

# Optimizacija postupka pripreme uzorka za kromatografsku analizu N-nitrozamina

---

**Vuković, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:041194>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Martina Vuković

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Martina Vuković

**OPTIMIZACIJA POSTUPKA PRIPREME UZORKA ZA KROMATOGRFSKU  
ANALIZU N-NITROZAMINA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Irena Škorić

Dr. sc. Kristina Tolić Čop

Zagreb, srpanj 2023.

*Diplomski rad pod nazivom Optimizacija postupka pripreme uzorka za kromatografsku analizu N-nitrozamina izrađen je u prostorijama Zavoda za analitičku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić.*

### **Zahvala:**

*Ponajprije se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na ukazanom povjerenju i dodijeljenoj temi, kao i na svom trudu, strpljenju, uloženom vremenu, prenesenim znanjima i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade ovoga rada.*

*Htjela bih se zahvaliti asistentici dr. sc. Kristini Tolić Čop prije svega na prijateljskom pristupu koji mi je dane u laboratoriju učinio izrazito lagodnima. Također, zahvaljujem se na svakoj pruženoj prilici, danome savjetu, nesebičnom dijeljenju znanja te svoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se i tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju, Tanji Ivančić i Slavici Kos na pristupačnosti i susretljivosti tijekom rada u laboratoriju.*

*Najveća hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koju su mi pružili tijekom fakultetskog obrazovanja. Hvala vam što se čvrsti oslonac u mom životu koji mi nikada nije dao da padnem i posustanem. Uz vas sam naučila kako je svaki cilj u životu ostvariv ukoliko sam uporna, hrabra, odlučna i puna vjere u samu sebe.*

*Na kraju bih se zahvalila svim svojim prijateljima i kolegama koji su me poticali, motivirali i ohrabivali onda kada je bilo najteže.*

*Velika HVALA svima!*

## SAŽETAK

### Optimizacija postupka pripreme uzorka za kromatografsku analizu *N*-nitrozamina

*N*-nitrozamini su spojevi opće kemijske strukture  $R_1N(-R_2)-N=O$ , a nastaju reakcijama oksidacije sekundarnih ili tercijarnih amina uz pomoć nitrozacijskog sredstva. Pokazujući mutageno i kancerogeno djelovanje na različite organe i tkiva kod ljudi, posljednjih godina postaju predmetom brojnih analitičkih ispitivanja. Upravo provođenje analitičkih ispitivanja predstavlja ključ za sprječavanje nastanka *N*-nitrozamina i njihova uklanjanja iz vode. U ovome radu ispitivano je sedam *N*-nitrozamina: *N*, *N*-dibutilnitrozni amid (NDBA), *N*, *N*-dietilnitrozni amid (NDEA), *N*, *N*-dimetilnitrozni amid (NDMA), *N*, *N*-dipropilnitrozni amid (NDPA), 4-nitrozomorfolin (NMOR), 1-nitrozopiperidin (NPIP) te 1-nitrozopirolidin (NPYR). Kako bi se zadovoljio cilj rada u vidu optimizacije postupka pripreme uzorka za kromatografsku analizu *N*-nitrozamina primijenjen je Box-Behnkenov dizajn eksperimenata s tri numeričke varijable na tri razine u kombinaciji s metodom odzivnih površina (RSM). Uzorci vode pripremljeni su ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE) uz upotrebu kokosova ugljena kao sorbensa. Nakon provedbe numeričke optimizacije kao optimalni uvjeti ekstrakcije čvrstom fazom primijenjeni su volumen uzorka od 300 ml, volumen eluensa od 12 ml te vrijeme sušenja sorbensa od 10 min. Provedena su dva eksperimenta pri optimalnim uvjetima, pri čemu je jedan uključivao uparavanje otapala iz uzorka na rotacijskom uparivaču, a drugi uparavanje otapala iz uzorka u struji dušika. Prisutnost *N*-nitrozamina u dobivenim ekstraktima u oba slučaja potvrđena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (HPLC-DAD) gdje je primjenom gradijentnog eluiranja uz protok od 0,5 ml/min provedena uspješna separacija svih sedam *N*-nitrozamina na kromatografskoj koloni Kinetex C18 uz korištenje MilliQ vode i acetonitrila kao pokretnih faza. Uspoređujući dobivene odzive odnosno vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije moguće je zaključiti kako uparavanje u struji dušika biva učinkovitije za NDMA, NDEA, NDPA i NDBA u odnosu na uparavanje na rotacijskom uparivaču. Gledano s ekonomskog aspekta optimizacijom SPE postupka osigurava se ušteda reagensa i potrošnog materijala, ali i utrošenog vremena samoga znanstvenika.

**Ključne riječi:** *N*-nitrozamini, optimizacija, Box-Behnkenov dizajn, metoda odzivnih površina, ekstrakcija čvrstom fazom, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

## ABSTRACT

### Optimization of sample preparation procedure for chromatographic analysis of *N*-nitrosamine

*N*-nitrosamines are compounds with the general chemical structure  $R_1N(-R_2)-N=O$  that are formed by oxidation reactions of secondary or tertiary amines with the help of a nitrosating agent. Showing mutagenic and carcinogenic effects on various organs and tissues in humans they have become the subject of numerous analytical tests in recent years. Analytical testing is essential to prevent the formation of *N*-nitrosamines and their removal from water. In this study, seven *N*-nitrosamines were analysed: *N*, *N*-dibutyl nitrous amide (NDBA), *N*, *N*-diethyl nitrous amide (NDEA), *N*, *N*-dimethyl nitrous amide (NDMA), *N*, *N*-dipropyl nitrous amide (NDPA), 4-nitrosomorpholine (NMOR), 1-nitrosopiperidine (NPIP) and 1-nitrosopyrrolidine (NPYR). In order to meet the goal of the study in the form of optimization of the sample preparation procedure for the chromatographic analysis of *N*-nitrosamines, the Box-Behnken design of experiments with three numerical variables at three levels in combination with the response surface methodology (RSM) was applied. Water samples were prepared by solid phase extraction (SPE) using coconut charcoal as a sorbent. After numerical optimization, a sample volume of 300 ml, an eluent volume of 12 ml and a sorbent drying time of 10 min were used as the optimal conditions for solid phase extraction. Two experiments were performed at optimal conditions, one involving the evaporation of the solvent from the sample on a rotary evaporator, and the other the evaporation of the solvent from the sample in a stream of nitrogen. The presence of *N*-nitrosamines in the obtained extracts in both cases was confirmed by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) by applying gradient elution at a flow rate of 0,5 ml/min. A successful separation of all seven *N*-nitrosamines was carried out on the Kinetex C18 chromatographic column using MilliQ water and acetonitrile as mobile phases. By comparing the obtained responses and extraction efficiency values, it is possible to conclude that evaporation in a nitrogen stream is more efficient for NDMA, NDEA, NDPA and NDBA compared to evaporation on a rotary evaporator. From an economic point of view, the optimization of the SPE procedure ensures the saving of reagents and consumables, as well as the time spent by the scientist.

**Key words:** *N*-nitrosamines, optimization, Box-Behnken design, response surface methodology, solid phase extraction, high-performance liquid chromatography

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Voda za piće .....	2
2.2. Dezinfekcija vode za piće .....	3
2.2.1. Dezinfekcija vode klorom i preparatima na bazi klora .....	5
2.2.2. Dezinfekcija vode ozonom .....	7
2.2.3. Dezinfekcija vode UV zračenjem .....	8
2.3. Nusprodukti dezinfekcije u vodi za piće .....	8
2.4. <i>N</i> -nitrozamini .....	11
2.4.1. Nastajanje <i>N</i> -nitrozamina .....	12
2.5. Ekstrakcija .....	13
2.5.1. Ekstrakcija iz tekućih uzoraka .....	14
2.5.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) .....	16
2.6. Kromatografija .....	18
2.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	19
2.7. Optimizacija .....	21
2.8. Metode dizajna eksperimenata .....	22
2.8.1. Faktorijalni dizajn .....	23
2.8.2. Djelomično faktorijalni dizajn .....	24
2.8.3. Plackett-Burmanov dizajn .....	25
2.8.4. Centralni kompozitni dizajn .....	26
2.8.5. Box-Behnkenov dizajn .....	27
2.8.6. Doehlertov dizajn .....	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	29
3.1. Materijali .....	29
3.1.1. Kemikalije .....	29
3.1.2. <i>N</i> -nitrozamini .....	29
3.1.2.1. <i>N</i> , <i>N</i> -dibutilnitrozni amid (NDBA) .....	30
3.1.2.2. <i>N</i> , <i>N</i> -dietilnitrozni amid (NDEA) .....	31
3.1.2.3. <i>N</i> , <i>N</i> -dimetilnitrozni amid (NDMA) .....	32
3.1.2.4. <i>N</i> , <i>N</i> -dipropilnitrozni amid (NDPA) .....	33



3.1.2.5. 4-nitrozomorfolin (NMOR) .....	34
3.1.2.6. 1-nitrozopiperidin (NPIP) .....	35
3.1.2.7. 1-nitrozopirolidin (NPYR).....	36
3.1.3. SPE kolone.....	37
3.1.4. Kromatografska kolona.....	37
3.2. Instrumenti .....	38
3.2.1. Sustav za proizvodnju MilliQ vode .....	38
3.2.2. Ultrazvučna kupelj .....	39
3.2.3. Aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom.....	39
3.2.4. Rotacijski uparivač otapala .....	40
3.2.5. Aparatura za uparavanje otapala u struji dušika .....	41
3.2.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom .....	41
3.3. Metode rada .....	43
3.3.1. Priprema standardnih i kontrolnih otopina <i>N</i> -nitrozamina .....	43
3.3.2. Priprema otopina <i>N</i> -nitrozamina za ekstrakciju čvrstom fazom.....	43
3.3.3. Razvoj optimalne SPE metode primjenom dizajna eksperimenata .....	44
3.3.4. Opis postupka ekstrakcije čvrstom fazom .....	46
3.3.5. HPLC metoda za određivanje učinkovitosti ekstrakcije čvrstom fazom .....	48
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	49
4.1. Utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije na ekstraktibilnost <i>N</i> -nitrozamina iz vode .....	49
4.1.1. Kromatografsko određivanje .....	50
4.2. Modeliranje procesa ekstrakcije <i>N</i> -nitrozamina .....	53
4.3. Optimiranje procesa ekstrakcije čvrstom fazom.....	70
4.4. Provjera uspješnosti ekstrakcije čvrstom fazom pri optimalnim uvjetima .....	71
5. ZAKLJUČAK .....	73
6. POPIS SIMBOLA.....	74
7. LITERATURA .....	78
8. PRILOZI .....	84
9. ŽIVOTOPIS .....	97

## 1. UVOD

Dezinfekcija vode za piće glavna je javnozdravstvena intervencija koja se provodi u svrhu sprječavanja mikrobiološke kontaminacije. Nekontrolirana mikrobiološka kontaminacija može prouzročiti dugotrajan i nimalo bezazlen problem za ljudsko zdravlje. Dezinfekcija vode za piće vrši se primjenom raznih kemikalija koje u doticaju s organskim ili anorganskim tvarima u sirovoj vodi mogu reagirati tvoreći pri tome nusprodukte dezinfekcije. Od 1974. godine pa sve do danas identificirano je preko 500 kemijskih spojeva kategoriziranih kao nusprodukti dezinfekcije, a skupina koja je od izrazite važnosti za ovaj rad naziva se *N*-nitrozaminima. *N*-nitrozamini su alifatski ili aromatski derivati sekundarnih amina koji sadrže nitrozo ( $-NO$ ) skupinu vezanu za deprotonirani amin, a prisutni su u vodi, hrani, alkoholnim pićima, dimu cigareta, lijekovima te kozmetici. Interes za ovu skupinu spojeva dodatno je porastao otkako je dokazano njihovo mutageno i kancerogeno djelovanje na različite organe i tkiva kako u ljudskim tako i u životinjskim organizmima, uključujući pluća, srce, jetru, bubrege, mozak, mjehur, želudac i jednjak.

Detekcija i kvantifikacija *N*-nitrozamina provodi se nizom tehnika poput primjerice polarografije, spektrofotometrije, tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije (GC) i tekućinske kromatografije (LC). Međutim, ukoliko je koncentracija *N*-nitrozamina izrazito niska tada se za njihovo određivanje primjenjuje kombinacija kromatografskih tehnika sa spektrometrijom masa.

U ovome radu optimirati će se postupak ekstrakcije čvrstom fazom kao postupak pripreme uzorka vode za kromatografsku analizu *N*-nitrozamina. Metoda ekstrakcije čvrstom fazom optimirati će se variranjem eksperimentalnih uvjeta (npr. izbor sorbensa, izbor eluensa, volumen eluensa, volumen uzorka, vrijeme trajanja ekstrakcije, vrijeme sušenja sorbensa). Optimizacija će se provesti primjenom metode dizajna eksperimenata (DoE) kao izvrsnog alata koji iziskuje daleko manje utrošenog vremena, truda i resursa, istodobno prikupljajući veliku količinu informacija uz provedbu minimalnog broja eksperimenata. Također, omogućava i postizanje veće efikasnosti tijekom razvoja samih metoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Voda za piće

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) kao međunarodno tijelo za javno zdravstvo i kvalitetu vode zagovara kako voda mora biti sigurna i lako dostupna, bez obzira koristi li se za piće, kućnu upotrebu, proizvodnju hrane ili pak u rekreacijske svrhe. Upravo stoga na samitu Ujedinjenih naroda 2010. godine izglasano je ljudsko pravo na vodu i sanitarne uvjete. Podizanjem razine prethodno navedenih prava potiče se gospodarski rast i razvoj zemalja te se uvelike pridonosi smanjenju siromaštva [1].

Pojam voda za piće ili pitka voda podrazumijeva svu vodu u njezinu izvornom obliku ili nakon postupaka obrade, a koja se koristi za piće, kuhanje i pripremu hrane ili druge kućanske potrebe, bez obzira na njezino podrijetlo te neovisno o tome distribuira li se razvodnim mrežama, cisternama, bocama ili spremnicima. Također obuhvaća i svu onu vodu koju poslovni objekti upotrebljavaju tijekom procesa proizvodnje, prerade, konzerviranja te prodaje proizvoda [2]. Voda za piće izuzev toga što mora biti bez boje, mirisa i okusa ne smije sadržavati mikroorganizme, parazite ili njihove razvojne oblike u koncentracijama koje mogu narušavati zdravlje ljudi, stoga kao takva mora ispunjavati zahtjeve za zdravstvenom ispravnošću. Moguće ju je podijeliti u nekoliko skupina, a to su: voda za piće iz javnih vodoopskrbnih sustava, prirodna mineralna voda, izvorska voda te stolna voda [3].

Voda za piće biva zakonski kontrolirana Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/2013), Pravilnikom o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/2017) i Pravilnikom o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/2019).

***Voda za piće iz javnih vodoopskrbnih sustava*** dolazi iz podzemnih ili površinskih vodotokova. Ima promjenjiva fizikalno-kemijska svojstva koja dopuštaju korištenje različitih tehnologija obrade vode, pri čemu je dezinfekcija jedan od obaveznih postupaka [4]. Sama javna vodoopskrba podrazumijeva opskrbu vodom za piće više od 50 ljudi ili 10 m<sup>3</sup> po danu kao i opskrbu objekata poput primjerice škola, bolnica, ustanova predškolskog odgoja, ugostiteljskih objekata, autobusnih i željezničkih kolodvora [2].

**Prirodna mineralna voda** je vrsta vode koja zadovoljava mikrobiološke standarde, a dobiva se iz zaštićenih podzemnih ležišta. Poznata je po svojim organoleptičkim i fizikalno-kemijskim svojstvima. Blagotvorno djeluje na ljudski organizam s obzirom da sadrži minerale i elemente u tragovima koje samo ljudsko tijelo nije u mogućnosti sintetizirati. Sastav svake prirodne mineralne vode je specifičan, a posljedica je geološke strukture terena [5]. Jedini postupci obrade mineralne vode koji su dopušteni su postupci filtracije i dekantiranja putem kojih se uklanjaju nestabilni elementi (željezo, sumpor, mangan) uz prethodnu oksidaciju (zrak, kisik, ozon). Strogo je zabranjena svaka vrsta dezinfekcije kao i dodavanje bakteriostatskih elemenata [6].

**Izvorska voda** je izvorno čista prirodna voda koja se dobiva iz podzemnih ležišta putem jednog ili više prirodnih ili bušenih izvora izoliranih od mnogih onečišćenja. Njihov sastav, temperatura kao i ostale značajke moraju biti konstantne te ne smiju varirati s izdašnosti izvora. Ovoj vrsti voda ne smije se mijenjati kemijski sastav, te stoga nije dopušteno provođenje nikakvog postupka obrade poput primjerice dezinfekcije. S obzirom da se u izvorsku vodu može uvoditi ugljični dioksid, ova vrsta vode upotrebljava se i za proizvodnju bezalkoholnih gaziranih ili negaziranih napitaka [5].

**Stolna voda** je pročišćena voda dobivena od vode za piće uz dodatak jedne ili više dopuštene tvari s ciljem poboljšanja organoleptičkih svojstava. U praksi je dopušteno uvođenje deset tvari, a to su: natrijev klorid (NaCl), kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>), natrijev karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kalcijev karbonat (CaCO<sub>3</sub>), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), magnezijev karbonat (MgCO<sub>3</sub>), magnezijev sulfat (MgSO<sub>4</sub>), natrijev fluorid (NaF) i ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>). Sve navedene tvari moraju zadovoljiti određene zahtjeve kako bi iste bile upotrebljive u prehrambenoj industriji. Za razliku od izvorske vode gdje je dopuštena isključivo provedba filtracije, ovdje je dozvoljena provedba mehaničkog i kemijskog pročišćavanja [5].

## **2.2. Dezinfekcija vode za piće**

U opskrbi zdravom pitkom vodom od neupitne je važnosti provedba njezine dezinfekcije. Postupak dezinfekcije predstavlja zadnju fazu pripreme vode s ciljem uklanjanja tj. smanjivanja broja patogenih mikroorganizama kao što su: bakterije, virusi, prioni, gljivice i paraziti. Dezinfekcija vode za piće često uključuje korištenje reaktivnih kemijskih sredstava poput primjerice klora, klorova dioksida ili ozona, a potrebno ju je primjenjivati kod površinskih i podzemnih voda koje su podložne fekalnoj kontaminaciji. Korištenjem navedenih kemijskih dezinficijensa tijekom obrade vode učestalo dolazi do nastanka kemijskih nusprodukata, međutim opasnosti po ljudsko

zdravlje od istih su daleko manje u odnosu na one koje može prouzročiti neadekvatna dezinfekcija [7]. Dezinfekcijske metode koje se smatraju najpogodnijima za uporabu moguće je klasificirati u nekoliko skupina sukladno njihovom mehanizmu djelovanja, stoga se tako razlikuju kemijske, fizikalne te biološke metode. Kemijske metode podrazumijevaju korištenje klora i preparata na bazi klora, ozona, broma, joda te srebra, fizikalne metode obuhvaćaju UV zračenje, membransku mikrofiltraciju, toplinu te ultrazvuk, a biološke metode se odnose na ribnjake [8]. Dezinfekcija vode za piće osim što se provodi s ciljem uklanjanja mikroorganizama iz iste, provodi se i kao preventivna mjera, te se obavezno vrši u slijedećim situacijama: ukoliko stanje vodnog objekta i njegova lokacija predstavljaju potencijalnu opasnost od zagađivanja neovisno na trenutno zadovoljavajuću bakteriološku ispravnost, ukoliko su u pitanju kraške vode koje se smatraju „primarno zagađenim“, prije puštanja u eksploataciju novih objekata i poslije izvršenih popravaka, ukoliko je voda predviđena za transport i skladištenje te nakon elementarnih nepogoda [9].

Na samu učinkovitost dezinfekcije vode za piće utječe nekoliko glavnih čimbenika, a to su: koncentracija dezinficijensa koji se primjenjuje, vrijeme kontakta, temperatura i pH. Temperatura i pH-vrijednost su čimbenici koji pokazuju utjecaj na brzinu kemijskih reakcija, odnosno na brzinu provođenja dezinfekcije. Ovisno o sredstvu koje se primjenjuje za dezinfekciju, potrebno je reguliranje kako temperature tako i pH prema nižim ili višim vrijednostima [10]. S obzirom da je temperatura proporcionalna baktericidnoj moći dezinfekcijskog sredstva, zaključuje se kako će do eliminacije bakterija doći daleko prije u toploj nego li u hladnoj vodi. Nasuprot tome gledajući pH-vrijednost vode, dokazano je kako će najbolji učinak dezinfekcije biti postignut u slabo kiselim do neutralnim vodama. Osim navedenih faktora, na učinkovitost dezinfekcije također utjecaj može imati i pojava mutnoće pri čemu suspendirane čestice ometaju postupak dezinfekcije te se stoga smanjuje njegova djelotvornost. Također u takvoj vodi moguć je nastanak i toksičnih tvari kojih prije u istoj nije bilo [11].

Svako dezinfekcijsko sredstvo prije upotrebe mora zadovoljiti propisane uvjete: da u propisanim koncentracijama ne izazove dodatne toksične promjene kao i promjenu senzorskih osobina vode, da uništava sve patogene i fakultativne patogene mikroorganizme u vodi, da osigura mikrobiološku ispravnost vode kroz dulje razdoblje štiteći vodu od onečišćenja, da je moguće brzo, jeftino i nekomplicirano odrediti koncentraciju sredstva u vodi, da je ekonomski isplativo, pogodno za rukovanje i pristupačno, da nije potrebna visoka stručnost i komplicirana aparatura [11].

Osim što je koristan i neophodan za prevenciju bolesti i nastanak epidemije svaki dezinficijens ima i svoje nedostatke. Iz tog razloga potrebno se konzultirati sa stručnjacima Zavoda za javno zdravstvo i provoditi redovitu kontrolu zdravstvene ispravnosti vode [11].

### **2.2.1. Dezinfekcija vode klorom i preparatima na bazi klora**

Dezinfekcija klorom ili kloriranje najrašireniji je postupak dezinfekcije vode za piće, a najčešće se provodi elementarnim klorom ( $\text{Cl}_2$ ), klorovim dioksidom ( $\text{ClO}_2$ ), kalcijevim hipokloritom ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ), natrijevim hipokloritom ( $\text{NaOCl}$ ) te kloraminom ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ). Kao i svaka vrsta dezinfekcije tako i ova, odlikuje se nizom kako prednosti tako i nedostataka. Vodeće prednosti kloriranja su ekonomska isplativost, relativno laka dostupnost, visoka primarna učinkovitost te rezidualno odnosno produljeno djelovanje koje se pokazalo efikasnim protiv mnogih bakterija i virusa. Nasuprot navedenim prednostima, nalazi se i cijeli niz nedostataka, a to su slijedeći: 100% plinoviti klor je izrazito agresivan, opasan za zdravlje i okoliš, opasan prilikom transporta, skladištenja i rukovanja, a uz postrojenja koja koriste 100% plinoviti klor potrebno je ugraditi i opremu za neutralizaciju istoga ukoliko dođe do njegova nekontroliranog istjecanja. Također što se tiče natrijeva hipoklorita, njegove 10-15%-tne otopine relativno su skupe i nestabilne, pa shodno tome bivaju nepraktičnima za rukovanje [12].

Dezinfekcija klorom i klorovim preparatima primjenjuje se za dezinfekciju manjih količina vode primjerice u domaćinstvima, ali i za dezinfekciju većih količina vode u vodovodnim sustavima. Dodavanjem klora i njegovih preparata u vodu, dio klora se troši na oksidaciju organskih tvari, uključujući mikroorganizme, a ostatak na oksidaciju anorganskih tvari poput željeza, sumpora i mangana u vodi. Kako bi došlo do pojave tzv. rezidualnog klora potrebno je definirati odgovarajuću *potrebu za klorom* tj. količinu klora koja se dodaje u vodu izražena u miligramima po litri. *Rezidualni klor* predstavlja količinu klora koja je preostala u vodi po završetku postupka dezinfekcije, a također se izražava u miligramima po litri. Upravo njegova prisutnost u vodi predstavlja dokaz o uspješno izvršenoj dezinfekciji te štiti istu od naknadne kontaminacije. Dopuštena koncentracija rezidualnog klora u vodi iznosi maksimalno 0,5 mg/l te biva propisana zakonom. Zbrajanjem potrebe za klorom i rezidualnog klora dobiva se *doza klora* koja predstavlja količinu klora u miligramima po litri koju je potrebno dodati vodi za provedbu dezinfekcije [13].

Nastavano na prethodno spomenuto, osim elementarnog klora za dezinfekciju vode mogu se primijeniti i druge tvari koje sadrže klor, a to prvenstveno ovisi o potrebnim pH-uvjetima i dostupnim mogućnostima skladištenja [13]. Kao alternativa plinovitom kloru, klorov dioksid se najčešće upotrebljava pri dezinfekciji vode za piće.

**Klorov dioksid** ( $\text{ClO}_2$ ) je tvar koju je potrebno proizvoditi na licu mjesta po trenutnoj potrebi u za to predviđenim uređajima, s obzirom da ga zbog njegove reaktivnosti nije moguće skladištiti. Klorov dioksid pruža niz prednosti u usporedbi s dezinfekcijom vode klorom. Njegovo dezinfekcijsko djelovanje porastom pH-vrijednosti ne opada kao što je to slučaj kod klora, a također ostaje stabilan u cjevovodu tijekom dužeg vremenskog perioda čime omogućava dugotrajnu mikrobiološku zaštitu vode. Prilikom dezinfekcije vode klorovim dioksidom, ne dolazi do stvaranja klorofenola, tvari intenzivnog mirisa, trihalometana te drugih kancerogenih spojeva kloriranih ugljikovodika. Svojim djelovanjem aktivno eliminira biofilme, alge, neugodne neutralne komponente ili tvari neugodnog mirisa i na taj način uništava uvjete opstanka mikrobiologije u cjevovodu [14].

**Kalcijev hipoklorit** ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) je spoj koji se sastoji od kalcijevih soli hipokloritne kiseline, a dobiva se otapanjem plinovitog klora u otopini kalcijeva oksida i natrijeva hidroksida. Bijela je nagrizajuća krutina jakoga mirisa koja dolazi u obliku tableta ili granuliranog praha. Kalcijev hipoklorit veoma je stabilan i pogodan za dugotrajno čuvanje. Primjenom kalcijeva hipoklorita u vodi dolazi do reakcije hidrolize uslijed koje nastaje hipokloritna kiselina:



Kao posljedica navedene reakcije dolazi do porasta pH-vrijednosti vode [13].

**Natrijev hipoklorit** ( $\text{NaOCl}$ ) u tekućem je obliku, bistre svijetložute boje te jakoga mirisa. Nastaje kada se plin klor otopi u otopini natrijeva hidroksida, a sastoji se od natrijevih soli hipokloritne kiseline. Nije pogodan za dugotrajno skladištenje s obzirom da podliježe prirodnoj razgradnji. Dezinfekcija natrijevim hipokloritom široko se primjenjuje kod dezinfekcija bazena, vodoopskrbnih sustava te se koristi kao sredstvo za izbjeljivanje u domaćinstvima. Primjenom natrijeva hipoklorita u vodi kao i kod kalcijeva hipoklorita dolazi do reakcije hidrolize:



Natrijev hipoklorit također će uzrokovati porast pH-vrijednosti vode, čime se narušava njegovo dezinfekcijsko djelovanje. Stoga se sniženje pH provodi upotrebom klorovodične kiseline kako bi postupak dezinfekcije bio uspješno izvršen [13].

**Kloramin** je bijeli, kristalni organski spoj koji lako oslobađa aktivni klor te se koristi kao sredstvo za oksidaciju i dezinfekciju. Postoje tri vrste kloramina, a to su: monokloramini ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), dikloramini ( $\text{NHCl}_2$ ) i trikloramini ( $\text{NCl}_3$ ). Kloramini su slabiji dezinficijensi za razliku od klora, ali proizvode daleko manje nusprodukata dezinfekcije. Stvaraju se na licu mjesta u postrojenjima za pročišćavanje uz pomoć bezvodnog amonijaka i amonijeva sulfata [15]. U reakciji s vodom raspadaju se do hipokloritne kiseline:



### 2.2.2. Dezinfekcija vode ozonom

Ozon ( $\text{O}_3$ ) je plin blijedo plave boje, neugodna mirisa, a predstavlja alotropsku modifikaciju kisika te je izrazito jako oksidacijsko sredstvo zahvaljujući svojoj reaktivnosti. Moguće ga je dobiti direktno iz zraka, iz zraka obogaćenog kisikom ili putem tekućeg kisika, pri čemu je zrak prethodno potrebno pripremit na način da se uklone čestice prašine, ulja te smanji vlažnost istoga. Veoma nepovoljno djeluje na mikroorganizme zbog čega se primjenjuje kao dezinfekcijsko sredstvo. U tu svrhu koristi se još od davne 1886. godine nakon čega dolazi do njegova eksperimentalnog razvoja uzlaznom putanjom. S obzirom da djeluje 10-20 puta brže i 300-600 puta jače od jednake koncentracije klora, biva sposobnim za dezinfekciju pri malom vremenu kontakta i već pri niskim koncentracijama. Uklanja obojenost, okus i miris vode te brzo oksidira organske tvari. Izrazito je nestabilan u vodi zbog čega se vrlo lako razgrađuje uslijed čega dolazi do nastanka atomskog kisika:



Sama brzina raspada kreće se u rasponu od svega nekoliko sekundi pa do nekoliko minuta, a zavisna je od pH-vrijednosti, temperature i koncentracije otopljenih tvari. Njegovim dodatkom vodi vrši se potpuna sterilizacija u roku od svega 5-6 minuta. Dezinfekcija ozonom se najbolje može primijeniti u neutralnim i slabo kiselim vodama gdje je ozon potrebno implementirati u koncentraciji od svega 0,4 mg/l. Dezinfekcija ozonom ili ozonizacija kao jedna od najefikasnijih metoda dezinfekcije vode posjeduje cijeli niz prednosti, a to su: povoljan utjecaj na organoleptička



svojstva vode, uklanjanje željeza, mangana i sumpora, visoka dezinfekcijska moć, dobivanje kisika kao produkta razgradnje. Izuzev navedenih prednosti potrebno se osvrnuti i na poneke mane ove metode. Ozonizacija iziskuje visoke početne troškove s obzirom da zahtjeva veliku količinu energije koju je potrebno generirati u postrojenjima. Također za kompletnu dezinfekciju sustava najčešće se ozon mora kombinirati s nekim drugim dezinficijensom poput primjerice klorom. S obzirom da postupak dezinfekcije vode za piće ozonom još nije dosegao svoj puni potencijal, smatra se kako će se u budućnosti sve više primjenjivati [16].

