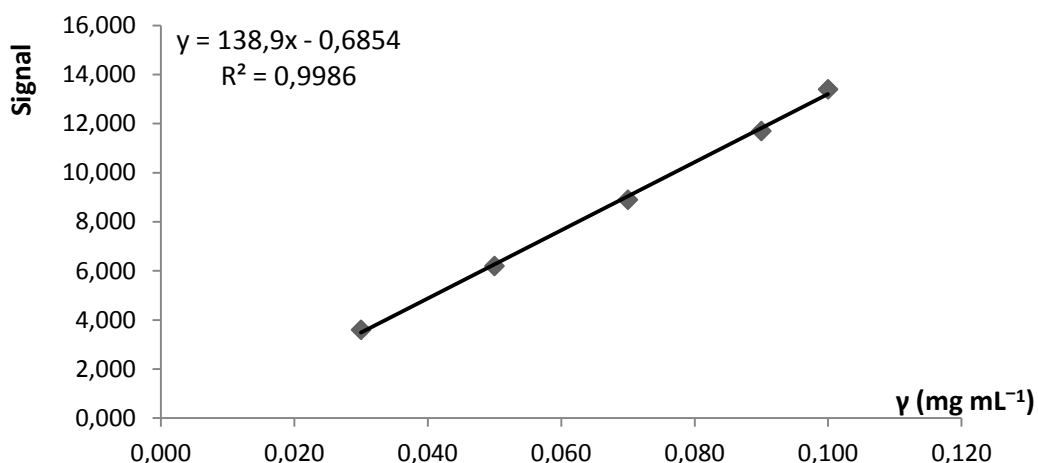


Slika 5.2. Krivulja umjeravanja za određivanje izopropil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,10 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

Jednadžba pravca za određivanje izopropil-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,10 mg mL<sup>-1</sup> – 10,00 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 177,02x - 3,7854$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je

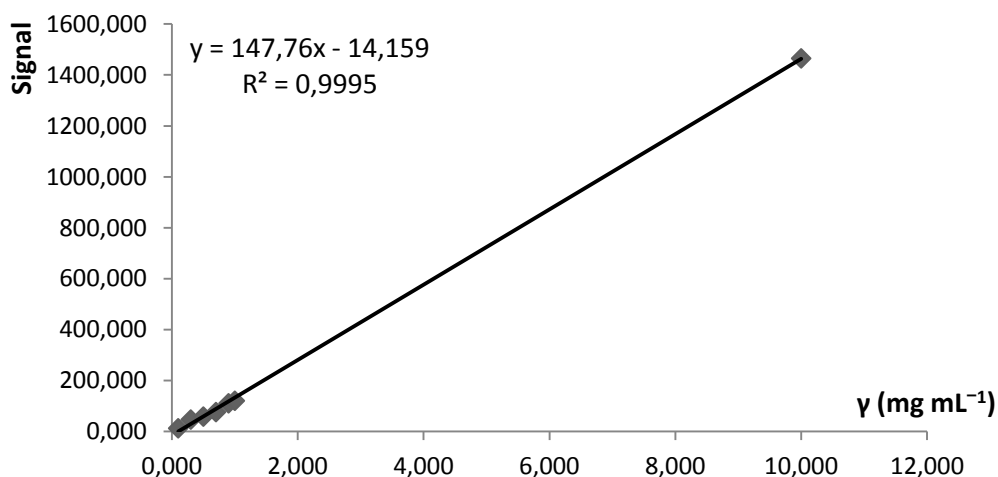
0,9999 (slika 5.2.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,066205, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 177,02. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi  $0,00123 \text{ mg mL}^{-1}$ , a granica određivanja, LOQ, je  $0,00374 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### Alil-izotiocijanat



Slika 5.3. Krivulja umjeravanja za određivanje alil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ .

