

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Viktorija Gorički

**Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje tioureje u uzorcima voda i
voćnih sokova**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić i voditeljstvom Luke Jerića, inž. kem. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020/2021.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1 Tioureja.....	2
1.1.1 Kemijska i fizikalna svojstva	2
1.2 Izvori i upotreba tioureje	3
1.3 Izloženost i potencijalne opasnost	3
1.4 Upotreba u poljoprivredi	4
1.5 Pregled analitičkih metoda za određivanje tioureje.....	5
1.6 Tioureja u okolišu [1]	6
1.7 Kromatografija.....	7
1.7.1 Kromatografski parametri	8
1.7.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	12
1.8 Validacija.....	14
1.8.1 Specifičnost/selektivnost.....	15
1.8.2 Linearnost.....	16
1.8.3 Granica detekcije.....	16
1.8.4 Granica kvantifikacije	17
1.8.5 Preciznost	18
1.8.6 Točnost.....	18
1.8.7 Radno područje	19
2. Opći i specifični ciljevi rada.....	20
3. Materijal i metode	22
3.1. Materijali	23
3.1.1. Standard.....	23
3.1.2. Kemikalije	23
3.1.3. Realni uzorci	23
3.1.4. Instrumenti	24

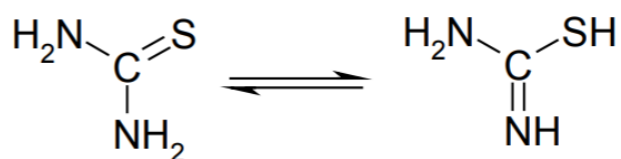
3.2. Metoda rada.....	28
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	28
3.2.2. Priprema realnih uzoraka.....	28
3.2.3. Priprema pokretne faze.....	29
3.2.4. Kromatografsko određivanje.....	29
3.2.5. Validacija metode.....	30
4. Rezultati i rasprava.....	31
4.1 Odabir pokretne faze	32
4.2 Odabir kromatografske kolone	34
4.3 Odabir valne duljine	34
4.4 Validacija metode	35
4.4.1 Selektivnost	35
4.4.2 Linearnost.....	37
4.4.3 Granica detekcije.....	39
4.4.4 Granica kvantifikacije	39
4.4.5 Preciznost	40
4.4.6 Točnost.....	40
4.5 Analiza rezultata validacije metode.....	44
4.6 Analiza realnih uzoraka	45
5. Zaključak.....	Error! Bookmark not defined.
6. Literatura	51
7. Sažetak	55
8. Summary	56
9. Životopis.....	57

1. UVOD

1.1 Tioureja

1.1.1 Kemijska i fizikalna svojstva

Tioureja (grč. θειον: sumpor + urea) je sumporni analogon ureje, pri čemu je atom kisika supstituiran sumporom te ima ulogu kromofora i antioksidansa. Tioureja (IUPAC naziv: tiourea, CAS broj: 62-56-6) formule $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{S}$, također je poznata kao tiokarbamid ili sulfoureja. Tioureja je u tautomernoj ravnoteži s izotioureom, $\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{SH}$ (**Slika 1**).



Slika 1. Tautomerni oblici tioureje [1]

To je bijela kristalna tvar u obliku rompskih prizama, topljiva u vodi, polarnim protičnim i aprotičnim otapalima, a netopljiva u nepolarnim otapalima [2].

Prilikom izlaganja toplini dolazi do dekompozicije tioureje uslijed čega se stvaraju otrovne pare dušikovih i sumporovih oksida [3]. Neka od bitnih fizikalno-kemijskih svojstava tioureje dana su u **Tablici 1**.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva tioureje [3]

Naziv fizikalno-kemijskog svojstva	Vrijednost
Molekulska masa	76,121 (g/mol)
Kemijska formula	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$
Talište	167 °C – 182 °C
Topljivost (kod 20 °C)	137 (g/L)
Gustoća	1,405 (g/cm ³)
Henryjeva konstanta (kod 20 °C)	$5,6 \cdot 10^{-9}$ (Pa m ³ /mol)
Tlak para (kod 25 °C)	$1,879 \cdot 10^{-5}$ (Pa)
Površinska napetost	$1,04 \cdot 10^{-2}$ (N/m)
Toplina isparavanja	$6,003 \cdot 10^7$ (J/kmol)

1.2 Izvori i upotreba tioureje

Tioureja je u malim količinama prisutna kao prirodni metabolit gljiva *Verticillium alboatrum* i *Bortrylius cinerea*. Ipak, tioureja je najvećim dijelom antropogenog podrijetla te dobivena reakcijom kalcijeva cijanamida (CaCN_2) i sumporovodika (H_2S) (ili jednog od njegovih prekursora) u vodenoj otopini, npr. amonijevom sulfidu ($(\text{NH}_4)_2\text{S}$) ili kalcijevom sumporovodiku ($\text{Ca}(\text{HS})_2$).

Tioureja i njezini derivati upotrebljavaju se u proizvodnji polimernih materijala, za ubrzanje vulkanizacije i proizvodnju nekih lijekova te kao antioksidansi i sredstva za poliranje i čišćenje, posebno za srebrne predmete [3]. Nadalje, tioureja se koristi u ljepilu za životinjske kože pri čemu njen udio iznosi između 10 – 20 % te u proizvodnji tioureja-formaldehidne smole koja se koristi kao usporivač gorenja (eng. *flame retardants*), kao pomoćno sredstvo u diazo-papiru (fotokopirni papir osjetljiv na svjetlost), obradi metala, elektroplatiniranju/elektroformiranju, kao inhibitor korozije, te u mnogim drugim primjenama [1].

Tijekom 1940-tih godina provedena su istraživanja i razmatranja tioureje kao potencijalnog lijeka za bolesti štitnjače [1]. Primjena tioureje danas može se svrstati u četiri glavne grane [3]:

- proizvodnja tioureja dioksida koji se koristi kao izbjeljivač u tekstilnoj industriji i obradi vune (30 %)
- ispiranje ruda (25 %)
- proizvodnja diazo-papira (15 %)
- katalizator u procesu sinteze fumarne kiseline (10 %)

1.3 Izloženost i potencijalne opasnost

Tioureja je klasificirana kao potencijalno kancerogena u Njemačkoj te kao kancerogena u Finskoj (1993), Francuskoj (1993), Japanu (1993) i Švedskoj (1993). Nizozemska je 1999. godine predložila maksimalno dozvoljenu koncentraciju izloženosti tioureji od $0,5 \text{ mg/m}^3$, dok je Ruska Federacija postavila koncentraciju od $0,3 \text{ mg/m}^3$ kao ograničenje kratkotrajne izloženosti. Od prve procjene negativnih učinaka tioureje koja je započeta 1974. godine, do danas je provedeno nekoliko studija kancerogenosti kod životinja, ali nijedna ne predstavlja konvencionalani biotest koji bi zadovoljio današnje standarde.

Tioureja se apsorbira putem gastrointestinalnog trakta. Jedna oralna doza od 100 mg tioureja gotovo u potpunosti se eliminira iz krvi nakon 24 h. Približno 15 % se razgradi u crijevima, 30 – 50 % u ostalim tkivima i tjelesnim tekućinama, dok se ostatak od 30-ak % izlučuje putem mokraće.

Prema nekoliko eksperimentalnih istraživanja, tioureja nije pokazala svojstvo mutagenosti na *Salmonella typhimurium* ili *E.coli* kada je testirana sa ili bez metaboličke aktivacije na uzorku jetrenih mikrosoma štakora, miševa i hrčaka. Ipak, zabilježena je slaba mutagenost u pokusima s miševima kao domaćinom, nakon intramuskularne primjene. Postoje literaturna neslaganja oko sposobnosti tioureja da izazove mutacije mišjeg limfoma L5178Y (*Tk* locus) ili stanica kineskog hrčka V79 (*Hprt* locus). Tioureja pripada skupini lijekova koji se koriste za liječenje hipertireoze te djeluje inhibirajući tiroidnu peroksidazu (koja smanjuje proizvodnju hormona štitnjače istovremeno povećavajući proliferaciju povećanjem lučenja TSH). To je vjerojatno razlog povećanog broja uočenih tumora štitnjače kod pokusnih životinja. Međutim, konačan zaključak u vezi njene kancerogenosti ipak se ne može izvesti s obzirom na kontradiktorne rezultate dobivene testovima genotoksičnosti [1].

1.4 Upotreba u poljoprivredi

Kao što je prethodno spomenuto, tioureja nalazi svoju primjenu u brojnim područjima znanosti i tehnologije. Jedna od njih je poljoprivreda i prehrambena tehnologija. Tioureja djeluje inhibirajuće na polifenol oksidazu (PPO) koja je odgovorna za enzimsko porumenjenje mnogih hortikulturalnih proizvoda. Tioureja se također koristi za indukciju ranog sazrijevanja nekolicine plodova te prekid mirovanja sjemena i gomolja. Spojevi tioureja često se dodaju agrumima kao fungicid tijekom njihova skladištenja u hladnjačama. Izravno izlaganje istraživača ili radnika tioureji treba izbjegavati zbog već spomenute potencijalne kancerogenosti [4].

Prilikom korištenja u svrhu predobrade sjemena, tioureja povećava klijavost, dok primjena tioureja kao folijarnog spreja poboljšava svojstva izmjene plinova. Iako u različitoj mjeri, tioureja je učinkovitija u poboljšanju rasta i razvoja biljaka u uvjetima suše, slanoe, toplinskog stresa i toksičnosti teških metala [5].

Razlog ispitivanja voćnih sokova u ovome radu leži upravo u činjenici da se tiourea od 90-tih godina prošlog stoljeća koristi kao insekticid, a poznato je da se koristi kao herbicid, fungicid te rodenticid u proizvodnji agruma [6].

1.5 Pregled analitičkih metoda za određivanje tioureje

Brojne metode predložene su za određivanje i analizu tioureje. Neke od njih su titracija s jodom te *N*-bromosukcinimidom, Ramanova spektroskopija, polarografija, voltimetrija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, kinetičke metode, potenciometrija, metode protočnog injekcijskog određivanja (eng. *flow-injection analysis*), amperometrijske metode, spregnuta spektroskopija masa itd. Međutim, većina spomenutih metoda nema zadovoljavajuću osjetljivost, nisu selektivne ili je vrijeme provođenja analize dugo [7]. U nastavku slijedi pregled dosad razvijenih analitičkih metoda za određivanje tioureje.

Metoda titracije s jodom ima radno područje određivanja tioureje u rasponu od 5 – 1000 µg. Određivanje se temelji na reakciji tioureje s kloroformnom otopinom joda u otopini natrijevog bikarbonata. Nakokon uklanjanja suviška joda, nastali jodid određen je Leipertovim postupkom. U provedenoj analizi utvrđeno je da 0,12 %-tna otopina joda daje brzu i kvantitativnu oksidaciju. Međutim, opisana metoda nalaže da se sav preostali jod u suspenziji vodene faze ukloni pranjem s kloroformom, jer bi u suprotnom moglo doći do pozitivne pogreške dajući rezultate veće od stvarnih [8].

Sljedeća u nizu analiza određivanja tioureje je metoda protočnog injekcijskog određivanja se temelji na brznoj oksidaciji tioureje pomoću talija(III) uz nastajanje fluorescentnog talija(I). Parametar koji se mjeri je fluorescencija talija(I), koja je proporcionalna koncentraciji tioureje. Linearna visnost fluorescencije o koncentraciji tioureje postignuta je u rasponu molarnih koncentracija od $5 \cdot 10^{-7}$ do $1 \cdot 10^{-5}$. Ljubičasta fluorescencija se pripisuje postojanju anionskog kompleksa $TiCl_3^{2-}$ zbog čega se reakcija provodi u prisutnosti klorovodične kiseline. Postupak je primjenjen za određivanje tioureje u voćnim sokovima. Uzorci sokova obogaćivani su tiourejom u koncentracijama od 8,0 µg/mL, 15 µg/mL i 30,0 µg/mL. Postignuta su iskorištenja u rasponu od 95,6 % do 100,5 % [9].

Ramanova spektroskopija korištena je za kvantitativno određivanje tioureje u vodenim otopinama zakiseljenim sumpornom kiselinom u prisutnosti sumporova dioksida. Metoda je pogodna za određivanje tioureje u prisutnosti visokih koncentracija sumporovog dioksida i anorganskih soli što je bitno s obzirom da se takve otopine koriste u postupku ispiranja zlata. Međutim, navedeni postupak, zbog dodatka sumporovog dioksida rezultira povećanom potrošnjom tioureje, što posljedično uzrokuje neekonomičnost u obradi ruda zlata. Metoda je stoga razvijena kako bi se procijenila ekonomičnost postupka ispiranja zlata vodenom otopinom tioureje. Važno je istaknuti kako razvijena metoda vrijedi samo u prisutnosti visokih koncentracija sumporovog dioksida te anorganskih soli [10].

Voltometrija je također jedna od metoda koja se koristi za određivanje tioureje. Abbasi i sur. [11] razvili su katalitičku diferencijalnu pulsnu voltamterijsku metodu koja se temelji na katalitičkom učinku tioureje na oksidaciju *Janus green* boje jodatom u kiselom mediju (klorovodična kiselina). Nakon oksidacije slijedi redukcija preostale boje *Janus green* ispod površine živine elektrode diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Metoda je vrlo povoljna za određivanje tioureje u voćnim sokovima te ju odlikuju niska granica detekcije (0,005 µg/mL) te široki linearni raspon (0,01–6,00 µg/mL) [11].

Istu reakciju oksidacije boje *Janus green* tiourejom, Abbasi je koristio u drugom radu u kojem je razvio spektrofotometrijsku metodu pri čemu je mjerio smanjenje apsorbancije boje pri 610 nm, nakon 25 minuta. Razvijena metoda omogućava određivanje tioureje u rasponu koncentracija od 0,01–12,00 mg/L uz granicu detekcije 0,008 mg/L. Metoda je primijenjena za određivanje tioureje u sokovima naranče i limuna te kori naranče. Analizirani su uzorci s dodatkom tioureje u koncentraciji od 5,0 mg/L, 10,0 mg/L i 15,0 mg/L te je određene iskorištenje u rasponu od 95,4 % do 101,0 % [12].

Tioureja je određena i potencijometrijski u otopini jake kiseline te ion-selektivnom elektrodom s Ag₂S-AgI-PTFE membranom. Linearni odziv dobiven je u rasponu koncentracija od 10⁻² M do 10⁻⁵ M. Promjena potencijala u ispitivanom koncentracijskom rasponu tioureje ukazao je na stvaranje Ag(tioureja)_{1,4}⁺ na površini membrane. Važno je istaknuti kako se navedeno istraživanje bavilo ponašanjem elektrode Ag₂S-AgI-PTFE te kako je eksperiment proveden u iznimno kiselom mediju (pH= 0-1) [13].

Ranhman i sur. [14] razvili su selektivan senzor za određivanje tioureje u uzorcima voda iz okoliša. Izradili su staklenu ugljičnu elektrodu s tankim slojem nanočestica kobaltovog oksida kodopiranog manganovim oksidom. Senzor je pokazao vrlo nisku granicu detekcije, 12,0 ± 0,05 pM. Primjenjivost razvijenog senzora ispitali su analizom realnih uzoraka morske i vodovodne vode obogaćenih tiourejom pri koncentracijama od 0,100 nM, 0,100 µM i 0,100 mM. Postignuta su iskorištenja u rasponu od 98,3 % do 102,4 %.

1.6 Tioureja u okolišu [1]

Uvidom u fizikalno-kemijska svojstva tioureje, ponajviše njenu malu vrijednost tlaka para, može se zaključiti kako je vjerojatnost da će se tioureja detektirati u zraku izuzetno mala. Međutim, topljivost tioureje koja iznosi 137 g/L pri temperaturi 25° C je značajna te je za očekivati da će se tioureja nalaziti u vodenom okolišu. Također, uzimajući u obzir Henryjevu

konstantu čiji je iznos u rasponu od $5,58 \cdot 10^{-9}$ do $8,44 \cdot 10^{-9}$ Pa m³/mol pretpostavlja se da tioureja neće ispariti iz vodenih otopina. Iz priloženih fizikalno-kemijskih vrijednosti može se pretpostaviti da će se tioureja nalaziti uglavnom u vodenom okolišu.

Koeficijenti sorpcije (K_{OC}) tioureje na tlo su u rasponu od 26-315 cm³/g što govori da se može očekivati niska do umjerena sorpcija tioureje na organsku tvar različitih vrsta tla. Značajnije isparavanje tioureje iz tla nije očekivano.