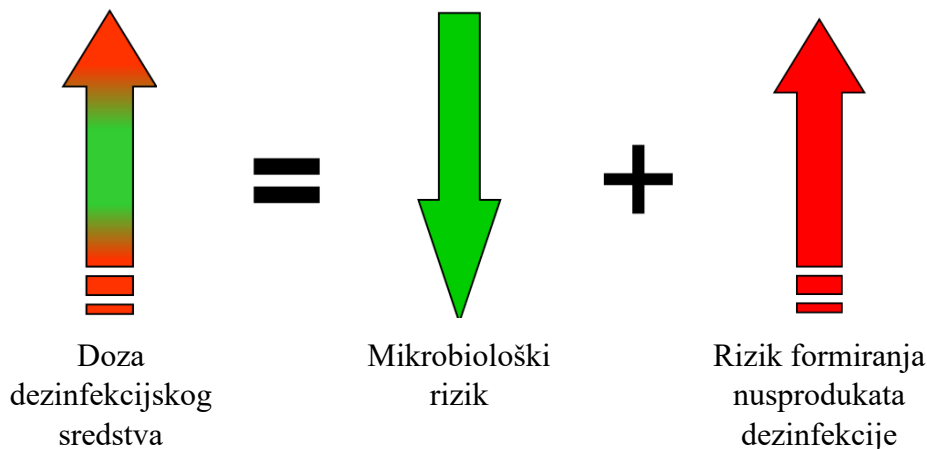
### **2.2.3. Dezinfekcija vode UV zračenjem**

Ultraljubičasto zračenje odnosno UV zračenje je elektromagnetsko zračenje valnih duljina u rasponu od 40 do 400 nanometara. Vrhunac dezinfekcije zapaža se pri valnim duljinama u takozvanom UV-C području (100-280 nm) u kojemu dolazi do razaranja protoplazme bakterijskih stanica. Količina UV zračenja koju je potrebno primijeniti za smanjenje patogena ovisna je o brojnim čimbenicima, kao što su: kvaliteta vode, razina mikrobne kontaminacije, epidemiološke odnosno zdravstvene korelacije, snaga zračenja te vrijeme izlaganja zračenju [17]. Prednosti ovog postupka dezinfekcije su: visoki stupanj učinkovitosti i trajnog uništavanja mikroorganizama, jednostavnost rukovanja, ne dolazi do promjene svojstava i kemijskog sastava vode te isključuje doziranje kemikalija u istu. Također zahvaljujući ekonomskoj isplativosti kao i ograničenom stvaranju štetnih dezinfekcijskih nusprodukata, korištenje UV zračenja kao sredstva za dezinfekciju vode postaje sve popularnije [8].

### **2.3. Nusprodukti dezinfekcije u vodi za piće**

Dezinfekcija vode za piće doprinijela je eradikaciji zaraznih crijevnih bolesti, ali je jednako tako dovela i do pojave novih kemijskih spojeva to jest nusprodukata dezinfekcije koji mogu imati potencijalno štetan efekt na ljudsko zdravlje [18]. Nusprodukti dezinfekcije su kemijske, organske i anorganske tvari čiji se nastanak opisuje reakcijom dezinfekcijskog sredstva s organskim tvarima u vodi, a ovisan je o nekolicini čimbenika: pH-vrijednosti vode, alkalitetu, prisutnosti huminskih kiselina, bromida, bromata, vremenu kontakta vode s dezinfekcijskim sredstvom, godišnjem dobu odnosno temperaturi, vrsti i koncentraciji prisutnih organskih tvari u vodi te dozi i rezidualnoj koncentraciji dezinfekcijskog sredstva. Tijekom provedbe dezinfekcije vode za piće, primarni zadatak je zadržati njezinu mikrobiološku ispravnost, a usporedo tome sekundarni zadatak bio bi

minimizirati nastanak nusprodukata dezinfekcije [19]. Opisanu tvrdnju moguće je prikazati shematski:



Prvi nusprodukt dezinfekcije kojega je otkrio Rook 1974. godine bio je triklorometan ili kloroform [20]. Danas, gotovo pedeset godina kasnije postoji minimalno 500 kemijskih spojeva, kategoriziranih kao nusprodukti dezinfekcije, a koji se klasificiraju u četiri glavne kategorije: halometani, halooctene kiseline, haloketoni i haloacetonitrili [21].

Također, nusprodukti dezinfekcije mogu biti hlapivi i hidrofobni te nehlapivi i hidrofilni, uključujući pri tome klorirane i neklorirane aromatske i alifatske nusprodukte [22].

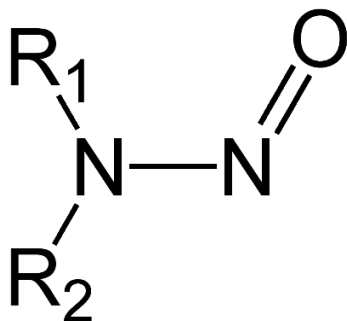
Maksimalno dopuštene koncentracije nusprodukata dezinfekcije u vodi za piće propisane su od strane raznih europskih i svjetskih organizacija te su izražene u mikrogramima po litri (Tablica 1). Ukoliko su koncentracije istih u vodi znatno veće od dopuštenih, mogu uzrokovati ozbiljne posljedice za ljudsko zdravlje. Naime nusprodukti dezinfekcije kao takvi pokazuju kancerogeno djelovanje za jetru, bubrege, pluća, gušteraču, štitnjaču i mozak, mogu izazvati bolesti živčanog, kardiovaskularnog i reproduktivnog sustava, povraćanje, citotoksičnost, hepatotoksičnost, anemiju i brojne druge [23].

**Tablica 1.** Prikaz propisanih vrijednosti maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK) nusprodukata dezinfekcije u vodi za piće od strane europskih i svjetskih organizacija [21]

Organizacija	Nusprodukt dezinfekcije	Vrijednost MDK [µg/l]
<b>Svjetska zdravstvena organizacija (WHO)</b>  $\frac{[\text{CHCl}_3]}{200} + \frac{[\text{CHCl}_2\text{Br}]}{60} + \frac{[\text{CHClBr}_2]}{100} + \frac{[\text{CHBr}_3]}{100} = 1$	kloroform	200
	bromodiklormetan	60
	dibromoklormetan	100
	bromoform	100
	dikloroacetena kiselina	50
	trikloroacetena kiselina	100
	dikloroacetonitril	90
	dibromoacetonitril	100
	trikloroacetonitril	1
<b>Agencija za zaštitu okoliša (EPA)</b>	kloroform	30
	trihalometani	80
	halooctene kiseline	60
<b>Europska unija (EU)</b>	ukupni trihalometani	100
<b>Južnokorejski propis</b>	ukupni trihalometani	100
	halooctene kiseline	100
	dikloroacetonitril	90
	dibromoacetonitril	100
	trikloroacetonitril	4
<b>Australska zakonska ograničenja</b>	trihalometani	250
<b>Kolumbijska uredba</b>	trihalometani	250

## 2.4. *N*-nitrozamini

*N*-nitrozamini su alifatski ili aromatski derivati sekundarnih amina, koji sadrže nitrozo ( $-NO$ ) skupinu vezanu za deprotonirani amin (Slika 1). Primarno, *N*-nitrozamini nastaju reakcijom nitrata sa sekundarnim aminom, no jednako tako moguće je i njihov nastanak redukcijom nitrata u nitrite uz prisutnost slina ili enzima u crijevnome traktu. Mnogi *N*-nitrozamini su izrazito kancerogeni te kontaminiraju nekoliko vrsta hrane, pića i vode već pri niskim koncentracijama. *N*-nitrozamini nižih molekulskih masa dobiveni su iz alkilnih ili monocikličkih sekundarnih amina i bivaju dobro okarakterizirani, a još su poznati i kao hlapivi *N*-nitrozamini. Nasuprot tome, mnogi veći i polarniji *N*-nitrozamini koji se mogu ekstrahirati iz hrane i analizirati poznati su kao nehlapivi *N*-nitrozamini. Treća, posljednja skupina *N*-nitrozamina definira se kao prividni ukupni sadržaj *N*-nitrozamina (engl. *Apparent Total N-nitrosamine Content*, ATNC), a predstavlja kombinaciju hlapivih i nehlapivih *N*-nitrozamina uključujući pri tome neidentificirane molekule poput nitrozoiranih proteina koji još nisu izolirani iz hrane. Ukoliko se mjeri ATNC, njegova vrijednost često znatno premašuje sumu identificiranih hlapivih i nehlapivih spojeva. *N*-nitrozamini od najveće važnosti i interesa su spojevi relativno male molekulske mase, posebice *N*-nitrozodimetilamin (NDMA). Drugi, važni *N*-nitrozamini koji se najčešće pronalaze u hrani, a nastali su iz sekundarnih amina su *N*-nitrozodietilamin (NDEA), *N*-nitrozometiletilamin (NMEA), *N*-nitrozodipropilamin (NDPA), *N*-nitrozodibutilamin (NDBA), *N*-nitrozopirolidin (NPYR) i *N*-nitrozopiperidin (NPIP). Glavni, nehlapivi *N*-nitrozamini su nitrozoirane aminokiseline i njezini srodni spojevi. Također, postoje i važni nitrozoirani produkti industrijskih kemikalija poput dietanolamina koji su u svezi s neprehrambenim proizvodima poput kozmetike. Nitrozoirane aminokiseline obuhvaćaju *N*-nitrozoprolin (NPRO), *N*-nitrozosarkozin (NSAR), *N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilnu kiselinu (NTCA), *N*-nitrozoooksazolidin-4-karboksilnu kiselinu i *N*-nitrozo-2-metil-tiazolidin-4-karboksilnu kiselinu [24].

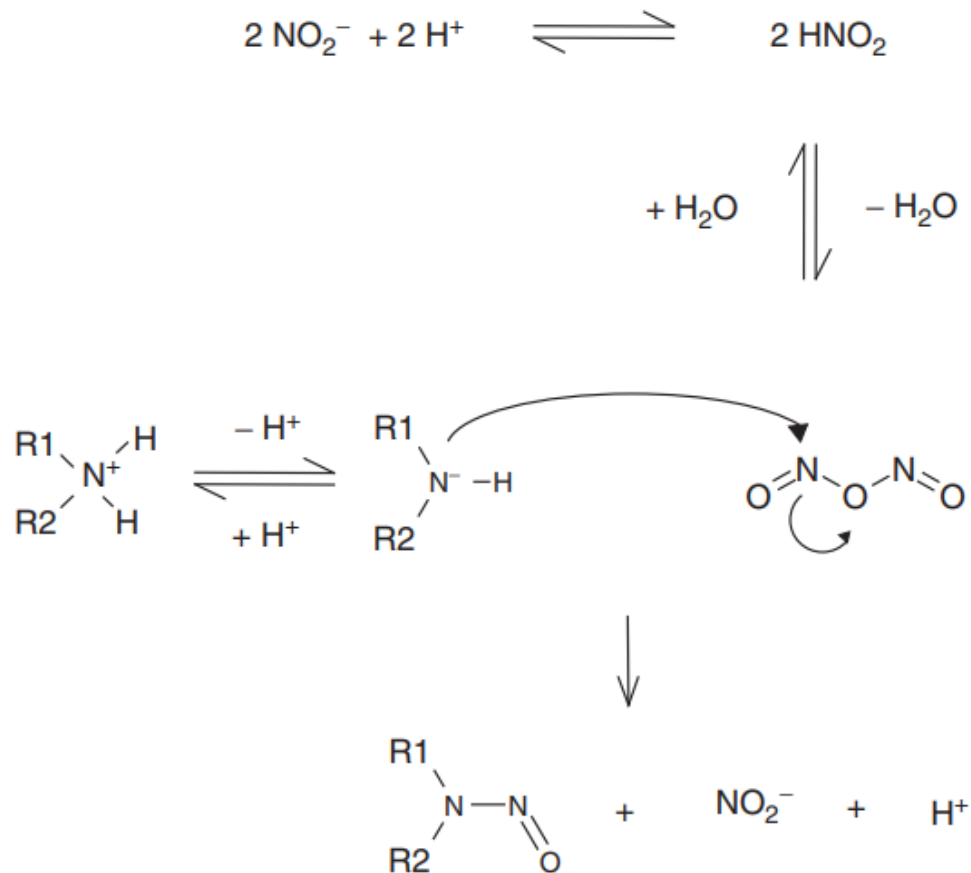


Slika 1. Kemijska struktura *N*-nitrozamina [25]

Toksičnost *N*-nitrozamina primijećena je sredinom 1950-ih godina kada je ustanovljeno kako kune hranjene haringom, a liječene nitritom, umiru od bolesti jetre. Time je potvrđeno da su sekundarni amini prirodno prisutni u ribi reagirali s nitritom i posljedično stvorili NDMA koji je uzrokovao nastanak karcinoma u jetri kune. Na osnovu prethodno opisanog događaja, nastojalo se posegnuti za metodom koja će pružiti mogućnost detekcije *N*-nitrozamina u hrani tretiranoj nitritima. U počecima sama analiza je napredovala veoma sporo, no s vremenom već 1970-ih godina primjenom plinske kromatografije u kombinaciji s analizatorom toplinske energije (engl. *Thermal Energy Analyser*, TEA) omogućena je detekcija vrlo niskih koncentracija *N*-nitrozamina. Proizvodi, poput primjerice duhana, koji sadrže sekundarne amine koji se u pravilu ne nalaze u hrani, gotovo uvijek sadrže niske koncentracije produkata nitrozacije. *N*-nitrozamini, također bivaju često povezani s industrijskim neprehrambenim proizvodima, osobito onima dobivenim od gume. Shodno tome proizvode se u znatnim količinama tijekom proizvodnje raketnih goriva na bazi hidrazina čime se uzrokuje zagađenje okoliša [24].

#### 2.4.1. Nastajanje *N*-nitrozamina

Kemijski se smatra kako se stvaranje *N*-nitrozamina odvija putem oksidacije NO u NO<sub>2</sub>, a potom i do N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, pri čemu svaki od navedenih oksida reagira sa sekundarnim aminima tvoreći *N*-nitrozamine (Slika 2). Nitrozacija sekundarnih amina odvija se pri niskim pH vrijednostima to jest u kiselim uvjetima, a samu reakciju kataliziraju nukleofilni anioni poput primjerice tiocijanata, bromida i klorida. S druge strane, reakciju je potrebno i inhibirati te se u tu svrhu poseže za askorbinskom kiselinom, a-tokoferolom, sulfaminskom kiselinom i njezinim solima. Nitrozacijom primarnih amina dolazi do formiranja alkohola, dok kod tercijarnih amina nakon njihove dealkilacije dolazi do veoma spore nitrozacije [24].



Slika 2. Mehanizam nastajanja *N*-nitrozamina iz sekundarnih amina [24]

## 2.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je moderna metoda pripreme uzoraka koja se definira kao ravnotežni separacijski proces eliminacije jedne ili više komponenti iz čvrste ili tekuće smjese primjenom pogodnog otapala. Svaka ekstrakcijska metoda odvija se kroz niz koraka, a to su: otapanje uzorka, uspostavljanje maksimalne razlike topljivosti između dviju faza uz pomoć kemijske reakcije, uspostavljanje dvofaznog sustava i ravnoteže te u konačnici razdvajanja faza. U kemijskoj analizi postupak ekstrakcije primjenjuje se u svrhu odvajanja analita ili interferencija iz matice uzorka, koncentriranja tragova analita radi postizanja niže granice određivanja, preliminarnog pročišćavanja uzorka ili pripreme obojenih metalnih kompleksa netopljivih u vodi [26].

Ekstrakcijske se metode pripreme uzoraka mogu podijeliti prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita te stoga govorimo o ekstrakciji tekuće-tekuće, ekstrakciji čvrsto-tekuće ili ekstrakciji plinovito-tekuće [27].

### 2.5.1. Ekstrakcija iz tekućih uzoraka

Prilikom ekstrakcije organskih sastojaka iz tekućih uzoraka tvar koja se ekstrahira prelazi iz jednog otapala u drugo. Djelotvornost ekstrakcije iz tekućih uzoraka uvelike je ovisna o fizikalno-kemijskim karakteristikama analita, kao što su topljivost, hidrofobnost i kiselo-bazni karakter [27]. Neke od ekstrakcijskih metoda koje se svrstavaju u ekstrakciju iz tekućih uzoraka nalaze se prikazane na Slici 3.



Slika 3. Metode ekstrakcije iz tekućih uzoraka

S obzirom na sredstvo za ekstrakciju razlikuje se:

- *ekstrakcija otapalom*: ekstrakcija tekuće-tekuće (Brza i jednostavna metoda. Provodi se u lijevku za odijeljivanje pri čemu se uzorak koji sadrži analit mućka u prikladnome otapalu 2-3 puta radi postizanja veće učinkovitosti ekstrakcije.),
- *ekstrakcija čvrstom fazom*: SPE (Najprimjenjivanija metoda pripreme uzorka, a koja se temelji na raspodjeli analita između čvrste i tekuće faze. Afinitet prema čvrstoj fazi daleko je veći nego li prema matici uzorka. Vezani analiti desorbiraju se eluiranjem.),
- *ekstrakcija u plinovitu fazu*: ekstrakcija hlapivih sastojaka u prostoru iznad uzorka (engl. *Headspace*, HS). Može se provoditi statički i dinamički [27].

S ciljem poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije, smanjenja volumena uzorka i smanjenja potrošnje otapala za ekstrakciju (uglavnom su to organska otapala štetna za analitičara i okoliš, a koja zahtijevaju posebno zbrinjavanje) razvijeni su slijedeći mikroekstrakcijski postupci:

- *tekuće-tekuće*: mikroekstrakcija na kapi (Ekonomski isplativa i brza metoda s obzirom da gotovo ne troši otapalo. Provodi se unosom mikrokapi u vodi netopljivoga organskog otapala u veliku vodenu kap.) i mikroekstrakcija otapalom (Zasniva se na difuziji, zbog čega je od velike važnosti poznavanje vrijednosti koeficijenta difuzije. Izvedena je kao trofazni sustav u kojemu se analiti u neutralnome obliku ekstrahiraju iz vodenog uzorka preko tankog sloja otapala u kap vode koja je smještena na vrhu mikroštrcaljke.),
- *ekstrakcija čvrstom fazom*: mikroekstrakcija čvrstom fazom (Ekstrakcijski mehanizam sličan je onome u ekstrakciji čvrstom fazom, a razlika je u količini sorbensa, koji je u obliku vlakana pa je metoda prikladnija za ekstrakciju malih količina analita. Glavne prednosti ove metode su izuzetno mala potrošnja organskih otapala te njezina selektivnost, jednostavnost, brzina kao i mogućnost povezivanja s plinskom i tekućinskom kromatografijom te s kapilarnom elektroforezom. Nedostatak metode je ograničen vijek uporabe vlakana zbog mogućnosti njihova oštećenja ili uništenja, što posljedično iziskuje dodatne troškove.) i ekstrakcija miješalom (Metoda ekstrakcije u kojoj se kao nosač sorbensa koristi magnetsko miješalo. Na taj način se osigurava povećanje površine sorbensa za 50-250 puta u odnosu na vlakno što posljedično rezultira višom učinkovitošću.) [27].

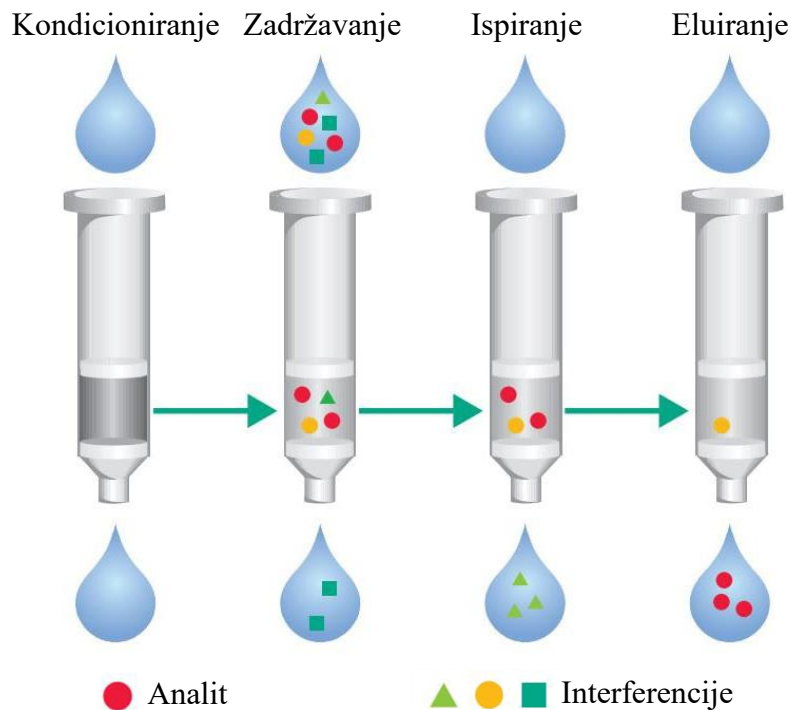


### 2.5.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)

Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid phase extraction*, SPE) razvijena je 1970-ih godina, a temelji se na propuštanju velike količine složenog uzorka kroz reaktivni sorbens odnosno čvrstu fazu. Reaktivni sorbens biva smješten u kartušama, plastičnim ili staklenim kolonama ili diskovima različitih veličina, a upravo njegovim pravilnim odabirom postiže se zahtijevana selektivnost i kapacitet te privlačenje analita. Također, sam izbor sorbensa ovisan je i o njegovim potencijalnim interakcijama s funkcionalnim skupinama analita, ali istovremeno i o matici uzorka te njezinim interakcijama sa sorbensom i analitom [27].

Postupak ekstrakcije čvrstom fazom najčešće se provodi u četiri jednostavna koraka (Slika 4) [27]:

- 1) Kondicioniranje (solvatacija sorbensa kako bi se pripremio za propuštanje uzorka)
- 2) Zadržavanje (propuštanje uzorka kroz sorbens pri čemu se analit i neki drugi sastojci matice uzorka zadržavaju/sorbiraju na površinu sorbensa)
- 3) Ispiranje (uklanjanje neželjenih tvari koje su vezane na površini sorbensa)
- 4) Eluiranje ili desorpcija analita odgovarajućim otapalom.



**Slika 4.** Shematski prikaz koraka ekstrakcije čvrstom fazom [28]

Ekstrakcija čvrstom fazom primarno se provodi s ciljem uklanjanja interferencija prisutnih u uzorku i/ili koncentriranja samog analita ili skupine strukturno sličnih analita [29]. Svoju primjenu, ova analitička tehnika pronašla je u ekstrahiranju vrlo različitih analita iz tekućih uzoraka te u pročišćavanju ekstrakata dobivenih iz tla, sedimenta te bioloških uzoraka drugim metodama pripreve [27].

Sorbensi koji se primjenjuju u ekstrakciji čvrstom fazom različitih su svojstava, od onih klasičnih pa do izrazito selektivnih. Shodno tome, najčešće korištene vrste sorbensa su modificirani silikagel, ionoizmjenjivačke smole, polimeri te novi selektivni i inovativni sorbensi poput primjerice polimera s otiskom molekule. Navedeni sorbensi pakiraju se u kartuše, odnosno staklene ili plastične otvorene kolone, između dva filtera izrađena od polietilena, nehrđajućeg čelika ili teflona (Slika 5). Uobičajena masa čvrstog sorbensa koja se smješta u kartuše kreće se u rasponu između 35 i 2000 mg [29].



**Slika 5.** Primjeri različitih vrsta sorbensa pakiranih u plastične kolone [30]

Jedan od prvih korištenih sorbensa u ekstrakciji čvrstom fazom bio je modificirani silikagel. Modificirani silikagel dobiva se reakcijom silanolnih skupina na površini čestice silikagela i organosilana koji sadrži hidrofobne alkilne ili arilne funkcionalne skupine (C1, C2, C4, C8, C18, fenil). Njihov glavni nedostatak je zaostajanje slobodnih silanolnih skupina na površini po završetku reakcije s organosilanom zbog čega bivaju neprikladnima za ekstrakciju polarnih, osobito bazičnih spojeva [29].

U novije vrijeme u ekstrakciji čvrstom fazom sve češća je upotreba poroznih polimera kao sorbensa. Osim što ne sadrže zaostale silanolne skupine, kao prednost može se istaknuti i njihova stabilnost u pH području od 1 do 14 te kapacitet za veće volumene uzorka. Za razliku od modificiranog silikagela, ovaj sorbens prikladan je za polarne i nepolarne analite te zadržava učinkovitost ekstrakcije čak i ukoliko se isuši [29].

Još jedan od sorbensa čija je primjena sve učestalija posljednjih godina je i polimer s otiskom molekule (engl. *Molecularly imprinted polymer*, MIP). To je sintetički polimer za kojega se tijekom polimerizacije molekula predložak vezuje kovalentnim i nekovalentnim vezama koje se potom eliminiraju kemijskom reakcijom ili ekstrakcijom. Ovaj sorbens odlikuje se izvanrednom selektivnošću, primjenjivošću za iznimno kompleksne uzorke, stabilnošću pri veoma visokim temperaturama te širokom pH području [29].

## 2.6. Kromatografija

Kromatografija je najučinkovitija fizikalno-kemijska tehnika odjeljivanja i analiziranja tvari koja se zasniva na različitoj sorpciji sastojaka na prikladnom sorbensu. Zahvaljujući tome široko je primjenjiva i učinkovita u mnogobrojnim znanstvenim, biomedicinskim i forenzičkim ispitivanjima. Kromatografski sustav čine dvije faze, pokretna odnosno mobilna i nepokretna odnosno stacionarna te ispitivana tvar koja se tokom kromatografskog procesa nastoji raspodijeliti između njih. Narušavanjem ravnotežnoga stanja ispitivana tvar se giba zajedno s pokretnom fazom uz povremeno zadržavanje u nepokretnoj fazi ovisno o jačini uspostavljenih interakcija [26]. Kromatografske tehnike moguće je podijeliti na tri različita načina: s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, na temelju sastava pokretne faze te na osnovu izvedbene tehnike [31].

Kromatografske tehnike se s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze mogu podijeliti na:

- *razdjelnu kromatografiju* (ravnoteža se uspostavlja između pokretne faze koja može biti tekućina ili fluid u superkritičnim uvjetima te tekuće nepokretne faze vezane na čvrsti inertni nosač),
- *adsorpcijsku kromatografiju* (ravnoteža se uspostavlja između tekućine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze),

- *ionsko-izmjenjivačku kromatografiju* (ravnoteža se uspostavlja između anionske ili kationske nepokretne faze te molekula ili funkcionalnih skupina),
- *afinitetnu kromatografiju* (ravnoteža se uspostavlja između nepokretne čvrste faze i kemijski vezanih liganada),
- *kromatografiju isključenjem po veličini* (ravnoteža se uspostavlja između nepokretne faze u obliku materijala s porama definiranih dimenzija) [31].

Kromatografske tehnike na temelju sastava pokretne faze je moguće podijeliti na:

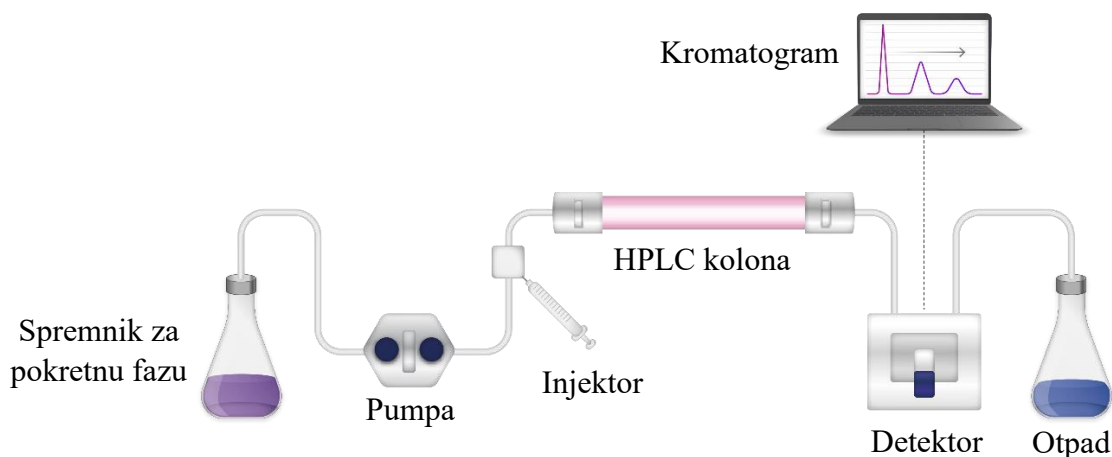
- *plinsku kromatografiju*, GC (pokretna faza je inertni plin),
- *tekućinsku kromatografiju*, LC (pokretna faza je kapljevina male viskoznosti),
- *fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima*, SFC (pokretna faza je fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka) [31].

Kromatografske tehnike na osnovu njihove izvedbe moguće je podijeliti na:

- *kromatografiju na stupcu* ili *koloni*,
- *plošnu kromatografiju* (kromatografija na papiru i tankoslojna kromatografija) [26].

### **2.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) je analitička tehnika koja se primjenjuje za odvajanje, identifikaciju ili kvantifikaciju svake komponente u smjesi [32]. Osnovni konstrukcijski dijelovi svakog tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti su: spremnici za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona i detektor [31]. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti nalazi se na Slici 6.

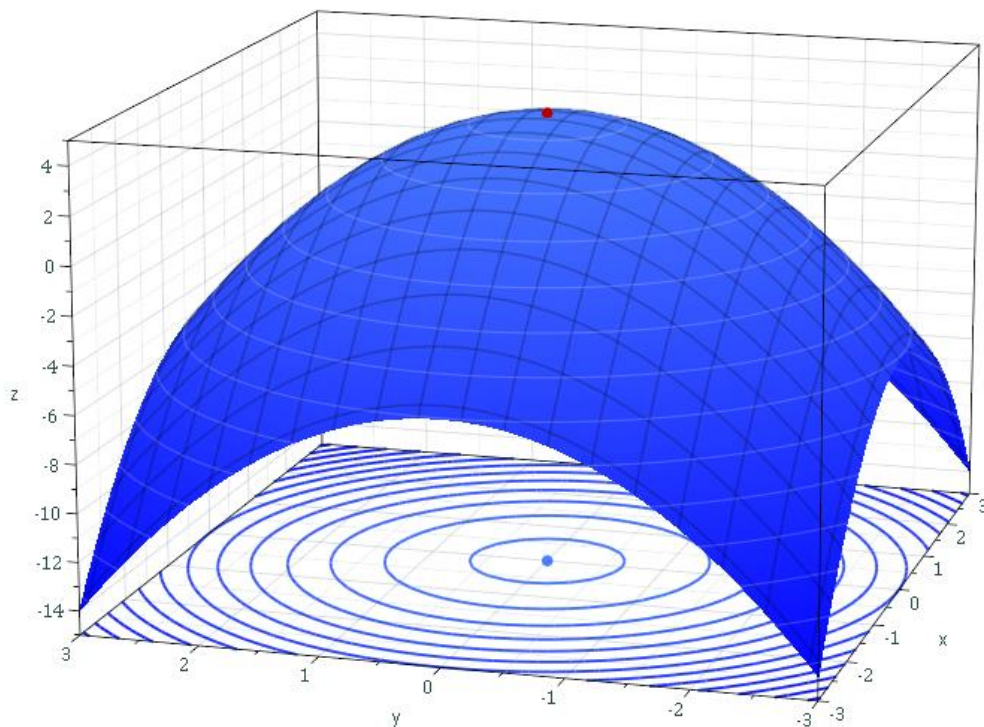


**Slika 6.** Shematski prikaz tekucijskog kromatografa visoke djelotvornosti [33]

Prilikom pristupanja rješavanju analitičkog problema HPLC-om u pravilu se prvo poseže za eluiranjem kromatografijom obratnih faza [31]. Kromatografija obratnih faza podrazumijeva uporabu nepokretne nepolarne faze primjerice modificiranog silikagela te pokretne polarne faze poput smjese vode i polarnog organskog otapala. Kod ove vrste kromatografije mehanizam razdvajanja se zasniva na hidrofobnosti analita. Nasuprot tome, druga solucija za rješavanje analitičkog problema je primjena eluiranja kromatografijom normalnih faza. Kromatografija normalnih faza suprotna je prethodno opisanoj, te podrazumijeva nepokretnu polarnu fazu kao što je silikagel ili neutralni aluminijski oksid i pokretnu nepolarnu fazu odnosno organsko otapalo. U ovome slučaju mehanizam odjeljivanja zavisi o interakciji polarnog analita s nepokretnom polarnom fazom [26]. Uz sve navedeno, kod rješavanja analitičkog problema HPLC-om nužno je razmotriti i opcije izokratnog te gradijentnog eluiranja. Izokratno eluiranje podrazumijeva stalan sastav pokretnih faza kroz cijelo vrijeme trajanja analize, dok kod gradijentnog eluiranja sastav pokretnih faza se postupno mijenja [31].