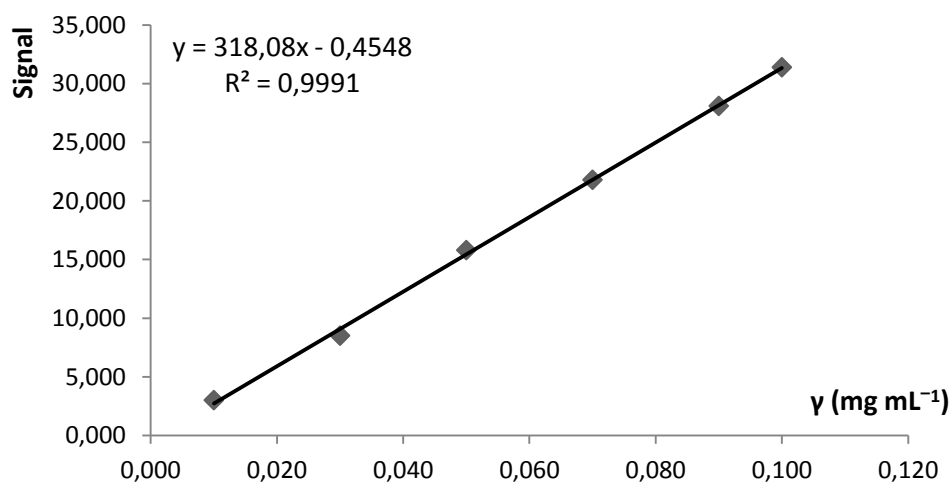
Jednadžba pravca za određivanje alil-izotiocijanata u rasponu koncentracija  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  –  $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$  je  $y = 138,90x - 0,6854$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9986 (slika 5.3.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,076313, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 138,90. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi  $0,00181 \text{ mg mL}^{-1}$ , a granica određivanja, LOQ, je  $0,00549 \text{ mg mL}^{-1}$ .



Slika 5.4. Krivulja umjeravanja za određivanje alil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,10 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

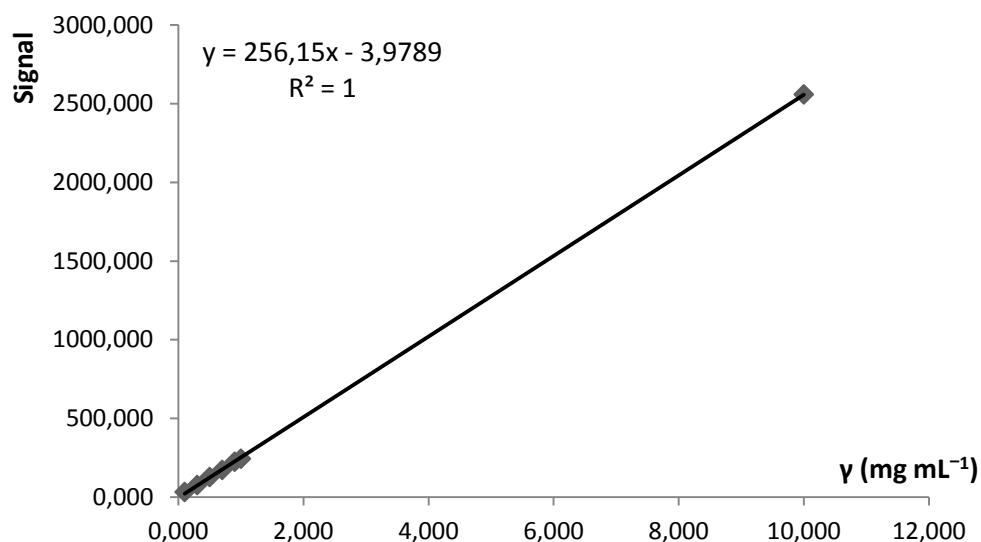
Jednadžba pravca za određivanje alil-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,10 mg mL<sup>-1</sup> – 10,00 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 147,76 x - 14,159$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9995 (slika 5.4.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,076313, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 147,76. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00170 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00516 mg mL<sup>-1</sup>.

### Benzil-izotiocijanat



Slika 5.5. Krivulja umjeravanja za određivanje benzil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 0,10 mg mL<sup>-1</sup>.