Iz UV-spektra tioureje izravna fotoliza u zraku i vodi nije za očekivati iako ne postoje eksperimentalni podaci kojima bi se to potkrijepilo. U atmosferi je glavni put razgradnje vjerojatno reakcija tioureje s hidroksilnim radikalima.

Također, provedeno je nekoliko ispitivanja biorazgradivosti tioureje. Ispitivanja su provedena prema međunarodno prihvaćenim standardnim postupcima pri aerobim uvjetima. U dvije studije o provedenoj biorazgradnji bez mineralizacije opažena je tioureja, dok je u drugom ispitivanju prijavljeno uklanjanje do 97 % iz aktivnog mulja.

Na temelju dostupnih podataka akumulacija tioureje u tlu je malo vjerojatna, a isto je potvrđeno i eksperimentalnim podacima. Kao što je već prethodno spomenuto zaključeno je kako je hidrosfera glavni medij u kojem se može detektirati tioureja. U istraživanju provedenom tijekom 1977. godine tioureja nije detektirana niti u jednom od šest uzoraka morske vode i sedimenata uzetih s područja zaljeva Yokaichi i Dokaiwan u Japanu. Međutim, 1992. godine određena je u koncentracija od 130 mg/L u podzemnoj vodi u Njemačkoj.

1.7 Kromatografija

Kromatografija je izumljena početkom 20. stoljeća kada je ruski botaničar Mikail Semenovič Cvet propustio otopinu biljnih pigmenata klorofila i ksantofila kroz staklenu kolonu ispunjenu sitnim zrnima kalcijevog karbonata. Prolaskom kroz kolonu kalcijevog karbonata došlo je do odvajanja sastojaka smjese biljnih pigmenata. Odijeljeni sastojci vidjeli su se na koloni kao obojene vrpce po čemu je i tehnika dobila svoje ime.

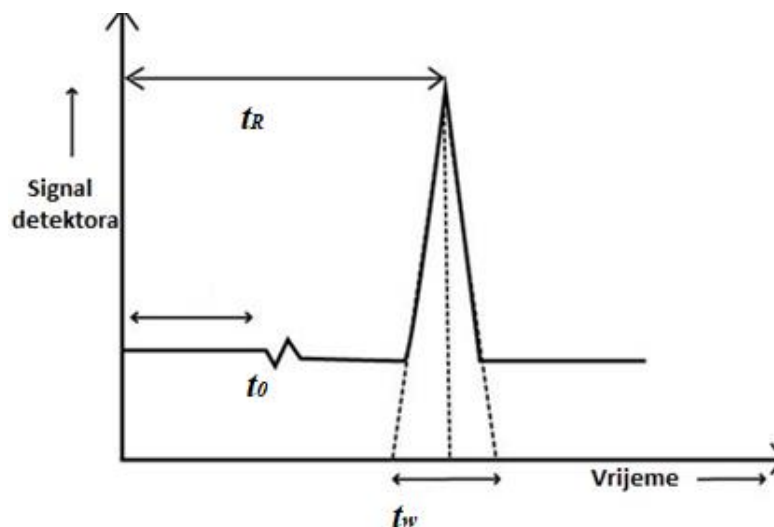
Kromatografija je tehnika odjeljivanja sastojaka u smjesi pri čemu pokretna faza (kapljevina ili plin) nosi sastojke uzorka kroz nepokretnu fazu, a odjeljivanje sastojaka temelji se na različitim brzinama kretanja pojedinih sastojaka kroz nepokretnu fazu. Koristi se za odjeljivanje sastojaka ispitivane smjese, a vezana s odgovarajućim detektorom omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju odijeljenih analita. Razlikujemo dvije vrste kromatografskih tehnika. U kromatografiji na stupcu, nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju se

pokretna faza kreće pod utjecajem tlaka, dok je u plošnoj kromatografiji nepokretna faza nanosena na papir ili ravnu plohu, a pokretna faza se kreće kroz nju pod utjecajem kapilarne sile ili gravitacije [5].

1.7.1 Kromatografski parametri

Kromatogram je zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata. Kod razvoja kromatografske metode postoji mnogo parametara koje treba optimirati da bi dobili željene rezultate. Kako bi osigurali valjanost rezultata kromatografskih određivanja, primjenjujemo određena ispitivanja prikladnosti sustava.

Glavni parametar kromatografskog pika je vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*). Vrijeme potrebno da molekule pokretne faze ili nezadržane molekule prođu kroz kolonu označavamo s t_0 ili t_M i nazivamo ga “mrtvo vrijeme“. Vrijeme zadržavanja, t_R je vrijeme potrebno pojedinoj sastavnici da nakon unošenja uzorka stigne do detektora (Slika 2.).



Slika 2. Vrijeme zadržavanja pokretne faze (t_0) i uzorka (t_R) [15]

Vrijeme koje je potrebno sastavnici da prođe kroz kolonu ovisi o faktoru kapaciteta (k'). Opisuje brzinu gibanja analita u koloni i pokazuje mjeru u kojoj se uzorak razdjeljuje između nepokretne i pokretne faze fenomenom dinamičke ravnoteže. Nazivamo ga i omjerom razdiobe mase (D_m), a možemo ga mijenjati promjenom temperature u plinskoj kromatografiji ili mijenjanjem sastava pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji. Faktor kapaciteta

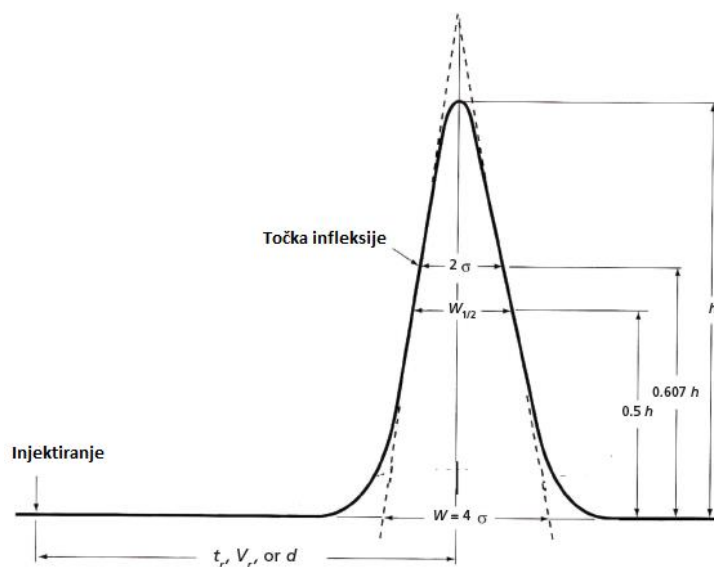
računamo prema jednadžbi (1) u kojoj je k'_A ravnotežni koeficijent razdiobe, V_S volumen nepokretne faze, a V_M volumen pokretne faze.

$$k'_A = \frac{K_A \cdot V_S}{V_M} \quad (1)$$

Što su kromatografski pikovi širi, manja je djelotvornost kolone. Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih odsječaka. Teorijski odsječak je područje u kromatografskom sustavu gdje se uspostavlja ravnoteža raspodjele sastavnice između nepokretne i pokretne faze. Teorijski odsječak u realnom kromatografskom sustavu predstavlja hipotetsku veličinu. Broj odsječaka predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža ispitivanog analita između pokretne i nepokretne faze. Djelotvornost kolone povećavamo smanjenjem visine odsječaka i povećanjem njihova broja. Broj teorijskih odsječaka (N) računamo prema jednadžbi (2) u kojoj je t_R vrijeme zadržavanja sastavnice, a $w_{1/2}$ širini pika na polovici njegove visine (**Slika 3.**). Visina odsječaka (H) računa se prema jednadžbi (3) gdje je L dužina kolone, a N broj odsječaka [16].

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right) \quad (2)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (3)$$



Slika 3. Širina na polovici pika i njegova visina [17]

Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje (R_S), koeficijent selektivnosti (α), faktor simetrije (A_S) i omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje (p/v) (engl. *peak-to-valley*).

Razlučivanje pikova opisuje se pomoću R_S -vrijednosti koja ukazuje na sposobnost kromatografskog sustava da odvoji dva susjedna analita [18] a računa se prema jednadžbi (4).

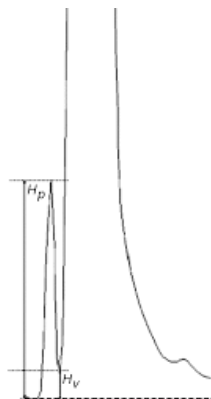
$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{rB} - t_{rA})}{w_{B\ 0,5} + w_{A\ 0,5}} \quad (4)$$

gdje je t_{rB} vrijeme zadržavanja tvari B, t_{rA} vrijeme zadržavanja tvari A, dok su $w_{B\ 0,5}$ i $w_{A\ 0,5}$ širine pikova A i B na polovici njihove visine.

Kao mjera razlučivosti ponekad se navodi kriterij *peak-to-valley* po kojem se razlučivost računa kao omjer nižeg vrha i visine između tog i susjednog vrha. Odnos vrha i doline koji se djelomično preklapaju računa se prema jednadžbi (5) i može se koristiti kao kriterij prikladnosti sustava u testu za srodne tvari kada se osnovno razdvajanje između dva vrha ne postigne kao što je ilustrirano na **Slici 4**.

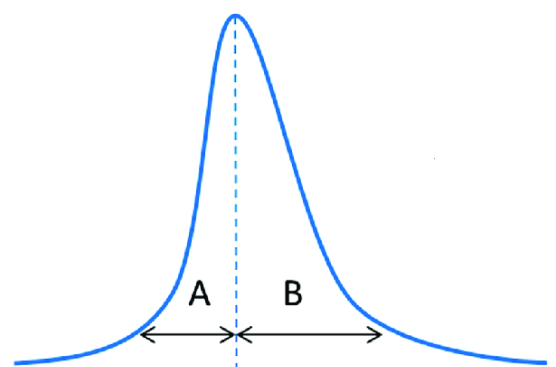
$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v} \quad (5)$$

Pri čemu je H_p visina iznad ekstrapolirane osnovne linije manjeg vrha, dok je H_v visina iznad ekstrapolirane osnovne linije na najnižoj točki krivulje kojom se razdvajaju manji od većih pikova [19].



Slika 4. Odnos doline i vrha [19]

Faktor asimetrije odnosi se na izgled pika (**Slika 5.**). Provjerava se na 5 % visine pika 100 %-tnog standarda od bazne linije, a ne smije biti veći od 2,0.



Slika 5. Asimetričnost pika

Faktor asimetrije računa se prema jednadžbi (6).

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (6)$$

Gdje je B širina vrha pika na 5 % njegove visine, mjereno od bazne linije, dok je A osnovna udaljenost između okomice koja je pala s maksimuma vrha i prednjeg ruba vrha na 5 % njegove visine.

Faktor asimetrije 1,0 označava potpunu simetriju. Vrijednosti faktora asimetrije veće od 2,0 mogu dovesti do netočne integracije što rezultira pogrešnom kvantifikacijom. Glavni faktori koji utječu na simetriju pika su vrijeme zadržavanja, učinak otapala, nekompatibilnost diluenta i pokretne faze ili pak nastanak prekomjerne praznine na ulazu u kolonu. Također, u kromatografiji obrnutih faza adsorpcijski fenomeni zbog prisutnosti ostataka skupine silanola u nepokretnoj fazi mogu dovesti do slabe simetrije pika [19].

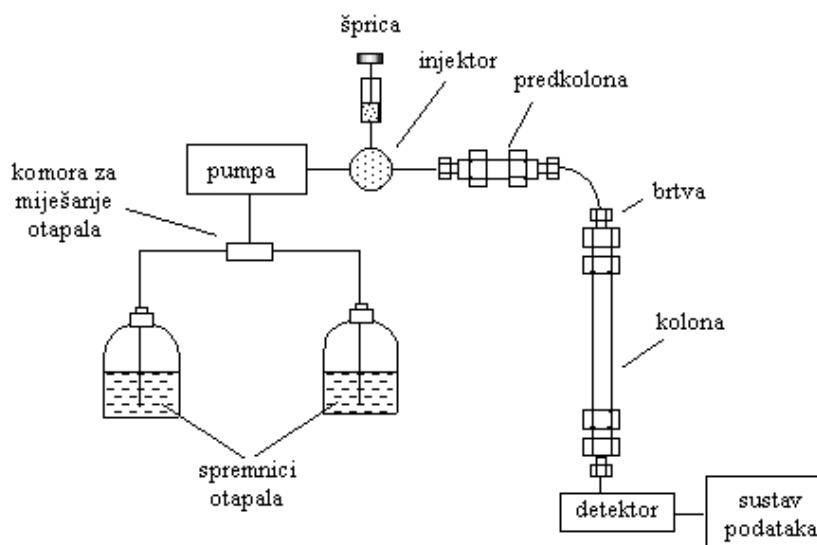
Odjeljivanje dvaju komponenti uzorka je moguće samo ako one imaju različitu brzinu putovanja kroz kromatografsku kolonu. Faktor separacije (α) predstavlja omjer faktora zadržavanja dvije komponente uzorka. Omjer mora iznositi više od 1 kako bismo mogli reći da su komponente ispitivanog uzorka razdvojene [20]. Računa se prema jednadžbi (7) danoj u nastavku.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (7)$$

Pri čemu su k'_B i k'_A faktori kapaciteta pikova A i B.

1.7.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

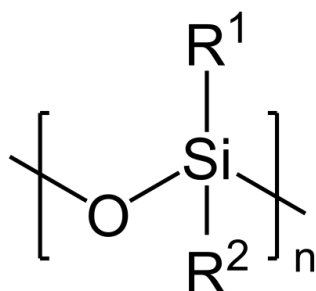
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) je tehnika koja se u 75 % primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi HPLC kromatografa su: spremnici za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (Slika 6.).



Slika 6. Shema HPLC instrumenta [18]

Otapala koja se koriste za pokretnu fazu trebaju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 mL/min) u kolonu. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju (zapremina 5 do 500 mL) u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa se analit, odnosno otopljena tvar, dokazuje neizravno promjenom ovih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Vrlo su dobri detektori s nizom dioda (eng. *diode-array detector*, DAD) (HPLC-DAD sustavi) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis području, pri čemu se apsorpcija snima u

ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. Među spektroskopskim detektorima valja spomenuti i spektrometar masa (MS) za identifikaciju organskih spojeva te atomsku apsorpcijsku spektroskopiju (AAS) ili atomsku emisijsku spektroskopiju (AES) za specijaciju elemenata. Kao nepokretna faza najčešće se koristi silika gel. Površina potpuno hidroliziranog silika gela sadrži silanolne skupine (-Si-OH). Njihovom reakcijom s organoklorosilanom nastaje siloksan (**Slika 7.**) pri čemu je alkilna skupina (R₁) u praksi najčešće -C₁₈H₃₇ (n-oktadecil) ili -C₈H₁₇ (n-oktil) čineći nepolarnu nepokretnu fazu za kromatografiju obrnutih faza.



Slika 7. Struktura siloksana

Dugi lanci ugljikovodikovih skupina postavljeni su međusobno paralelno, a u odnosu na površinu čestice okomito, čineći „četkastu“ površinu. U kromatografiji normalnih faza na silika gel mogu biti vezane polarne skupine, npr. dioli, cijano, amino, dimetilamino ili diamino.

Valja razlikovati izokratno od gradijentnog eluiranja. Kod izokratnog eluiranja pokretna faza je stalnog sastava tijekom kromatografskog procesa. Ponekad se bolje i brže odjeljivanje postiže primjenom gradijentnog eluiranja pri čemu se sastav pokretne faze stalno mijenja.

HPLC obrnutih faza je u pravilu metoda koja se prva ispituje kada se rješava neki novi analitički problem. Uobičajena nepokretna faza je C₁₈ a zadržavanje tvari i selektivnost podešavaju se variranjem sastava pokretne faze. Ukoliko izokratno eluiranje ne dovodi do željenog odjeljivanja primjenjuje se gradijentno eluiranje. Nadalje, snaga otapala koja čini pokretnu fazu može se modificirati variranjem pH-vrijednosti (dodatkom pufera) ili dodavanjem reagenasa koji tvore ionske parove s ionom u otopini (kromatografija ionskih parova). U oba slučaja nastoji se stvoriti neutralne kemijske vrste u pokretnoj fazi koje stupaju u interakciju s nepolarnom nepokretnom fazom. Da bi se promijenila polarnost analita i povećala osjetljivost dokazivanja moguće je analit derivatizirati. Enantiomere je moguće

odijeliti primjenom kiralnih faza; obično se u tu svrhu koristi silika gel kao nosač koji je prevučen polimerom na koji je kemijski vezan optički aktivni polimer. Npr. za odjeljivanje enantiomera amino kiselina koristi se kiralna faza dobivena iz optički aktivnog Cu(II)-L-prolin kompleksa [18].