## 2.7. Optimizacija

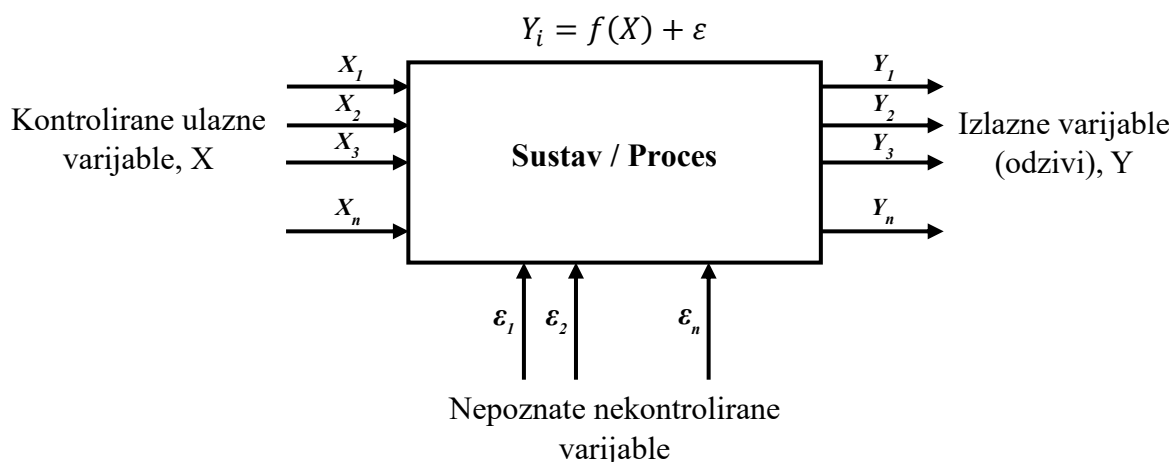
Optimizacija ili matematičko programiranje je naziv skovan 1940-ih godina, a predstavlja skup matematičkih principa i metoda koji se upotrebljava za rješavanje kvantitativnih problema u mnogim disciplinama poput primjerice fizike, kemije, biologije, inženjerstva, ekonomije ili pak poslovanja. Optimizacija obuhvaća proučavanje matematičke strukture optimizacijskih problema, pronalazak metoda za rješavanje istih, proučavanje matematičkih svojstava tih metoda te njihovu implementaciju na računala. Optimizacijski problemi u praksi najčešće uključuju tri temeljna elementa. Prvi element je jedna numerička veličina ili funkcija cilja koja zahtjeva maksimizaciju ili minimizaciju (Slika 7). Drugi element je skup čimbenika, to jest veličina čijim je vrijednostima moguće manipulirati u svrhu optimiziranja cilja. Treći, posljednji element optimizacijskog problema predstavlja skup ograničenja odnosno ograničenja vrijednosti koje pojedini čimbenici mogu poprimiti. Ovisno o tome radi li se u optimizacijskom problemu o kontinuiranim, diskretnim ili kombinatornim čimbenicima, očekuje se primjena različitih vrsta pristupa problemu. Samu optimizaciju je moguće podijeliti u nekoliko klasa, a to su: linearno i nelinearno programiranje, stohastičko programiranje i kombinatorna optimizacija [34].



Slika 7. Primjer maksimizacije funkcije dvaju čimbenika [35]

## 2.8. Metode dizajna eksperimenata

Dizajn eksperimenata (engl. *Design of Experiments*, DoE) predstavlja granu primijenjene statistike koja uključuje planiranje, provedbu, analizu i interpretaciju kontroliranih eksperimenata kako bi se izmjerili čimbenici koji utječu na vrijednost parametra ili grupe parametara od interesa [36]. Dizajn eksperimenata najbrži je i najisplativiji način za dizajniranje djelotvornih eksperimenata čime se uzrokuje povećanje produktivnosti te rješavanje najtežih izazova i problema u razvoju i proizvodnji. Najčešće se primjenjuje u farmaceutskoj, prehrambenoj i petrokemijskoj industriji, a ovisno o potrebama i primjeni moguće je posegnuti za osnovnim ili naprednim dizajnom eksperimenata [37]. U inženjerstvu i znanosti, eksperimentiranje ima značajnu ulogu prilikom razvoja novih proizvoda, kao i u razvoju te poboljšanju procesa proizvodnje [38]. Sam pristup eksperimentiranju moguće je opisati shematski, metodom crne kutije (Slika 8).



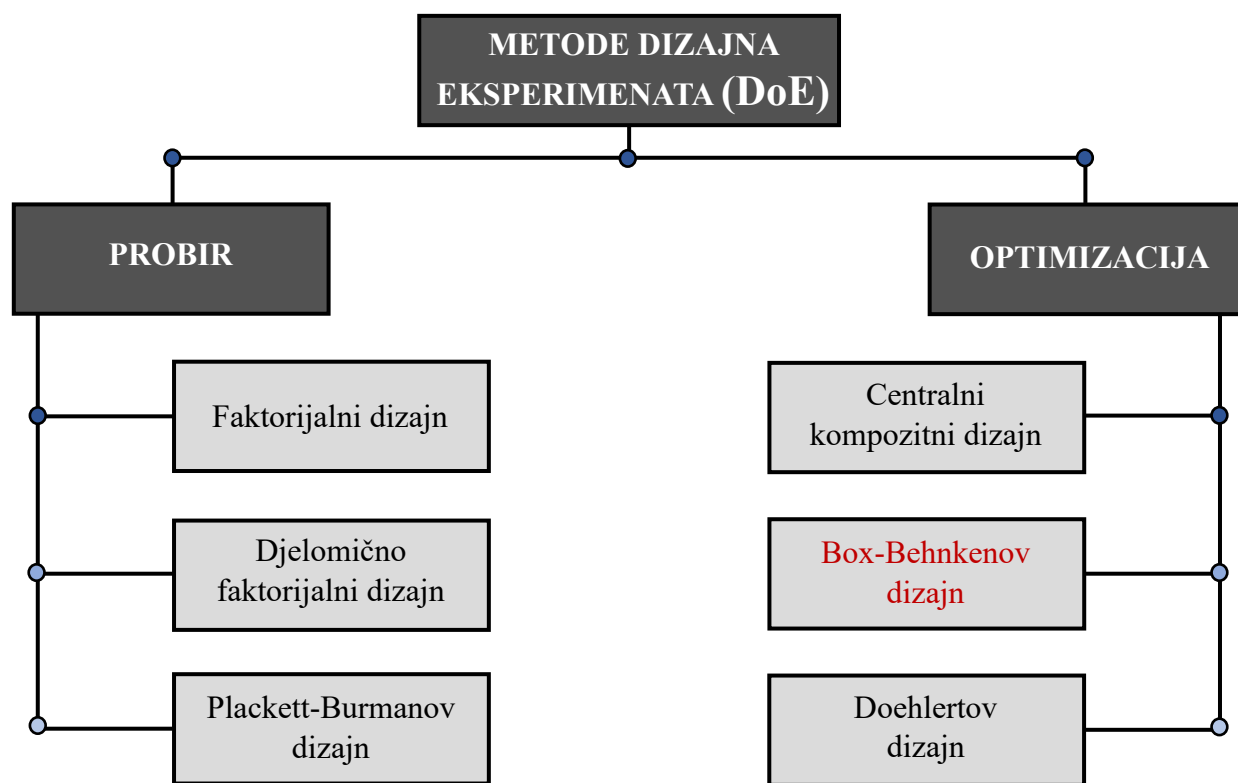
**Slika 8.** Shematski prikaz metode crne kutije [38]

Shematski prikaz metode crne kutije predstavlja proces kojega je moguće okarakterizirati pomoću ulaznih odnosno nezavisnih varijabli, te izlaznih odnosno zavisnih varijabli. Ulazne varijable pri tome mogu biti kontrolirane i nekontrolirane, a izlazne varijable predstavljaju odziv sustava. Svrha svakog eksperimenta je utvrditi njegovu uzročnu posljedičnu vezu [38].

Postavlja se pitanje koji je uopće cilj korištenja metoda dizajna eksperimenata? Naime dizajn eksperimenata služi za dobivanje što većeg broja informacija o istraživanom sustavu uz minimalan eksperimentalni i financijski angažman. Sama metoda sastoji se od sustavnog odabira strukturiranog plana u kojem se ulazni čimbenici organizirano mijenjaju kako bi se dobio prikaz

utjecaja pojedinih čimbenika na stanoviti odziv. Primarni cilj ove metode zapravo bi bio optimizirati odziv s najmanje moguće varijabilnosti. Kako bi zadovoljili statistiku, prilikom planiranja ravnoteže moguće je izračunati potencijalne kombinacije velikog broja ulaznih čimbenika pri raznim razinama. Na taj način bi se odredila najbolja kombinacija s najmanjim brojem eksperimenata [38].

Prilikom optimizacije željene metode primjenjuje se dizajn eksperimenata kojega je moguće provesti u dva koraka, a to su: probir i optimizacija. Svaki korak se zatim može klasificirati u nekoliko podskupina kao što je prikazano na Slici 9.



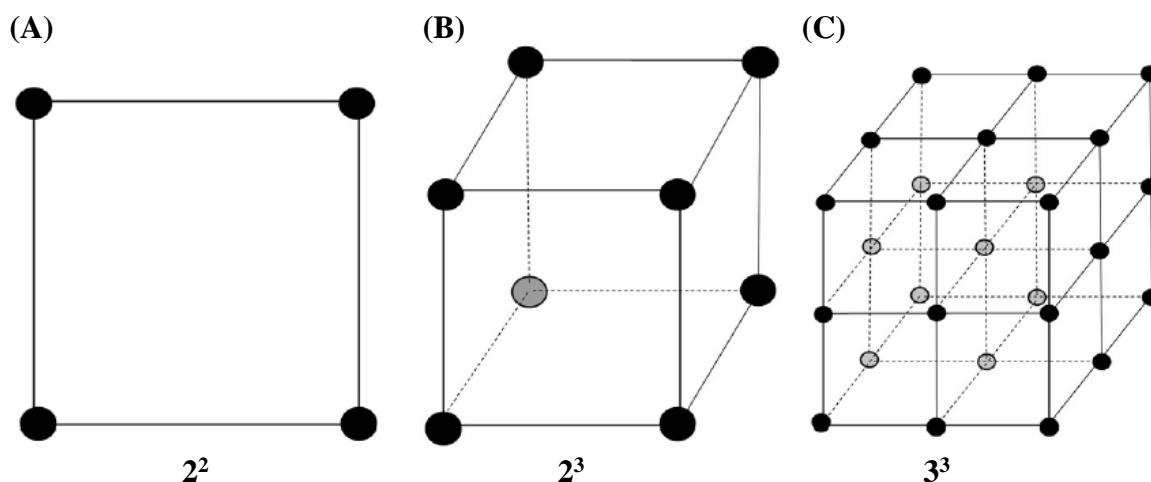
**Slika 9.** Klasifikacija metoda dizajna eksperimenata (DoE) [39]

### 2.8.1. Faktorijalni dizajn

Metodu faktorijalnog dizajna predložio je Sir Ronald Aylmer Fisher davne 1935. godine. Metoda faktorijalnog dizajna vjerojatno je najčešća i najintuitivnija strategija eksperimentalnog dizajna koja pruža najpotpuniji uvid u proučavani sustav s obzirom da se temelji na izvođenju svih mogućih kombinacija razina čimbenika [38]. Ukoliko se pretpostavi da postoji  $k$  čimbenika za



istraživanje te da se svaki čimbenik može postaviti na  $L$  različitih razina tada je broj mogućih eksperimenata,  $N$  moguće opisati pomoću izraza:  $N = L^k$ . Najjednostavniji i u praksi najčešće primjenjivan je faktorijalni dizajn s varijacijom čimbenika na dvije razine. Povećanjem broja razina i čimbenika posljedično dolazi i do povećanja broja mogućih kombinacija odnosno eksperimenata. Stoga će za dizajn s dva čimbenika na dvije razine biti potrebno provesti 4 eksperimenta ( $N = 2^2 = 4$ ), za dizajn s tri čimbenika na dvije razine 8 eksperimenata ( $N = 2^3 = 8$ ), a za dizajn s tri čimbenika na tri razina čak 27 eksperimenata ( $N = 3^3 = 27$ ) [39]. Svaki faktorijalni plan posjeduje odgovarajuću matricu, a koja se zatim može predočiti geometrijskim oblicima [38]. Slika 10 prikazuje primjere faktorijalnog dizajna uključujući različiti broj čimbenika i razina.

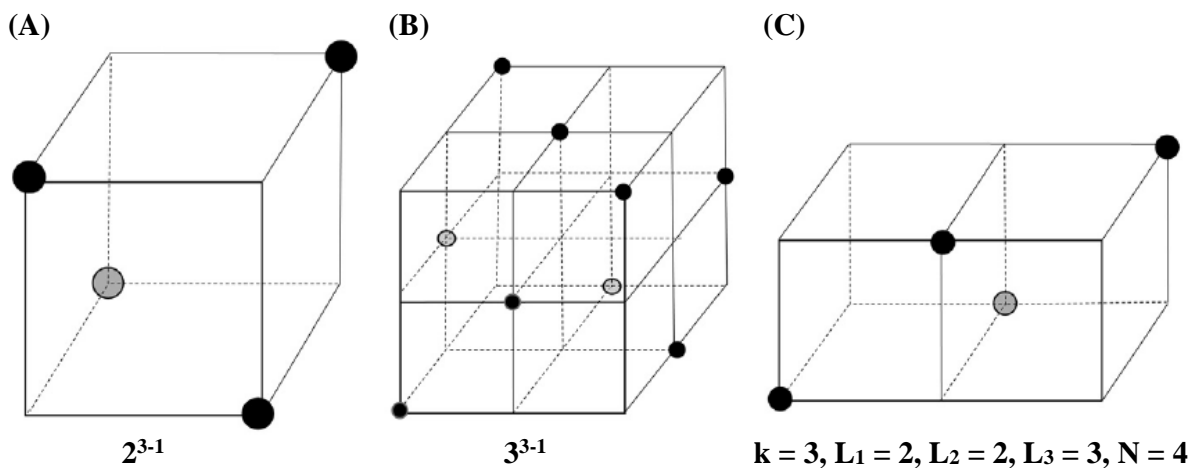


**Slika 10.** Primjeri faktorijalnog dizajna: (A) dva čimbenika na dvije razine, (B) tri čimbenika na dvije razine, (C) tri čimbenika na tri razine [39]

### 2.8.2. Djelomično faktorijalni dizajn

Djelomično faktorijalni dizajn (Slika 11) jedan je od najčešće korištenih planova koji se primjenjuje kod analitičkih metoda, a osobito kod metode ekstrakcije čvrstom fazom [39]. Izuzev navedenoga, veliku primjenu pronalazi i u istraživanju, razvoju te unaprjeđenju procesa u industriji. U tim se eksperimentima u obzir uzima veliki broj čimbenika sa svrhom utvrđivanja onih čimbenika koji imaju najznačajniji utjecaj. Stoga, ukoliko je broj čimbenika relativno velik te ukoliko se međudjelovanja višeg reda između više od dva čimbenika mogu zanemariti, željene preliminarne informacije tada se mogu dobiti primjenom samo određenog dijela faktorijalnog dizajna. U tom slučaju zanemaruju se utjecaji interakcija između tri i više čimbenika, a promatraju

se samo utjecaji pojedinačnih čimbenika ili interakcije prvoga reda. S obzirom da se odabire samo dio faktorijalnog dizajna dolazi do izostavljanja određenih pokusa. Za razliku od prethodno opisanog faktorijalnog dizajna, kod djelomičnog faktorijalnog dizajna broj mogućih eksperimenata,  $N$  određuje se putem izraza:  $N = 2^{k-L}$  pri čemu je  $k$  ukupni broj čimbenika, a  $L$  cijeli broj koji ukazuje na nepotpunost dizajna. Ukoliko je  $L = 0$ , tada je faktorijalni dizajn potpun. Najčešće se odabire 1/2, 1/4, 1/8 potpunog faktorijalnog dizajna, pri čemu odabrani kandidati trebaju biti uravnoteženi i ortogonalni [38].



Slika 11. Primjeri djelomičnog faktorijalnog dizajna [39]

### 2.8.3. Plackett-Burmanov dizajn

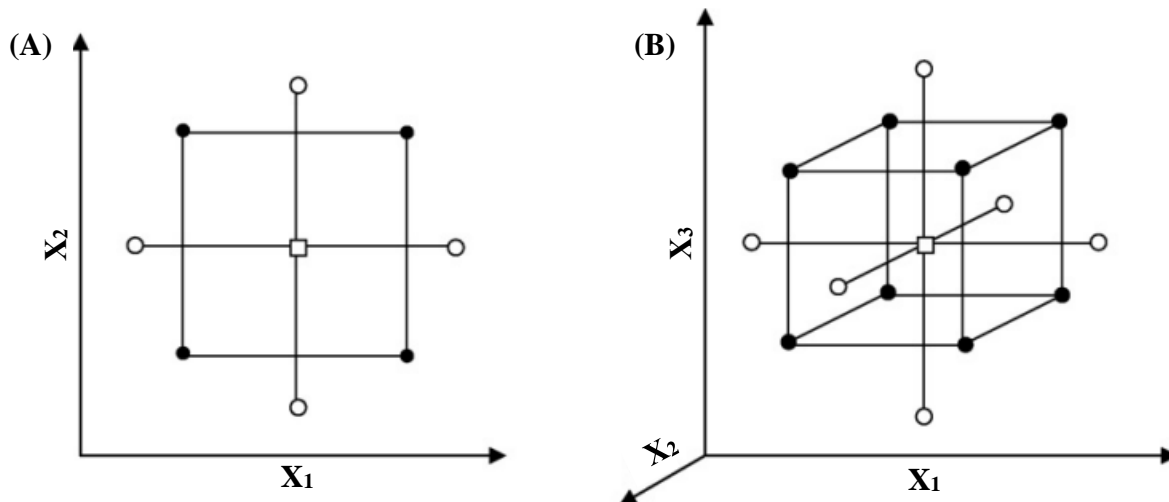
Plackett-Burmanov dizajn ili tzv. zasićeni plan predložili su R. L. Plackett i J. P. Burman 1946. godine, a korišten je kao dizajn eksperimenata za procjenu robusnosti tijekom razvoja metode [38]. Plackett-Burmanov dizajn smatra se veoma ekonomičnim s obzirom da izdvaja nevažne čimbenike čime omogućuje izbjegavanje prikupljanja velikih količina podataka. Za razliku od prethodno opisanih metoda dizajna eksperimenata, Plackett-Burmanov dizajn dozvoljava procjenu najviše  $k = N-1$  čimbenika u  $N$  eksperimenata, pri čemu je  $N$  višekratnik broja četiri ( $N = 8, 12, 16, 20, 24, \dots$ ) [39]. Zasićeni plan kreira se upotrebom Hadamardove matrice prikazane Tablicom 2, a na osnovu koje se može zaključiti kako se preliminarne studije koje sadrže i do 11 čimbenika mogu realizirati u svega 12 eksperimenata [38].

**Tablica 2.** Hadamardova matrica od 12 eksperimenata za 11 čimbenika [38]

	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$
<b>1</b>	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
<b>2</b>	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
<b>3</b>	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
<b>4</b>	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
<b>5</b>	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
<b>6</b>	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
<b>7</b>	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
<b>8</b>	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
<b>10</b>	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
<b>11</b>	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
<b>12</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

#### 2.8.4. Centralni kompozitni dizajn

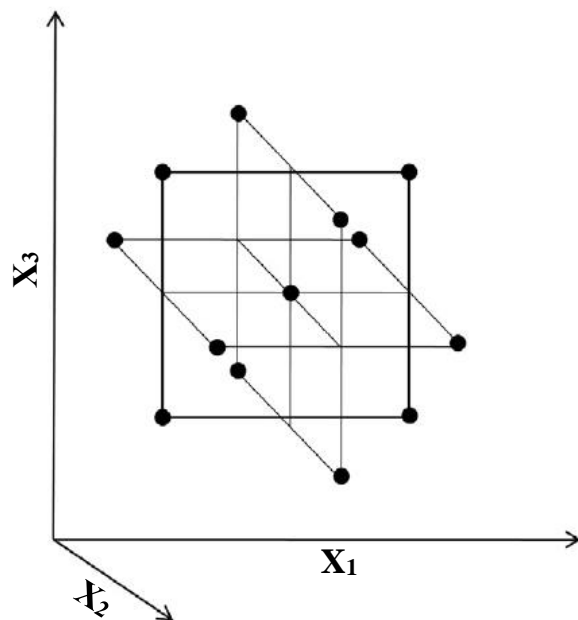
Centralni kompozitni dizajn predstavlja jednu od najpopularnijih metoda dizajna eksperimenata drugoga reda, a koja se koristi za modeliranje procesa s dva ili više čimbenika (Slika 12). Ovu vrstu dizajna predstavili su G. E. P. Box i K. B. Wilson 1951. godine, a sam dizajn u osnovi se sastoji od slijedećih dijelova: faktorijalnog ili djelomično faktorijalnog dizajna, dodatnog, najčešće zvjezdastog dizajna u kojemu su eksperimentalne točke udaljene od središta te središnje odnosno centralne točke. Broj eksperimenata koje je potrebno provesti u centralnom kompozitnom dizajnu određuje se putem slijedećeg izraza:  $N = 2^k + 2k + C_p$ , gdje je  $k$  broj čimbenika, a  $C_p$  broj ponavljanja u središnjoj točki [40].



**Slika 12.** Centralni kompozitni dizajn za optimizaciju: (A) dva ili (B) tri čimbenika [40]

### 2.8.5. Box-Behnkenov dizajn

Box-Behnkenov dizajn predložili su G. E. P. Box i D. Behnken 1960. godine, a može se koristiti za modeliranje procesa s tri ili više čimbenika, pri čemu se svi ti čimbenici proučavaju na tri razine (-1, 0, +1). Sam dizajn zasniva se na nepotpunom, ali uravnoteženom dizajnu blokova [39]. U Box-Behnkenovom dizajnu, eksperimentalne točke bivaju smještene na hipersferi te su jednako udaljene od središnje točke (Slika 13).

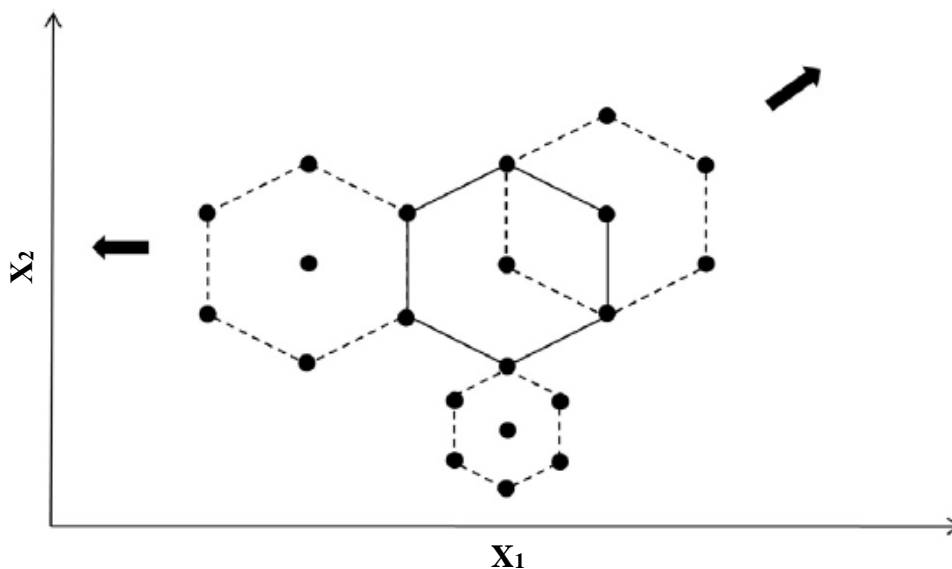


**Slika 13.** Box-Behnkenov dizajn za optimizaciju triju čimbenika [39]

Sam broj eksperimenata,  $N$ , koji je potreban za dobivanje modela definira se primjenom slijedećeg izraza:  $N = 2k(k+1) + C_p$ , pri čemu je  $k$  broj čimbenika, a  $C_p$  broj središnjih točaka [40]. Box-Behnkenov dizajn je učinkovitiji i ekonomičniji od odgovarajućih  $3^k$  dizajna, osobito za veliki broj čimbenika. Učestalo se primjenjuje za optimizaciju nekoliko čimbenika ekstrakcije čvrstom fazom poput primjerice: vremena ekstrakcije, volumena uzorka te volumena eluensa [39].

### 2.8.6. Doehlertov dizajn

Doehlertov dizajn datira iz 1970. godine kada ga je razvio Doehlert. Ova vrsta dizajna praktična je i ekonomična alternativa u odnosu na ostale metode eksperimentalnog dizajna drugoga reda, budući da zahtjeva manji broj eksperimenata [40]. U Doehlertovu dizajnu, broj razina nije jednak za sve čimbenike, stoga se za dva čimbenika ovaj dizajn uspostavlja na tri i pet razina, a za tri čimbenika uspostavlja se na tri, pet i sedam razina. Broj eksperimenata koji će se provesti definira se izrazom:  $N = k^2 + k + C_p$ , gdje je  $k$  broj čimbenika, a  $C_p$  broj središnjih točaka. Također još jedna od ključnih značajki ovoga dizajna je ta da se eksperimentalne matrice pomiču u drugo eksperimentalno područje na način da se zadrže prethodno ispitane susjedne točke. Primjer Doehlertova dizajna za optimizaciju dvaju čimbenika kao i neki od mogućih pomaka početnog dizajna korištenjem prethodnih točaka moguće je prikazati Slikom 14 [40].



**Slika 14.** Doehlertov dizajn za optimizaciju dvaju čimbenika [39]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu ovoga rada prikazane su Tablicom 3.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	PROIZVOĐAČ	ČISTOĆA	CAS BROJ
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	Fisher Scientific, Loughborough, UK	HPLC	75-05-8
Diklormetan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	p.a.	75-09-2
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	J.T. Baker, Avantor Performance Materials Poland S. A., Gliwice, Poljska	HPLC	67-56-1

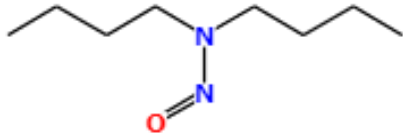


Izuzev prethodno navedenih kemikalija, tijekom rada u laboratoriju korištene su i znatne količine MilliQ vode dobivene pomoću odgovarajućeg sustava koji je detaljnije opisan u poglavlju 3.2.1. U najvećoj mjeri MilliQ voda primjenjivana je za pripremu otopina *N*-nitrozamina odgovarajućih koncentracija, kondicioniranje sorbensa u ekstrakciji čvrstom fazom te u pripremi pokretne faze za tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti.

##### 3.1.2. *N*-nitrozamini

Tijekom provedbe eksperimenata ispitivano je sedam *N*-nitrozamina čija se fizikalno-kemijska svojstva nalaze u Tablicama 4-10. *N*-nitrozamini su nusprodukti dezinfekcije koji u najvećoj mjeri nastaju za vrijeme dezinfekcije vode za piće primjenom kloramina, slobodnog klora, klorova dioksida te ozona, a također moguć je i njihov nastanak UV zračenjem specifičnih efluenata [41].