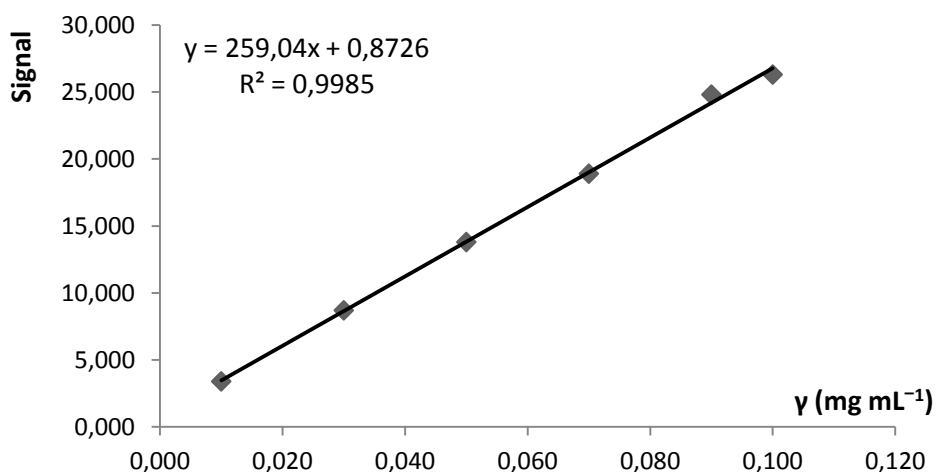
Jednadžba pravca za određivanje benzil-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup> – 0,10 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 318,08x - 0,4548$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9991 (slika 5.5.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,082203, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 318,08. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00085 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00258 mg mL<sup>-1</sup>.



Slika 5.6. Krivulja umjeravanja za određivanje benzil-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,10 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

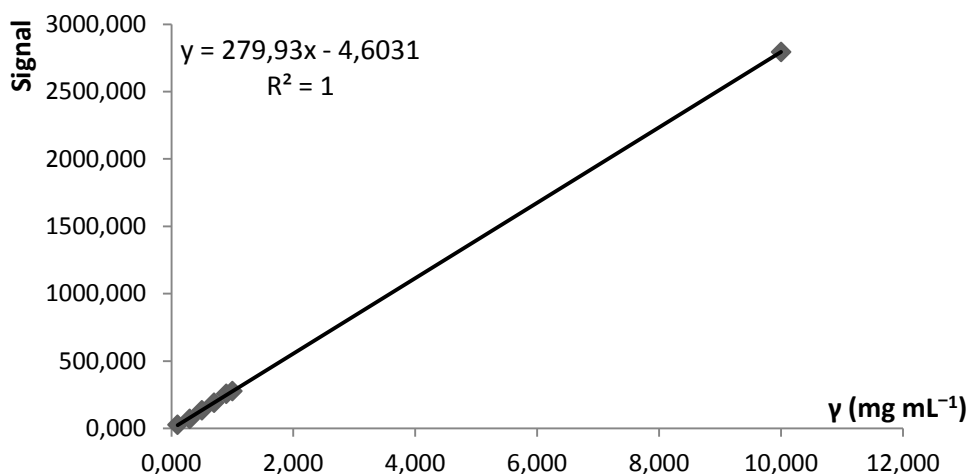
Jednadžba pravca za određivanje benzil-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,10 mg mL<sup>-1</sup> – 10,00 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 256,15x - 3,9789$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 1 (slika 5.6.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,082203, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 256,15. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00106 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00321 mg mL<sup>-1</sup>.

## 2-fenilet-il-izotiocijanat



Slika 5.7. Krivulja umjeravanja za određivanje 2-fenilet-il-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,01 mg mL<sup>-1</sup> do 0,10 mg mL<sup>-1</sup>.

Jednadžba pravca za određivanje 2-fenilet-il-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,01 mg mL<sup>-1</sup> – 0,10 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 259,04x - 0,9985$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ ) je 0,9985 (slika 5.7.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,157098, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 259,04. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00200 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00606 mg mL<sup>-1</sup>.