1.8 Validacija

Validacija metode jest postupak utvrđivanja prikladnosti metode za korištenje u određenu svrhu, a slijedi nakon razvoja metode [21]. Budući da se svrha i same analitičke metode međusobno razlikuju, ne može se na jednak način pristupiti validaciji različitih metoda za različite namjene. Ipak, tijekom svakog postupka validacije važno je slijediti određene korake: prepoznati bitne radne značajke metode, odnosno parametre validacije te postaviti određene zahtjeve (kriterije) za te značajke [22]. Najznačajnija prednost validacije analitičkih metoda je izgradnja određenog stupnja pouzdanosti u metodu. Postoji niz preporuka prema kojima se provodi validacija metode, u farmaceutskoj industriji najčešće se koriste smjernice koje propisuje Međunarodna organizacija za harmonizaciju (engl. *International conference on harmonization*, ICH) – poglavlje Q2 (R1) *Validation of analytical procedures* [23] i Organizacija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) – *Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics* [24].

Postupak validacije sastoji se od nekoliko faza. U prvoj fazi se definira svrha, odnosno cilj metode, analit koji će se određivati, očekivani raspon koncentracije, uzorak, oprema na kojoj će se raditi i lokacija. Druga faza obuhvaća definiranje kriterija validacije, a to su kriteriji prihvatljivosti određivanih parametara i karakteristike djelovanja, kao što su priprema i izvedba eksperimenata. Treća faza obuhvaća razvoj plana za kontrolu kvalitete za rutinske analize i naposljetku faza izrade validacijskog izvješća i dokumentacije [23]. Ključni element za uspješnu validaciju metode je priprema uzorka. Ona mora biti dobro dokumentirana, a izbor određenog postupka pripreme ovisi o vrsti i koncentraciji analita, matriksu uzorka, veličini uzorka i instrumentalnoj tehnici. Provođenje eksperimenata se odnosi na dobivanje kvalitativnih ili kvantitativnih informacija o ispitivanim analitima s prihvatljivom razinom nesigurnosti. Analiza podataka sastoji se od matematičkih i statističkih postupaka koji vode smislenim informacijama i zaključcima o eksperimentu i validaciji metode u cjelini [24].

Općeprihvaćene radne značajke metode, odnosno parametri validacije su:

- ❖ Specifičnost/selektivnost
- ❖ Linearost
- ❖ Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD)
- ❖ Granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ)
- ❖ Preciznost
 - Ponovljivost (eng. *repeatability*)
 - Međupreciznost (eng. *intermediate precision*)
 - Obnovljivost (eng. *reproducibility*)
- ❖ Točnost (eng. *accuracy*)
- ❖ Radno područje

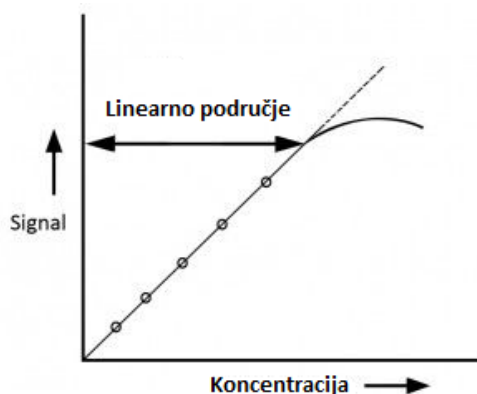
Za oblikovanje plana validacije metode, potrebno je kombinirati navedene parametre. Pri provedbi validacije, ovisno o zahtjevima metode, odabiru se različiti parametri, nije nužno uzimati u obzir sve parametre validacije. Nastavno na to, validacija može biti potpuna – ako se određuju sve izvedbene značajke, odnosno parametri validacije, i djelomična – ako se određuju samo neki parametri [25].

1.8.1 Specifičnost/selektivnost

Specifičnost i selektivnost kao parametri validacije koriste se za veliki broj metoda i važni su parametri u dokazivanju da metoda služi svrsi. Specifičnost odnosno selektivnost svojstvo je metode da specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod točno utvrđenim uvjetima ispitivanja, tako da daju predodžbu o pouzdanosti analitičke metode. Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona koja može odrediti samo jedan specifični analit, dok selektivnom metodom nazivamo onu metodu kojom se može određivati više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj. U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku. Kod spektrofotometrijskih metoda se kao prikaz rezultata koriste reprezentativni spektri referentnih materijala, dostupnih onečišćenja, razgrađenih i nerazgrađenih uzoraka i matriksa [26].

1.8.2 Linearnost

Linearnost metode je njezina mogućnost da u zadanom području daje rezultate koji su izravno ili prema definiranoj matematičkoj transformaciji proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost se prvo uspostavlja vizualno kao graf ovisnosti signala o koncentraciji analita (**Slika 8.**). Ako je procijenjen linearan odnos, potrebno je obraditi rezultate odgovarajućim statističkim metodama (npr. računanjem parametara regresijskog pravca metodom najmanjih kvadrata). Cilj određivanja ovoga parametra je dobivanje matematičke ovisnosti signala o koncentraciji analita koja se kasnije koristi za izračunavanje koncentracije analita u ispitnom uzorku. Otopine za ispitivanje linearnosti pripremaju se razrjeđivanjem iz jedne koncentrirane otopine. Linearnost treba provjeriti na najmanje pet točaka u prikladnom radnom području [27].



Slika 8. Prikaz linearnosti [29]

1.8.3 Granica detekcije

LOD je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću preciznost i točnost, ali ne nužno i kvantificirati. Postoji nekoliko metoda za računanje LOD, u kromatografskim određivanjima najčešće se određuje na temelju omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije (S/N), čija je prihvaćena vrijednost 3:1 [27].

Granicu detekcije moguće je odrediti računski prema jednadžbi (8).

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{b} \quad (8)$$

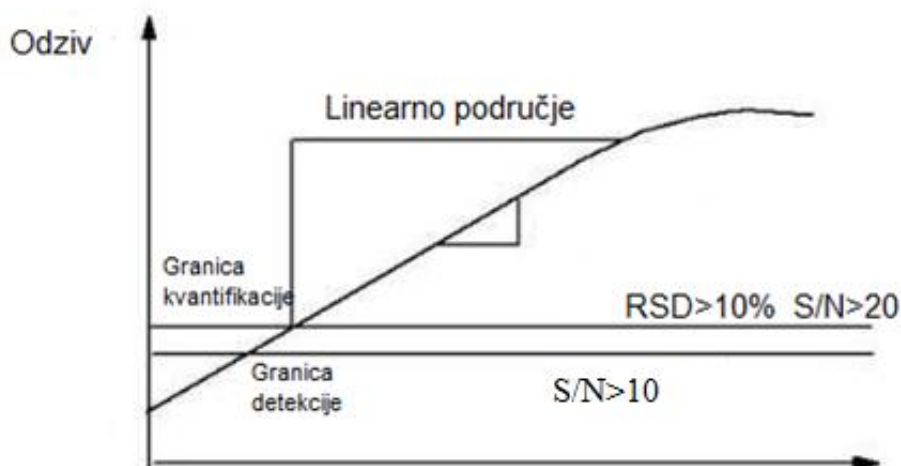
Pri čemu je s standardno odstupanje odziva, dok je b nagib kalibracijske krivulje.

1.8.4 Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom točnošću i preciznošću. Posebno se koristi za određivanje onečišćenja i/ili razgradnih produkata u uzorcima. Ima nekoliko pristupa određivanju granice kvantifikacije ovisno o tome je li analiza instrumentalna ili nije. Granica kvantifikacije se općenito određuje analizom uzoraka poznate koncentracije analita utvrđivanjem najniže koncentracije pri kojoj se analit može kvantitativno odrediti sa zadovoljavajućom točnosti i preciznosti. Određivanje LOQ je iznimno važno kod mjerenja analita u tragovima, koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu nepovoljno djelovati na okoliš i zdravlje ljudi. Isto kao i za određivanje LOD, za određivanje LOQ postoji nekoliko pristupa, a za kromatografska određivanje najčešće se koristi omjer signala i šuma. Smatra se da je za LOQ potreban omjer $S/N > 10:1$ [27]. Također, LOQ računski prema jednadžbi (9). Grafički prikaz određivanja granice kvantifikacije nalazi se na **Slici 9**.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (9)$$

Pri čemu je s standardno odstupanje odziva, dok je b nagib pravca kalibracijske krivulje.



Slika 9. Granica detekcije i kvantifikacije [28]

1.8.5 Preciznost

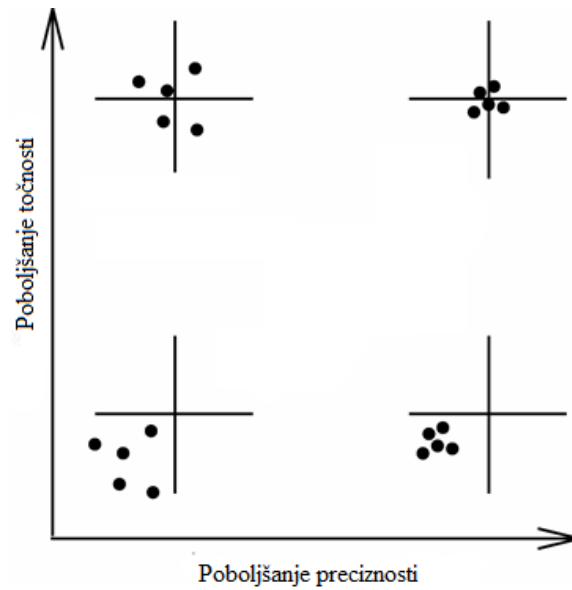
Preciznost analitičkog postupka pokazuje ponovljivost rezultata kroz seriju mjerenja napravljenih višestrukim uzorkovanjem i analiziranjem istog homogenog uzorka. Preciznost se može razmotriti na tri razine: ponovljivost, međupreciznost (unutar laboratorija) i obnovljivost (između laboratorija). Ponovljivost izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala. Određuje se na minimalno 9 priprema uzorka koje pokrivaju radno područje, pri čemu 3 pripreme uzorka za 3 koncentracije ili minimalno 6 priprema na 100 % razini ispitivane koncentracije. Međupreciznost izražava varijacije unutar laboratorija: različiti dani, različiti analitičari, različita oprema, itd. Obnovljivost izražava varijacije između laboratorija, odnosno različitih radnih uvjeta unutar specificiranih parametara metode. Preciznost je sastavni dio validacije metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja. Preporuka je izražavanje rezultata ispitivanja preciznosti kao standardno odstupanje ili relativno standardno odstupanje (RSD) [27].

1.8.6 Točnost

Točnost je stupanj podudaranja između stvarne tj. prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja se dobije primjenom mjernog postupka određeni broj puta. Točnost se izražava kao iskorištenje koje se računa prema sljedećoj jednadžbi (10) :

$$\text{iskorištenje} = \frac{\text{izmjerena koncentracija}}{\text{dodana koncentracija}} \cdot 100 \quad (10)$$

Eksperimenti kojima se određuje točnost provode se tek nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Mjerenje je potrebno ponoviti najmanje tri puta za najmanje tri različite koncentracije, čije se vrijednosti trebaju nalaziti u rasponu koji odgovara stvarnom uzorku [29]. Razlika točnosti i preciznosti dana je na **Slici 10**.



Slika 10. Razlika između preciznosti i točnosti

1.8.7 Radno područje

Radno područje ili područje primjene metode je interval između gornje i donje koncentracije analita, uključujući i te granice, za koje je potvrđena prihvatljiva preciznost, točnost linearnost. Uobičajeno se iskazuje istim jedinicama kao i rezultat analize (npr. u koncentraciji ili udjelu) [27].

2. Opći i specifični ciljevi rada

Tioureja je spoj koji sadrži organski sumpor i smatra se spojem koji može imati ozbiljne ekološke učinke, uočeno je da štetno djeluje na sisavce i nitrifikacijske bakterije. Tioureja je kancerogena i djeluje kao alergen, može uzrokovati poremećaj metabolizma ugljikohidrata i inhibirati nitrifikaciju u tlu i vodi. Unatoč tome, intenzivno se koristi u brojnim industrijskim granama poput industrije galvanizacije, gumarske industrije, izradi fotografija, kao reagens u analitičkoj i organskoj kemiji [30]. U poljoprivredi se koristi kao fungicid, herbicid te rodenticid, kao i za smanjenje sadržaja nitrifikacijskih bakterija u tlu [31]. Uzimajući u obzir fizikalno-kemijska svojstva tioureje te njenu razdiobu kroz različite dijelove okoliša, ona se može naći u tlu te u vodenom okolišu [1].

Upravo zbog navedenog važno je razviti selektivnu, točnu i ponovljivu analitičku metodu koja će nam pružiti vjerodostojne rezultate ispitivanja realnih uzoraka. Kako bi potvrdili da je razvijena metoda prikladna za namjeravanu upotrebu te kako bi bili sigurni da daje pouzdane rezultate potrebno ju je validirati.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- razviti analitičku metodu za određivanje tioureje
- validacijom metode potvrditi njenu prikladnost za određivanje tioureje u realnim uzorcima
- odrediti sadržaj tioureje u realnim uzorcima voda i prirodnim sokovima

3. Materijal i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Standard

U provedenom eksperimentu korišten je standard tioureje ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) proizvođača Sigma Aldrich čija je čistoća $\geq 99,00\%$.

3.1.2. Kemikalije

Za provođenje eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije: acetonitril, amonijev acetat te amonijak. Acetonitril (CH_3CN) je korišten kao pokretna faza B (organska faza) te kod izrade diluenta ($\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}=8:2$) koji je korišten kod razrijeđenja standarda. Proizvođač spomenutog acetonitrila je VWR Chemicals BDH, a njegova čistoća iznosi $\geq 99,5\%$. Amonijev acetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) korišten je za pripravu pokretne faze A (vodene faze) prilikom čega je pripravljena otopina 10 mmol/L amonijeva acetata. Proizvođač je Honeywell Fluka, dok njegova čistoća iznosi $\geq 99,0\%$. Amonijak je bio potreban kako bismo pH-vrijednost pokretne faze A podesili na vrijednost 9,2.

3.1.3. Realni uzorci

U eksperimentalnom radu analizirani su realni uzorci voda i prirodnih sokova. Tri uzorka vode uzeta su iz različitih izvora. Prvi uzorak potječe iz kućanstva (voda iz slavine), drugi uzorak je uzorak izvorske vode uzet na lokaciji Horvati, dok je treći uzorak flaširana prirodna izvorska voda (Kala) kupljena u prodavaonici. Također, analizirani su komercijalni sokovi od naranče proizvođača Vindije i Coca Cola Hrvatska (sok Cappy).

Uzorkovanje navedenih realnih uzoraka provedeno je na sljedeći način. Voda iz slavine puštena je na srednji mlaz nekoliko minuta, nakon čega je uzorak vode iz slavine uzet u bočicu za uzorak. Prije uzimanja uzorka vode iz slavine, slavina je dezinficirana alkoholom kako ne bi došlo ni do kakvog sekundarnog onečišćenja. Za potrebe uzorkovanja korištena je sterilna bočica (koja se može koristiti i za mikrobiološka istraživanja). Kod uzorkovanja izvorske vode sa lokacije Horvati bočica je prethodno isprana nekoliko puta prije nego što je uzet uzorak izvorske vode. Voda je uzeta direktno sa samog izvorišta. U slučaju uzorkovanja

komercijalne vode, bočica je također prethodno isprana sa istom komercijalnom vodom prije nego što je dopunjena do otprilike polovice volumena bočice. Sva tri uzorka vode uzorkovana su datuma 8. ožujka 2021. godine te su sladištena u hladnjaku na temperaturi od oko 5 ° C u periodu od dva dana prije nego li su analizirani. Sokovi od naranče su komercijalnog podrijetla (kupljeni u prodavaonici), a proizvođači su Coca Cola Hrvatska i Vindija. Sva tri analizirana soka su intenzivno narančasto–žute boje. Sok proizvođača Vindija sadrži koncentrirani sok od naranče pri čemu je najmanji udio voća prema deklaraciji 12 %. Sok od naranče Cappy također je proizveden od koncentrata soka naranče, međutim nije naveden udio voća. Sok od naranče sa narančinom pulpom, Cappy, sadrži prema deklaraciji minimalni udio voća od 11 % (od toga minimalni udio voćnog soka 7% te minimalni udio voćne pulpe od 4 %).