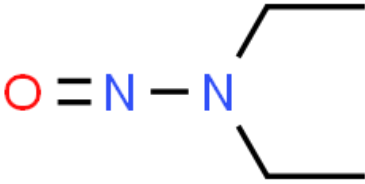


### 3.1.2.1. *N, N*-dibutilnitrozni amid (NDBA)

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva NDBA-a [42, 43]

<b>NAZIV PREMA IUPAC-U</b>	<i>N, N</i> -dibutilnitrozni amid
<b>MOLEKULSKA FORMULA</b>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O
<b>STRUKTURNA FORMULA</b>	
<b>PIKTOGRAMI OPASNOSTI</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 07</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 08</b></p>  </div> </div>
<b>MOLEKULSKA MASA</b>	158,24 g/mol
<b>CAS BROJ</b>	924-16-3
<b>SVOJSTVA/IZGLED</b>	blijedožuta, uljasta tekućina
<b>TALIŠTE</b>	< 25 °C
<b>VRELIŠTE</b>	237 °C
<b>TLAK PARE (25 °C)</b>	0,04 mmHg
<b>TOPLJIVOST U VODI</b>	1,20 g/l
<b>GUSTOĆA (20 °C)</b>	0,9009 g/ml
<b>INDEKS LOMA (20 °C)</b>	1,4475
<b>MAKSIMALNA APSORPCIJA U VODI</b>	233 nm
<b>p<i>K</i><sub>a</sub></b>	3,14
<b>log <i>K</i><sub>ow</sub></b>	2,63

### 3.1.2.2. *N, N*-dietilnitrozni amid (NDEA)

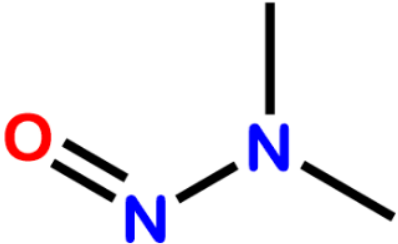



Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva NDEA-a [44, 45]

NAZIV PREMA IUPAC-U	<i>N, N</i> -dietilnitrozni amid
MOLEKULSKA FORMULA	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O
STRUKTURNA FORMULA	
PIKTOGRAMI OPASNOSTI	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 06</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 08</b></p>  </div> </div>
MOLEKULSKA MASA	102,14 g/mol
CAS BROJ	55-18-5
SVOJSTVA/IZGLED	bistra, blago žuta tekućina
TALIŠTE	< 25 °C
VRELIŠTE	177 °C
PLAMIŠTE	63 °C
TLAK PARE (25 °C)	5,70 mmHg
TOPLJIVOST U VODI (24 °C)	106,20 g/l
GUSTOĆA (20 °C)	0,9422 g/ml
INDEKS LOMA (20 °C)	1,4386
MAKSIMALNA APSORPCIJA U VODI	230 ; 340 nm
p <i>K</i> <sub>a</sub>	3,14
log <i>K</i> <sub>ow</sub>	0,48



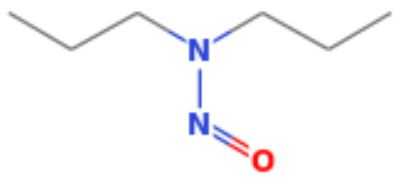



### 3.1.2.3. *N, N*-dimetilnitrozni amid (NDMA)

Tablica 6. Fizikalno-kemijska svojstva NDMA-a [46-48]

NAZIV PREMA IUPAC-U	<i>N, N</i> -dimetilnitrozni amid		
MOLEKULSKA FORMULA	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O		
STRUKTURNA FORMULA			
PIKTOGRAMI OPASNOSTI	<b>GHS 06</b> 	<b>GHS 08</b> 	<b>GHS 09</b> 
MOLEKULSKA MASA	74,08 g/mol		
CAS BROJ	62-75-9		
SVOJSTVA/IZGLED	žuta, uljasta tekućina		
TALIŠTE	< 25 °C		
VRELIŠTE	153 °C		
PLAMIŠTE	61 °C		
TLAK PARE (20 °C)	2,70 mmHg		
TOPLJIVOST U VODI	106,00 g/l		
GUSTOĆA (20 °C)	1,0048 g/ml		
INDEKS LOMA (20 °C)	1,4368		
p <i>K</i> <sub>a</sub>	3,52		
log <i>K</i> <sub>ow</sub>	-0,57		

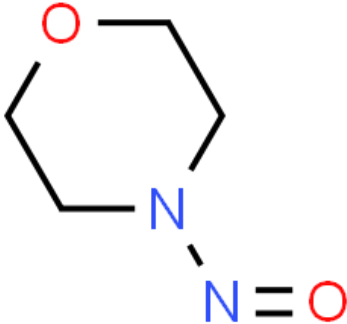


### 3.1.2.4. *N, N*-dipropilnitrozni amid (NDPA)

Tablica 7. Fizikalno-kemijska svojstva NDPA-a [49, 50]

<b>NAZIV PREMA IUPAC-U</b>	<i>N, N</i> -dipropilnitrozni amid		
<b>MOLEKULSKA FORMULA</b>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O		
<b>STRUKTURNA FORMULA</b>			
<b>PIKTOGRAMI OPASNOSTI</b>	<b>GHS 07</b> 	<b>GHS 08</b> 	<b>GHS 09</b> 
<b>MOLEKULSKA MASA</b>	130,19 g/mol		
<b>CAS BROJ</b>	621-64-7		
<b>SVOJSTVA/IZGLED</b>	bistra do blijedožuta tekućina		
<b>TALIŠTE</b>	-		
<b>VRELIŠTE</b>	206 °C		
<b>PLAMIŠTE</b>	10 °C		
<b>TLAK PARE (25 °C)</b>	0,39 mmHg		
<b>TOPLJIVOST U VODI (25 °C)</b>	9,90 g/l		
<b>GUSTOĆA (20 °C)</b>	0,9163 g/ml		
<b>INDEKS LOMA (20 °C)</b>	1,4437		
<b>MAKSIMALNA APSORPCIJA U VODI</b>	233 nm		
<b>pK<sub>a</sub></b>	3,18		
<b>log K<sub>ow</sub></b>	1,36		

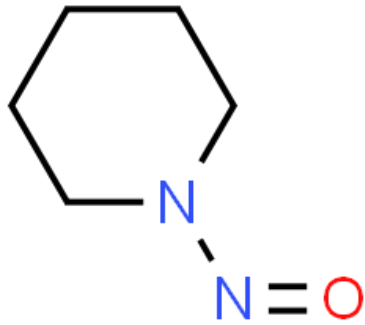


### 3.1.2.5. 4-nitrozomorfolin (NMOR)

Tablica 8. Fizikalno-kemijska svojstva NMOR-a [51, 52]

<b>NAZIV PREMA IUPAC-U</b>	4-nitrozomorfolin
<b>MOLEKULSKA FORMULA</b>	$C_4H_8N_2O_2$
<b>STRUKTURNA FORMULA</b>	
<b>PIKTOGRAMI OPASNOSTI</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 06</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 08</b></p>  </div> </div>
<b>MOLEKULSKA MASA</b>	116,12 g/mol
<b>CAS BROJ</b>	59-89-2
<b>SVOJSTVA/IZGLED</b>	žuti kristali
<b>TALIŠTE</b>	29 °C
<b>VRELIŠTE</b>	225 °C
<b>TLAK PARE (20 °C)</b>	0,04 mmHg
<b>TOPLJIVOST U VODI</b>	92,8 g/l
<b>p<i>K</i><sub>a</sub></b>	3,14
<b>log <i>K</i><sub>ow</sub></b>	-0,44

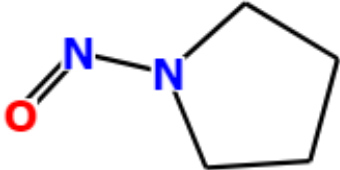


### 3.1.2.6. 1-nitrozopiperidin (NPIP)

Tablica 9. Fizikalno-kemijska svojstva NPIP-a [53-55]

<b>NAZIV PREMA IUPAC-U</b>	1-nitrozopiperidin
<b>MOLEKULSKA FORMULA</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O
<b>STRUKTURNA FORMULA</b>	
<b>PIKTOGRAMI OPASNOSTI</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 06</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 08</b></p>  </div> </div>
<b>MOLEKULSKA MASA</b>	114,15 g/mol
<b>CAS BROJ</b>	100-75-4
<b>SVOJSTVA/IZGLED</b>	svijetlo žuta, uljasta tekućina
<b>TALIŠTE</b>	170 °C (raspad)
<b>VRELIŠTE</b>	219 °C
<b>PLAMIŠTE</b>	11 °C
<b>TLAK PARE (20 °C)</b>	0,09 mmHg
<b>TOPLJIVOST U VODI (24 °C)</b>	76,48 g/l
<b>GUSTOĆA (18,5 °C)</b>	1,0631 g/ml
<b>INDEKS LOMA (19 °C)</b>	1,4933
<b>pK<sub>a</sub></b>	3,30
<b>log K<sub>ow</sub></b>	0,36

### 3.1.2.7. 1-nitrozopirolidin (NPYR)

Tablica 10. Fizikalno-kemijska svojstva NPYR-a [56-58]

<b>NAZIV PREMA IUPAC-U</b>	1-nitrozopirolidin
<b>MOLEKULSKA FORMULA</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O
<b>STRUKTURNA FORMULA</b>	
<b>PIKTOGRAMI OPASNOSTI</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 07</b></p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>GHS 08</b></p>  </div> </div>
<b>MOLEKULSKA MASA</b>	100,12 g/mol
<b>CAS BROJ</b>	930-55-2
<b>SVOJSTVA/IZGLED</b>	žuta tekućina
<b>TALIŠTE</b>	-
<b>VRELIŠTE</b>	214 °C
<b>PLAMIŠTE</b>	83 °C
<b>TLAK PARE (20 °C)</b>	0,06 mmHg
<b>TOPLJIVOST U VODI</b>	52,90 g/l
<b>GUSTOĆA (25 °C)</b>	1,085 g/ml
<b>pK<sub>a</sub></b>	3,30
<b>log K<sub>ow</sub></b>	-0,19

### 3.1.3. SPE kolone

Za ekstrakciju čvrstom fazom korištene su tri Supelco Supelclean™ polipropilenske SPE kolone, volumena 6 ml, te punjene s 2 g kokosova ugljena kao sorbensa (Slika 15). Veličina čestica sorbensa prema američkom mjernom standardu iznosi 80/120 mesh-a. Mehanizam zadržavanja navedenih kolona je mehanizam obratnih faza, a podrazumijeva razdvajanje analita na osnovu njihove hidrofobnosti.



**Slika 15.** Supelco Supelclean™ 6 ml polipropilenske SPE kolone punjene s 2 g kokosova ugljena. Primarno se koriste u analizama pitkih, podzemnih i otpadnih voda. Također, ove kolone osobito su razvijene za EPA metodu 521: „Određivanje *N*-nitrozamina u pitkoj vodi ekstrakcijom čvrstom fazom i plinskom kromatografijom na kapilarnoj koloni s injektiranjem velikog volumena i spregnute spektrometrije masa (MS/MS)“ [59].

### 3.1.4. Kromatografska kolona

Kromatografska kolona korištena za analizu *N*-nitrozamina na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti je Kinetex C18, tvrtke Phenomenex (Slika 16). Dimenzije kolone su 150 x 4,6 mm, veličina zrna punjenja 5 μm i veličina pora 100 Å. Kolona C18 je primjer kolone obratnih faza koje se često koriste s polarnijim otapalima poput primjerice vode, metanola ili acetonitrila. C18 sadrži osamnaest atoma ugljika vezanih na jedan atom silicija te upravo zbog viška ugljika, C18 ima veću površinu preko koje pokretna faza mora prijeći.



Slika 16. Kromatografska kolona Kinetex C18, tvrtke Phenomenex

## 3.2. Instrumenti

### 3.2.1. Sustav za proizvodnju MilliQ vode

Kako bi se osiguralo dobivanje pouzdanih rezultata tijekom provedbe eksperimenata važna je upotreba čiste odnosno ultra čiste vode koja se prema aparaturi za njezino dobivanje često naziva i MilliQ vodom. Sustavi za proizvodnju MilliQ vode pretežito funkcioniraju na način da se voda iz slavine najprije pročišćava od čestica slobodnog klora prolaskom kroz za to predviđene filtere, a nakon čega se nastoji smanjiti razina organskih i mineralnih onečišćenja principom reverzno-osmotske membrane i modula elektrodeionizacije. Tijekom rada u laboratoriju za dobivanje MilliQ vode korišten je model prikazan na Slici 17.



Slika 17. Sustav za proizvodnju MilliQ vode, Milli-Q<sup>®</sup> Reagent Grade Water System

### 3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj (Slika 18) u analitičkom laboratoriju korištena je u svrhu eliminacije plinova iz MilliQ vode i acetonitrila tijekom pripreve pokretnih faza za HPLC. Također, moguće ju je primijeniti za čišćenje i odmašćivanje laboratorijskog posuđa te u svrhu tretiranja uzoraka ultrazvukom. Ultrazvučna kupelj koristi kavitacijske mjehuriće odnosno male prostorne šupljine ispunjene parom u tekućini, koji su inducirani visokofrekventnim zvučnim valovima (frekvencija 20-40 kHz) za miješanje tekućine. Sama kupelj puni se vodom, a ispod posude nalaze se ultrazvučne sonde koje djeluju na uzorke smještene u kupelji [60, 61].



**Slika 18.** Ultrazvučna kupelj 20R, Iskra, Slovenija

### 3.2.3. Aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom provedena je na aparaturi Supelco Visiprep™ 24 koja zahvaljujući vakuumskim razdjelnicima omogućuje obradu i do 24 SPE uzorka istovremeno (Slika 19). Za održavanje ponovljivih ekstrakcija ključna je kontrola brzine protoka kroz kolone. Sukladno tome, upravo ova vrsta sustava sadrži patentirane samostalne, rotirajuće ventile koji omogućuju preciznu kontrolu protoka kroz svaku SPE kolonu. Navedeni ventili bivaju smješteni na poklopcu staklene kade [62].





**Slika 19.** Supelco Visiprep™ 24 aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom

### **3.2.4. Rotacijski uparivač otapala**

Rotacijski uparivač otapala ili tzv. „Rotavapor“ je uređaj koji se primjenjuje u kemijskim laboratorijima u svrhu efikasnog i laganog uklanjanja otapala iz uzoraka uparavanjem. Uređaj se sastoji od jedinice za rotaciju okrugle tikvice, vodene kupelji zapremine pet litara, povratnog hladila, tikvice za sakupljanje kondenzata i vakuum sisaljke pomoću koje se okrugla tikвица sa ekstraktom povezuje na sustav. Sama vodena kupelj sadržava grijače koji omogućuju podešavanje temperature uparavanja u rasponu između 20 i 100 °C. U laboratoriju, uparavanje otapala iz uzoraka nakon ekstrakcije čvrstom fazom provodilo se na Rotavaporu R-114 Büchi prikazanom na Slici 20.



**Slika 20.** Rotacijski uparivač otapala R-114, Büchi, Švicarska

### 3.2.5. Aparatura za uparavanje otapala u struji dušika

Nakon ekstrakcije čvrstom fazom, uparavanje otapala se osim na rotacijskom uparivaču provodilo i na aparaturi za uparavanje u struji dušika. Aparatura za uparavanje otapala u struji dušika sastoji se od boca punjenih dušikom uključujući ventil za njegovo otvaranje i zatvaranje te regulaciju protoka, plastičnog crijeva povezanog s kapalicom kao i popratnog laboratorijskog posuđa poput metalnog stativa, hvataljke, mufe, stalka za epruvete te građuiranih kiveta sa sadržanim ekstraktom (Slika 21).



Slika 21. Aparatura za uparavanje otapala u struji dušika

Uparavanje u struji dušika zasniva se na kontinuiranom upuhivanju plinovitog dušika na površinu ili u unutrašnjost otapala čime se posljedično smanjuje tlak pare i povećava površina. Samo uparavanje može se kontrolirati brzinom protoka plina kao i temperature.

### 3.2.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom

Detekcija i kvantifikacija *N*-nitrozamina provedena je na uređaju HPLC Agilent Series 1100 s DAD detektorom (Slika 22) uz kromatografsku kolonu opisanu u poglavlju 3.1.4. Prije provedbe kromatografske analize, instrument je potrebno pripremiti primjenom propisanog protokola.

Spomenuti protokol obuhvaća postupke poput ispiranja, kondicioniranja kolone te ekvilbiriranja kolone na početne uvjete analize.



**Slika 22.** HPLC Agilent Series 1100 s DAD detektorom

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Priprema standardnih i kontrolnih otopina *N*-nitrozamina

Standardna otopina smjese sedam *N*-nitrozamina (NDBA, NDEA, NDMA, NDPA, NMOR, NPIP, NPYR) koncentracije 2 mg/l pripravljena je korištenjem standardne otopine smjese pet *N*-nitrozamina (NDBA, NDEA, NDPA, NMOR, NPYR) koncentracije 10 mg/l i dviju zasebnih standardnih otopina *N*-nitrozamina (NDMA, NPIP) koncentracije 5 mg/l. Ovisno o trenutnoj potrebi, standardna otopina smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracije 2 mg/l pripremana je u odmjernim tikvicama od 5 ili 10 ml. Ukoliko je pripremano 5 ml standardne otopine, u tikvicu se automatskom pipetom otpipetira 2 ml standardne otopine NDMA-a koncentracije 5 mg/l, 2 ml standardne otopine NPIP-a koncentracije 5 mg/l te 1 ml standardne otopine smjese pet *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg/l. U drugom slučaju, ako potrebe zahtijevaju pripravu 10 ml standardne otopine, tada se automatskom pipetom dodaju po 4 ml standardnih otopina NDMA-a i NPIP-a koncentracije 5 mg/l te 2 ml standardne otopine smjese pet *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg/l.

Kontrolne otopine smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracija 0,4 i 1,2 mg/l pripremljene su razrjeđenjem standardne otopine smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracije 2 mg/l. Kontrolna otopina koncentracije 0,4 mg/l pripremljena je tako što se u odmjernu tikvicu od 5 ml otpipetira 1 ml standardne otopine koncentracije 2 mg/l te se do oznake tikvica dopuni MilliQ vodom, a za kontrolnu otopinu koncentracije 1,2 mg/l postupak se ponavlja, ali uz dodatak 3 ml standardne otopine koncentracije 2 mg/l.

#### 3.3.2. Priprema otopina *N*-nitrozamina za ekstrakciju čvrstom fazom

Za provedbu ekstrakcije čvrstom fazom korištene su otopine *N*-nitrozamina koncentracije 0,004 mg/l. Otopine željene koncentracije pripravljane su u različitim količinama od 100, 300 i 500 ml. Kako bi se pripremili navedeni volumeni otopina koncentracije 0,004 mg/l, u 100, 300 odnosno 500 ml MilliQ vode bilo je potrebno dodati po 200 µl, 600 µl odnosno 1 ml standardne otopine smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracije 2 mg/l. Također, ukoliko je istovremeno potrebno pripremiti znatne količine otopina za SPE, tada se priprema istih može vršiti u odmjernim tikvicama od 1000 ili 2000 ml. Po završetku pripreme otopina, potreban volumen odvoji se odmjernim laboratorijskim posuđem.

### 3.3.3. Razvoj optimalne SPE metode primjenom dizajna eksperimenata

Serijom eksperimenata ispitivan je utjecaj procesnih parametara ekstrakcije čvrstom fazom na ekstraktibilnost *N*-nitrozamina iz vode. Procesni parametri čiji je utjecaj ispitivan su: volumen uzorka ( $X_1$ ), volumen eluensa ( $X_2$ ) i vrijeme sušenja sorbensa ( $X_3$ ). Za razvoj optimalne SPE metode primijenjen je Box-Behnkenov dizajn eksperimenata s tri numeričke varijable na tri razine (Tablica 11). Navedeni dizajn primjenjuje se u kombinaciji s metodom odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM).

**Tablica 11.** Prikaz procesnih parametara i njihovih razina korištenih u Box-Behnkenovu dizajnu

Procesni parametar	Kodirana vrijednost	Donja razina (-1)	Centralna razina (0)	Gornja razina (+1)
Volumen uzorka [ml]	$X_1$	100,00	300,00	500,00
Volumen eluensa [ml]	$X_2$	8,00	10,00	12,00
Vrijeme sušenja sorbensa [min]	$X_3$	10,00	20,00	30,00

Odabirom željenog modela u ovome slučaju Box-Behnkenova kao i unosom procesnih parametara, nezavisnih varijabli u kodiranom i nekodiranom obliku te broja ponavljanja središnje točke u softverski paket *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0 (State Ease, Minneapolis, USA) dobiven je detaljan plan eksperimenata koji su provedeni tijekom izrade ovoga rada (Tablica 12). Također, softverski paket osim za razvoj plana eksperimenata služi i za procjenu koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, numeričku optimizaciju ispitivanih procesnih parametara te statističku analizu (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese.

**Tablica 12.** Prikaz plana Box-Behnkenova dizajna eksperimenata

<b>Eksperiment</b>	$X_1$	$X_2$	$X_3$	<b>Volumen uzorka [ml]</b>	<b>Volumen eluensa [ml]</b>	<b>Vrijeme sušenja sorbena [min]</b>
<b>1</b>	0	0	0	300,00	10,00	20,00
<b>2</b>	0	+1	-1	300,00	12,00	10,00
<b>3</b>	0	0	0	300,00	10,00	20,00
<b>4</b>	+1	+1	0	500,00	12,00	20,00
<b>5</b>	-1	0	-1	100,00	10,00	10,00
<b>6</b>	-1	+1	0	100,00	12,00	20,00
<b>7</b>	0	-1	-1	300,00	8,00	10,00
<b>8</b>	+1	0	+1	500,00	10,00	30,00
<b>9</b>	+1	0	-1	500,00	10,00	10,00
<b>10</b>	0	-1	+1	300,00	8,00	30,00
<b>11</b>	0	+1	+1	300,00	12,00	30,00
<b>12</b>	-1	-1	0	100,00	8,00	20,00
<b>13</b>	+1	-1	0	500,00	8,00	20,00
<b>14</b>	-1	0	+1	100,00	10,00	30,00
<b>15</b>	0	0	0	300,00	10,00	20,00

Prema Box-Behnkenovu dizajnu provedeno je 15 eksperimenata ekstrakcije čvrstom fazom. Dobiveni eksperimentalni podaci potom su aproksimirani primjenom matematičkih modela koji se zasnivaju na linearnoj (5) ili kvadratnoj funkciji (6):

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon_i \quad (5)$$

gdje je:  $Y$  - odzivna funkcija predviđena modelom,  $\beta_0$  - konstanta jednadžbe,  $k$  - broj varijabli,  $\beta_i$  - koeficijent linearnih parametara (prvoga reda),  $X_i$  - ispitivana nezavisna kodirana varijabla,  $\varepsilon_i$  - slučajna varijabla koja modelu daje karakter stohastičnosti, a predstavlja nepoznata odstupanja od funkcionalnog odnosa (rezidualne).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon_i \quad (6)$$

gdje je:  $\beta_{ii}$  - koeficijent kvadratnih parametara (drugoga reda),  $\beta_{ij}$  - koeficijent parametara interakcije,  $X_j$  – ispitivana nezavisna kodirana varijabla.

Na osnovu dobivenih matematičkih modela konstruirana je odzivna površina koja omogućuje vizualan prikaz utjecaja ispitivanih procesnih parametara. Sama odzivna površina može se predočiti kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

### 3.3.4. Opis postupka ekstrakcije čvrstom fazom

U svrhu pronalaska optimalnih uvjeta metode ekstrakcije čvrstom fazom proveden je niz od 15 eksperimenata prethodno prikazanih u poglavlju 3.3.3. (Tablica 12). Postupak ekstrakcije čvrstom fazom uključuje nekoliko jednostavnih koraka poput kondicioniranja kolona, zadržavanja analita te eluiranja. Prvi korak u ekstrakciji čvrstom fazom je kondicioniranje SPE kolona, odnosno sorbensa, a sastoji se u propuštanju 2 x 3 ml diklormetana i 2 x 3 ml metanola, te 2 x 3 ml metanola i 5 x 3 ml MilliQ vode. Diklormetan i metanol najprije se propuštaju kroz kolone do suha, bez zadržavanja sloja otapala iznad sorbensa, a potom u slijedećem koraku metanol i MilliQ voda se ne smiju propustiti kroz kolone do suha kako bi se osiguralo močenje sorbensa. Po završetku kondicioniranja slijedi propuštanje uzoraka vode uz dodatak standardne otopine *N*-nitrozamina kroz SPE kolone uz odgovarajući protok. Uzorci se propuštaju kroz kolone na način da se plastične cjevčice urone u čaše sa uzorcima, povežu s kolonama te propuste uz djelovanje vakuuma. Nakon propuštanja 100, 300 ili 500 ml uzorka, kolone se suše uporabom vakuuma kroz 10, 20 ili 30 min kako bi se uklonio višak vode. Zadržani analiti se potom u posljednjem koraku ekstrakcije eluiraju s 4 x 2 ml, 5 x 2 ml ili 6 x 2 ml diklormetana u graduirane kivete koje su postavljene u staklenoj kadi ispod ventila na poklopcu. Svaki od 15 eksperimenata proveden je paralelno u dva ponavljanja (otopine *N*-nitrozamina pripremljene u MilliQ vodi) te slijepu probu (čista MilliQ voda bez dodatka analita). Naime, slijepa proba se koristi kako bi se provjerilo da u dobivenom ekstraktu nema spojeva koji bi se na kromatogramu pojavljivali na istim vremenima zadržavanja kao i ispitivani *N*-nitrozamini. U tom slučaju to bi bile interferencije koje bi unosile pozitivnu pogrešku u sami rezultat.

Nakon ekstrakcije čvrstom fazom, dobiveni ekstrakti oprezno se prebace u okrugle tikvice te se podvrgavaju uparavanju. Kako bi se spriječili značajni gubitci analita tijekom uparavanja, ekstraktima se dodaje tzv. „zaštitno“ otapalo poput acetona ili acetonitrila. No bez obzira na bolju mješljivost acetona s diklormetanom, ipak je odabran acetonitril s obzirom da je on ujedno i pokretna faza korištena tijekom HPLC-DAD analiza. Ekstraktima se dodaje 500 µl acetonitrila te se uparavaju na rotacijskom uparivaču 5 min pri 25 °C. U jednom trenutku rada u laboratoriju došlo je do promjene dijela aparature te je stoga vrijeme uparavanja bilo potrebno smanjiti sa dotadašnjih 5 min na svega 1 min. Cilj uparavanja na rotacijskom uparivaču je potpuno uklanjanje diklormetana uz istovremeno zaostajanje acetonitrila. Osim ove vrste uparavanja, provedeno je i uparavanje otapala u struji dušika. U tu svrhu ekstrakti se ne prebacuju u okrugle tikvice već ostaju u graduiranim kivetama u koje se izravno dodaje 500 µl acetonitrila. Uparavanje otapala u struji dušika znatno je blaži proces u odnosu na uparavanje otapala putem rotacijskog uparivača što je moguće zamijetiti po vremenu uparavanja. Naime, uparavanje otapala u struji dušika za svaki uzorak provodilo se oko 1 h. Po završetku uparavanja, zaostali volumeni iz okruglih tikvica odnosno graduiranih kiveta prebačeni su u odmjerne tikvice od 1 ml, nadopunjene MilliQ vodom do oznake i dobro homogenizirane. Sadržaj tikvica prebačen je u vijale iz kojih se uzorak injektira i analizira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda.



### 3.3.5. HPLC metoda za određivanje učinkovitosti ekstrakcije čvrstom fazom

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti analizirane su standardne otopine *N*-nitrozamina, slijepa proba (MilliQ voda), kao i dobiveni ekstrakti. Sama analiza provedena je kromatografijom obratnih faza uz gradijentno eluiranje. Kromatografija obratnih faza podrazumijeva uporabu nepokretne, nepolarne faze u ovome slučaju C18 kromatografske kolone te pokretne, polarne faze, odnosno smjese MilliQ vode (A) i acetonitrila (B). Gradijent pokretne faze korišten tijekom snimanja kromatograma na HPLC-DAD kromatografskom sustavu prikazan je u Tablici 13.

**Tablica 13.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-DAD analizama [63]

<i>t</i> [min]	A [%]	B [%]	protok [ml/min]
0 - 7,50	95,0	5,0	0,5
7,51 - 15,00	95,0 - 40,0	5,0 - 60,0	0,5
15,01 - 25,00	40,0	60,0	0,5
25,01 - 30,00	95,0	5,0	0,5

Vrijeme trajanja analize iznosilo je 30 minuta, volumen injektiranja 20 µl, a tlak pri injektiranju 56 bara. Kromatogrami na HPLC-DAD kromatografskom sustavu snimani su pri valnim duljinama od 220, 230, 240 i 254 nm. Na osnovu dobivenih kromatograma provedena je kvantitativna analiza integriranjem, tj. očitavanjem površina ispod kromatografskih krivulja. Usporedbom vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja analita u ekstraktu ( $A_{i, E}$ ) i površina ispod kromatografskih krivulja analita u standardu ( $A_{i, STD}$ ) moguće je izračunati učinkovitost ekstrakcije čvrstom fazom putem slijedećeg izraza:

$$I[\%] = \frac{A_{i, E}}{A_{i, STD}} \cdot 100 \quad (7)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije na ekstraktibilnost *N*-nitrozamina iz vode

Eksperimentalno je ispitan utjecaj triju procesnih parametara ekstrakcije čvrstom fazom u tri razine na učinkovitost ekstrakcije pojedinog *N*-nitrozamina iz vode. Procesni parametri i njihove razine prethodno su definirani Tablicom 11. Prema Box-Behnkenovu dizajnu provedeno je 15 eksperimenata čiji se plan provedbe kao i dobiveni eksperimentalni rezultati nalaze prikazani u Tablicama 12 i 14. Sami odzivi prikazani Tablicom 14 dobiveni su primjenom SPE-HPLC-DAD metode te obradom dobivenih podataka u tabličnom Excel kalkulatoru, a predstavljaju učinkovitost ekstrakcije pojedinog *N*-nitrozamina iz vode. Učinkovitost ekstrakcije izračunata je putem jednadžbe (7) uz vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja datih Tablicama P1-P6.

**Tablica 14.** Vrijednosti odziva dobivene provedbom SPE-HPLC-DAD metode

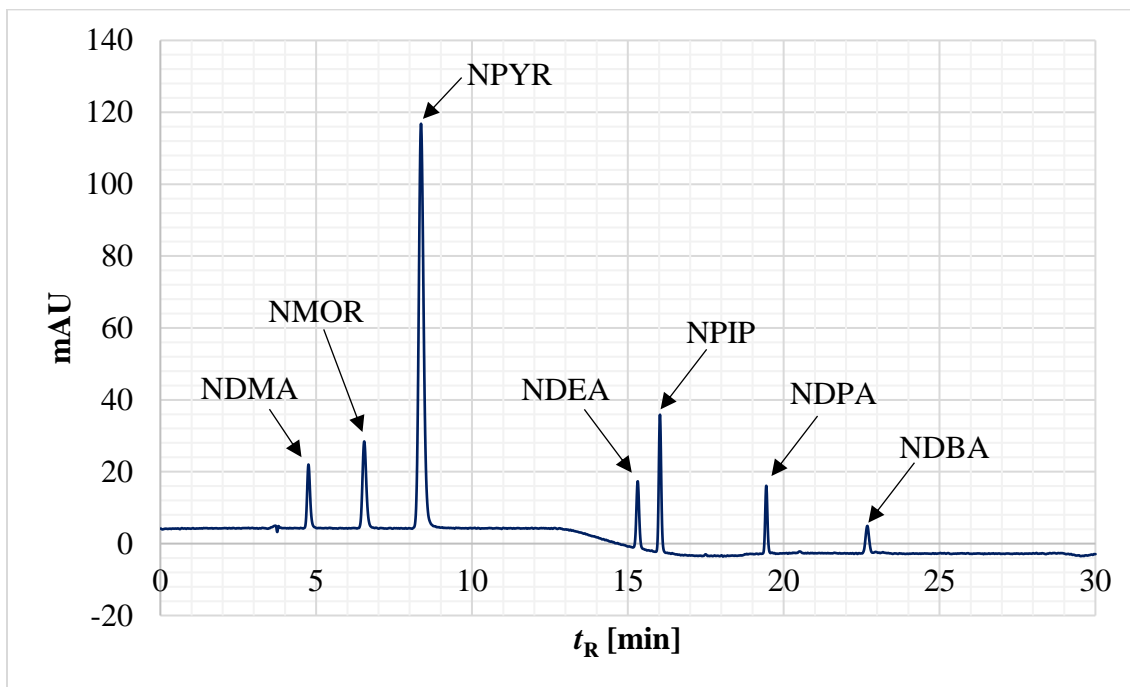
	<b>Odziv 1</b>	<b>Odziv 2</b>	<b>Odziv 3</b>	<b>Odziv 4</b>	<b>Odziv 5</b>	<b>Odziv 6</b>	<b>Odziv 7</b>
	<i>I</i> (NDMA), %	<i>I</i> (NMOR), %	<i>I</i> (NPYR), %	<i>I</i> (NDEA), %	<i>I</i> (NPIP), %	<i>I</i> (NDPA), %	<i>I</i> (NDBA), %
<b>1</b>	65,30	73,77	72,80	53,32	66,81	45,51	34,15
<b>2</b>	66,02	78,51	79,04	52,95	70,93	41,31	26,97
<b>3</b>	63,46	79,23	79,04	48,76	69,93	34,27	22,44
<b>4</b>	64,43	60,77	60,96	48,51	55,66	33,94	22,58
<b>5</b>	52,44	73,76	77,68	34,54	64,22	43,18	0,00
<b>6</b>	55,36	81,92	81,95	33,23	69,77	35,29	0,00
<b>7</b>	64,66	77,41	76,51	50,96	66,61	33,52	20,89
<b>8</b>	51,36	76,61	76,00	32,08	64,51	14,50	8,40
<b>9</b>	65,13	67,04	66,53	54,21	57,24	40,44	32,53
<b>10</b>	61,14	64,02	64,15	55,31	56,55	46,18	50,85
<b>11</b>	62,25	64,71	64,07	50,00	52,63	32,81	25,45
<b>12</b>	49,59	74,00	75,14	30,45	61,99	35,53	29,13
<b>13</b>	59,62	70,57	68,82	37,69	54,58	22,71	15,74
<b>14</b>	49,03	66,64	67,35	37,56	58,67	34,93	0,00
<b>15</b>	56,51	59,81	58,87	48,38	49,94	38,99	39,95

Na temelju Tablice 14 moguće je uvidjeti pri kojim eksperimentalnim uvjetima se postiže najveća učinkovitost ekstrakcije pojedinog *N*-nitrozamina iz vode. Stoga, najveća učinkovitost ekstrakcije NDMA-a i NPIP-a postignuta je uz volumen uzorka od 300 ml, volumen eluenta od 12 ml i vrijeme sušenja sorbensa od 10 min, a iznosi 66,02% odnosno 70,93%. Za NMOR i NPYR postignuta je

uz volumen uzorka od 100 ml, volumen eluensa od 12 ml i vrijeme sušenja sorbensa od 10 min te iznosi 81,92% odnosno 81,95%, a za NDEA, NDPA i NDBA maksimalna učinkovitost ekstrakcije postiže se uz volumen uzorka od 300 ml, volumen eluensa od 8 ml te vrijeme sušenja sorbensa od 30 min i iznosi 55,31%, 46,18% odnosno 50,85%.