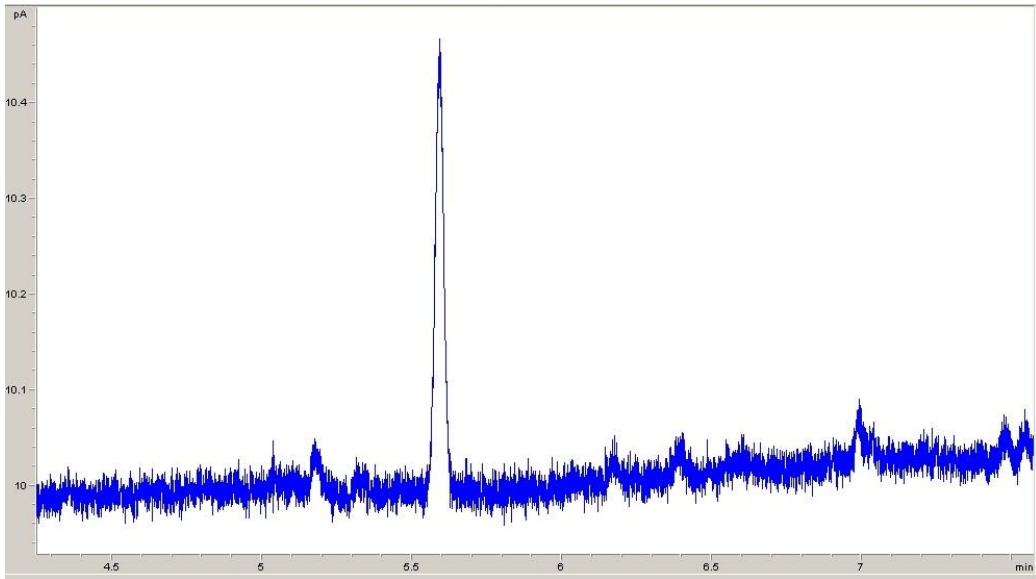
Slika 5.8. Krivulja umjeravanja za određivanje 2-fenilet-il-izotiocijanata u rasponu masenih koncentracija od 0,10 mg mL<sup>-1</sup> do 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

Jednadžba pravca za određivanje 2-fenilet-il-izotiocijanata u rasponu koncentracija 0,10 mg mL<sup>-1</sup> – 10,00 mg mL<sup>-1</sup> je  $y = 279,93x - 4,6031$ , a koeficijent linearne regresije ( $R^2$ )

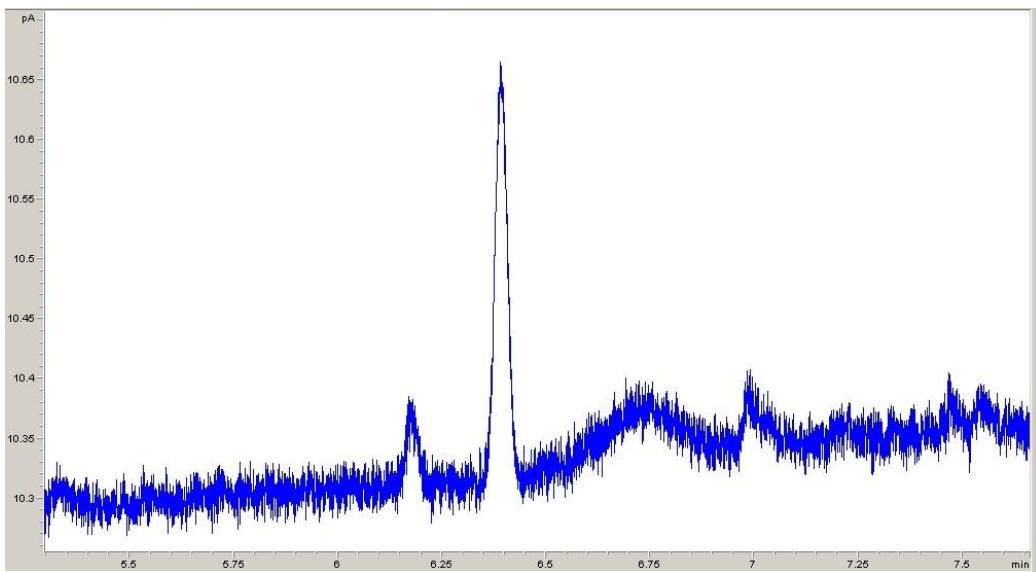
je 1 (slika 5.8.). Standardno odstupanje bazne linije,  $\sigma$ , iznosi 0,157098, a nagib krivulje umjeravanja,  $S$ , je 279,93. Iz navedenih podataka su izračunate granica dokazivanja i granica određivanja. Granica dokazivanja, LOD, iznosi 0,00185 mg mL<sup>-1</sup>, a granica određivanja, LOQ, je 0,00561 mg mL<sup>-1</sup>.