3.1.4. Instrumenti

U nastavku slijedi popis korištenih instrumenata sa pripadajućim slikama.

Tehnička vaga EOB120 (**Slika 11.**) s preciznošću 0,01 g proizvođača Ohaus Explorer (Parsippany, NJ, SAD) korištena je za vaganje amonijeva acetata potrebnog za pripremu pokretne faze.



Slika 11. Tehnička vaga Ohaus Explorer (Parsippany, NJ, SAD)

Analitička vaga MSA 2.7S-0CE-DM (**Slika 12.**) kapaciteta 2,1 g, preciznosti 0,1 μg proizvođača Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Goettingen, Njemačka) korištena je za vaganje standarda tioureje za izradu standardnih otopina.



Slika 12. Analitička mikrovaga Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Goettingen, Njemačka)

pH-metar 691 (**Slika 13.**) proizvođača Metrohm (Herisau, Švicarska) korišten je u postupku podešavanja pH-vrijednosti vodene pokretne faze (otopine amonijeva acetata) na vrijednost 9,2



Slika 13. pH-metar Metrohm (Herisau, Švicarska)

Ultrazvučna kupelj Sonorex Digitec (**Slika 14.**) proizvođača Bandelin Electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Njemačka) korištena je prilikom izrade standardnih otopina tioureje. Nakon otapanja tioureje u izabranom diluentu, standardi su stavljeni na ultrazvučnu kupelj koja je pospješila njihovo otapanje.



Slika 14. Ultrazvučna kupelj Sonorex Digitec (Bandelin, Berlin, Njemačka)

U radu je korištena ultračista voda koja je pripravljena na uređaju za pripremu MilliQ ultračiste vode Advantage A10 (**Slika 15.**) proizvođača Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, SAD).



Slika 15. uređaju za pripremu MilliQ ultračiste vode Advantage A10 (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, SAD)

Za kromatografsko određivanje tioureje korištene je uređaj UHPLC 1290 II Infinity (Slika 16.) proizvođača Agilent Technologies (Santa Clara, California, SAD).



Slika 16. UHPLC 1290 II Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD)

Prikazani instrument sastoji se od binarne pumpe pomoću koje se generira pritisak. Binarna pumpa (1290 Infinity II High Speed Pump) stvara pritisak na otapalo kako bi moglo proći kroz kromatografsku kolonu. Navedena pumpa može ostvariti pritisak do 1300 bara te brzine protoka do visokih 5 mL/min te ima izrazito mali volumen kašnjenja u iznosu 10 μ L što omogućuje brze gradijente. Zadatak injektora je ubrizgavanje tekućeg uzorka u pokretnu fazu. Korišteni injektor omogućava ubrizgavanje tekućeg uzorka u rasponu od 0,1 do 100 mL pod visokim tlakom. Detektor je dio HPLC uređaja koji se koristi za detektiranje komponenti eluiranih iz kolone.. HPLC uređaj na kojem su provedene analize vezan je s DAD detektorom koji ima mogućnost mjerenja cijelog raspona valnih duljina u stvarnom vremenu. Jedna od brojnih prednosti DAD detektora je mogućnost otkrivanja nepoznatih pikova na kromatografskoj krivulji (za potpunu potvrdu trebala bi se svakako provesti analiza spektrometrom masa). Svakako je potrebno spomenuti kromatografsku kolonu čiji je važan zadatak odvajanje komponenti uzorka [32].

3.2. Metoda rada

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardna otopina tioureje pripravljena je na sljedeći način: U tikvicu od 100 mL na analitičkoj vagi Sartorius izvagano je 10 mg standarda tioureje. Tikvica je dopunjena diluentom do oznake te stavljena pet minuta u ultrazvučnu kupelj. Potom je iz pripravljene otopine (0,1 mg/mL) uzet 1 mL otopine u tikvicu od 25 mL kako bismo pripravili otopinu koncentracije 4 mg/L. Također, pripravljeno je šest otopina različitih koncentracija tioureje 5 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L te 0,1 mg/L. Pripravljene otopine korištene su u svrhu ispitivanja linearnosti. U tikvicu od 100 mL na analitičkoj vagi izvagano je 5 mg tioureje te je tikvica dopunjena diluentom i stavljena 5 minuta na ultrazvučnu kupelj. Iz pripravljene otopine (0,05 mg/mL) uzeto je 10 mL otopine staklenom pipetom, preneseno u tikvicu od 100 mL i nadopunjeno diluentom čime je dobivena otopina 5 mg/L. Iz otopine koncentracije 5 mg/L uzeto je 40 mL otopine te je dopunjeno u tikvici od 50 mL čime je pripravljena otopina koncentracije 4 mg/L. Iz iste tikvice uzet je volumen otopine od 12,5 mL te prenesen i razrijeđen u tikvici od 25 mL kako bi se dobila otopina koncentracije 2 mg/L. Otopine koncentracije 1 mg/L, 0,5 mg/L te 0,1 mg/L pripravljene su na način da je staklenom pipetom prenesen volumen od 10 mL, 5 mL te 1 mL iz prethodno pripravljene otopine u tikvice od 20 mL, 10 mL i 5 mL te dopunjen diluentom. Otopina tioureje koncentracije 0,1 mg/L pripravljena je šest puta, a pripravljene otopine korištene su za procjenu granice detekcije i granice kvantifikacije.

3.2.2. Priprema realnih uzoraka

Uzorci sokova od naranče su prije kromatografske analize zahtijevali centrifugiranje. Pet mL uzorka stavljeno je u kivetu te centrifugirano u trajanju od 10 minuta na 5000 okretaja.

Dodatno, pripravljene su obogaćeni uzorci (eng. *spiked samples*) sokova na način da je direktno u vial dodano 100 μ L soka te 900 μ L prethodno pripravljene otopine tioureje koncentracije 0,1 mg/L. Obogaćeni uzorci korišteni su za procjenu točnosti.

Uzorci vode nisu zahtijevali pripremu, izravno su injektirani u kromatografski sustav.

3.2.3. Priprema pokretne faze

Pokretna faza sastojala se od vodene faze – 10 mmol/L amonijevog acetata (A), pH=9,2, i organske faze – acetonitril (ACN) (B).

Pripravljena je 1 L otopine amonijevog acetata koncentracije 10 mmol/L i pH-vrijednosti 9,2. U odmjernu tikvicu od 1 L izvagano je 0,77 g amonijevog acetata na tehničkoj vagi Ohaus Explorer te je tikvica dopunjena ultračistom vodom do oznake i stavljena u ultrazvučnu kupelj. Potom je uslijedilo podešavanje pH-vrijednosti na odgovarajuću vrijednost od 9,2 dodavanjem razrijeđene otopine amonijaka.

3.2.4. Kromatografsko određivanje

Za određivanje tioureje u uzorcima sokova i vode korištena je UHPLC-DAD metoda razvijena i validirana u ovom radu. Mjerenje je provedeno na UHPLC instrumentu korištenjem prethodno opisne pokretne faze uz izokratno eluiranje te korištenjem kromatografske kolone Acquity UPLC BEH proizvođača WatersTM. Vrsta punila izabrane kromatografske kolone je Amide, dimenzije kolone su 150 x 2,1 mm, dok veličina čestica iznosi 1,7 µm. Izabrana kolona prikladna je za UHPLC analizu zbog svojih malih dimenzija te male veličine čestica čime se postižu veći tlakovi te smanjeno vrijeme analize. Izabrano punilo podržava rad pri povišenim pH-vrijednostima (do pH=11). U **Tablici 2.** prikazani su optimalni eksperimentalni uvjeti kromatografskog određivanja tioureje pri kojima su provedeni eksperimenti opisani u ovom radu.

Tablica 2. Kromatografska metoda za određivanje tioureje

Pokretna faza A		10 mmol/L amonijev acetat pH=9,2	
Pokretna faza B	ACN		
Protok (mL/min)	0,150		
Valna duljina (nm)	242		
Temperatura kolone (°C)	30		
Volumen injektiranja (µL)	1		
Eluiranje	Izokratno	Vrijeme/ min	%B
		0	70
		5	70

3.2.5. Validacija metode

Validacijom UHPLC metode ispitane su izvedbene karakteristike: selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, preciznost i točnost.

Za provjeru linearnosti analizirane su standardne otopine tioureje koncentracija 5 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L te 0,1 mg/L. Detaljan postupak pripreve navedenih otopina opisan je u poglavlju Metoda rada.

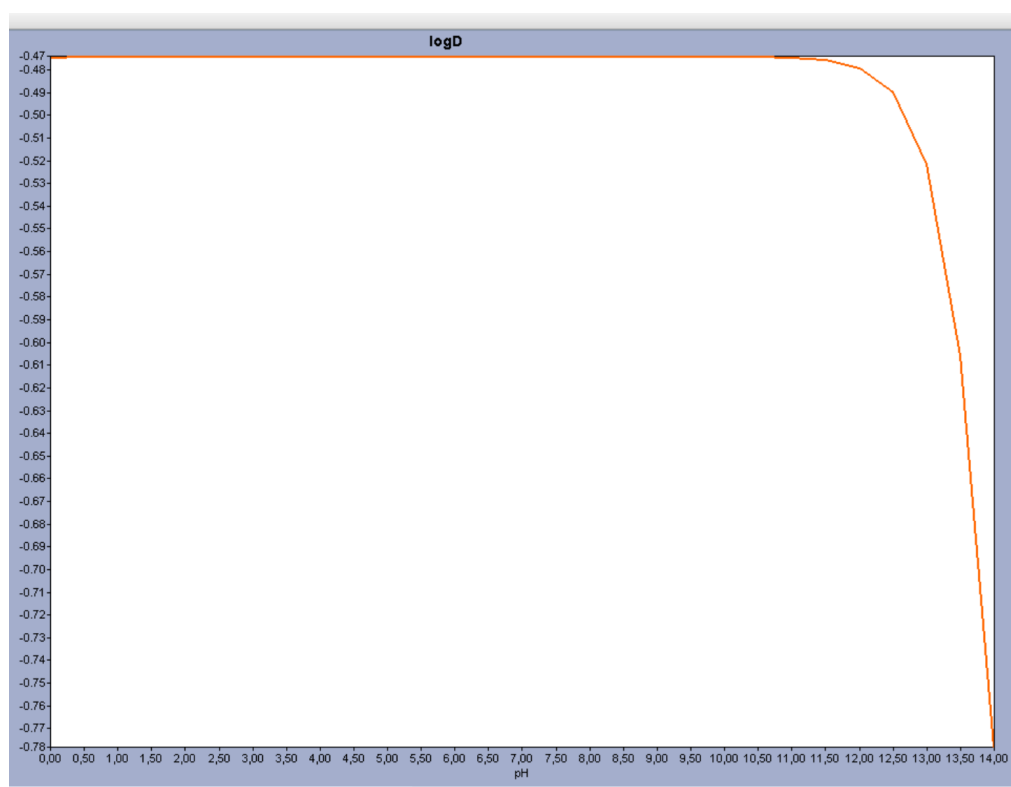
Za provjeru preciznosti pripravljeno je šest kontrolnih otopina standarda tioureje koncentracije 0,1 mg/L. U tikvice od 100 mL izvagano je 1 mg standarda tioureje na analitičkoj mikrovagi, dopunjeno do oznake diluentom te stavljeno na ultrazvučnu kupelj. Iz pripravljene otopine uzet je 1 mL staklenom pipetom te prenesen u tikvicu od 100 mL i nadopunjen diluentom do oznake čime je dobivena koncentracija 0,1 mg/L.

Granica detekcije provjerena je otopinama standarda koncentracije 0,1 mg/L čiji je volumen injektiranja bio 0,5 μ L (pola od volumena injektiranja ostatka analiziranih uzoraka).

4. Rezultati i rasprava

4.1 Odabir pokretne faze

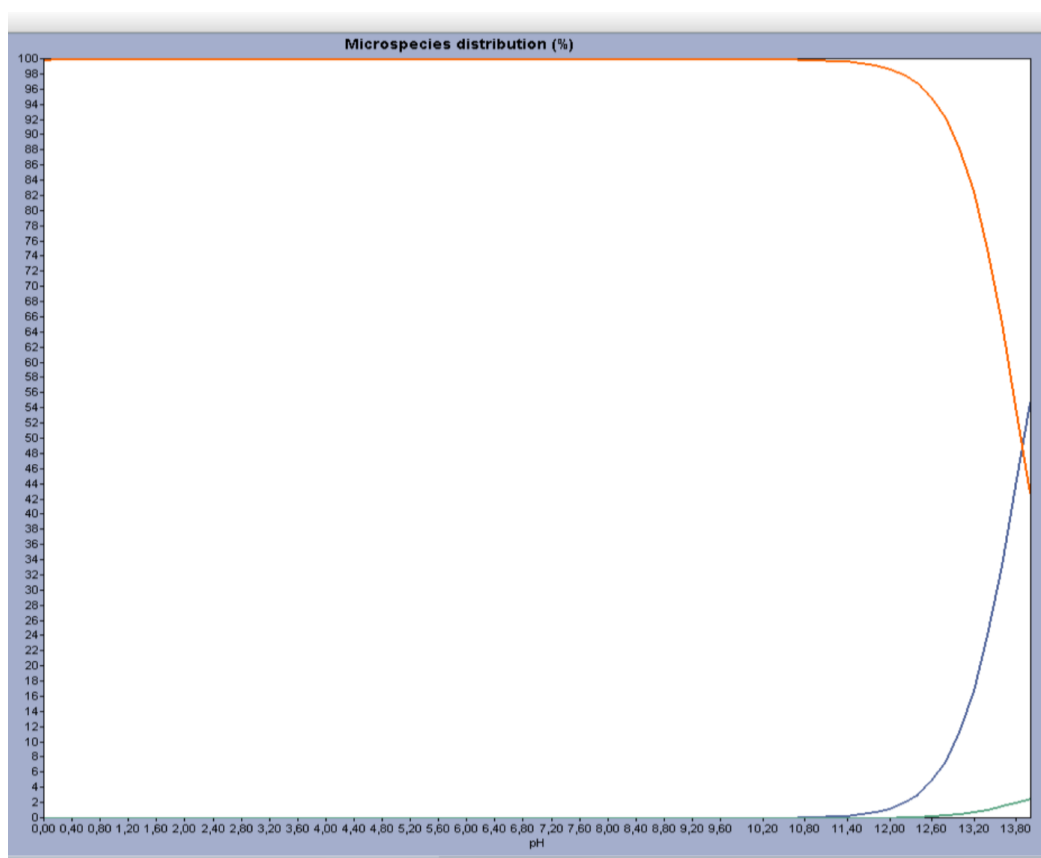
Pokretna faza za kromatografska određivanja sastoji se od vodene i organske faze. Organska faza uobičajeno je neko organsko otaplo poput acetonitrila ili metanola. U ovom radu za organsku fazu izabran je acetonitril. Kod izbora vodene faze ključan je odabir odgovarajuće pH-vrijednosti. Za odabir pH-vrijednosti vodene pokretne faze korišten je programski dodatak Marvin Sketch. U navedenom programskom dodatku nacrtana je analizirana molekula tioureje. Grafički su prikazane ovisnosti pH-vrijednosti o veličini $\log D$ (Slika 17.) te pH vrijednosti o veličini pK_a (Slika 18.).



Slika 17. Ovisnost $\log D$ o pH-vrijednosti za molekulu tioureje

Ispravan odabir pH-vrijednosti ključan je kako bi razvijena metoda bila uspješna. Budući da većina analiziranih spojeva sadrži kisele ili bazične funkcionalne skupine, kontrola pH-vrijednosti pokretne faze je nužna. Vodena otopina tioureje ima pH-vrijednost u kiselom području pH-skale s vrijednošću nešto višom od 3. Kada se molekula s kiselom funkcionalnom skupinom nalazi u području 2 pH-jedinice iznad njene pK_a vrijednosti ona će biti >99,0 % ionizirana, odnosno u području 2 pH-jedinice ispod njene pK_a vrijednosti bit će u neioniziranom obliku. Neionizirana molekula će stoga biti manje polarna što će rezultirati dužim vremenom zadržavanja. Nužno je osigurati da pH-vrijednost pokretne faze ne bude

blizu pK_a vrijednosti, jer će navedeno dovesti do velikih promjena u zadržavanju što za posljedicu ima nerobusnu metodu. Također, svakako je važno da izabrana pH-vrijednost ne bude previsoka zbog stabilnosti većine kromatografskih kolona te njihova vijeka trajanja.