#### 4.1.1. Kromatografsko određivanje

Učinkovitost ekstrakcije praćena je kromatografski metodom opisanom u poglavlju 3.3.5. Kao rezultat provedene metode dobiveni su kromatogrami čiji se primjer nalazi prikazan na Slici 23.

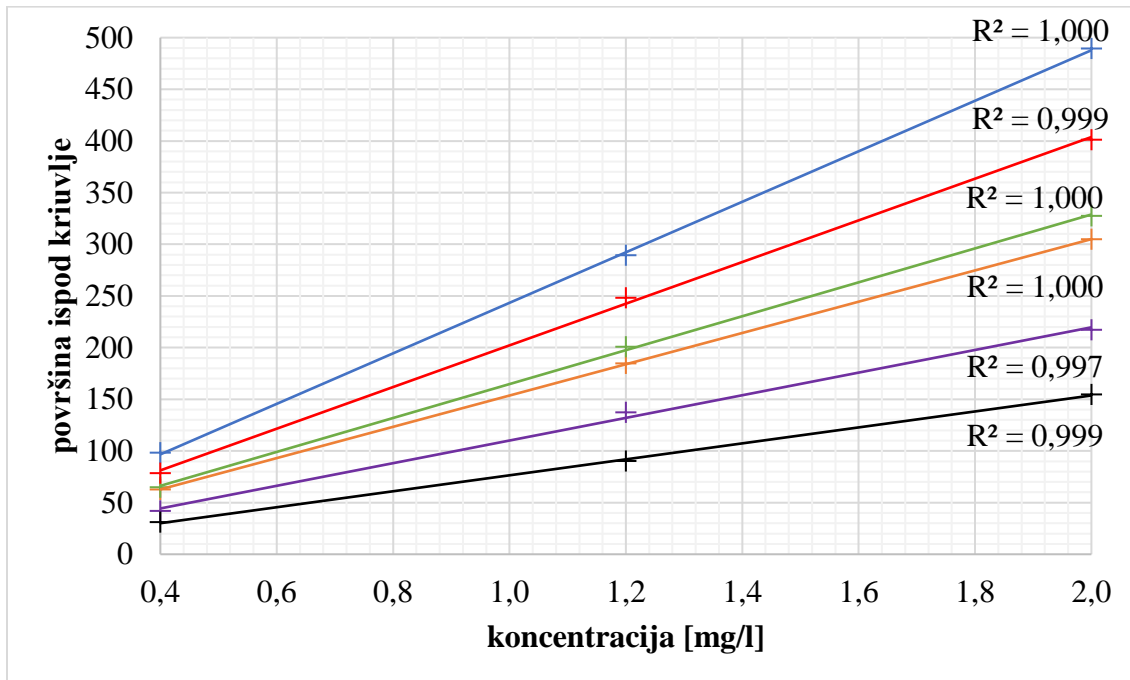


**Slika 23.** Kromatogram standardne otopine smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracije 2 mg/l

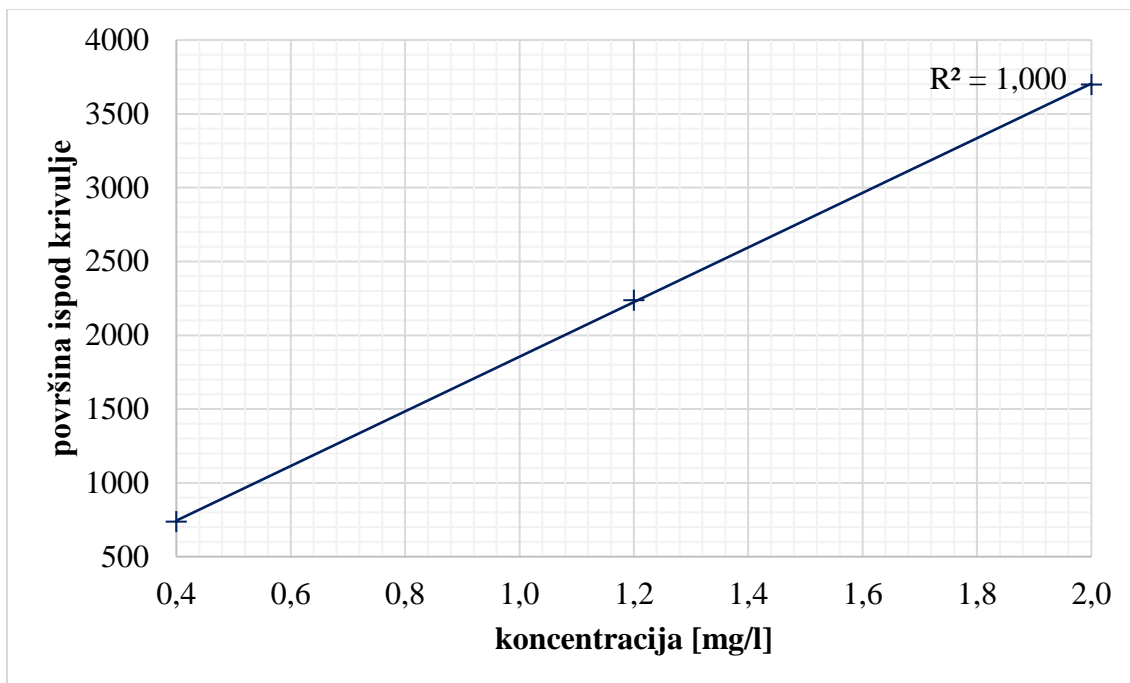
Primjenom gradijentnog eluiranja dolazi do potpune separacije sedam *N*-nitrozamina na Kinetex C18 kromatografskoj koloni koja predstavlja nepokretnu, nepolarnu fazu. Stoga se može zaključiti da što je *N*-nitrozamin nepolarniji on će se uslijed uspostave interakcija s nepokretnom fazom sve više zadržavati na njoj. Porastom nepolarnog karaktera *N*-nitrozamina posljedično raste i vrijeme zadržavanja istih. Prema tome, NDMA je najpolarniji ispitivani *N*-nitrozamin s najkraćim vremenom zadržavanja, dok je nasuprot tome NDBA najnepolarniji te se stoga najdulje zadržava u kromatografskoj koloni.

Prilikom analize uzoraka dobivenih ekstrakcijom čvrstom fazom na HPLC-DAD kromatografskom sustavu usporedno je bilo potrebno samoj analizi podvrgnuti i kontrolne otopine smjese sedam *N*-nitrozamina koncentracija 0,4, 1,2 i 2 mg/l. Kontrolne otopine podvrgavaju se analizi kako bi se dobiveni kromatogrami istih odnosno dobivena vremena zadržavanja i površine ispod kromatografskih krivulja mogle usporediti s onima dobivenima za ekstrakte. Na osnovu usporedbe tih dvaju dobivenih rezultata moguće je odrediti učinkovitost ekstrakcije.

Promatrajući vrijednosti dobivenih površina ispod kromatografskih krivulja za kontrolne otopine *N*-nitrozamina prikazane Tablicom P6 moguće je jasno uvidjeti kako se porastom koncentracije istih posljedično povećavaju i vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja. Naime, kontrolna otopina koncentracije 1,2 mg/l pokazuje oko tri puta veće vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja u odnosu na kontrolnu otopinu *N*-nitrozamina koncentracije 0,4 mg/l, dok kontrolna otopina *N*-nitrozamina koncentracije 2 mg/l pokazuje oko pet puta veće vrijednosti površina u odnosu na kontrolnu otopinu koncentracije 0,4 mg/l. Time se može zaključiti kako su koncentracije kontrolnih otopina i vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja u linearnom odnosu (Slike 24 i 25).



**Slika 24.** Prikaz linearnog odnosa između koncentracija kontrolnih otopina *N*-nitrozamina i površina ispod kromatografskih krivulja (**NDMA**, **NPIP**, **NDEA**, **NMOR**, **NDPA**, **NDBA**)



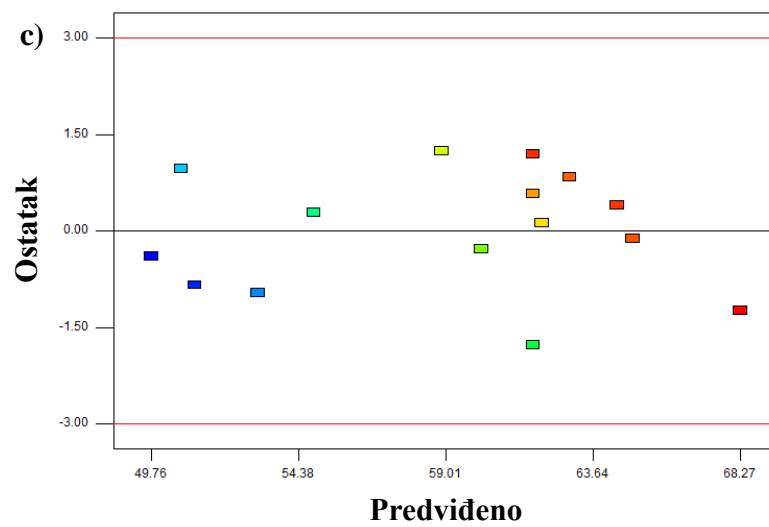
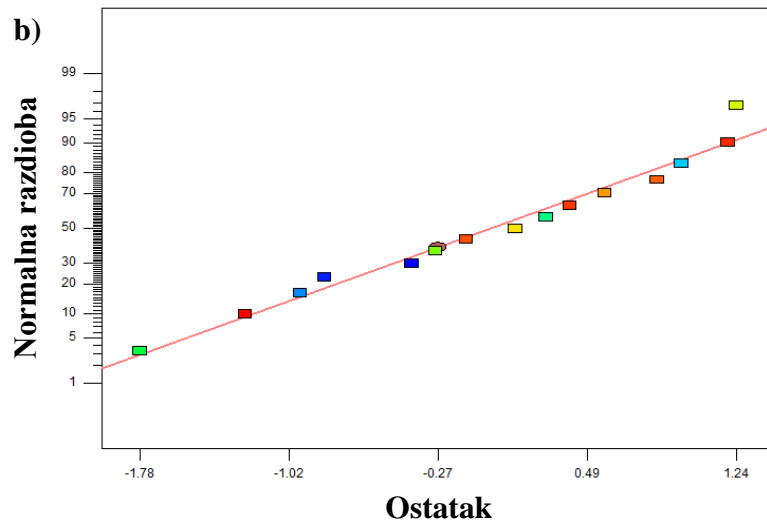
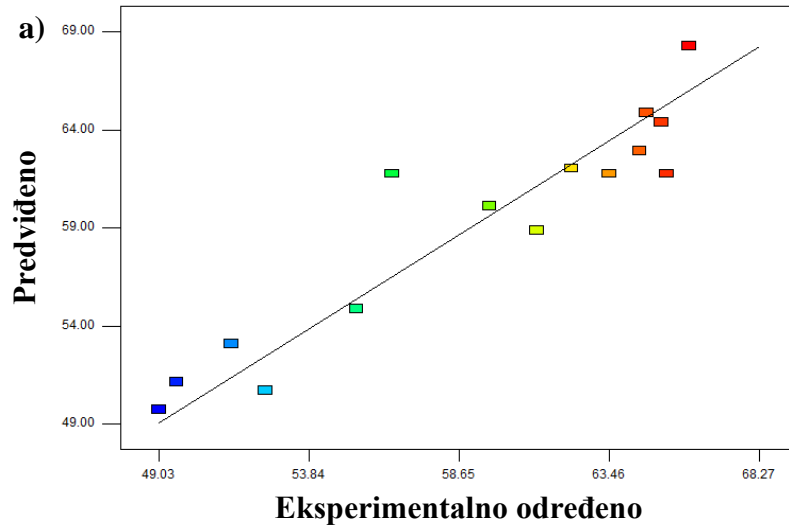
**Slika 25.** Prikaz linearnog odnosa između koncentracija kontrolnih otopina *N*-nitrozamina i površina ispod kromatografskih krivulja (**NPYR**)

## 4.2. Modeliranje procesa ekstrakcije *N*-nitrozamina

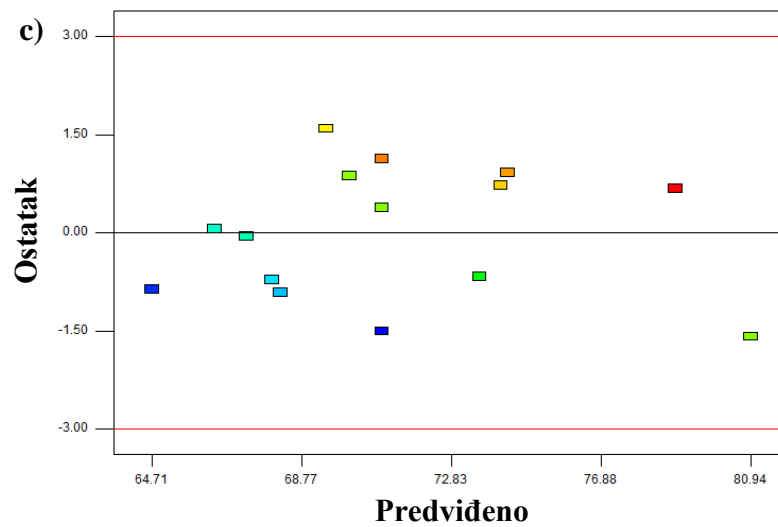
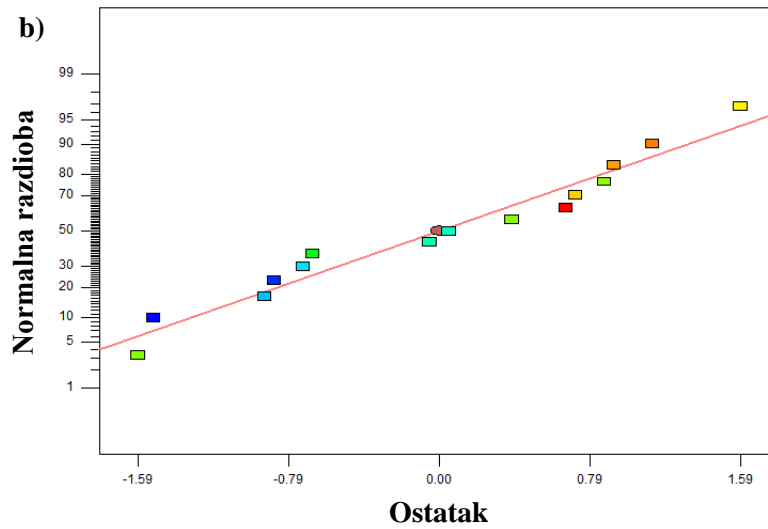
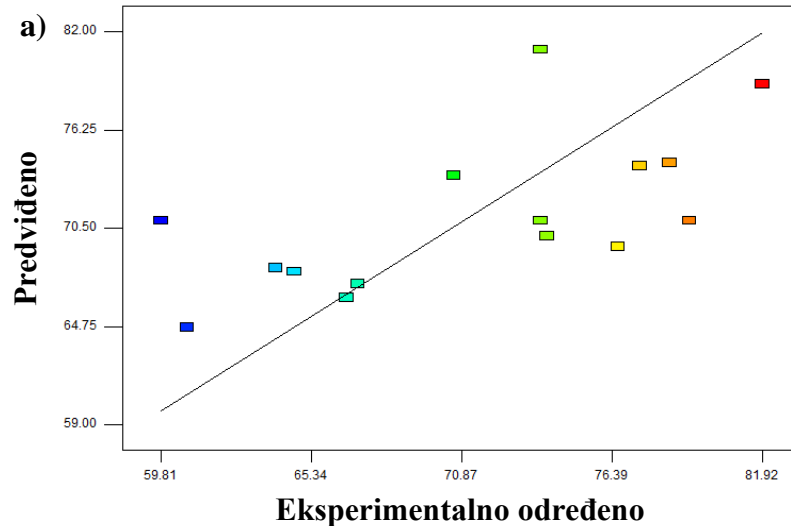
Po završetku provedbe svih 15 eksperimenata ekstrakcije čvrstom fazom prethodno definiranih Box-Behnkenovim dizajnom potrebno je putem softverskog paketa provesti adekvatnu analizu. Sama analiza uključuje niz koraka kao što su transformacija, predviđanje i odabir modela, grafička procjena valjanosti modela i dijagnostička analiza ostatka te konstruiranje dvodimenzionalnih (2D) konturnih grafikona i trodimenzionalnih (3D) grafikona odzivnih površina.

S obzirom da je za svih sedam dobivenih odziva, omjer maksimalne i minimalne vrijednosti istoga manji od 10, ne sugerira se provedba transformacije. Nadalje, višeregresijska analiza matrice dizajna i dobivenih vrijednosti za odgovarajući odziv rezultirala je dobivanjem funkcija prvog ili drugog reda koje ujedno služe za predviđanje ponašanja promatranog sustava. Stoga se odzivi NDMA-a, NMOR-a, NDEA-a i NDBA-a mogu opisati primjenom kvadratnog modela, odzivi NPYR-a i NPIP-a primjenom linearnog modela, a odziv NDPA-a primjenom 2FI modela.

Grafička procjena valjanosti modela provedena je ispitivanjem sukladnosti eksperimentalno dobivenih i modelom predviđenih vrijednosti odziva (Slike 26(a)-32(a)). Vidljivo je da su točke uglavnom smještene u blizini dijagonalne linije što je rezultat manjih odstupanja. Važne informacije o ponašanju modela dobivene su iz ostataka, a u njima su sažeta sva odstupanja. Grafički prikazi ostatka u odnosu na normalnu razdiobu, te na predviđene vrijednosti, prikazani su na Slikama 26(b, c)-32(b, c). Vidljivo je da su točke smještene u blizini dijagonalne linije (Slike 26(b)-32(b)), što dovodi do zaključka da su pogreške normalno distribuirane i međusobno neovisne, te da je pogreška varijance homogena i neovisna o ostacima. Grafički prikazi na Slikama 26(c)-32(c) testiraju pretpostavku konstantne varijance. Točke su nasumično razbacane i smještene unutar intervala prikazanih Tablicom P7 pri čemu se krajnje vrijednosti -3 i +3 smatraju donjom i gornjom granicom detekcije. To ukazuje na nepostojanje ekstremnih vrijednosti što znači da nema značajnih odstupanja modela od eksperimenta. Iz rezultata prikazanih na Slikama 26-32 zaključuje se da odabrani model jasno opisuje korelaciju između utjecajnih parametara i odzivne veličine promatranog sustava.

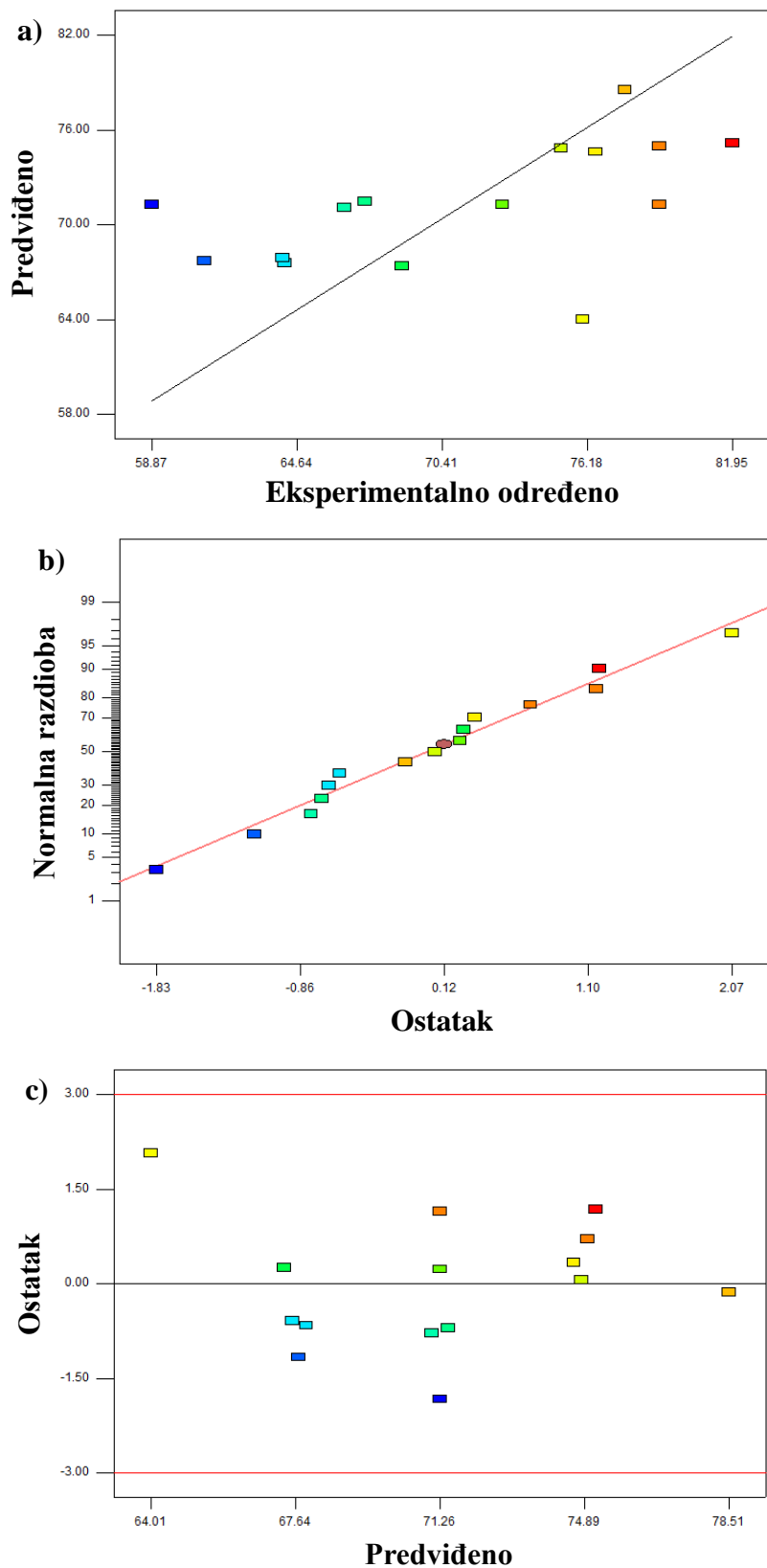


Slika 26. Grafička procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NDMA

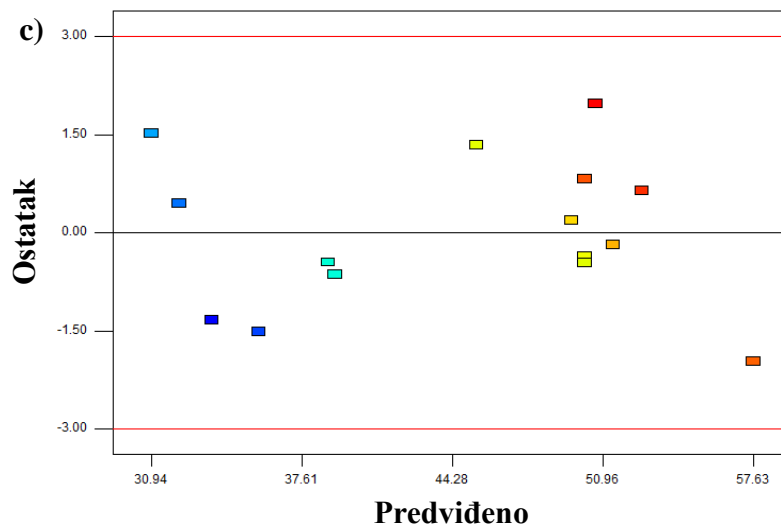
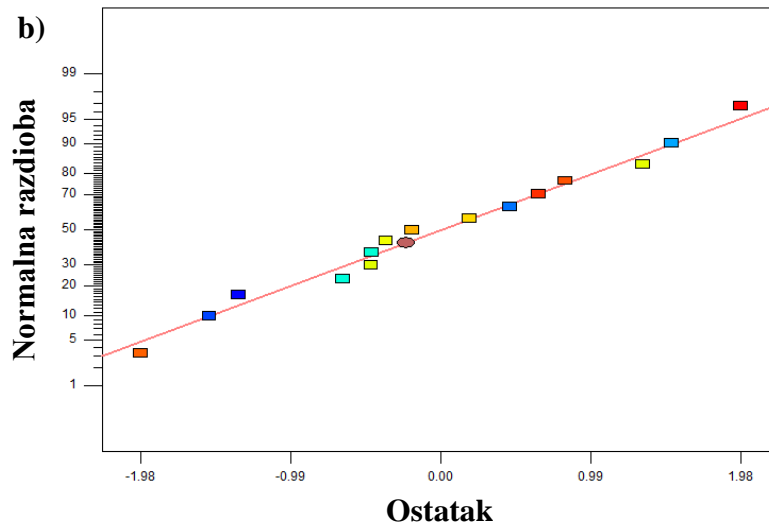
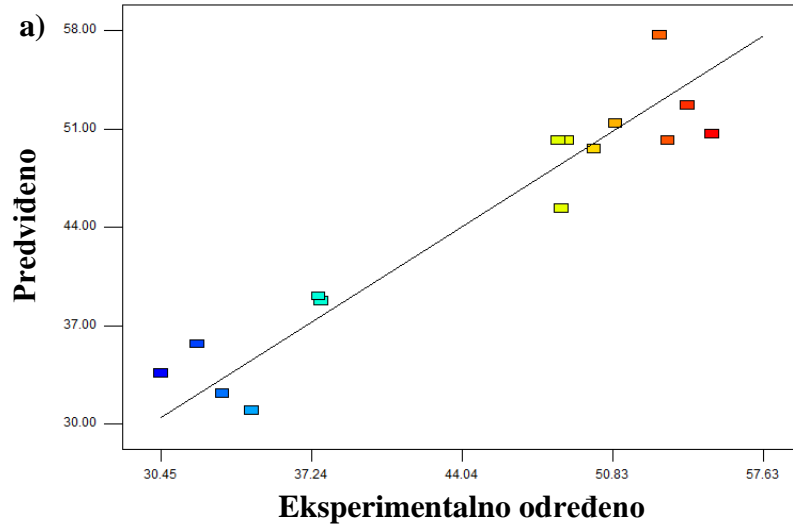


Slika 27. Grafična procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NMOR

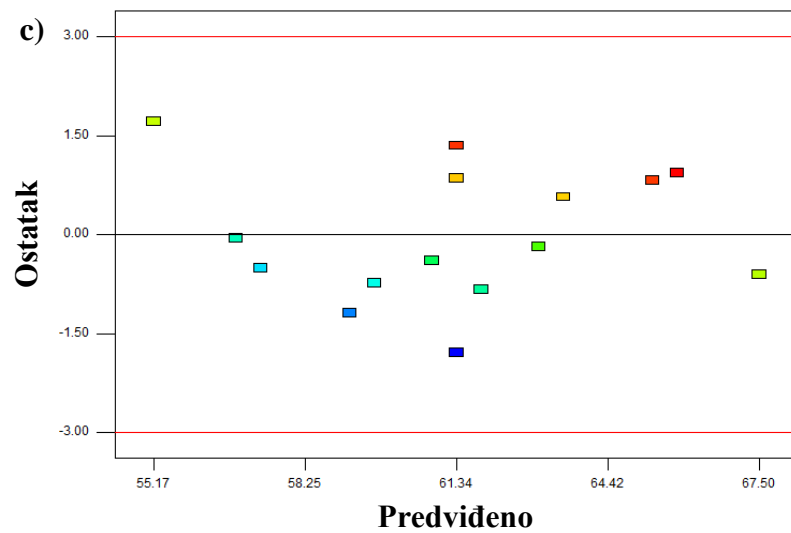
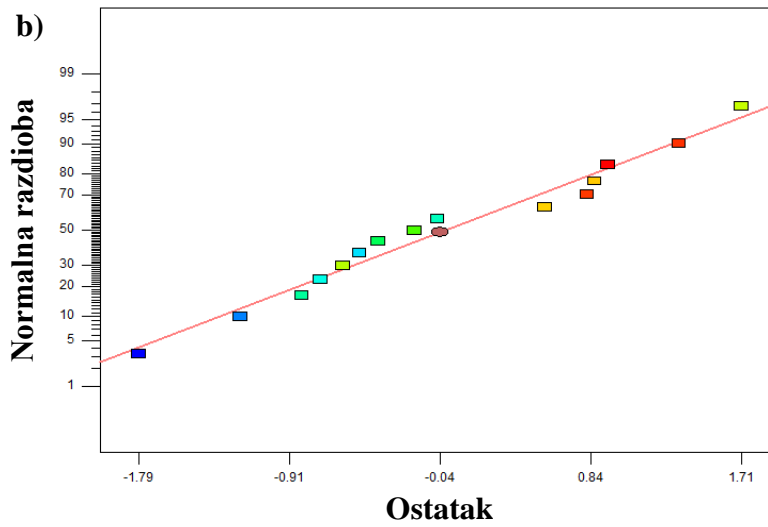
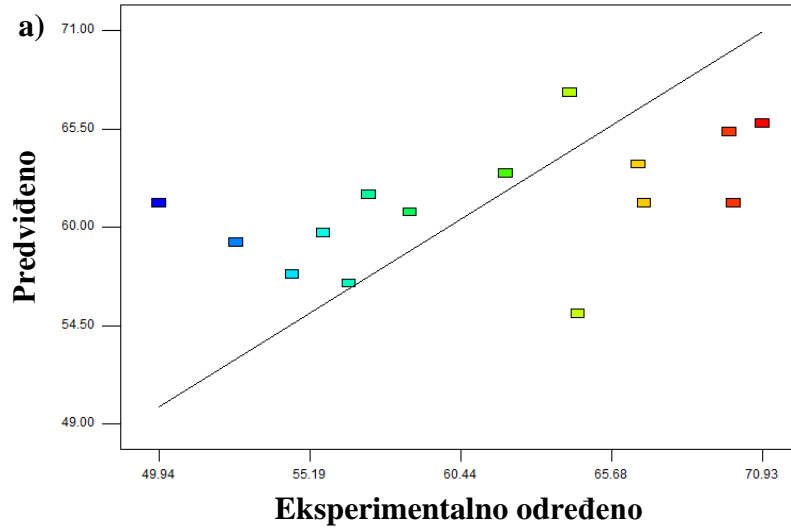