Iz dobivenih kromatograma može se uočiti da su benzil-izotiocijanat i 2-fenilet-ilizotiocijanat, spojevi s aromatskim prstenom, uspješno kvantificirani, odnosno kromatografske krivulje su integrirane pri svim analiziranim koncentracijama, što nije slučaj kod preostala dva spoja. Izopropil-izotiocijanat i alil-izotiocijanat, spojevi jednostavnije strukture su kvantificirani u 11 analiziranih uzoraka, dok pri koncentraciji 0,01 mg mL<sup>-1</sup> to nije bilo moguće. Ovo se može pripisati razlici u njihovim strukturama i svojstvu plamenoionizacijskog detektora, FID, da teže prepoznaje spojeve s heteroatomima nego ugljikovodike. S obzirom da izotiocijanati u svojoj strukturi imaju dva heteroatoma, atom dušika i sumpora, smanjuje im se takozvani „*effective carbon number*“ (ECN), odnosno pri izgaranju stvaraju ne-ugljikovodične spojeve koji imaju manji doprinos stvaranju signala. Kako izopropil-izotiocijanat i alil-izotiocijanat, uz izotiocijanatnu skupinu, imaju samo tri C-atoma, ne mogu biti kvantificirani pri najnižim koncentracijama, za razliku od spojeva s aromatskim prstenom koji imaju veći ECN te su uspješno kvantificirani (28).

Na slikama 5.9. i 5.10. su prikazani kromatogrami izopropil-izotiocijanata i alil-izotiocijanata u koncentraciji od 0,01 mg mL<sup>-1</sup>. S obzirom da omjer signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*, S/N) iznosi 8:1 za izopropil-izotiocijanat, a 6:1 za alil-izotiocijanat, oni nisu uspješno kvantificirani jer je kriterij za granicu određivanja S/N omjer 10:1 (22). Kako su računski dobivene granice određivanja niže od 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, a imajući na umu ograničenja plamenoionizacijskog detektora, može se pretpostaviti da bi se primjenom detektora osjetljivijeg prema heteroatomima i eksperimentalno mogli potvrditi izračunati LOQ.



Slika 5.9. Kromatogram standardne otopine izopropil-izotiocijanata masene koncentracije  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ .



Slika 5.10. Kromatogram standardne otopine alil-izotiocijanata masene koncentracije  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Metoda razvijena na standardnim otopinama izotiocijanata je provjerena na realnom uzroku benzil-izotiocijanata pomiješanog s probavnim enzimima. Na kromatogramu (slika 4.23.) je vidljiv dominantan signal u vremenu 13,986 min što odgovara vremenu zadržavanja benzil-izotiocijanata. Na temelju ovog rezultata može se projicirati da je metoda 2 primjenjiva na realnim uzorcima i drugih izotiocijanata obuhvaćenih metodom.

## **6. ZAKLJUČCI**



1. Plinska kromatografija uz plamenoionizacijski detektor je odgovarajuća tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje odabranih izotiocijanata.
2. Razvijenom metodom (metoda 2) se uspješno kvalitativno i kvantitativno mogu odrediti četiri izotiocijanata: izopropil-izotiocijanat, alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat i 2-feniletil-izotiocijanat.
3. Metoda 2 je primjenjiva za područje masenih koncentracija koje obuhvaća tri reda veličine, a krivulja umjeravanja je napravljena na minimalno 11 točaka.
4. Kako bi se smanjile pogreške pri radu, preporučuje se koristiti krivulje umjeravanja napravljene za manji raspon koncentracija od jedan, odnosno dva reda veličine.
5. Smanjenjem *split* omjera se postiže veća osjetljivost za niže koncentracije analita.
6. Povećanjem brzine porasta temperature se skraćuje vrijeme zadržavanja, a ne ometa se odjeljivanje komponenata uzorka.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Higdon J, Drake VJ, Delage B, Ho E. Isothiocyanates. Oregon State University: The Linus Pauling Institute [Internet] 2017. [citirano 8.8.2019.] Dostupno na: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>
2. Chandra K, Ali SS, Ahmad N, Gilani SJ, Ali Khan N. Isothiocyanates: A review. Res J Pharmacogn. 2018;5(2):71-89.
3. Radić N, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. 630-663 p.
4. Chromatographic separation techniques. U: European Pharmacopoeia 5,0. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe; 2005. 69 p.
5. Cserhati T. Chromatography of aroma compounds and fragrances. Berlin: Springer; 2010. 1-16 p.
6. Reach Devices [Internet] [citirano 26.6.2019.] Dostupno na: <http://www.reachdevices.com/SetUpColumn.html>
7. Cerjan Stefanović Š, Drvenkar V, Jurišić B, Medić Šarić M, Petrović M, Šegudović N, et al. Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998. Zagreb: Hinus; 1999.
8. Ahuja S, Dong MW. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. 6th volume. Oxford: Elsevier; 2005. 346-48 p.
9. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC method development. 2nd ed. Danvers: John Wiley & Sons, Inc.; 1997. 1-6 p.
10. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul. 2016;3(2):156-60.
11. Sparkman OD, Penton Z, Kitson F. Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2011. 18-79 p.
12. Eiceman GA. Gas Chromatography: Introduction. U: Meyers RA. Encyclopedia of analytical chemistry: Applications, theory and instrumentation. 15th ed. New York: Wiley; 2001. 11298-7 p.
13. Larson P. Column technology in gas chromatography. U: Meyers RA. Encyclopedia of analytical chemistry: Applications, theory and instrumentation. 15th ed. New York: Wiley; 2001. 11302-46 p.
14. Meadows Instrumentation [Internet] [preuzeto 4.8.2019.] Dostupno na: <https://www.meadowshplc.com/products/gas-chromatography/components-parts/agilent-7683-autosampler>