Slika 18. Ovisnost pK_a o pH-vrijednosti za molekulu tioureje

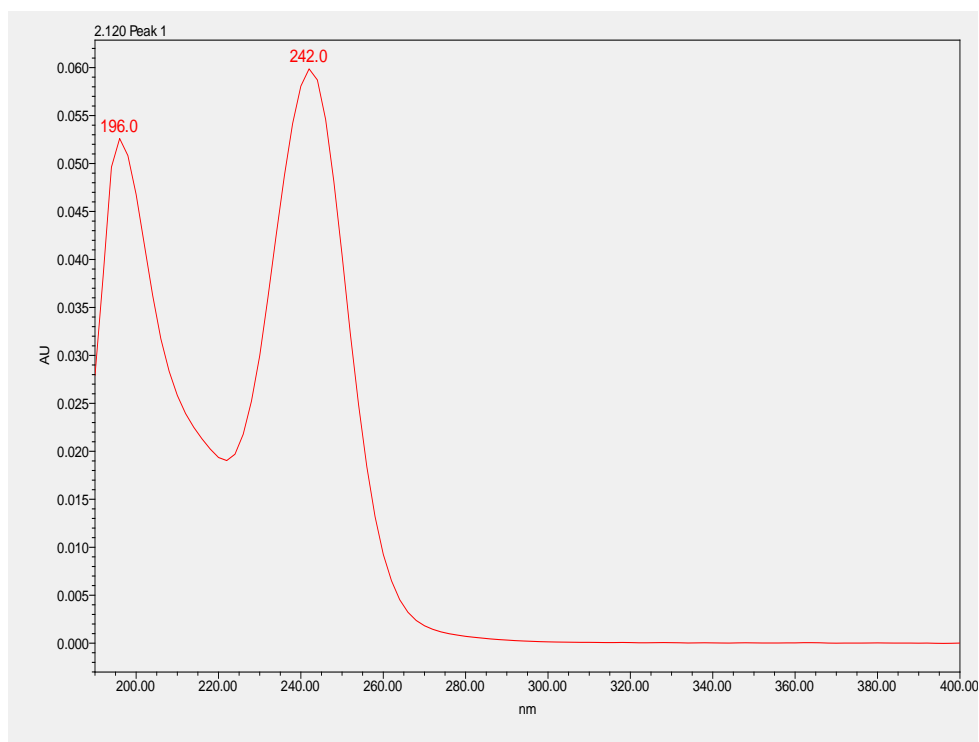
Kod provedbe analize izabran je izokratni način eluiranja. Za izokratno eluiranje karakterističan je konstantan sastav pokretne faze, dok kod gradijentnog eluiranja to nije slučaj te se udio otapala koja čine pokretnu fazu mijenja s vremenom čime se mijenja i polarnost pokretne faze koja se može povećavati ili smanjivati tijekom analize. Glavni razlog odabira izokratnog eluiranja je njegova jednostavnost te prilagodljivost metodi. Jedan od važnijih čimbenika koji tjeraju analitičare na gradijentno eluiranje je postojanje višekomponentnih uzoraka koje je teško razdvojiti primjenom izokratnog eluiranja (što u našoj analizi nije slučaj). Također, važan čimbenik koji je pridonio odabiru izokratnog nad gradijentnim eluiranjem je afinitet analita (tioureje) prema nepokretnoj fazi. Sastav pokretne faze kod izokratnog eluiranja dobiven je prethodnim gradijentnim eluiranjem prilikom čega je načinjeno 'skeniranje'. Literaturni prijedlog [33] je sljedeći: sastav pokretne faze prilikom gradijentnog eluiranja u trenutku $t_R - 2,5t_0$ je očekivana početna točka kod izokratnog eluiranja, što se u našem slučaju pokazalo točnim.

4.2 Odabir kromatografske kolone

Kod odabira kromatografske kolone važno je uzeti u obzir nekoliko važnih parametara. To su tip punila kromatografske kolone, veličina čestica te dimenzije same kolone. Budući da je u ovom radu razvijena kromatografska metoda ultra-visoke djelotvornosti koja omogućava kraće vrijeme analize, uz razlučivost i osjetljivost znatno boljima nego kod HPLC metoda. Za potrebe UHPLC analiza razvijene su kolone punjene nepokretnom fazom malih veličina čestica (oko 1,7 μm) čime se postižu tlakovi do 1000 bara. U razvoju metode za određivanje tioureje stoga je izabrana UHPLC kolonu, u kojoj je veličina čestica punila 1,7 μm , a dimenzije kolone su 2,1 x 150 mm. Kao tip punila izabran je BEH Amide koji podržava široki raspon pH-vrijednosti pokretne faze (od 2-11) te olakšava zadržavanje polarnih analita.

4.3 Odabir valne duljine

Optimalna valna duljina detekcije tioureje određena je korištenjem DAD detektora kojim se detektira apsorpcija zračenja vidljivog i ultraljubičastog dijela spektra zračenja. Valna duljina pri kojoj molekula tioureje ostvaruje apsorpcijski maksimum je valna duljina koju izabiremo za provođenje kromatografske analize. Snimljen je apsorpcijski spektar tioureje (**Slika 19.**) na kojem se mogu uočiti dva maksimuma, pri 196,0 nm i 242,0 nm. Za detekciju ispitivanog analita, tioureje, izabrana je valna duljina od 242 nm.



Slika 19. Apsorpcijski spektar tioureje

4.4 Validacija metode

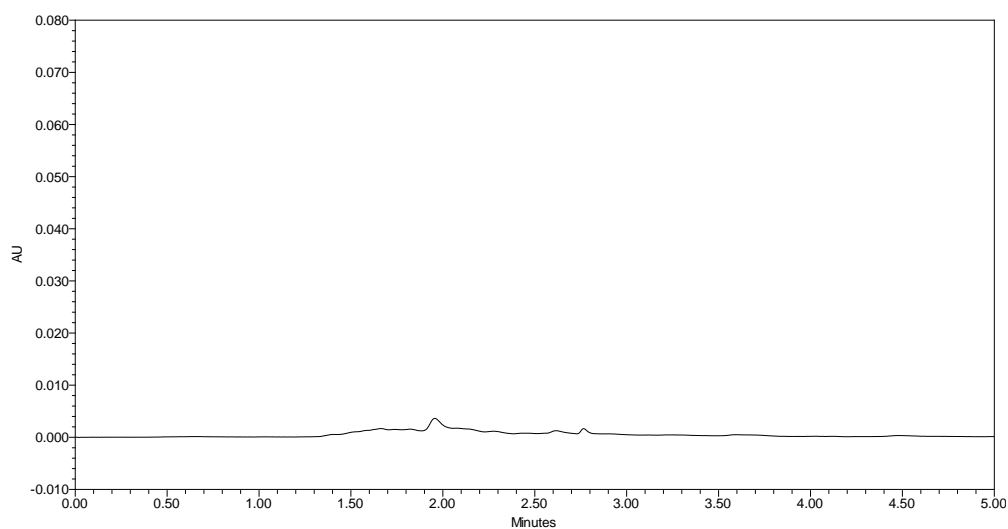
Prvi korak u validaciji metode je definiranje parametara koji će se ispitati te kriterija prihvatljivosti za izabrane parametre. Izabrani parametri i kriteriji prihvatljivosti prikazani su u **Tablici 3**. Kriteriji prihvatljivosti izabrani su na temelju literaturnih podataka (granica detekcije) te iskustva i dobre laboratorijske prakse (ostali parametri).

Tablica 3. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

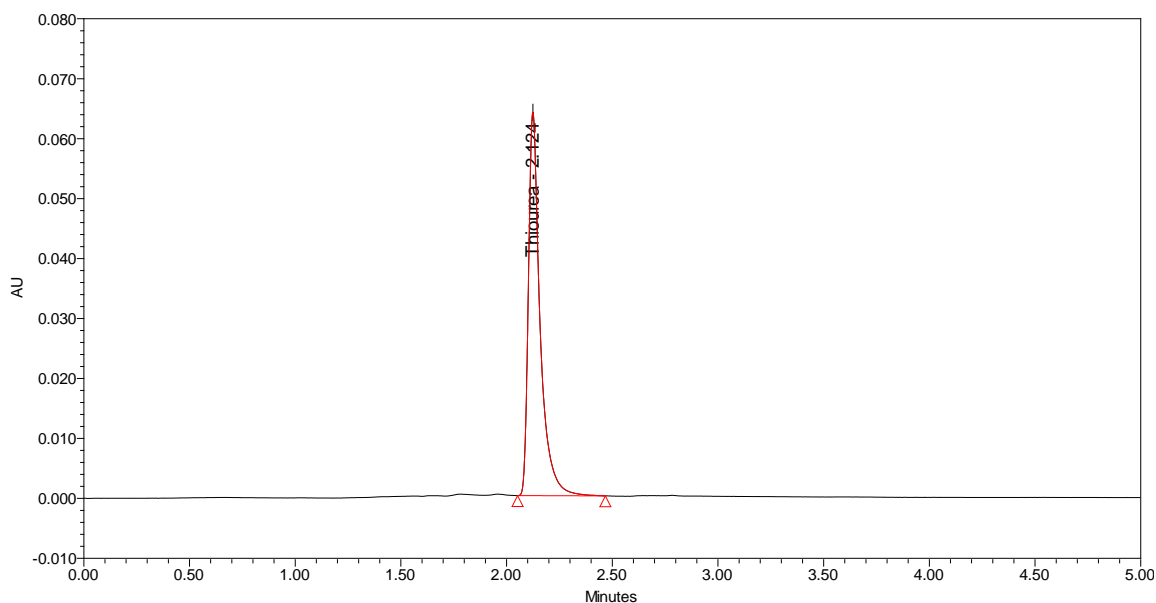
Parametar validacije	Kriterij
Selektivnost	informacija
Linearnost	$R^2 > 0,999$
Granica detekcije	0,1 mg/L [1]
Granica kvantifikacije	0,3 mg/L
Ponovljivost	RSD < 10 %
Točnost (iskazano kao iskorištenje)	$75 \% < R < 120 \%$ [29]

4.4.1 Selektivnost

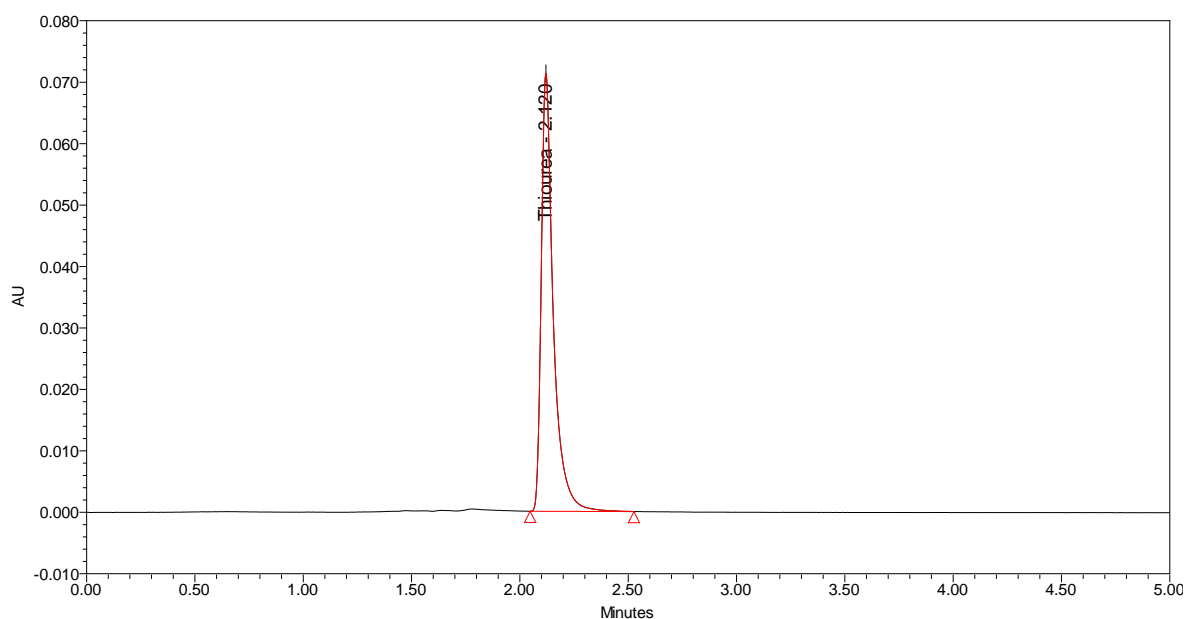
Ispitivanje selektivnosti metode provedeno je s uzorkom soka Cappy, kao primjerom realnog uzorka. U tu svrhu, snimljeni su i uspoređeni kromatogrami realnog uzorka soka, obogaćnog realnog uzorka soka (5,0 mg/L) i pripravljenog standarda tioureje koncentracije 5,0 mg/L (**Slike 20. – 22.**).



Slika 20. Kromatogram realnog uzorka soka Cappy

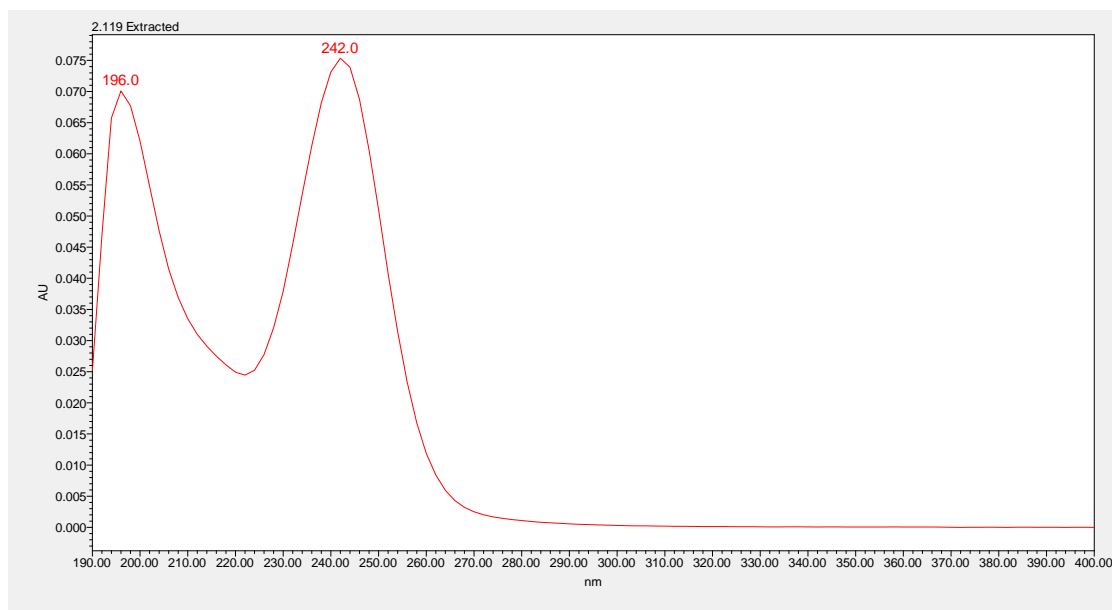


Slika 21. Obogaćeni uzorak soka Cappy pri koncentraciji 5,0 mg/L

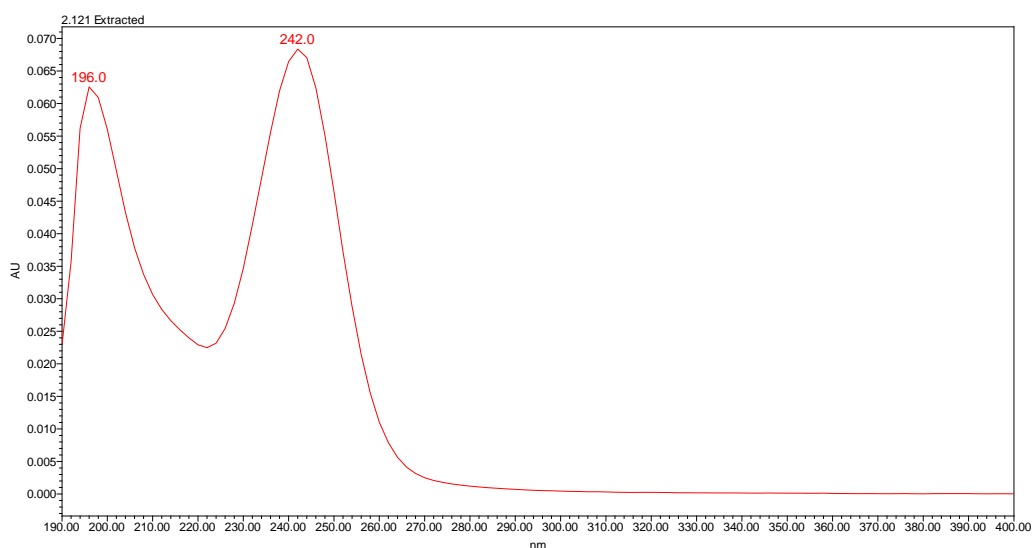


Slika 22. Standardna otopina tioureje koncentracije 5,0 mg/L

Također, na **Slikama 23.** te **24.** prikazani su apsorpcijski spektri u kromatografskom piknu za uzorak soka Cappy obogaćenog tiourejom pri koncentraciji 5,0 mg/L i standardnu otopinu tioureje koncentracije 5,0 mg/L.