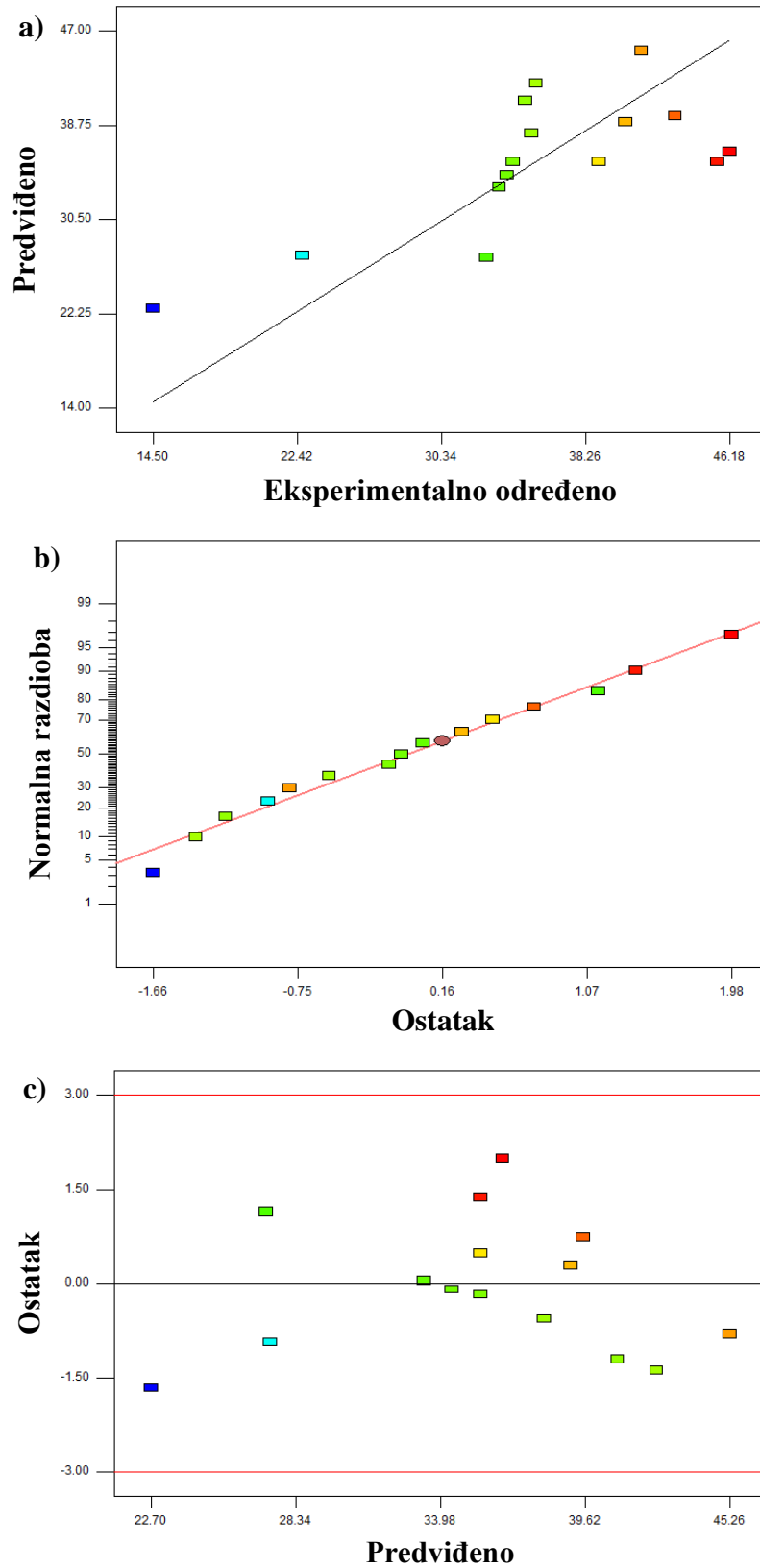
Slika 28. Grafička procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NPYR



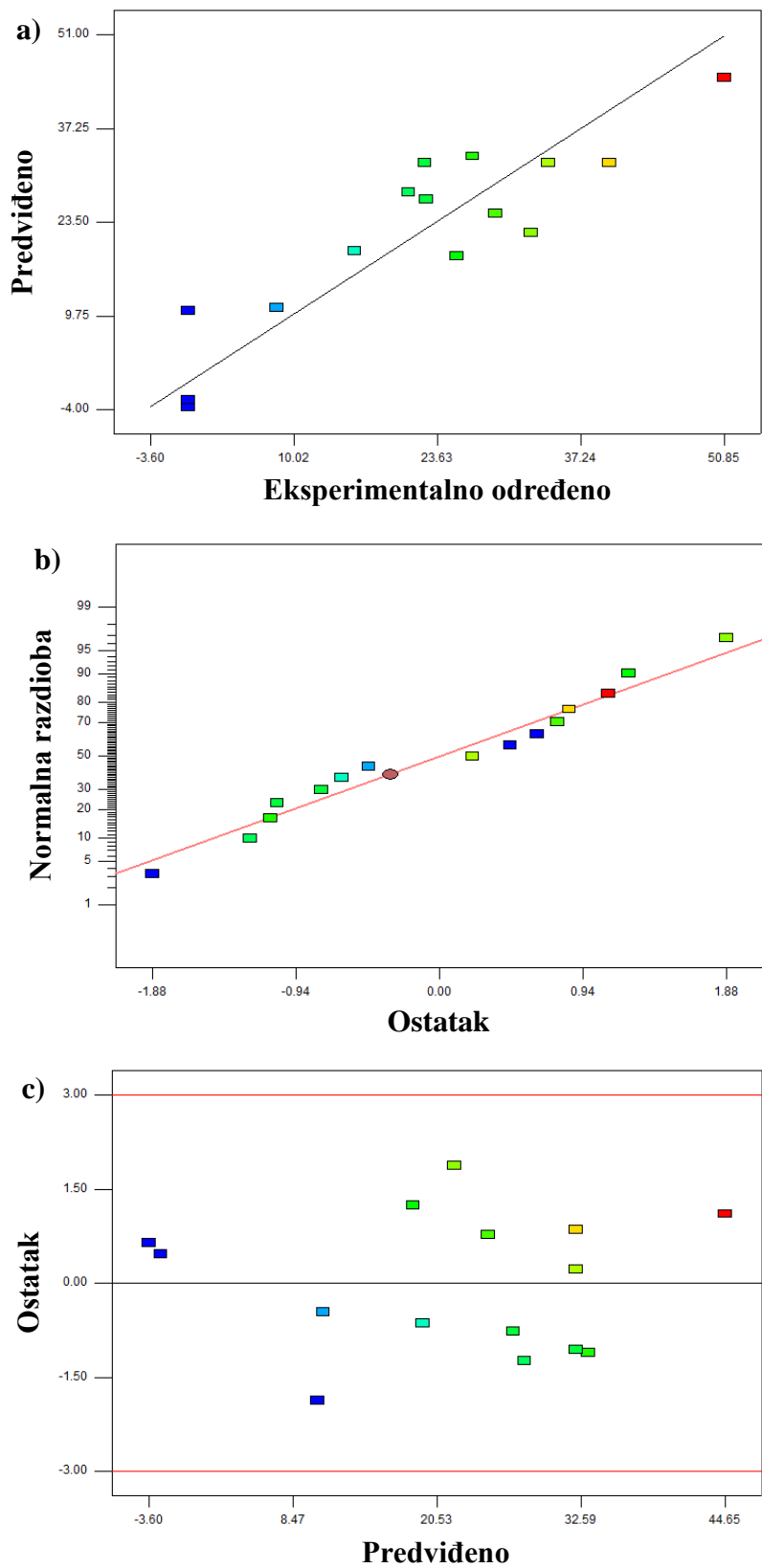
Slika 29. Grafička procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NDEA



Slika 30. Grafična procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NPIP



Slika 31. Grafička procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NDPA



Slika 32. Grafička procjena valjanosti modela, dijagnostička analiza ostatka za NDBA

Interaktivni učinci nezavisnih varijabli na učinkovitost ekstrakcije pojedinog *N*-nitrozamina iz vode proučavani su analizom dvodimenzionalnih konturnih grafikona (Slike 33-39) te trodimenzionalnih grafikona odzivnih površina (Slike 1P-7P). Na osnovu navedenih grafikona moguće je prikazati točno područje u kojemu se očekuje minimalan ili maksimalan odziv. Također, na svakom grafikonu nalaze se smještene dvije nezavisne varijable na osima u istraživanome rasponu, dok se treća nezavisna varijabla održava konstantnom. Konturne linije predstavljaju odzivne vrijednosti.

Promatrajući grafikone na Slici 33 može se uočiti značajna zakrivljenost konturnih linija. Upravo ta zakrivljenost upućuje na veliku važnost parametara interakcije. Nadalje, udaljenosti između pojedinih konturnih linija su velike što znači da se vrijednosti odziva mijenjanju daleko sporije nego li što bi to bio slučaj kod izrazito bliskih konturnih linija. Crveno područje grafikona označava tzv. optimalno područje u kojemu se postižu maksimalni odzivi. Na Slici 33(a) vidljivo je da je učinkovitost ekstrakcije veća kada se povećava volumen uzorka od 100 do 500 ml uz istodobno povećanje volumena eluensa od 8 do 12 ml. U tom slučaju vrijeme sušenja sorbensa je konstanta varijabla. Na Slici 33(b) učinkovitost ekstrakcije je veća kada se volumen uzorka povećava od 100 do 500 ml uz istodobno smanjenje vremena sušenja sorbensa s 30 na 10 min. U tom slučaju volumen eluensa je konstanta varijabla. Na Slici 33(c) povećanjem volumena eluensa s 8 na 12 ml uz istodobno smanjenje vremena sušenja sorbensa s 30 na 10 min dolazi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije. U tom slučaju volumen uzorka je konstantna varijabla.

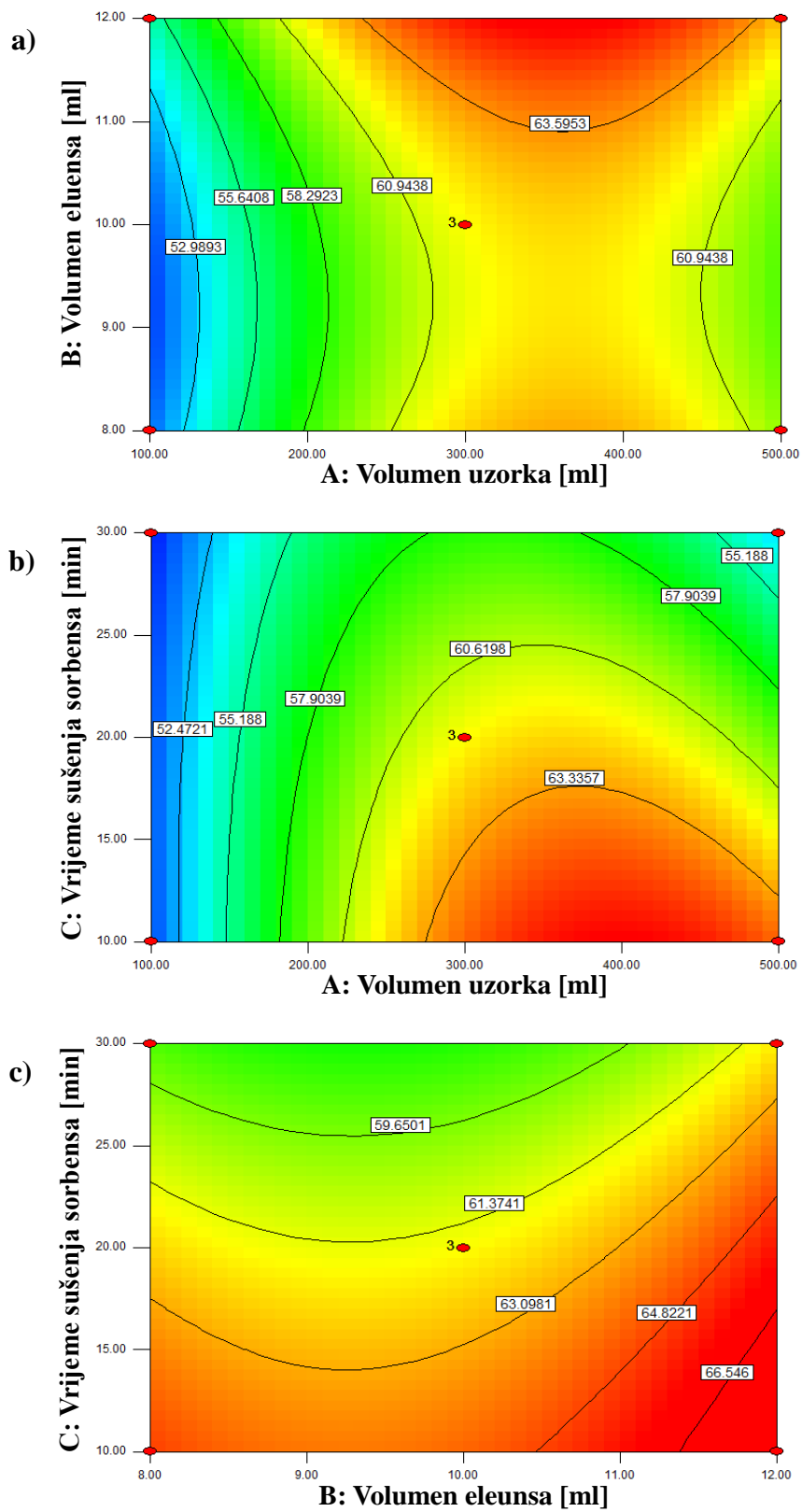
Promatrajući grafikone na Slici 34(a, b) vidljiva je značajna zakrivljenost konturnih linija što ukazuje na veliku važnost parametara interakcije. Optimalno područje na navedenim grafikonima prikazano je narančasto-crvenom bojom. Na Slici 34(c) zakrivljenost je izrazito blaga te stoga međudjelovanje nije zamjetno. S obzirom da je razmak između konturnih linija velik, odzivne vrijednosti mijenjaju se sporije. Na Slici 34(a) vidljivo je da je učinkovitost ekstrakcije veća kada je volumen uzorka manji, primjerice 100 ml uz istodobno povećanje volumena eluensa od 8 do 12 ml. U ovome slučaju vrijeme sušenja sorbensa je konstantna varijabla. Na Slici 34(b) učinkovitost ekstrakcije je veća što je volumen uzorka manji jednako kao i vrijeme sušenja sorbensa. U ovom slučaju konstantna varijabla je volumen eluensa. Učinak nezavisnih varijabli na odziv odnosno učinkovitost ekstrakcije na Slici 34(c) nije značajan.

S obzirom da su konturne linije grafikona prikazanih na Slikama 35 i 37 linearne odnosno ravne moguće je zaključiti kako međudjelovanje nije značajno. To znači kako primijenjeni regresijski model tj. model prvoga reda sadrži samo glavne učinke interakcije. Konturne linije u oba slučaja daleko su jedne od drugih pa se sukladno tome odzivne vrijednosti mijenjaju sporije. Područja maksimalnih odziva na Slikama 35 i 37 označena su žutom ili narančastom bojom.

Slično kao i na Slikama 33 i 34 tako i na Slici 36 se može uočiti značajna zakrivljenost konturnih linija koja upućuje na važnost parametara interakcije. Udaljenosti između linija u središtima grafikona su velike, dok se potom iste prema rubovima postepeno smanjuju. Time se može zaključiti kako se odzivne vrijednosti najprije mijenjaju sporije, a potom nešto brže. Narančasto-crvenom bojom označeno je optimalno područje. Na Slici 36(a) maksimalni odziv postignut je uz volumen uzorka od 300 ml, volumen eluensa od 12 ml te konstantno vrijeme sušenja sorbensa. Na Slici 36(b) maksimalan odziv je postignut u slučaju kada je volumen uzorka 300 ml, vrijeme sušenja sorbensa 10 min, a volumen eluensa konstantna varijabla. Dok je na Slici 36(c) maksimalan odziv postignut uz volumen eluensa od 12 ml, vrijeme sušenja sorbensa od 10 min i konstantan volumen uzorka.

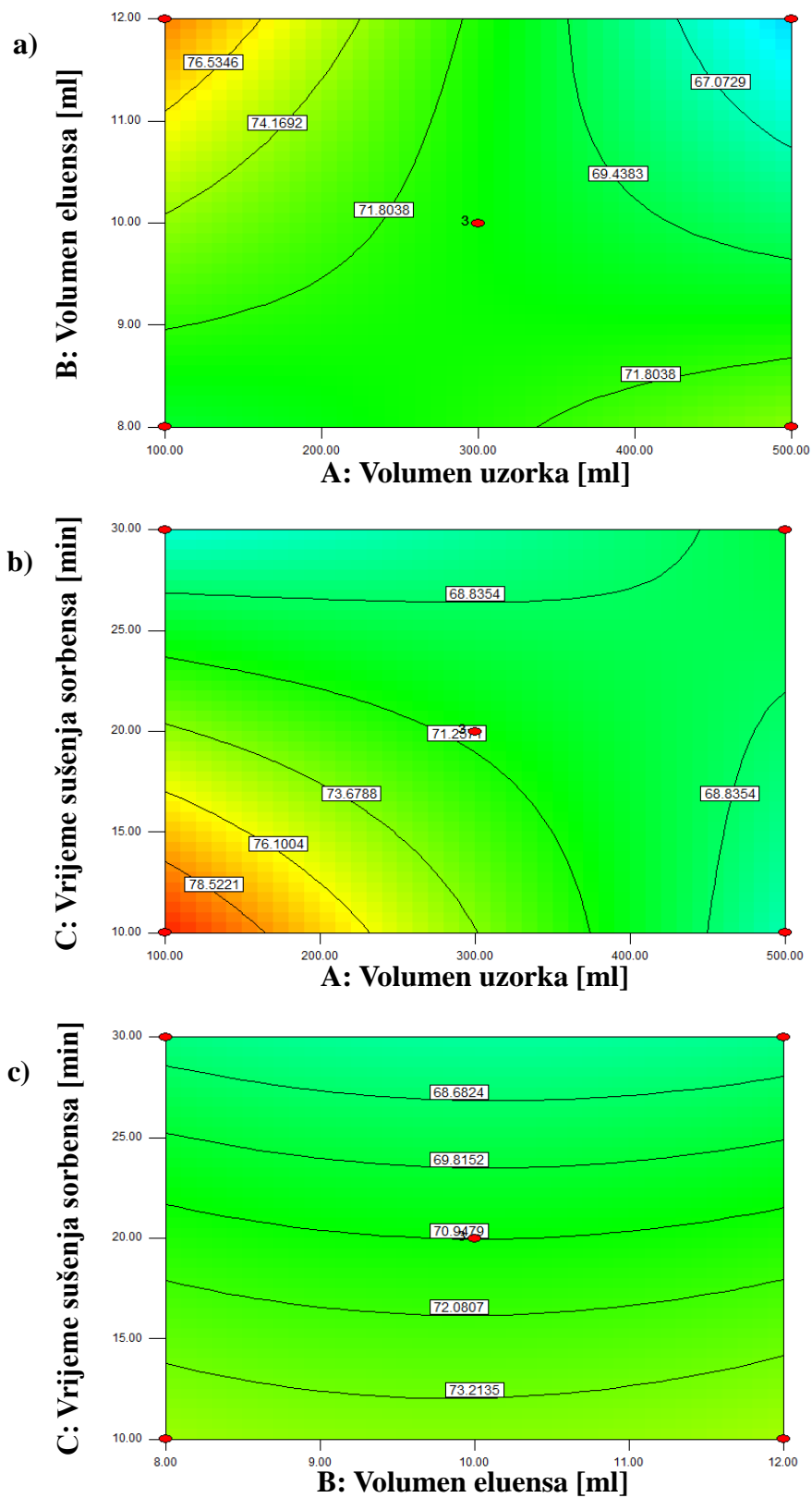
Što se tiče grafikona prikazanih na Slikama 38 i 39 kao u većini prethodnih slučajeva prisutna je značajna zakrivljenost konturnih linija. Također, dolazi do pojave novog momenta na Slici 39(b) gdje konturne linije poprimaju oblik elipse. Razmak između konturnih linija na obje slike je velik te shodno tome mijenjanje odzivnih vrijednosti je sporije. Optimalna područja na Slikama 38 i 39 bivaju označena narančastom, žutom ili zelenom bojom.

Sumarno gledano najveći utjecaj nezavisnih varijabli na učinkovitost ekstrakcije *N*-nitrozamina iz vode zamjećuje se na grafikonima prikazanim Slikama 33 i 36.

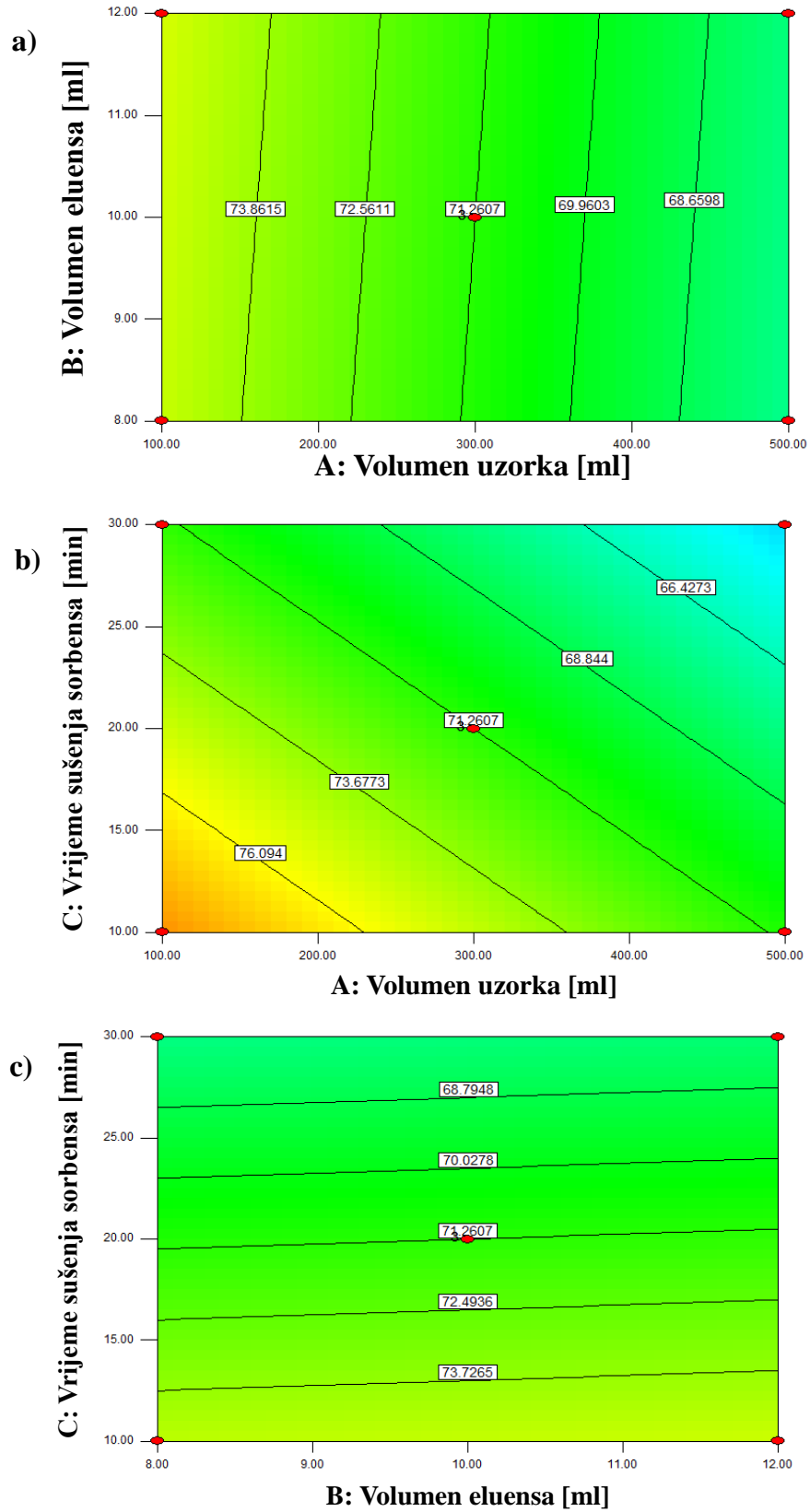


Slika 33. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NDMA

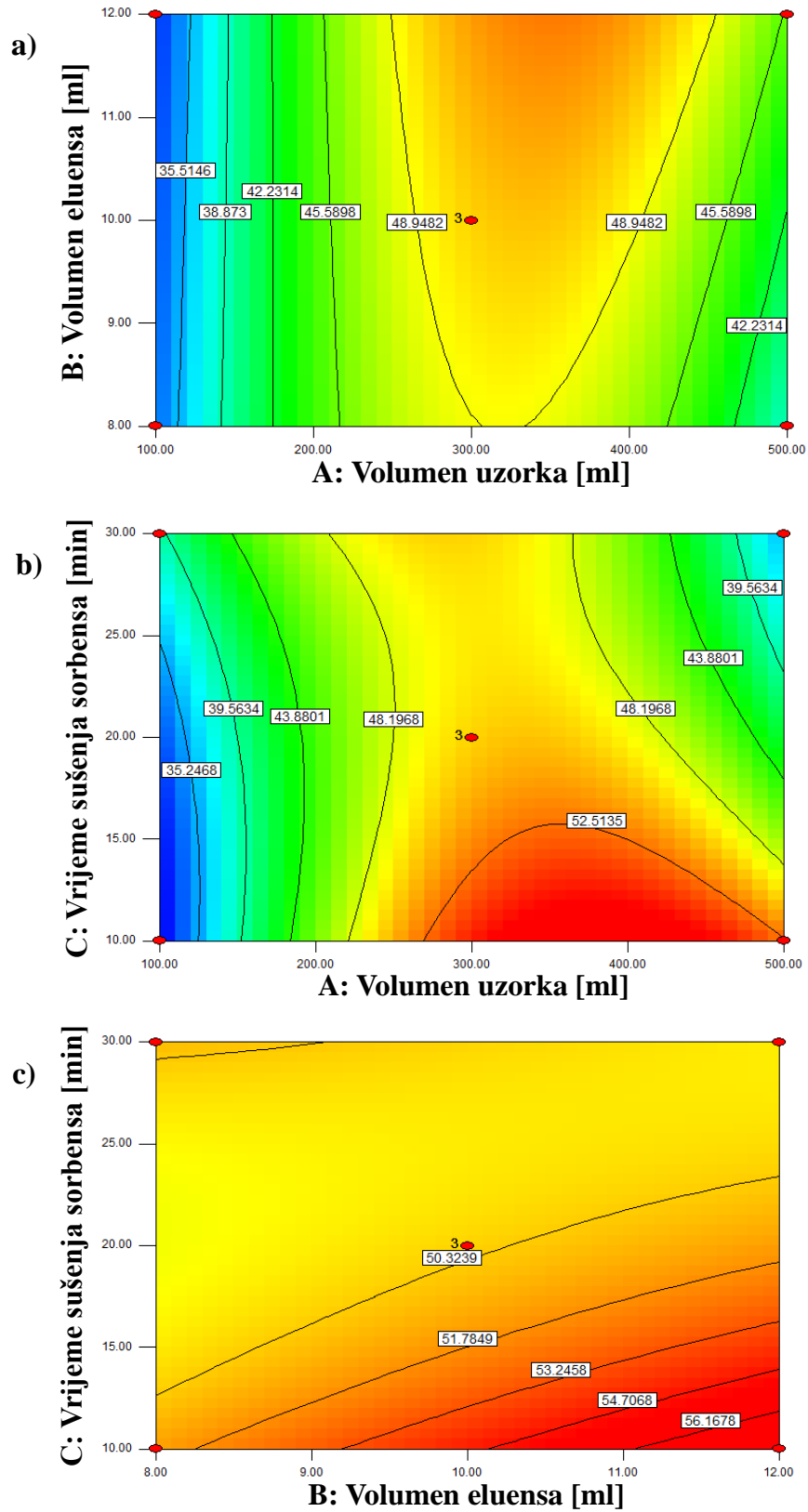




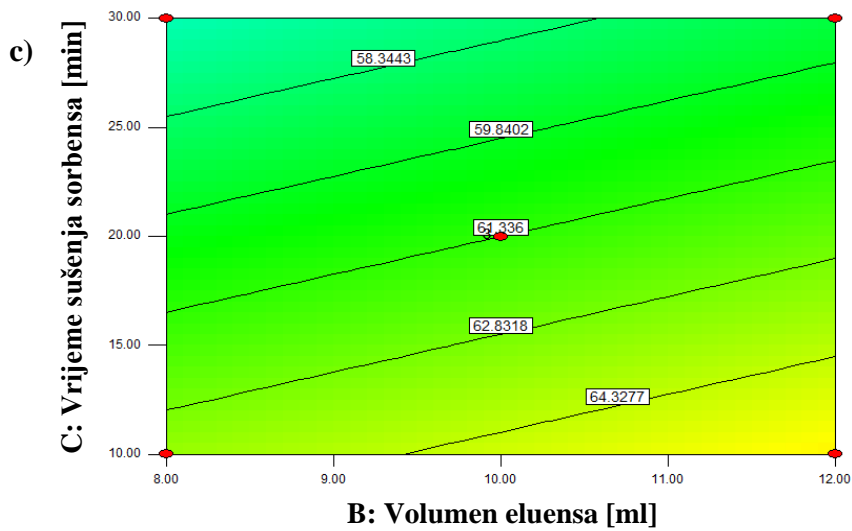
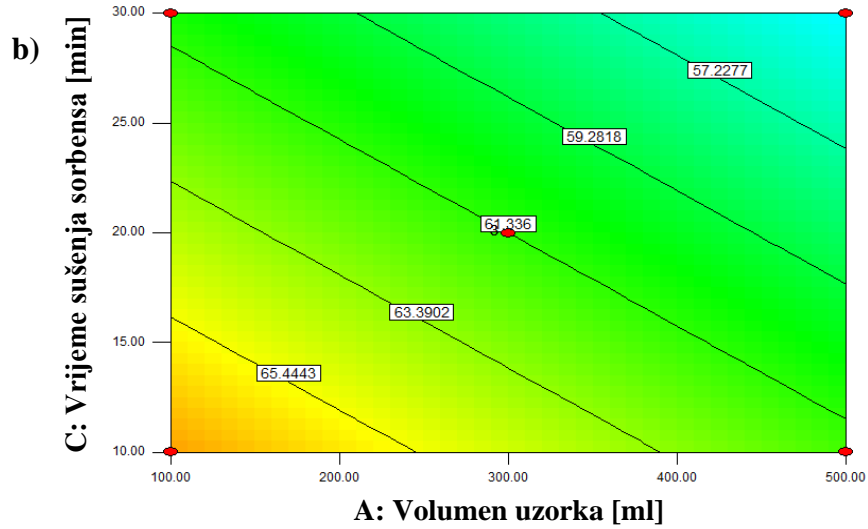
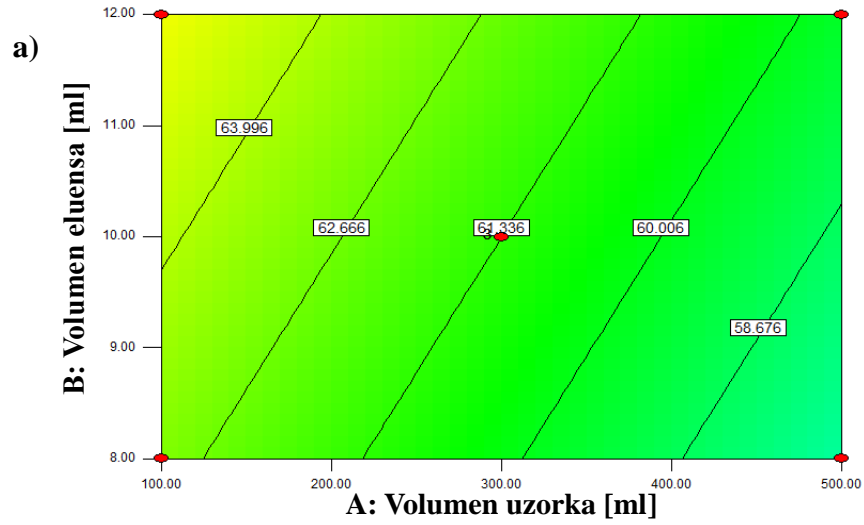
Slika 34. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NMOR