15. Gas chromatography. U: European Pharmacopoeia 5,0. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe; 2005. 42 p.
16. Delloyd chemistry resources, reagents and instrumentation [Internet] [preuzeto 5.8.2019.] Dostupno na: <http://delloyd.50megs.com/MOBILE/GC.html>
17. ASDL Community [Internet] [preuzeto 18.9.2019.] Dostupno na: <https://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/01/electron-capture-detector/>
18. Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. 3rd volume. London:Academic Press; 2001. 415-43 p.
19. ICH [Internet] ICH Harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedure: Text and methodology Q2(R1) [citirano 18.9.2019.] 2005. Dostupno na: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/analytical-procedure-development-and-revision-of-q2r1-analytical-validation-copy-1.html>
20. Radić N, Kukoč Modun L. Instrumentne metode analize u farmaciji [interna skripta]; 14-5 p.
21. Wenzl T, Headrich J, Schaechtele A, Robouch P, Stroka J. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food. European Union Reference Laboratory; 2016. 9-11 p.
22. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles Young Sci. 2011;2(1):21-5.
23. Kranjčec K. Kvalitativno i kvantitativno određivanje limonena u komercijalnim uzorcima eteričnog ulja plinskom kromatografijom. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, Medicinski fakultet; 2018.
24. Teknolab [Internet] Agilent J&W: GC column and selection guide [citirano 10.8.2019.] Dostupno na: [http://www.teknolab.no/wp-content/uploads/2014/03/JWS\\_GC\\_Column\\_Selection\\_Guide.pdf](http://www.teknolab.no/wp-content/uploads/2014/03/JWS_GC_Column_Selection_Guide.pdf)
25. RM Business Services [Internet] [preuzeto 10.8.2019.] Dostupno na: <https://www.rm-business-services.de/en/Agilent+J-W+HP-5-+19091J-413+GC+Column-+new.htm>
26. Marton MR, Lavric V. A simple method for the quantification of isothiocyanates from mustard. U.P.B. Sci. Bull., Series B, 2013;75(1):63-72.
27. Pontes H, Guedes de Pinho P, Casal S, Carmo H, Santos A, Magalhaes T, et al. GC determination of acetone, acetaldehyde, ethanol and methanol in biological matrices and cell culture. J Chromatogr Sci. 2009;47:272-8.

28. Holm T. Review: Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J Chromatogr A*. 1999;(842):221-7.

## **8. SAŽETAK**

*Cilj istraživanja:* Razvoj i vrednovanje metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata primjenom plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor, FID.

*Materijali i metode:* Pripremljeno je 12 standardnih otopina izopropil-izotiocijanata, alil-izotiocijanata, benzil-izotiocijanata i 2-feniletil-izotiocijanata masenih koncentracija od  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $10,00 \text{ mg mL}^{-1}$  s diklormetanom kao otapalom koje su analizirane plinskom kromatografijom uz plamenoionizacijski detektor (GC-FID). Primijenjene su dvije metode u kojima se mijenjao temperaturni program peći u kojoj je smještena kolona i *split* omjer injektora, dok su ostali parametri bili konstantni. Korištena je kapilarna kolona s nepolarnom nepokretnom fazom. Kao pokretna faza se koristio helij, za sagorijevanje analita u detektoru su se koristili zrak i vodik, a dušik se koristio za ujednačavanje bazne linije.