Slika 23. Apsorpcijski spektar za standardnu otopinu tioureje koncentracije 5,0 mg/L



Slika 24. Apsorpcijski spektar za obogaćeni uzorak soka Cappy pri koncentraciji 5,0 mg/L

Kako se može uočiti iz dobivenih rezultata u slijepom uzorku nema pikova u blizini vremena zadržavanja tioureje, vremena zadržavanja tioureje za obogaćeni uzorka soka i standard se ne razlikuju. Nadalje, spektri standarda tioureje i tioureje u voćnom soku se ne razlikuju. Na temelju navedenoga potvrđena je selektivnost metode.

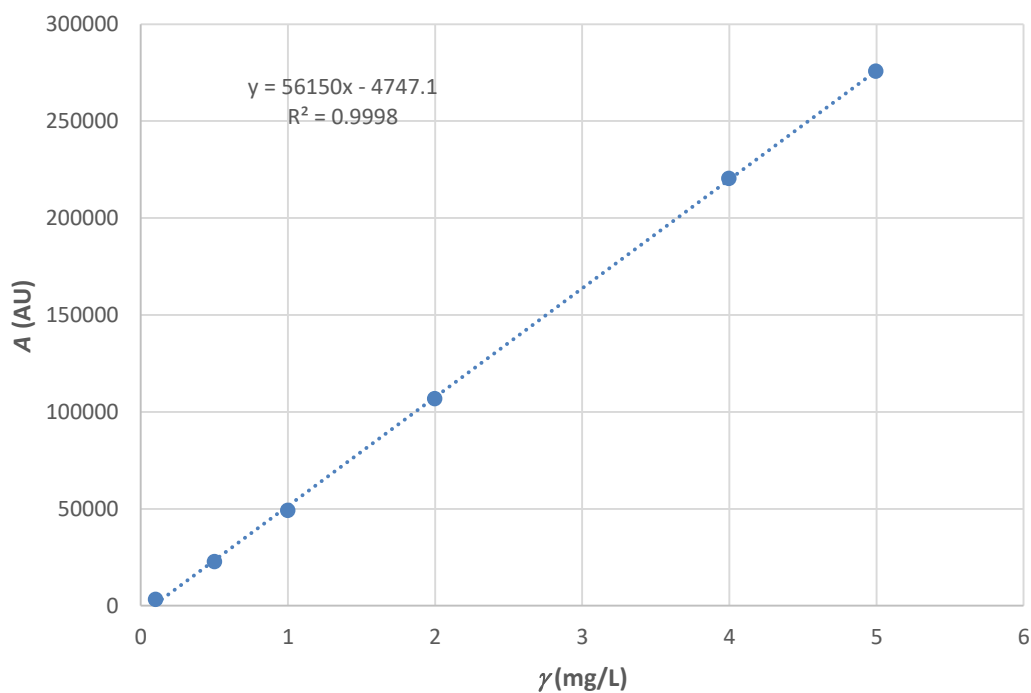
4.4.2 Linearnost

Za ispitivanje linearnosti korištene su pripravljene standardne otopine tioureje koncentracija 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 4,0 mg/L te 5,0 mg/L. Mjerenjem odziva

instrumenta (površina ispod kromatografskog pika, A) za pripravljene otopine (**Tablica 4.**) i grafičkim prikazom dobivenih rezultata u ovisnosti o koncentraciji dobivena je kalibracijska krivulja. Jednadžba pravca koji opisuje eksperimentalne podatke određena je metodom linearne regresije čime je dobivena jednadžba $y = 56150 \cdot x - 4747,1$ uz koeficijent determinacije $R^2 = 0,9998$. Kalibracijska krivulja prikazana je da **Slici 25.**

Tablica 4. Rezultati određivanja linearnosti

γ (mg/L)	A (AU)
5,0	275,801
4,0	220,373
2,0	106,810
1,0	49,260
0,5	22,808
0,1	3,253



Slika 25. Kalibracijski pravac

4.4.3 Granica detekcije

Granica detekcije izračunata je prema jednadžbi (8). Točne vrijednosti standardnog odstupanja (s) te nagiba kalibracijskog pravca (b) izračunate su pomoću programskog dodatka *Data Analysis* koji se nalazi unutar MS Office Excel-a i iznose:

$$b = 56150$$

$$s = 1047,45$$

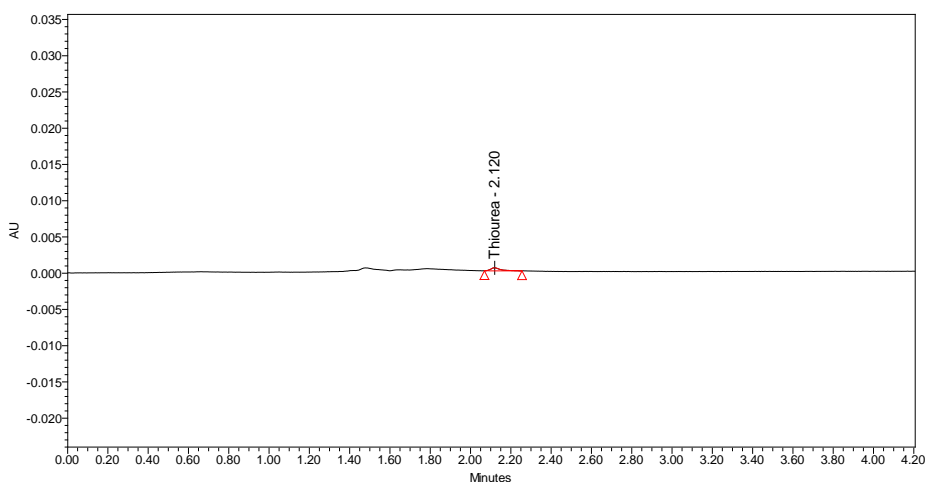
Računski određena granica detekcije iznosi: LOD = 0,06 mg/L

4.4.4 Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije izračunata je pomoću jednadžbe (9) korištenjem vrijednosti za s i b kao i kod izračuna granice detekcije.

Računski određena granica kvantifikacije iznosi: LOQ = 0,19 mg/L

Kako je navedeno u teorijskom dijelu, granicu kvantifikacije moguće je odrediti iz omjera signala i šuma (S/N). Na **Slici 26.** prikazan je kromatogram standarda tioureje pri koncentraciji 0,1 mg/L za koju je omjer S/N=25. S obzirom na visoku vrijednost S/N, odlučeno je ovu koncentraciju ispitati kao granicu kvantifikacije.



Slika 26. Kromatogram standarda tioureje pri koncentraciji od 0,1 mg/L

4.4.5 Preciznost

Preciznost je ispitana kao ponovljivost u mjerenju vremena zadržavanja i površine ispod kromatografskog pika tioureje za ponovljena injektiranja standardne otopine. Ponovljivost je ispitana sa standardnom otopinom tioureje koncentracije 0,1 mg/L. Način pripreve opisan je u poglavlju 3.2.5. U **Tablici 5.** prikazani su rezultati ispitivanja ponovljivosti za vrijeme zadržavanja te površinu ispod kromatografskog pika tioureje.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja ponovljivosti

Broj injektiranja	t_R (min)	A (AU)
1	2.122	3130
2	2.123	3097
3	2.121	3114
4	2.122	3127
5	2.12	3024
6	2.121	3063
Srednja vrijednost:	2.1215	3092.5000
SD:	0.0010	41.5728
RSD, %:	0.05	1.34

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da relativno standardno odstupanje (RSD) mjerenja vremena zadržavanja za ponovljena injektiranja iznosi 0,05 % što zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD < 10\%$), dok RSD mjerenja površine ispod pika za ponovljena injektiranja iznosi 1,34 % što također zadovoljava kriterij prihvatljivosti.

4.4.6 Točnost

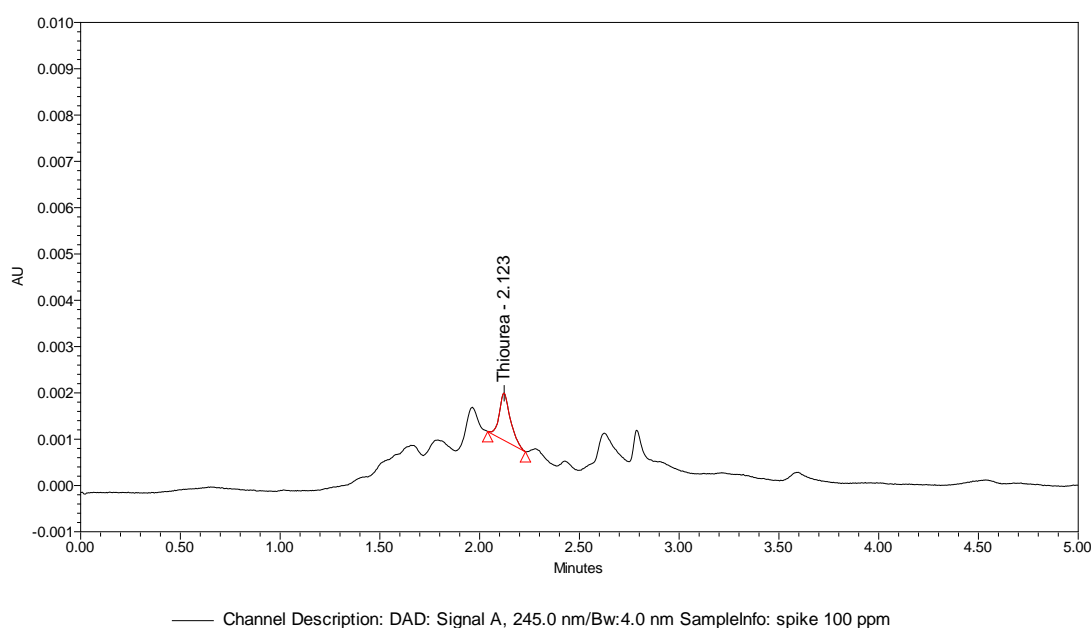
Točnost određivanja tioureje razvijenom metodom provjerena je analizom obogaćenih realnih uzoraka sokova i iskazana kao iskorištenje.

U **Tablici 6.** dani su rezultati provedene analize točnosti (iskazani kao iskorištenje), a na slikama koje slijede kromatogrami obogaćenih uzoraka sokova (**Slike 27. – 32.**). Iskorištenje je računato prema jednadžbi (10).

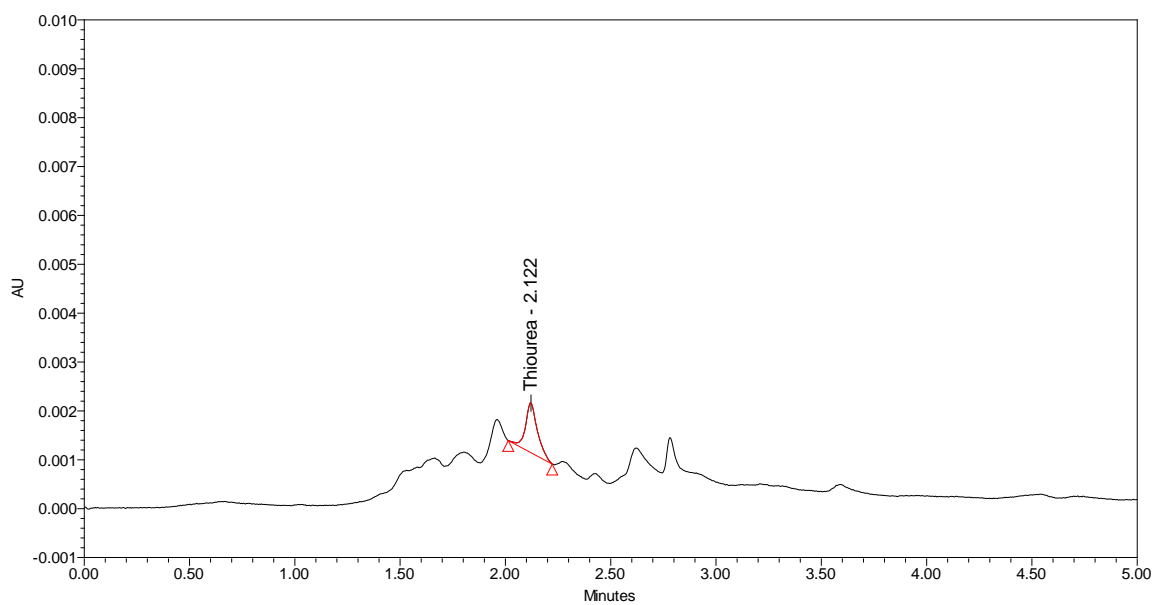
Tablica 6. Iskorištenje obogaćenih realnih uzoraka

Uzorak	Sok – Cappy	Sok – Cappy Pulpy	Sok – Vindija
A (AU) (0,1 mg/L)	2789	3998	4022
A (AU) (5,0 mg/L)	245791	246436	249427
Određena koncentracija za 0,1 mg/L	0,0001256	0,0001457	0,0001461
Određena koncentracija za 5,0 mg/L	0,004175	0,004186	0,004236
Iskorištenje (%) za koncentraciju 0,1 mg/L	125,6	145,7	146,1
Iskorištenje (%) za koncentraciju 5 mg/L	83,5	83,7	84,7

Koncentracije obogaćenih uzoraka izračunate su korištenjem jednadžbe kalibracijskog pravca koja glasi $y = 56150 \cdot x - 4747,1$.

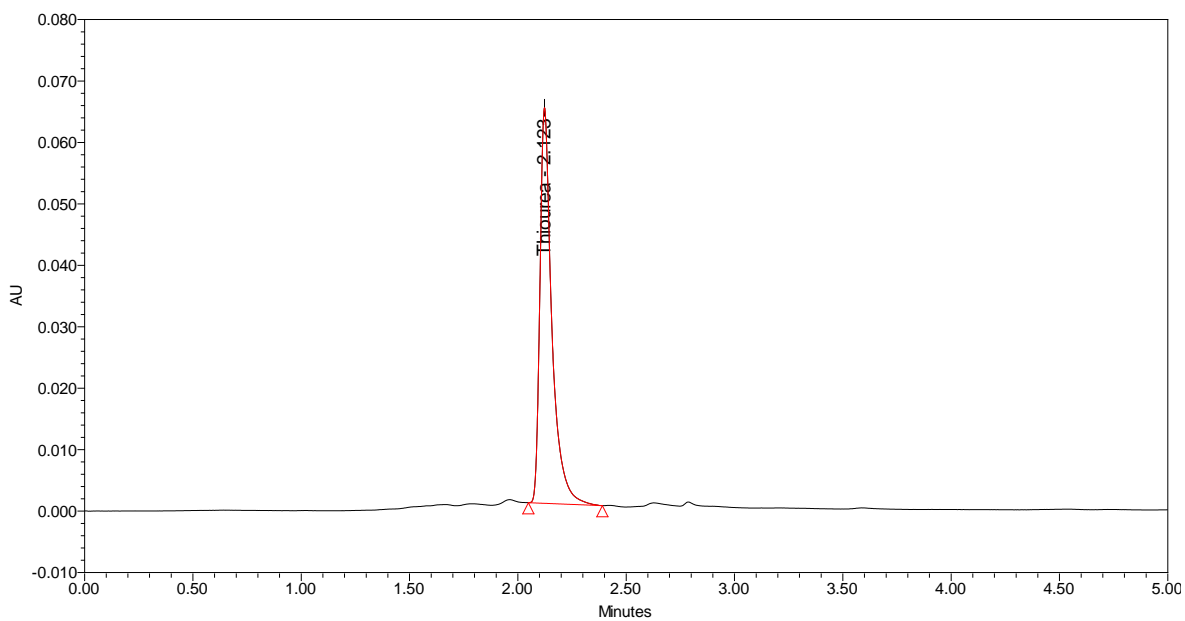


Slika 27. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Cappy Pulpy (0,1 mg/L)