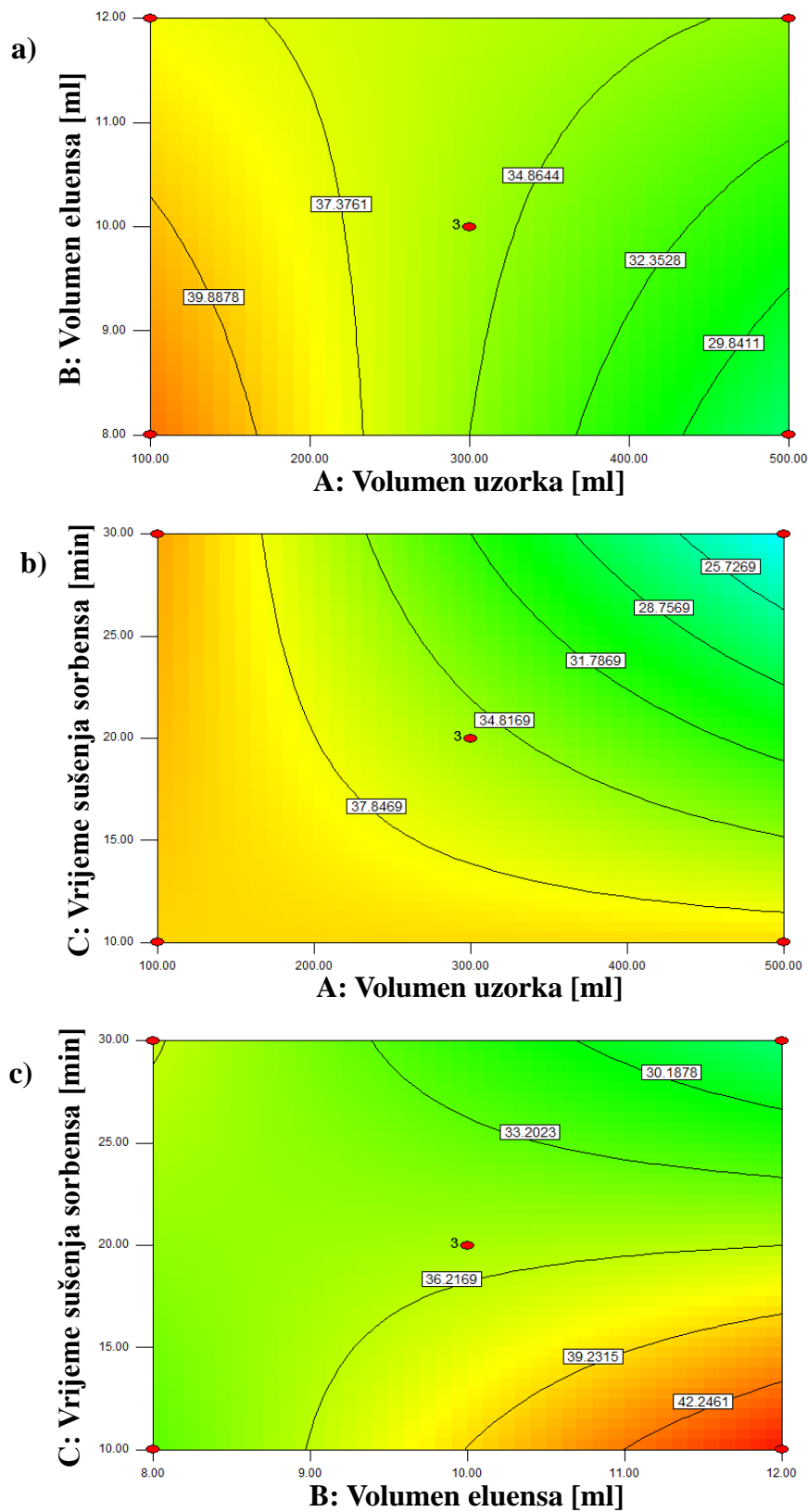
Slika 35. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NPYR



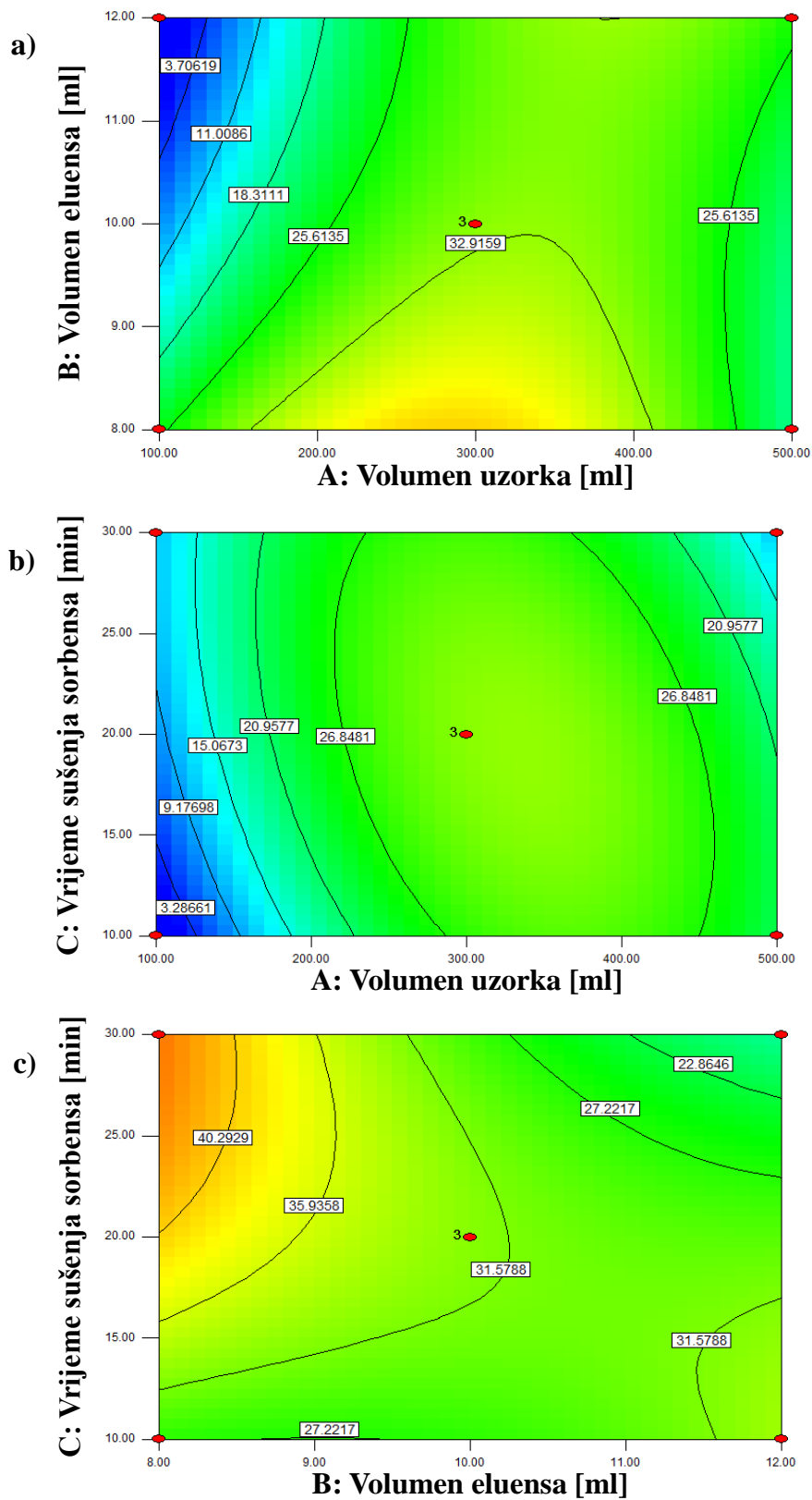
Slika 36. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NDEA



Slika 37. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NPPI



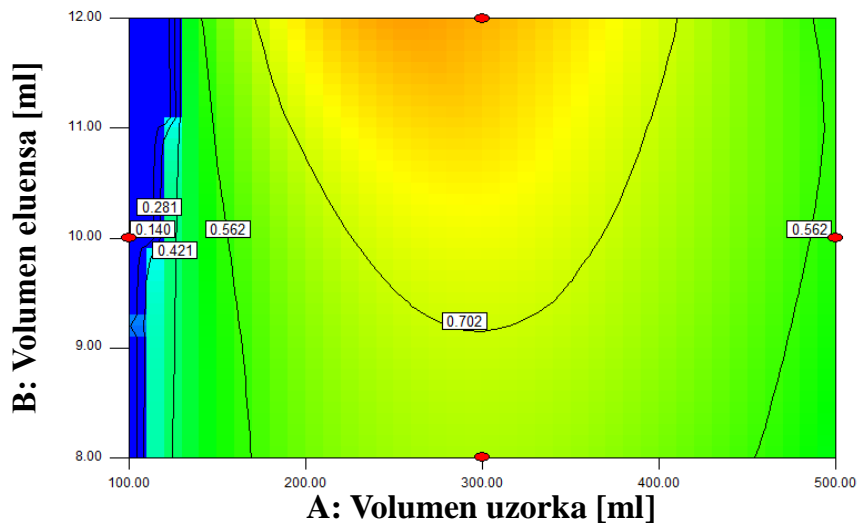
Slika 38. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NDPA



Slika 39. Odzivne površine predstavljene pomoću kontura odzivnih površina za NDBA

### 4.3. Optimiranje procesa ekstrakcije čvrstom fazom

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije čvrstom fazom pri kojima se postiže njezina najveća učinkovitost, provedena je numerička optimizacija procesa pomoću softverskog paketa *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0.0. Numerička optimizacija provedena je maksimizacijom funkcije pri čemu je kao rezultat dobiveno više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih parametara, točnije njih čak 15. U tom slučaju kao najbolje rješenje odabrani su eksperimentalni uvjeti kod kojih je vrijednost poželjnosti (engl. *desirability*), kao kriterij za optimalno provođenje procesa najveća tj. najbliža vrijednosti 1. Prema tome uz vrijednost poželjnosti od 0,843 određeni su slijedeći optimalni uvjeti ekstrakcije čvrstom fazom: volumen uzorka 300 ml, volumen eluensa 12 ml te vrijeme sušenja sorbensa 10 min. Optimalno područje ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije čvrstom fazom, obojeno narančasto nalazi se prikazano na Slici 40.



**Slika 40.** Optimalno područje (obojeno narančasto) ispitivanih procesnih uvjeta ekstrakcije čvrstom fazom (volumen uzorka 300 ml, volumen eluensa 12 ml, vrijeme sušenja sorbensa 10 min) za postizanje maksimalne učinkovitosti ekstrakcije

#### 4.4. Provjera uspješnosti ekstrakcije čvrstom fazom pri optimalnim uvjetima

Nakon određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije *N*-nitrozamina iz vode metodom odzivnih površina, provedena je ekstrakcija pri utvrđenim optimalnim uvjetima kako bi se provjerila uspješnost samog optimiranja. Ekstrakcija *N*-nitrozamina iz vode pri optimalnim uvjetima provedena je na dva načina, jednom uz uparavanje otapala iz uzorka na rotacijskom uparivaču, a drugi puta uz uparavanje otapala iz uzorka u struji dušika. Po završetku ekstrakcije čvrstom fazom, dobiveni ekstrakti oba postupka podvrgnuti su analizi na HPLC-DAD sustavu. Rezultati provedenih analiza prikazani su Tablicama 15 i 16.

**Tablica 15.** Rezultati dobiveni provedbom SPE-HPLC-DAD metode pri optimalnim uvjetima uz uparavanje otapala iz uzorka na rotavaporu

Uparavanje na rotavaporu	SPE (MilliQ)			Kontrolna otopina 1,2 mg/l	Učinkovitost ekstrakcije, %
	1. mjerenje	2. mjerenje	$\bar{A}$		
<b>ANALIT</b>					
<b>NDMA</b>	158,9	209,8	184,4	298,5	61,76
<b>NMOR</b>	126,8	164,6	145,7	177,0	82,32
<b>NPYR</b>	1518,9	1983,8	1751,4	2179,7	80,35
<b>NDEA</b>	75,4	108,6	92,0	191,3	48,09
<b>NPIP</b>	140,2	186,6	163,4	243,1	67,22
<b>NDPA</b>	23,6	38,3	31,0	127,9	24,20
<b>NDBA</b>	13,5	27,8	20,7	84,6	24,47

**Tablica 16.** Rezultati dobiveni provedbom SPE-HPLC-DAD metode pri optimalnim uvjetima uz uparavanje otapala iz uzorka u struji dušika

Uparavanje u struji dušika	SPE (MilliQ)	Kontrolna otopina	Učinkovitost ekstrakcije,
ANALIT	<i>A</i>	1,2 mg/l	%
<b>NDMA</b>	207,7	298,3	69,63
<b>NMOR</b>	125,5	179,1	70,07
<b>NPYR</b>	1554,9	2183,4	71,21
<b>NDEA</b>	130,6	195,7	66,73
<b>NPIP</b>	166,9	242,9	68,71
<b>NDPA</b>	78,2	131,1	59,65
<b>NDBA</b>	57,0	91,4	62,36



Uspoređujući izračunate vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije obaju postupaka moguće je uvidjeti kako su prilikom uparavanja u struji dušika za pojedine *N*-nitrozamine poput NDMA-a, NDEA-a, NDPA-a i NDBA-a postignute daleko veće vrijednosti nego li tijekom postupka koji je uključivao uparavanje na rotacijskom uparivaču. Na osnovu navedenoga moguće je iznijeti nekoliko zaključaka. Naime, uparavanje u struji dušika je izrazito blagi i postepeni proces tijekom kojega ne dolazi do gubitka *N*-nitrozamina kao što je to primjerice slučaj kod rotacijskog uparivača. Također, dobivene rezultate moguće je povezati s vrijednostima  $\log K_{ow}$  danima u Tablicama 4-10. Prethodno navedeni izraz predstavlja logaritamsku vrijednost koeficijenta razdiobe oktanol/voda na osnovu koje je moguće tumačiti topljivost i polarnost samih spojeva, u ovome slučaju *N*-nitrozamina. Posljedično tome moguće se osvrnuti i na njihovu hlapivost uzimajući pritom u obzir vrijednosti molekulskih masa. Logaritamska vrijednost koeficijenta razdiobe oktanol/voda u pravilu se kreće u rasponu između -3 i 10. Što je manja vrijednost  $\log K_{ow}$  to će određeni spoj biti bolje topljiv u vodi odnosno polarnom otapalu (hidrofilan), u suprotnome, veća vrijednost  $\log K_{ow}$  ukazuje na bolju topljivost spojeva u oktanolu odnosno nepolarnom otapalu (lipofilan). Polarniji spojevi odnosno spojevi s manjom vrijednošću  $\log K_{ow}$  će ujedno biti i manje hlapivi, ali jedino ukoliko je riječ o spojevima istih molekulskih masa. Sukladno vrijednostima  $\log K_{ow}$  prikazanim u Tablicama 4-10 ispitivane *N*-nitrozamine je moguće poredati od najpolarnijeg do najnepolarnijeg na slijedeći način: NDMA > NMOR > NPYR > NPIP > NDEA > NDPA > NDBA. Navedeni niz gotovo u potpunosti odgovara redosljedju izlaska pojedinog *N*-nitrozamina iz kromatografske kolone tijekom provedbe HPLC-DAD analize. Stoga, na temelju vrijednosti  $\log K_{ow}$  još jednom se potvrđuje kako je NDMA najpolarniji, a NDBA najnepolarniji ispitivani *N*-nitrozamin. Nadalje, manje vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije mogu biti i posljedica jakog adsorbiranja *N*-nitrozamina u sorbensu zbog čega ih nije moguće u potpunosti eluirati iz istoga. Posljednji razlog trebao bi biti najmanje vjerojatan s obzirom da su korištene SPE kolone punjene kokosovim ugljenom pomno odabrane upravo za ovu skupinu spojeva. Odlikuju se izrazitom poroznošću, strukturom pora koju je moguće kontrolirati, visokom termostabilnošću i niskom kiselo-baznom reaktivnošću te je upravo stoga, ova vrsta sorbensa pronašla prednost u primjeni u odnosu na neke druge vrste.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu primjenom Box-Behnkenova dizajna eksperimenata u kombinaciji s metodom odzivnih površina uspješno je procijenjen utjecaj procesnih parametara, volumena uzorka, volumena eluensa i vremena sušenja sorbensa na učinkovitost ekstrakcije *N*-nitrozamina iz vode. Optimalni uvjeti ekstrakcije čvrstom fazom pri kojima se postižu maksimalne vrijednosti učinkovitosti iste određeni su numeričkom optimizacijom. Određeni optimalni uvjeti su volumen uzorka u iznosu od 300 ml, volumen eluensa od 12 ml te vrijeme sušenja sorbensa od 10 min.

Pri navedenim optimalnim uvjetima provedena su dva eksperimenta tijekom kojih je ispitan utjecaj dvaju potpuno različitih postupaka uparavanja otapala na učinkovitost ekstrakcije. Provedbom prvog eksperimenta koji je uključivao uparavanje otapala na rotacijskom uparivaču te potom analizu dobivenih ekstrakata na HPLC-DAD sustavu postignute su slijedeće vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije *N*-nitrozamina iz vode: 61,76% za NDMA, 82,32% za NMOR, 80,35% za NPYR, 48,09% za NDEA, 67,22% za NPIP, 24,20% za NDPA i 24,47% za NDBA. S druge strane, tijekom eksperimenta koji je uključivao uparavanje otapala u struji dušika te analizu ekstrakata na HPLC-DAD sustavu postignut je slijedeći niz vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije: 69,63% za NDMA, 70,07% za NMOR, 71,21% za NPYR, 66,73% za NDEA, 68,71% za NPIP, 59,65% za NDPA i 62,36% NDBA.

Usporedbom navedenih rezultata dobivenih provedbom SPE-HPLC-DAD analiza može se zaključiti kako je uparavanje otapala u struji dušika, kao blaži proces koji nudi mogućnost kontrole same brzine uparavanja učinkovitiji u odnosu na uparavanje na rotacijskom uparivaču, osobito ukoliko je riječ o kemijskim spojevima poput *N*-nitrozamina koji se odlikuju hlapivošću.

Također, na osnovu svega navedenoga može se zaključiti kako je optimizirana metoda pripreme uzorka za kromatografsku analizu *N*-nitrozamina jednostavna, učinkovita i pristupačna.

## 6. POPIS SIMBOLA

2D - dvodimenzionalno

3D - trodimenzionalno

$A$  - površina ispod kromatografskih krivulja

ANOVA - statistička analiza varijance

ATNC - prividni ukupni sadržaj *N*-nitrozamina

$\text{Ca}(\text{OCl})_2$  - kalcijev hipoklorit

$\text{Ca}(\text{OH})_2$  - kalcijev hidroksid

$\text{CaCl}_2$  - kalcijev klorid

$\text{CaCO}_3$  - kalcijev karbonat

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - diklormetan

$\text{CH}_3\text{CN}$  - acetonitril

$\text{CH}_3\text{OH}$  - metanol

$\text{Cl}_2$  - klor

$\text{ClO}_2$  - klorov dioksid

$\text{CO}_2$  - ugljikov dioksid

$C_p$  - broj središnjih točaka

DAD - detektor s nizom dioda

DoE - dizajn eksperimenata

EPA - Agencija za zaštitu okoliša

EU - Europska unija

GC - plinska kromatografija

$\text{H}_2\text{O}$  - voda

HClO - hipokloritna kiselina

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HS - prostor iznad uzorka

*I* - iskorištenje, učinkovitost ekstrakcije

*k* - broj varijabli

*L* - broj razina

LC - tekućinska kromatografija

LLE - ekstrakcija tekuće-tekuće

log  $K_{ow}$  - logaritamska vrijednost koeficijenta razdiobe oktanol/voda

MDK - maksimalno dopuštena koncentracija

MgCO<sub>3</sub> - magnezijev karbonat

MgSO<sub>4</sub> - magnezijev sulfat

MIP - polimer s otiskom molekule

MS - spektrometar masa

*N* - broj mogućih eksperimenata

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - dušikov (III) oksid

N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - didušikov tetroksid

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - natrijev karbonat

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - natrijev sulfat

NaCl - natrijev klorid

NaF - natrijev fluorid

NaHCO<sub>3</sub> - natrijev hidrogenkarbonat

NaOCl - natrijev hipoklorit

NaOH - natrijev hidroksid

$\text{NCl}_3$  - trikloramin

NDBA - *N*-nitrozodibutilamin

NDEA - *N*-nitrozodietilamin

NDMA - *N*-nitrozodimetilamin

NDPA - *N*-nitrozodipropilamin

$\text{NH}_2\text{Cl}$  - kloramin

$\text{NH}_4\text{OH}$  - amonijev hidroksid

$\text{NHCl}_2$  - dikloramin

NMEA - *N*-nitrozometiletilamin

NMOR - *N*-nitrozomorfolin

NO - dušikov (II) oksid

$\text{NO}_2$  - dušikov (IV) oksid

NPIP - *N*-nitrozopiperidin

NPRO - *N*-nitrozoprolin

NPYR - *N*-nitrozopirrolidin

NSAR - *N*-nitrosarkozin

NTCA - *N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilna kiselina

$\text{O}_2$  - kisik

$\text{O}_3$  - ozon

$pK_a$  - simbol za konstantu disocijacije kiseline na logaritamskoj skali

RSM - metoda odzivnih površina

SBSE - ekstrakcija miješalom

SDME - mikroekstrakcija na kapi

SFC - fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima

SPE - ekstrakcija čvrstom fazom

SPME - mikroekstrakcija čvrstom fazom

STD - standard

$t$  - vrijeme

TEA - analizator toplinske energije

TLC - tankoslojna kromatografija

UV - ultraljubičasto zračenje

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

$X_1$  - volumen uzorka

$X_2$  - volumen eluenta

$X_3$  - vrijeme sušenja sorbensa

$X_i$  - ispitivana nezavisna kodirana varijabla

$X_j$  - ispitivana nezavisna kodirana varijabla

$Y$  - odzivna funkcija predviđena metodom

$\beta_0$  - konstanta jednadžbe

$\beta_i$  - koeficijent linearnih parametara

$\beta_{ii}$  - koeficijent kvadratnih parametara

$\beta_{ij}$  - koeficijent parametara interakcije

$\varepsilon_i$  - slučajna varijabla koja modelu daje karakter stohastičnosti

## 7. LITERATURA

[1] Voda za piće, URL:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water?fbclid=IwAR2Im9-SFazAnR42lkqWSR84KQZg4ZIDLi-WCXCjaGkXCyn1QamDUANSLF4> (pristup 03.03.2023.)

[2] Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće (NN 47/1593), URL:

[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_04\\_47\\_1593.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_04_47_1593.html) (pristup 03.03.2023.)

[3] T. J. Casey, Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering, Wiley, Chichester, 2006.

[4] E. Drljo, Nusprodukti u vodi za piće kao posljedica dezinfekcije hipokloritom, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.

[5] Mineralna, izvorska i stolna voda, URL:

[https://www.vitalisvoda.hr/2021/05/10/koja-je-razlika-između-izvorske-mineralne-i-stolne-vode/?fbclid=IwAR1NGk1oz33oaAquZ5WVI6aPRlh9Yf\\_bsJnsi\\_F8PmKysWci-IPk7IOA43wGkXCyn1QamDUANSLF4](https://www.vitalisvoda.hr/2021/05/10/koja-je-razlika-između-izvorske-mineralne-i-stolne-vode/?fbclid=IwAR1NGk1oz33oaAquZ5WVI6aPRlh9Yf_bsJnsi_F8PmKysWci-IPk7IOA43wGkXCyn1QamDUANSLF4) (pristup 03.03.2023.)

[6] Pravilnik o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/1743), URL:

[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019\\_09\\_85\\_1743.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_09_85_1743.html) (pristup 03.03.2023.)

[7] Guidelines for Drinking-water Quality, 4. izdanje, World Health Organization, Geneva, 2011, str. 78.

[8] G. Hanrahan, Key Concepts in Environmental Chemistry, Academic Press, Amsterdam, 2012, str. 155-176.

[9] M. Habuda-Stanić, B. Kalajdžić, M. Nujić, Tehnologija vode i obrada otpadnih voda, Interna skripta, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

[10] World Health Organization, Water Treatment and Pathogen Control, IWA Publishing, London, 2004, str. 41-42.

[11] Dezinfekcija vode za piće, URL:

<https://www.pliva-sept.hr/dezinfekcija-vode.html> (pristup 06.03.2023.)

- [12] Dezinfekcija vode klorom, URL:  
<http://fornax-automatika.hr/dezinfekcija-vode> (pristup 07.03.2023.)
- [13] N. Omerđić, Stručni prikaz: Kloriranje vode, Hrvatske vode, 29 (2021) 133-138.
- [14] Dezinfekcija vode klorovim dioksidom, URL:  
<https://3-m.hr/wp-content/uploads/2021/02/Klor-dioksid-katalog.pdf> (pristup 07.03.2023.)
- [15] D. Askenaizer, Drinking Water Quality and Treatment, u R. A. Meyers (ur.), Encyclopedia of Physical Science and Technology, 3. izdanje, Academic Press, Amsterdam, 2003, str. 651-671.
- [16] Dezinfekcija vode ozonom, URL:  
<https://spartanwatertreatment.com/pdf> (08.03.2023.)
- [17] C. Collivignarelli, O. Conio, V. Riganti, G. Ziglio, G. Bertanza, Drinking Water and Waste Water Disinfection: Strategies and Problems, u R. Gavasci i S. Zandaryaa (ur.), Proceedings of the First International Conference on „Environmental Engineering and Renewable Energy“, Elsevier, Amsterdam, 1998, str. 285-293.
- [18] Nusprodukti dezinfekcije, URL:  
[file:///C:/Users/PC%20Korisnik/Downloads/dokumen.tips\\_dezinfekcija-vode-i-nusprodukti-dezinfekcije-1-ph-vode-to-nii-to-bolja.pdf](file:///C:/Users/PC%20Korisnik/Downloads/dokumen.tips_dezinfekcija-vode-i-nusprodukti-dezinfekcije-1-ph-vode-to-nii-to-bolja.pdf) (pristup 09.05.2023.)
- [19] Nusprodukti dezinfekcije, URL:  
<https://www.lenntech.com/processes/disinfection/byproducts/disinfection-byproducts.htm#:~:text=What%20are%20disinfection%20byproducts%3F,organic%20matter%20in%20the%20water> (pristup 09.05.2023.)
- [20] B. C. Vizioli, L. W. Hantao, C. C. Montagner, Disinfection byproducts in emerging countries, u T. Dalu i N. Tavengwa (ur.), Emerging Freshwater Pollutants, Elsevier, Amsterdam, 2022, str. 241-266.
- [21] M. Rosero-Moreano, New Trends in Chemical Analysis of Disinfection By-Products, u S. Kırmusaoglu (ur.), Disinfection, IntechOpen, 2018, DOI: 10.5772/intechopen.77254



[22] Nusprodukti dezinfekcije, URL:

<https://www.lenntech.com/processes/disinfection/byproducts/disinfection-byproducts-types.htm>

(pristup 09.05.2023.)

[23] A. F. Gilca, C. Teodosiu, S. Fiore, C. P. Musteret, Emerging disinfection byproducts: A review on their occurrence and control in drinking water treatment processes, *Chemosphere*, 259 (2020) 127476.

[24] C. Crews, Processing contaminants: *N*-nitrosamines, u Y. Motarjemi, G. Moy, E. Todd (ur.), *Encyclopedia of Food Safety*, 1. izdanje, Academic Press, Amsterdam, 2014, str. 409-412.

[25] Kemijska struktura *N*-nitrozamina, URL:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrosamine> (pristup 12.05.2023.)

[26] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217-279.

[27] D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, Priprava uzoraka za analizu, u M. Kaštelan-Macan i M. Petrović (ur.), *Analitika okoliša, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije*, Zagreb, 2013, str. 143-154.

[28] Koraci ekstrakcije čvrstom fazom, URL:

<https://www.gilson.com/default/learninghub/post/food-safety-and-solid-phase-extraction-an-essential-guide-for-switching-from-a-manual-to-an-automated-protocol.html>

(pristup 10.05.2023.)

[29] A. Mornar, B. Nigović, D. Amidžić Klarić, M. L. Jeličić, E. Brusač, Ekstrakcija čvrstom fazom-primjena u bioanalitici, *Farmaceutski glasnik*, 76 (2020) 353-369.

[30] Vrste sorbensa, URL:

<https://shop.sorbtech.com/collections/spe-cartridges> (pristup 11.05.2023.)

[31] A. J. M. Horvat, Tehnike i metode kemijske analize okoliša, u M. Kaštelan-Macan i M. Petrović (ur.), *Analitika okoliša, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije*, Zagreb, 2013, str. 206-214.