*Rezultati:* Analizom je uočeno da brži temperaturni porast ne ometa razdvajanje komponenata uzoraka, a smanjenje *split* omjera metodu čini osjetljivijom prema nižim koncentracijama analita. Srednje vrijeme zadržavanja izopropil-izotiocijanata iznosi 5,505 min, alil-izotiocijanata 6,304 min, benzil-izotiocijanata 14,002 min, a 2-feniletil-izotiocijanata 15,300 min. Krivulja umjeravanja je konstruirana na najmanje 11 točaka za svaki od izotiocijanata te je podijeljena na dvije krivulje umjeravanja za dva područja koncentracija.

*Zaključak:* Plinska kromatografija uz plamenoionizacijski detektor je prihvatljiva tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje izotiocijanata. Razvijena metoda je primjenjiva za četiri odabrana izotiocijanata i područje masenih koncentracija koje obuhvaća tri reda veličine.

Ključne riječi: izotiocijanati, plinska kromatografija, plamenoionizacijski detektor, krivulja umjeravanja

## **9. SUMMARY**



*Diploma Thesis Title:* Qualitative and quantitative determination of selected isothiocyanates using gas chromatography.

*Objectives:* Development and validation of the method for qualitative and quantitative determination of isopropyl-isothiocyanate, allyl-isothiocyanate, benzyl-isothiocyanate and 2-phenylethyl-isothiocyanate using gas chromatography with flame ionization detector, FID.

*Material and Methods:* 12 standard solutions of isopropyl-isothiocyanate, allyl-isothiocyanate, benzyl-isothiocyanate and 2-phenylethyl-isothiocyanate were dissolved in dichloromethane with mass concentrations from 0,01 mg mL<sup>-1</sup> to 10,00 mg mL<sup>-1</sup> and analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Two methods were applied in which column oven temperature rate and split ratio of the injector were altered, while other operation conditions were kept constant. A capillary column with non-polar stationary phase was used. Helium was the mobile phase, air and hydrogen were used for combustion in the detector and nitrogen was used as make up gas.

*Results:* The analysis found that faster temperature rise does not interfere with the separation of the sample components, and decrease in the split ratio makes method more sensitive to lower analyte concentrations. The mean retention time of isopropyl-isothiocyanate is 5,505 min, allyl-isothiocyanate 6,304 min, benzyl-isothiocyanate 14,002 min and 2-phenylethyl-isothiocyanate 15,300 min. A calibration curve is constructed of at least 11 points for each of the isothiocyanates and divided into two calibration curves for two concentration ranges.

*Conclusions:* Gas chromatography with flame ionization detector is a suitable technique for qualitative and quantitative determination of isothiocyanates. The developed method is applicable to four selected isothiocyanates and a range of mass concentrations that spans three orders of magnitude.

**Key words:** isothiocyanates, gas chromatography, flame ionization detector, calibration curve

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:**

- Ime i prezime: Branka Kuzmanić
- Datum rođenja: 1.9.1995.
- Državljanstvo: hrvatsko
- Adresa: Omiš, Četvrt Žarka Dražojevića 9
- E-mail: [branka.kuzmanic@gmail.com](mailto:branka.kuzmanic@gmail.com)

**Obrazovanje:**

- 2002. – 2010. Osnovna škola „Josip Pupačić“, Omiš
- 2010. – 2014. Srednja škola „Jure Kaštelan“, opća gimnazija, Omiš
- 2014. – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

**Radno iskustvo:**

- II. 2019. – VIII. 2019. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Lučac
- CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije)

**Posebne vještine:**

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

**Ostalo:**

- Kongresno priopćenje: D. Leskur, B. Kuzmanić, J. Bukić, D. Rušić, M. Portolan, A. Šešelja Perišin, A. Meštrovčić, D. Modun. Stavovi, znanje i korištenje dodataka prehrani u ljekarnika. 6. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Dubrovnik, travanj 2019.