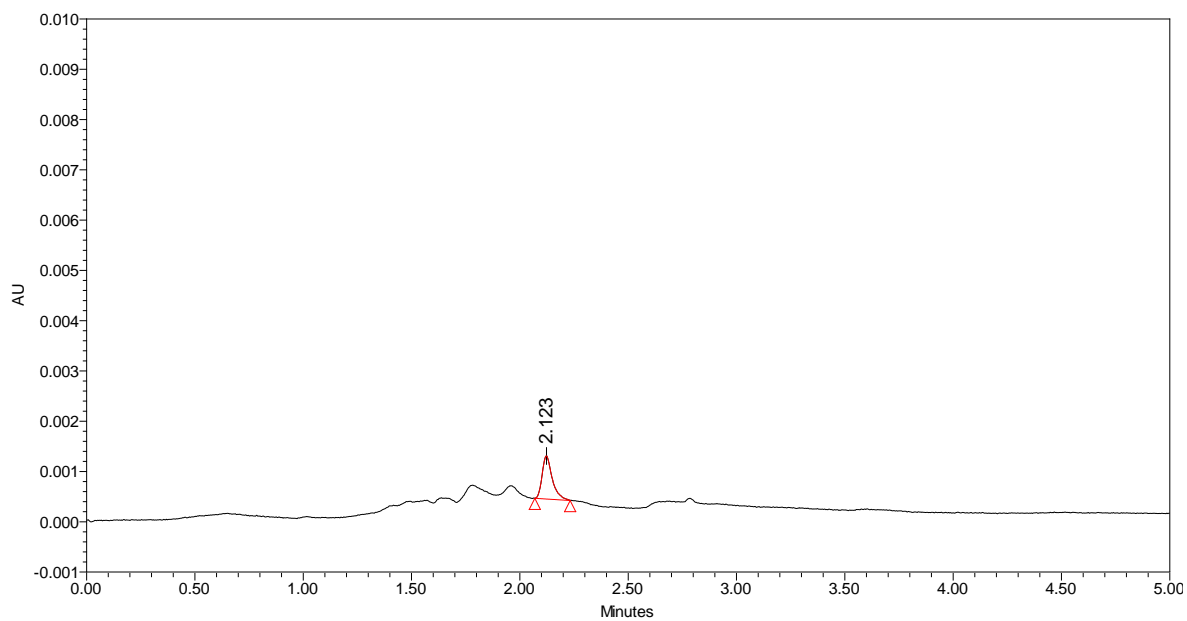
Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: spike 100 ppm

Slika 28. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Vindija (0,1 mg/L)

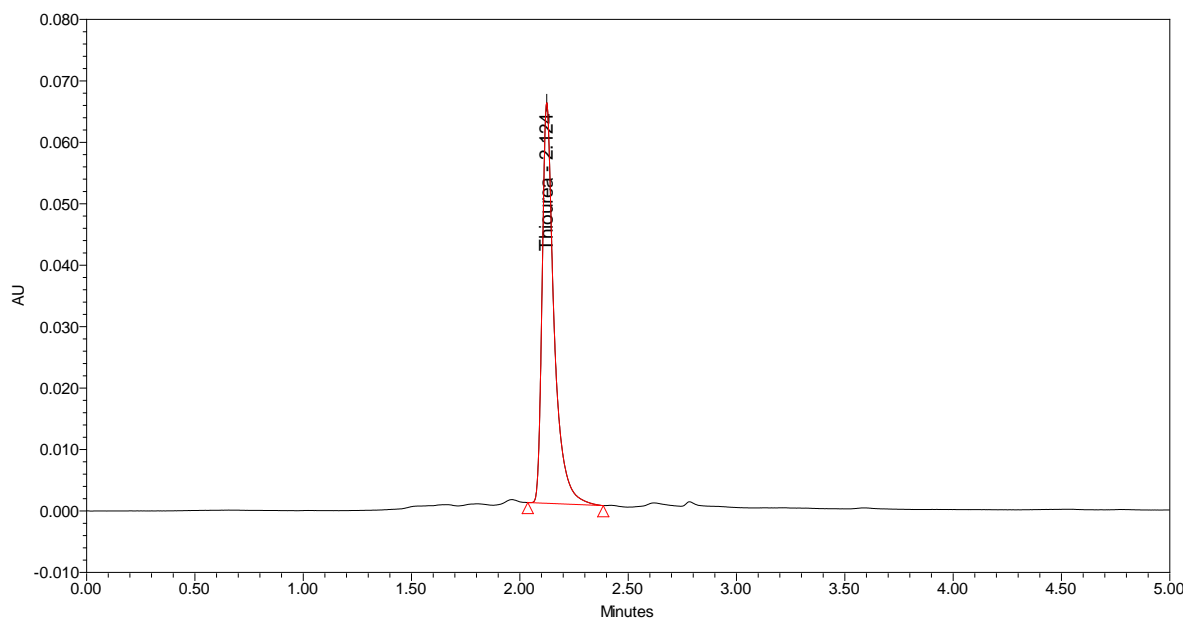


Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: spike 5000 ppm

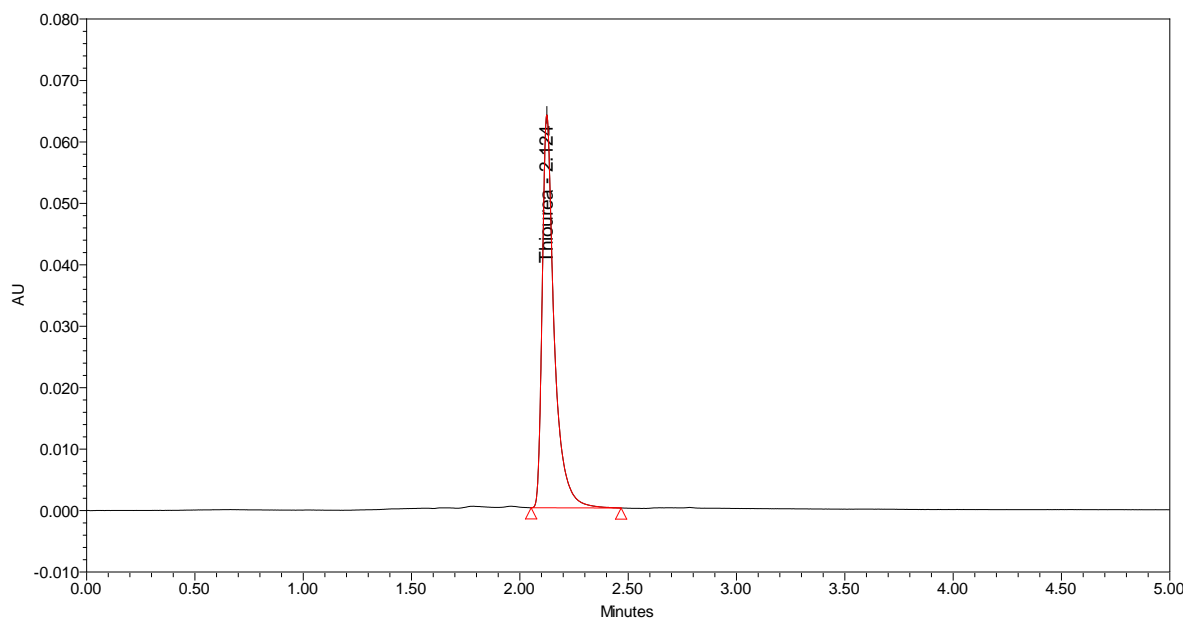
Slika 29. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Cappy Pulpy (5,0 mg/L)



Slika 30. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Cappy (0,1 mg/L)



Slika 31. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Vindija (5,0 mg/L)



Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: spike 5000 ppm

Slika 32. Kromatogram obogaćenog uzorka soka Cappy (5,0 mg/L)

4.5 Analiza rezultata validacije metode

Rezultati validacije sumirani su u **Tablici 7.** uključujući postavljene kriterije prihvatljivosti.

Tablica 7. Rezultati validacije i kriteriji prihvatljivosti

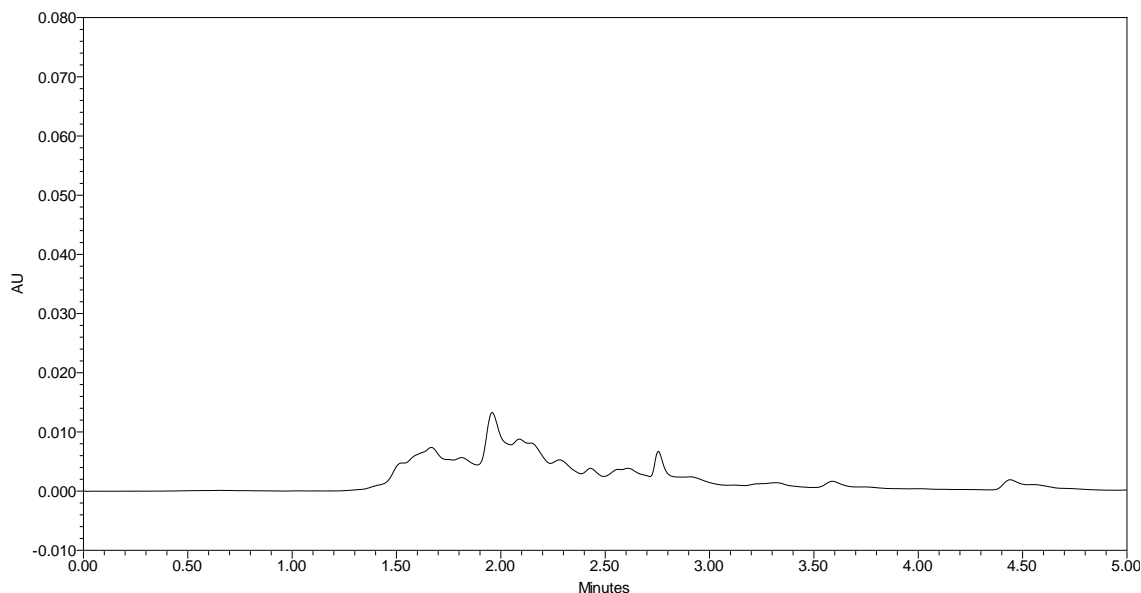
Parametar validacije	Kriterij	Rezultati
Selektivnost	informacija	Selektivna metoda
Linearnost	$R^2 > 0,999$	0,9998
Granica detekcije	0,1 mg/L	0,06 mg/L
Granica kvantifikacije	0,3 mg/L	0,1 mg/L
Ponovljivost za površinu ispod pika	RSD < 10 %	1,34 %
Ponovljivost za vrijeme zadržavanja	RSD < 10 %	0,05 %
Točnost (iskorištenje) za Cappy	75 % < R < 120 %	83,5 < R < 125,6
Točnost (iskorištenje) za Cappy PL.	75 % < R < 120 %	83,7 < R < 145,7
Točnost (iskorištenje) za Vindiju	75 % < R < 120 %	84,7 < R < 146,1

Rezultati provjere točnosti i preciznosti pri koncentraciji 0,1 mg/L potvrdili su navedenu koncentraciju kao granicu kvantifikacije.

Usporedbom rezultate validacije razvijene metode s postavljenim kriterijima prihvatljivosti (**Tablica 7**) vidljivo je da su zadovoljeni postavljeni kriteriji za sve izvedbene karakteristike metode, osim za točnost. Na temelju toga može se zaključiti da je metoda prikladna za određivanje tioureje u rasponu koncentracija 0,1 mg/L do 5,0 mg/L, uzimajući u obzir korekciju iskorištenja. U ovome slučaju značajnije odstupa obogaćeni uzorak soka Vindija, a potencijalno objašnjenje bi moglo biti u postojanju zamijećenih šumova u kromatogramu spomenutog soka, što nam ukazuje na potrebu za efektivnijim postupcima pripreme uzoraka soka čime bismo učinak matrice sveli na minimum.

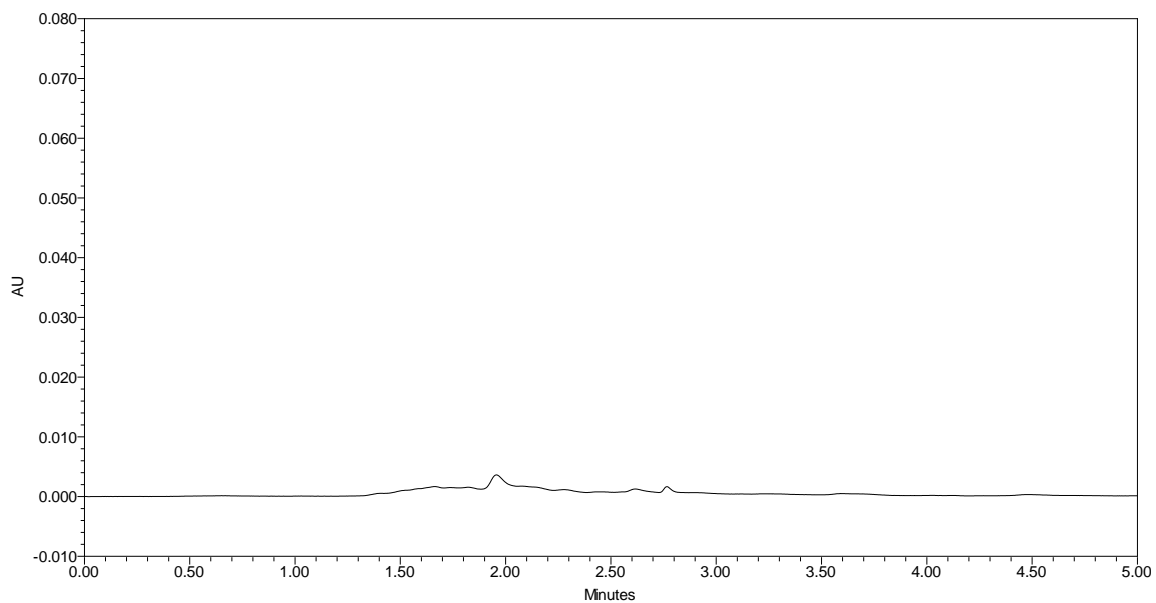
4.6 Analiza realnih uzoraka

Nakon razvoja i validacije metode provedena je analiza realnih uzoraka vode i voćnih sokova. Dobiveni kromatogrami prikazani su na **Slikama 32. – 34.** za uzorke voćnih sokova te **Slikama 35. – 37.** za uzorke voda.



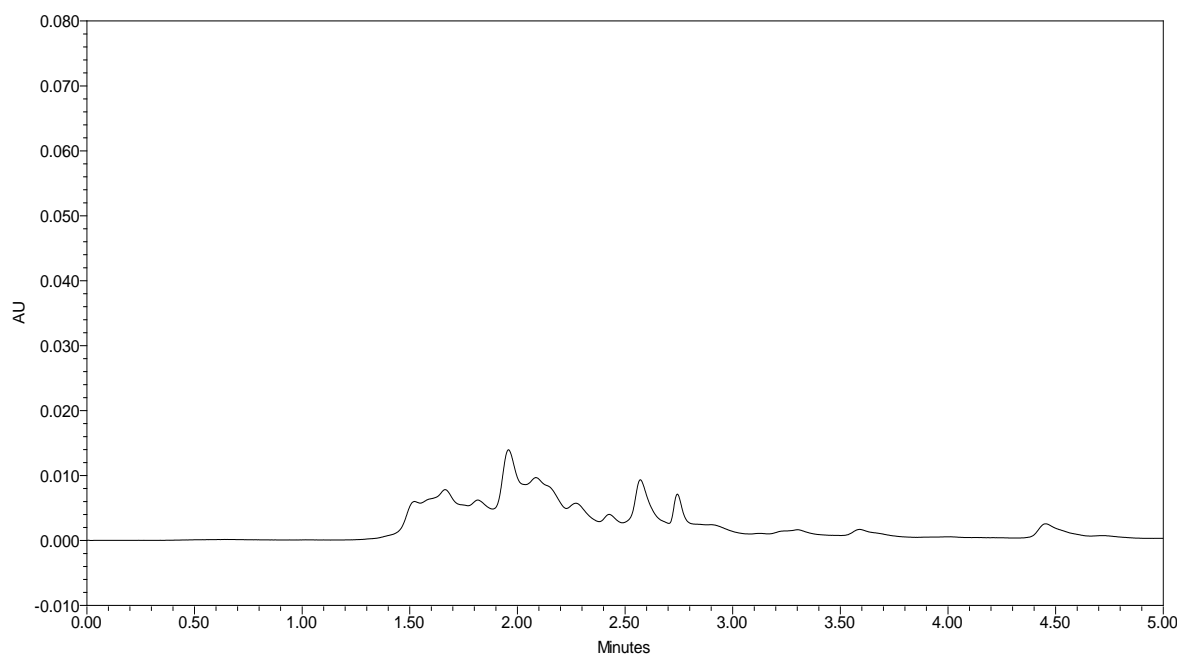
— Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo:

Slika 32. Kromatografska krivulja soka Cappy Pulpy



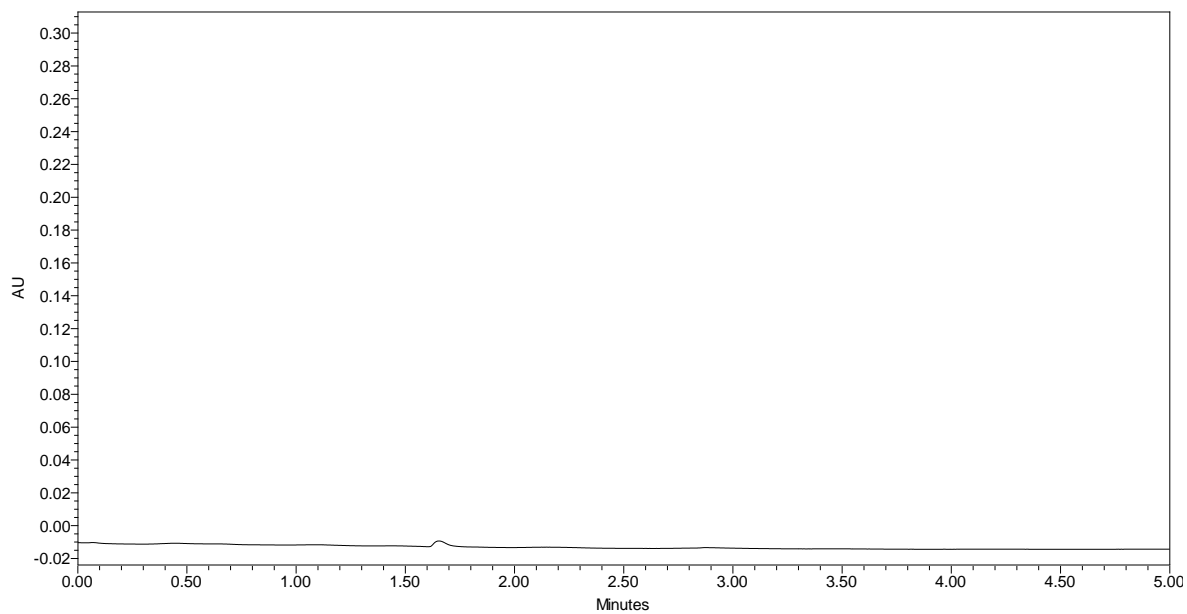
— Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo:

Slika 33. Kromatografska krivulja soka Cappy



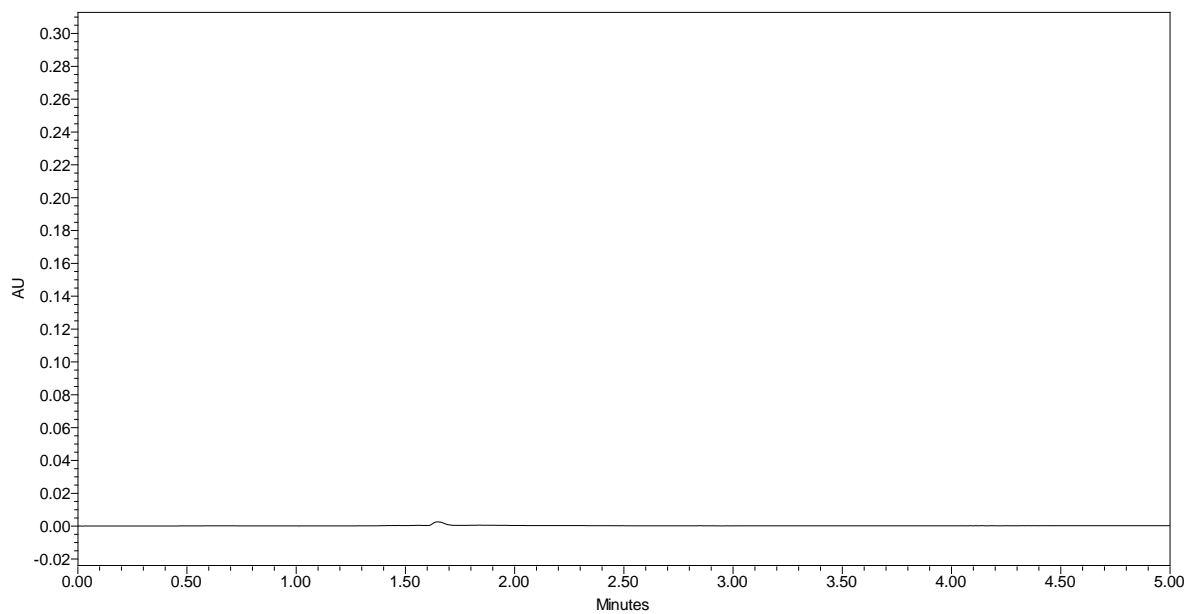
— Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo:

Slika 34. Kromatografska krivulja soka Vindija



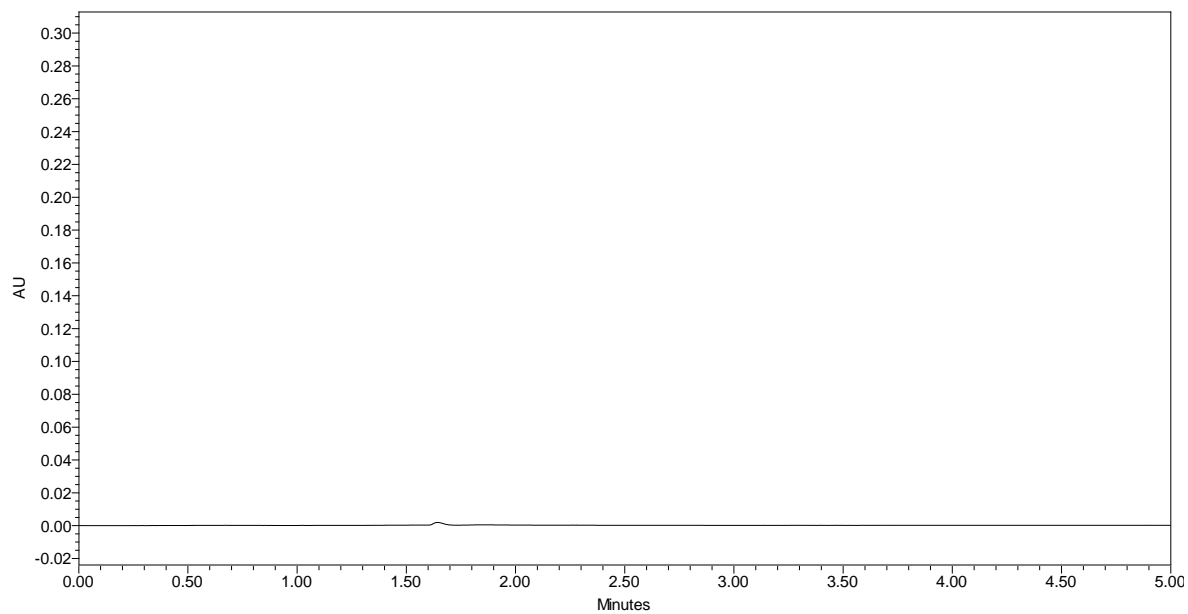
Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: izvor

Slika 35. Kromatografska krivulja izvorske vode na lokaciji Horvati



Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: kućanstvo

Slika 36. Kromatografska krivulja vode iz kućanstva



— Channel Description: DAD: Signal A, 245.0 nm/Bw:4.0 nm SampleInfo: komercijalna

Slika 37. Kromatografska krivulja komercijalne vode Kala

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Razvijena je brza UHPLC-DAD metoda za određivanje tioureje u uzorcima vode i voćnih sokova.
2. Validacijom metode potvrđeno je:
 - Metoda je dokazano linearna u rasponu od 0,1 mg/L do 5,0 mg/L što je zaključeno iz vrijednosti koeficijenta determinacije.
 - Metoda je dokazano selektivna što je pokazano usporedbom kromatograma obogaćenog uzorka soka Cappy s kromatogramom standardne otopine tioureje.
 - Metoda je dokazano precizna što je vidljivo iz RSD vrijednosti ponovljenih mjerenja vremena zadržavanja i površine ispod pika za standardnu otopinu tioureje koncentracije 0,1 mg/L.
 - Točnost razvijene metode ispitana je obogaćivanjem uzoraka sokova te je iskazana kao iskorištenje pri čemu su vrijednosti iskorištenja nešto više od kriterija prihvatljivosti, što nam ukazuje na potrebu za efektivnijim postupcima pripreme uzoraka soka čime bismo učinak matrice sveli na minimum.
3. Analizom realnih uzoraka vode i voćnih sokova nije detektirano postojanje tioureje.

6. Literatura

1. World Health Organization, Thiourea, (2003) 1-20.
2. Thiourea, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=61398> (pristup 29.5.2021.)
3. Thiourea, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiourea#section=Use-and-Manufacturing> (pristup 4.5.2021.)
4. A. Oliveira, H. de Santana, C.T.B.V. Zaia, D.A.M. Zaia, A study of reaction between quinones and thiourea: determination of thiourea in orange juice, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (2004) 165-177.
5. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, 1999, 645.
6. S. Abbasi, K. Khodarahmiyan, A. Farmanya, Ultra sensitive quantification of thiourea at nanomolar level by catalytic-kinetic differential pulse voltammetry, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2386-2391.
7. S. Abbasi, H. Khani, M. H. Bagher, A. Naghipour, A. Farmanya, F. Abbasi, A kinetic method for the determination of thiourea by its catalytic effect in micellar media, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 72 (2009) 327-331.
8. D. Amin, Determination of Thiourea, Phenylthiourea and Allylthiourea With Iodine, *Analyst*, 110 (1986) 215-216.
9. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, R. Casajús, Flow injection fluorimetric determination of thiourea, *Talanta*, 42 (1995) 391-394.
10. H. J. Bowley, E. A. Crathorne, D. L. Gerrard, Quantitative Determination of Thiourea in Aqueous Solution in the Presence of Sulphur Dioxide by Raman Spectroscopy, *Analyst*, 111 (1968) 539-542.
11. S. Abbasi, K. Khodarahmiyan, A. Farmanya, Ultra sensitive quantification of thiourea at nanomolar level by catalytic-kinetic differential pulse voltammetry, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2386-2391.
12. S. Abbasi, H. Khani, L. Hosseinzadeh, Z. Safari, Determination of thiourea in fruit juice by a kinetic spectrophotometric method, *Journal of Hazardous Materials*, 174 (2010) 257–262.
13. Nj. Radić, J. Komljenović, Potentiometric determination of mercury(II) and thiourea in strong acid solution using an ion-selective electrode with AgI-based membrane hydrophobised by PTFE, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 341 (1991) 592–596.

14. M. M. Rahman, J. Ahmed, A. M. Asiria, Thiourea sensor development based on hydrothermally prepared CMO nanoparticles for environmental safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 99 (2018) 586–592.
15. D. Deepak, *How to minimize retention time drifts in Gas Chromatography?* (2017)
16. (17) D.G. Watson, *Pharmaceutical analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Churchill Livingstone (1999) 195-198.
17. H. G. Barth, *Chromatography Fundamentals, Part V: Theoretical Plates: Significance, Properties, and Uses*, 2018. (pristupljeno: svibanj 2021)
18. S. Luterotti, *Temelji kromatografskih odjeljivanja-opći pojmovi : Uvod u kemijsku analizu*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet , (2011) 204-209.
19. World Health Organization, *Proposal for revision of high-performance liquid chromatography: In the International Pharmacopoeia* (2012) 10-12.
20. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Hyphenated techniques liquid chromatography-mass spectrometry: basic methodology and applications*, *Medicina*, 45 (2009) 220.
21. U.S. Food and Drug Administration, *Guidelines for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics, and veterinary products* (2019) 20.
22. V. Gašljević, *Validacija i mjerna nesigurnost*, *Biochemia Medica*, 20 (1) (2010) 57-63.
23. European Medicines Agency, *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2004) 5.
24. Food and Drug Administration, *Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics* (2015) 3-5.
25. Analytical method validation, <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/analytical-method-validation> (pristup: svibanj 2021.)
26. K. Lazarić, *Validacija analitičkih metoda- osnovna načela*, *Svijet po mjeri*, 1 (2012) 61-64.
27. United States Pharmacopoeia 39, *Validation of Compendial Procedures*, (2016) 1643-1644.
28. M. Patel, D. A. Patel, B. Gajra, *Validation of Analytical Procedure: Methodology*, *International journal of pharamceutical innovation*, 1 (2011) 41-50
29. AOAC INTERNATIONAL, *How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification*, (2007) 14-16.
30. M. M. Rahman, J. Ahmed, A. M. Asiria, Thiourea sensor development based on hydrothermally prepared CMO nanoparticles for environmental safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 99 (2018) 586–592.

31. S. Abbasi, H. Khani, M. H. Bagher, A. Naghipour, A. Farmanya, F. Abbasi, A kinetic method for the determination of thiourea by its catalytic effect in micellar media, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 72 (2009) 327-331.
32. J. Dolan, A guide to HPLC and LC-MS buffer selection, *ACE HPLC columns*, 2-5
33. P.E. Kavanagh, Converting gradient retention times to isocratic retention times in reversed phase liquid chromatography, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 23 (10) (2010) 1477-1487.

7. Sažetak

Viktorija Gorički

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje tioureje u uzorcima voda i voćnih sokova

Tioureja je sumporni analogon ureje, pri čemu je atom kisika supstituiran sumporom te ima ulogu kromofora i antioksidansa. To je bijela kristalna tvar u obliku rompskih prizama, topljiva u vodi, polarnim protičnim i aprotičnim otapalima. Tioureja se učestalo koristi u različitim granama industrije. Smatra se kancerogenom zbog čega predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Zbog specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava očekivana je migracija i zadržavanje tioureje u vodenom okolišu, a zbog njene česte upotrebe kao fungicida, herbicida i rodenticida, njena moguća prisutnost u voću.

U ovome radu razvijena je brza UHPLC-DAD metoda za kvantitativno određivanje tioureje u uzorcima voćnih sokova i vodi. Validacijom razvijene metode potvrđena je njena prikladnost za danu namjenu, potvrđena je selektivnost, linearnost u rasponu koncentracija od 0,1 mg/L do 5,0 mg/L, te preciznost i točnost. Rezultati validacije ukazali su na potrebu učinkovite pripreme uzorka voćnog soka prije kvantitativnog određivanja. U analiziranim uzorcima vode i sokova nije detektirana tioureja.

Ključne riječi: tioureja, kromatografija, UHPLC-DAD, validacija

8. Summary

Viktorija Gorički

Development and validation of chromatographic method for determination of thiourea in water samples and fruit juice

Thiourea is a sulfur analog of urea, where the oxygen atom is substituted with sulfur which acts as a chromophore and an antioxidant. It is a white crystalline substance in the form of rhombic prisms, soluble in water, polar protic, and aprotic solvents. The use of thiourea is highly represented in various branches of industry. It is considered carcinogenic and therefore poses a danger to human health. Due to its specific physicochemical properties, migration and retention of thiourea in the aquatic environment are expected, and due to its frequent uses as fungicides, herbicides, and rodenticides, its possible presence in fruit.

In this work, a fast UHPLC-DAD method for the quantitative determination of thiourea in fruit juices and water samples was developed. Validation of the developed method confirmed its suitability for a given purpose. Validation confirmed the selectivity, linearity in the concentration range from 0,1 mg/L to 5,0 mg/L, precision, and accuracy. Validation results pointed out the need for efficient sample preparation before quantitative determination. Thiourea was not detected in the analyzed water and juice samples.

Key words: thiourea, chromatography, UHPLC-DAD, validation

9. Životopis

Viktorija Gorički rođena je 7.12.1996. u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje završila je u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija. Godine 2015. upisuje preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradila je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja 'Ivan Vučetić'. Završila je preddiplomski sveučilišni studij u rujnu 2019. obranom završnog rada na temu „Kako sintetizirati biodizel iz otpadnog taloga kave“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandre Sander. U rujnu 2019. upisuje diplomski sveučilišni studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša. Od veljače 2020. radi na odjelu TAPI R&D – Analitika. Aktivno se služi engleskim jezikom, te poznaje osnove talijanskog i njemačkog jezika.