- [32] Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, URL:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/03%3A\\_Principles\\_of\\_Gas\\_Chromatography/3.02%3A\\_High\\_Performance\\_Liquid\\_chromatography#:~:text=High%2Dperformance%20liquid%20chromatography%20\(HPLC,used%20to%20separate%20colored%20compounds.](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.02%3A_High_Performance_Liquid_chromatography#:~:text=High%2Dperformance%20liquid%20chromatography%20(HPLC,used%20to%20separate%20colored%20compounds.) (pristup 13.05.2023.)
- [33] HPLC shema, URL:  
<https://www.novami.com/nova-technology/hplc-high-performance-liquid-chromatography/> (pristup 13.05.2023.)
- [34] Optimizacija, URL:  
<https://www.britannica.com/science/optimization/Theory> (pristup 10.05.2023.)
- [35] Optimizacija, URL:  
[https://hr.wikipedia.org/wiki/Optimizacija\\_%28matematika%29#/media/Datoteka:MaximumParaboloid.png](https://hr.wikipedia.org/wiki/Optimizacija_%28matematika%29#/media/Datoteka:MaximumParaboloid.png) (pristup 10.05.2023.)
- [36] B. Halassy, Dizajn eksperimenta (DoE) u optimizaciji in vivo pokusa, Sveučilište u Zagrebu Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Zagreb, URL:  
<http://www.crolasa.com/wp-content/uploads/2017/09/Beata-Halassy-DoE.pdf> (pristup 06.04.2023.)
- [37] Dizajn eksperimenata, URL:  
<https://www.sartorius.hr/proizvodi/bioprocес/kontrolа-procesа-senzori/umetrics-programсka-rjesenja/modde-program-za-dizajn-eksperimenata/> (pristup 06.04.2023.)
- [38] M. Ukrainczyk, Planiranje pokusa u industriji, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 5(3-4) (2010) 96-105.
- [39] A. L. H. Müller, J. A. de Oliveira, O. D. Prestes, M. B. Adaime, R. Zanella, Design of experiments and method development, u C. F. Pool (ur.), Solid-Phase extraction, Elsevier, Amsterdam, 2020, str. 589-608.
- [40] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, Talanta, 76 (2008) 965-977.

[41] S. Morović, K. Košutić, B. Babić, D. Ašperger, Pregledni članak: Sudbina *N*-nitrozamina u okolišu i primjenjivi postupci njihovog uklanjanja iz voda, Hrvatske vode, 29 (2021), 175-186.

[42] NDBA, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodibutylamine> (pristup 10.03.2023.)

[43] NDBA, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB0358200.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0358200.htm)  
(pristup 22.03.2023.)

[44] NDEA, URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5921> (pristup 10.03.2023.)

[45] NDEA, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8732709.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8732709.htm)  
(pristup 22.03.2023.)

[46] NDMA, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodimethylamine> (pristup 10.03.2023.)

[47] NDMA, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_En.aspx?kwd=N-Nitrosodimethylamine](https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=N-Nitrosodimethylamine)  
(pristup 22.03.2023.)

[48] NDMA, URL: <https://foodb.ca/compounds/FDB003496> (pristup 22.03.2023.)

[49] NDPA, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodipropylamine> (pristup 10.03.2023.)

[50] NDPA, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7400641.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7400641.htm)  
(pristup 22.03.2023.)

[51] NMOR, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosomorpholine> (pristup 10.03.2023.)

[52] NMOR, URL: <https://contaminantdb.ca/contaminants/CHEM003975> (pristup 22.03.2023.)

[53] NPIP, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosopiperidine> (pristup 10.03.2023.)

[54] NPIP, URL: <https://contaminantdb.ca/contaminants/CHEM004108> (pristup 22.03.2023.)

[55] NPIP, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_En.aspx?kwd=N-Nitrosopiperidine%20](https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=N-Nitrosopiperidine%20)  
(pristup 22.03.2023.)

[56] NPYR, URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosopyrrolidine> (pristup 10.03.2023.)

[57] NPYR, URL: <https://foodb.ca/compounds/FDB008291> (pristup 22.03.2023.)

[58] NPYR, URL:

[https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_En.aspx?kwd=N-Nitrosopyrrolidine%20](https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=N-Nitrosopyrrolidine%20)  
(pristup 22.03.2023.)

[59] SPE kolone, URL:

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/supelco/57144u> (pristup 19.05.2023.)

[60] Ultrazvučna kupelj, URL:

<file:///C:/Users/PC%20Korisnik/Downloads/Elmasonic+P+ultrazvu%C4%8Dna+kupelj.pdf>  
(pristup 20.05.2023.)

[61] Ultrazvučno čišćenje, URL:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic\\_cleaning](https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic_cleaning) (pristup 20.05.2023.)

[62] Aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom, URL:

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/supelco/57250u> (pristup 19.05.2023.)

[63] V. Golub, Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje nitrozo-spojeva, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2022.

## 8. PRILOZI

**Tablica P1.** Površine ispod kromatografskih krivulja dobivene tijekom provedbe SPE-HPLC-DAD metode za eksperimente 1-3

ANALIT	SPE (MilliQ)	Uvjeti eksperimenta - volumen uzorka [ml], volumen eluensa [ml], vrijeme sušenja sorbensa [min]		
		Eksperiment 1 (100;8;20)	Eksperiment 2 (100;10;10)	Eksperiment 3 (100;12;20)
NDMA	1. mjerenje	46,7	55,1	50,4
	2. mjerenje	50,7	47,9	54,4
	$\bar{A}$	48,7	51,5	52,4
NMOR	1. mjerenje	48,1	47,5	48,3
	2. mjerenje	44,4	44,7	54,1
	$\bar{A}$	46,3	46,1	51,2
NPYR	1. mjerenje	551,6	577,2	585,7
	2. mjerenje	557,5	569,3	623,9
	$\bar{A}$	554,6	573,3	604,8
NDEA	1. mjerenje	20,5	25,9	19,9
	2. mjerenje	18,9	18,8	23,1
	$\bar{A}$	19,7	22,4	21,5
NPIP	1. mjerenje	48,9	51,2	52,1
	2. mjerenje	48,3	49,5	57,3
	$\bar{A}$	48,6	50,4	54,7
NDPA	1. mjerenje	15,7	17,2	14,8
	2. mjerenje	14,0	18,9	14,7
	$\bar{A}$	14,9	18,1	14,8
NDBA	1. mjerenje	9,6	-	-
	2. mjerenje	8,4	-	-
	$\bar{A}$	9,0	-	-

**Tablica P2.** Površine ispod kromatografskih krivulja dobivene tijekom provedbe SPE-HPLC-DAD metode za eksperimente 4-6

ANALIT	SPE (MilliQ)	Uvjeti eksperimenta - volumen uzorka [ml], volumen eluensa [ml], vrijeme sušenja sorbensa [min]		
		Eksperiment 4 (100;10;30)	Eksperiment 5 (300;8;10)	Eksperiment 6 (300;12;10)
NDMA	1. mjerenje	49,2	213,4	168,4
	2. mjerenje	47,1	158,8	217,0
	$\bar{A}$	48,2	186,1	192,7
NMOR	1. mjerenje	43,2	157,8	125,6
	2. mjerenje	40,1	128,6	165,5
	$\bar{A}$	41,7	143,2	145,6
NPYR	1. mjerenje	513,3	1872,5	1533,5
	2. mjerenje	480,8	1527,4	1998,4
	$\bar{A}$	497,1	1700,0	1766,0
NDEA	1. mjerenje	21,4	120,0	93,4
	2. mjerenje	27,2	82,5	120,2
	$\bar{A}$	24,3	101,3	106,8
NPIP	1. mjerenje	47,9	184,7	154,2
	2. mjerenje	44,1	145,7	198,9
	$\bar{A}$	46,0	165,2	176,6
NDPA	1. mjerenje	14,8	55,6	47,3
	2. mjerenje	14,4	31,9	65,4
	$\bar{A}$	14,6	43,8	56,4
NDBA	1. mjerenje	-	26,9	22,3
	2. mjerenje	-	13,3	32,5
	$\bar{A}$	-	20,1	27,4

**Tablica P3.** Površine ispod kromatografskih krivulja dobivene tijekom provedbe SPE-HPLC-DAD metode za eksperimente 7-9

ANALIT	SPE (MilliQ)	Uvjeti eksperimenta - volumen uzorka [ml], volumen eluensa [ml], vrijeme sušenja sorbensa [min]		
		Eksperiment 7 (300;10;20)	Eksperiment 8 (300;10;20)	Eksperiment 9 (300;10;20)
NDMA	1. mjerenje	198,1	171,7	164,7
	2. mjerenje	172,4	206,8	162,7
	$\bar{A}$	185,3	189,3	163,7
NMOR	1. mjerenje	146,3	125,1	108,1
	2. mjerenje	147,5	145,8	110,7
	$\bar{A}$	146,9	135,5	109,4
NPYR	1. mjerenje	1757,8	1532,9	1312,0
	2. mjerenje	1773,8	1733,9	1331,7
	$\bar{A}$	1765,8	1633,4	1321,9
NDEA	1. mjerenje	112,6	96,4	89,7
	2. mjerenje	84,1	120,7	106,8
	$\bar{A}$	98,4	108,6	98,3
NPIP	1. mjerenje	177,2	155,7	111,7
	2. mjerenje	170,9	180,1	135,4
	$\bar{A}$	174,1	167,9	123,6
NDPA	1. mjerenje	61,4	55,9	45,5
	2. mjerenje	32,1	70,7	64,3
	$\bar{A}$	46,8	63,3	54,9
NDBA	1. mjerenje	32,7	30,5	26,5
	2. mjerenje	12,9	37,6	49,0
	$\bar{A}$	22,8	34,1	37,8

**Tablica P4.** Površine ispod kromatografskih krivulja dobivene tijekom provedbe SPE-HPLC-DAD metode za eksperimente 10-12

ANALIT	SPE (MilliQ)	Uvjeti eksperimenta - volumen uzorka [ml], volumen eluensa [ml], vrijeme sušenja sorbensa [min]		
		Eksperiment 10 (300;8;30)	Eksperiment 11 (300;12;30)	Eksperiment 12 (500;10;30)
NDMA	1. mjerenje	180,3	171,0	221,5
	2. mjerenje	170,5	189,7	269,7
	$\bar{A}$	175,4	180,4	245,6
NMOR	1. mjerenje	125,5	116,4	229,2
	2. mjerenje	1119,	120,3	252,5
	$\bar{A}$	118,7	118,4	240,9
NPYR	1. mjerenje	1509,0	1405,9	2745,7
	2. mjerenje	1365,8	1471,5	3061,9
	$\bar{A}$	1437,4	1438,7	2881,3
NDEA	1. mjerenje	118,3	98,2	90,2
	2. mjerenje	98,2	104,9	125,1
	$\bar{A}$	108,3	101,6	107,7
NPIP	1. mjerenje	151,6	124,9	239,0
	2. mjerenje	125,4	135,5	281,6
	$\bar{A}$	138,5	130,2	260,3
NDPA	1. mjerenje	74,5	60,1	23,0
	2. mjerenje	53,5	32,3	39,9
	$\bar{A}$	64,0	46,2	31,5
NDBA	1. mjerenje	49,5	28,2	11,3
	2. mjerenje	40,7	19,9	15,0
	$\bar{A}$	45,1	24,1	13,2



**Tablica P5.** Površine ispod kromatografskih krivulja dobivene tijekom provedbe SPE-HPLC-DAD metode za eksperimente 13-15

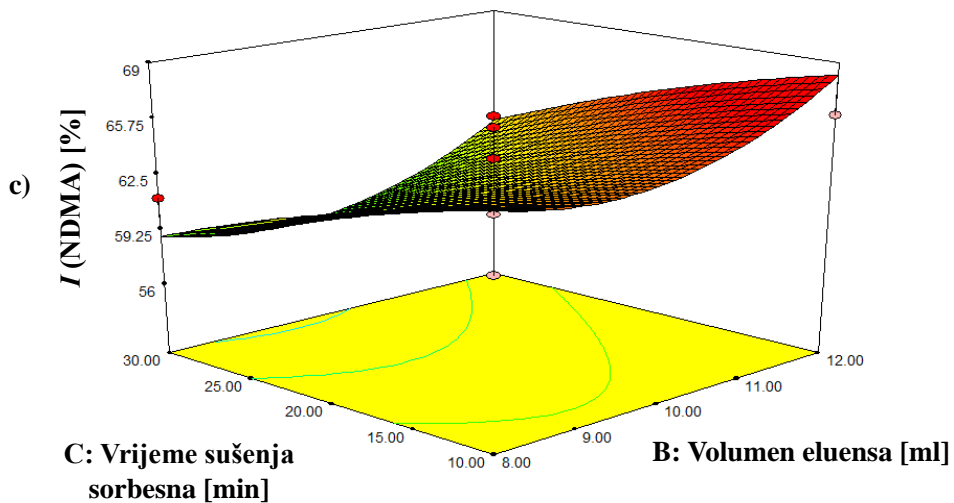
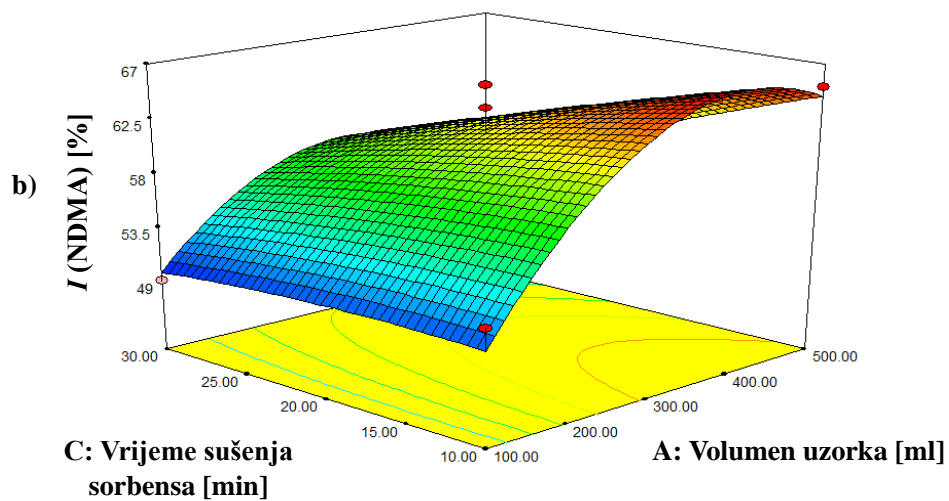
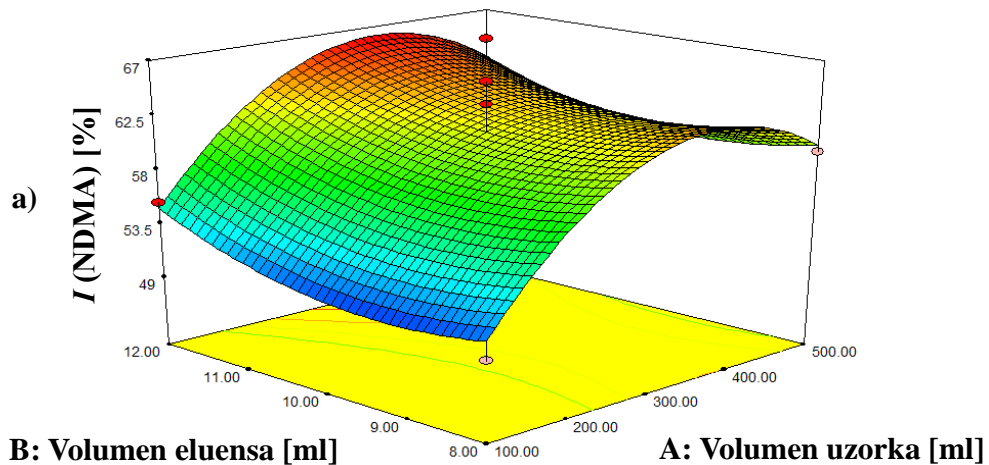
ANALIT	SPE (MilliQ)	Uvjeti eksperimenta - volumen uzorka [ml], volumen eluensa [ml], vrijeme sušenja sorbensa [min]		
		Eksperiment 13 (500;10;10)	Eksperiment 14 (500;8;20)	Eksperiment 15 (500;12;20)
NDMA	1. mjerenje	332,4	244,0	324,7
	2. mjerenje	312,1	346,0	312,9
	$\bar{A}$	322,3	295,0	318,8
NMOR	1. mjerenje	187,6	247,4	183,1
	2. mjerenje	197,9	193,1	196,2
	$\bar{A}$	192,8	220,3	189,7
NPYR	1. mjerenje	2275,9	2930,7	2252,1
	2. mjerenje	2392,9	2296,0	2377,1
	$\bar{A}$	2334,4	2613,4	2314,6
NDEA	1. mjerenje	155,5	87,3	146,9
	2. mjerenje	184,8	163,2	175,5
	$\bar{A}$	170,2	125,3	161,2
NPIP	1. mjerenje	198,5	230,5	195,4
	2. mjerenje	258,3	206,6	250,3
	$\bar{A}$	228,4	218,6	222,9
NDPA	1. mjerenje	67,2	16,9	52,1
	2. mjerenje	109,7	81,1	94,4
	$\bar{A}$	88,5	49,0	73,3
NDBA	1. mjerenje	30,3	-	18,3
	2. mjerenje	72,5	46,9	49,0
	$\bar{A}$	51,4	23,5	33,7

**Tablica P6.** Dobivene površine ispod kromatografskih krivulja za kontrolne otopine *N*-nitrozamina tijekom provedbe HPLC-DAD metode za eksperimente 1-15

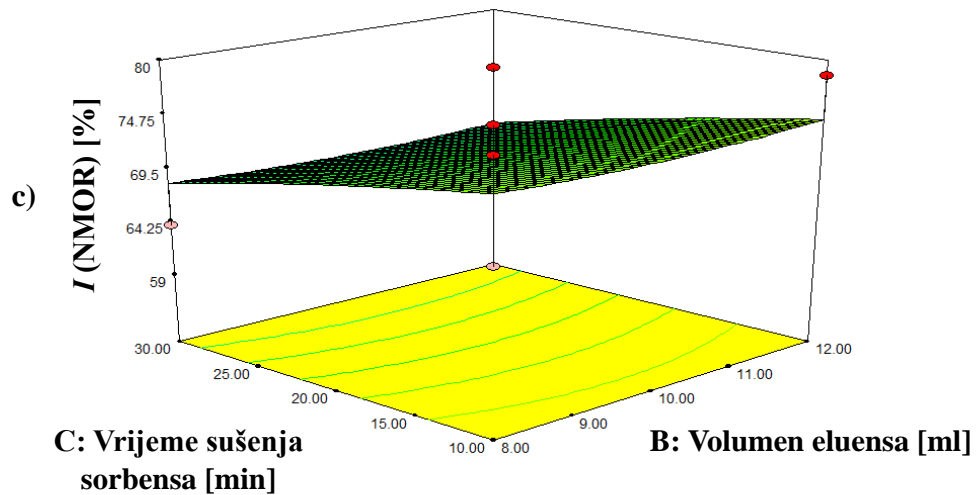
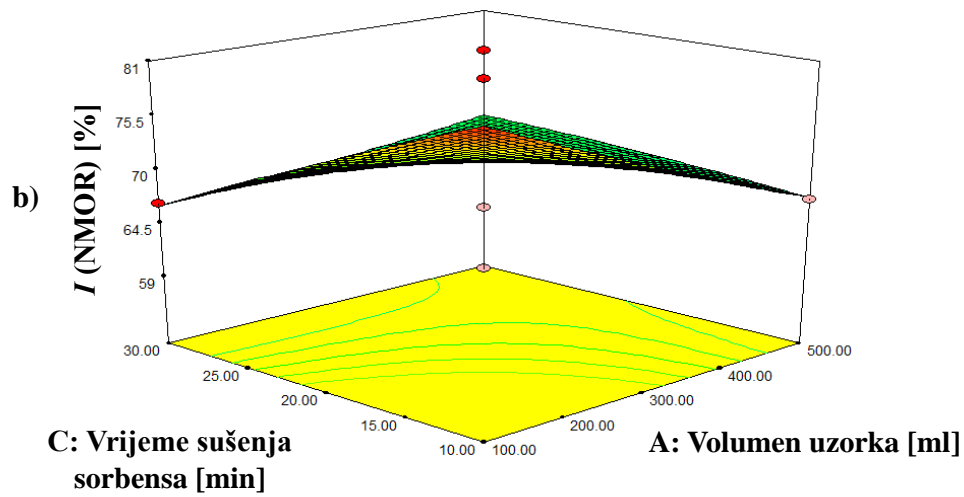
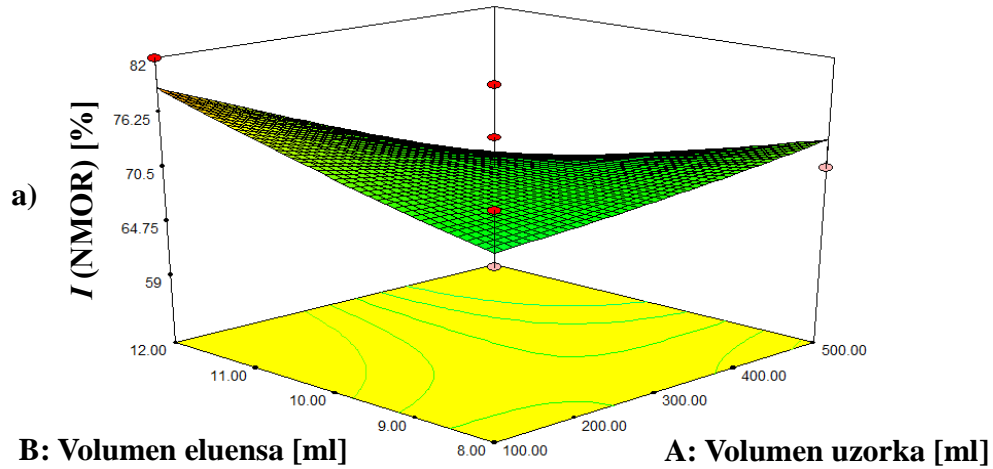
Kontrolna otopina	<i>A</i> (NDMA)	<i>A</i> (NMOR)	<i>A</i> (NPYR)	<i>A</i> (NDEA)	<i>A</i> (NPIP)	<i>A</i> (NDPA)	<i>A</i> (NDBA)
0,4 mg/l (1, 2, 3, 4)	98,2	62,5	738,0	64,7	78,4	41,8	30,9
1,2 mg/l (5)	287,8	185,0	2222,0	198,7	248,0	130,5	96,2
1,2 mg/l (6 i 7)	291,9	185,4	2234,2	201,7	248,9	136,4	101,6
1,2 mg/l (8)	289,8	183,6	2243,6	203,6	251,3	139,1	99,7
1,2 mg/l (9 i 11)	289,7	182,9	2245,4	203,1	247,4	140,8	94,5
1,2 mg/l (10)	286,9	185,4	2240,6	195,7	244,9	138,6	88,7
2 mg/l (12)	478,2	314,4	3791,1	335,6	403,5	216,9	156,5
2 mg/l (13)	494,8	287,5	3508,8	313,9	399,0	218,7	158,0
2 mg/l (14 i 15)	494,8	312,1	3797,1	332,3	400,4	215,8	149,0

**Tablica P7.** Prikaz vrijednosti intervala

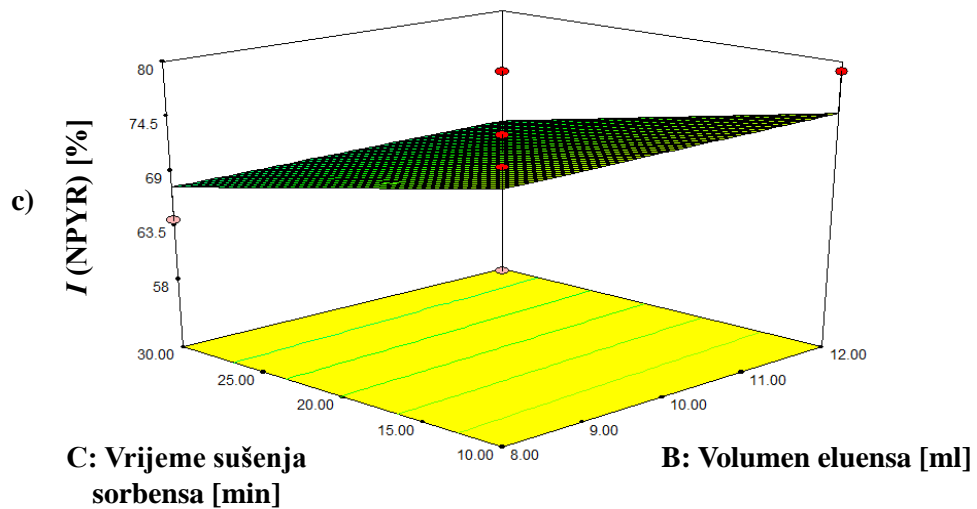
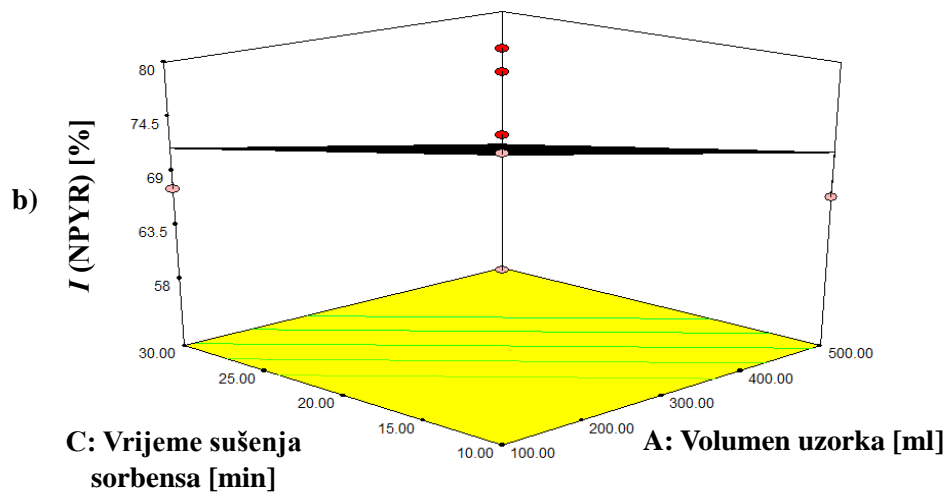
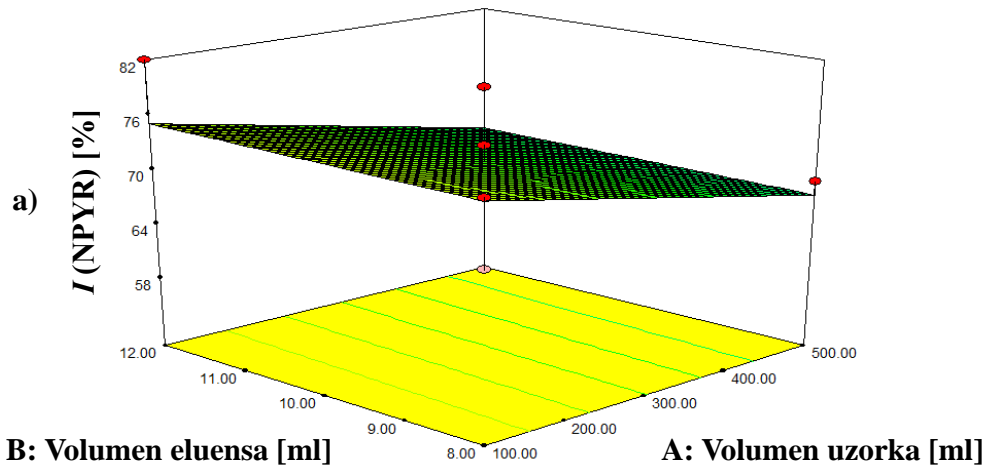
ANALIT	Donja granica intervala	Gornja granica intervala
NDMA	-1,775	1,243
NMOR	-1,589	1,589
NPYR	-1,598	1,472
NDEA	-1,976	1,976
NPIP	-1,671	1,401
NDPA	-1,660	1,981
NDBA	-1,875	1,875



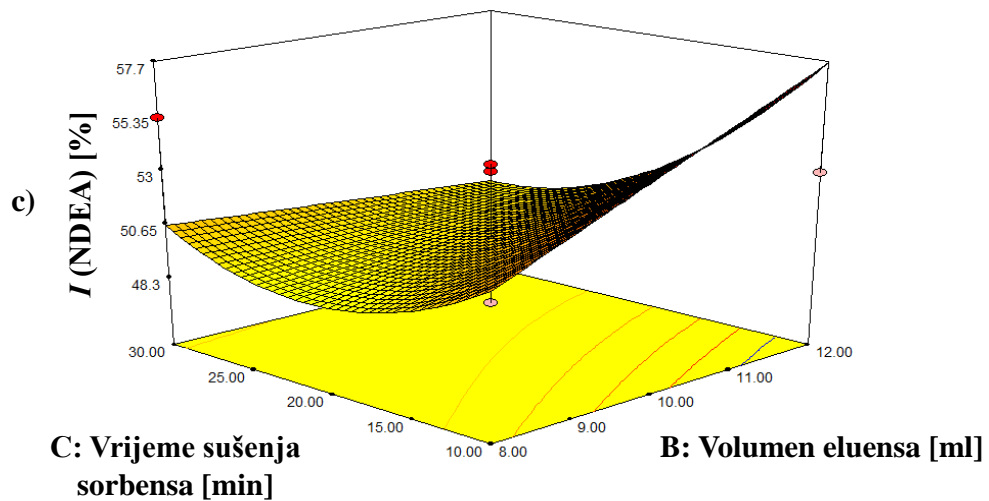
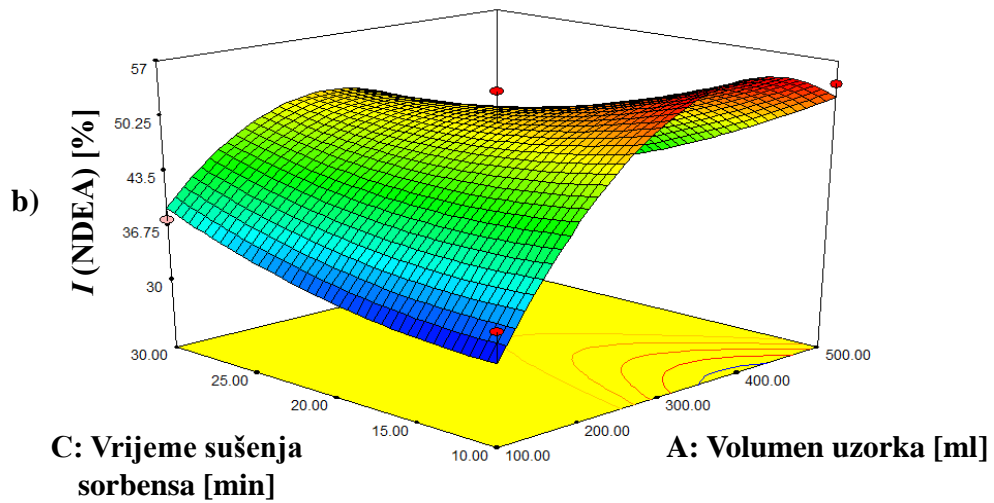
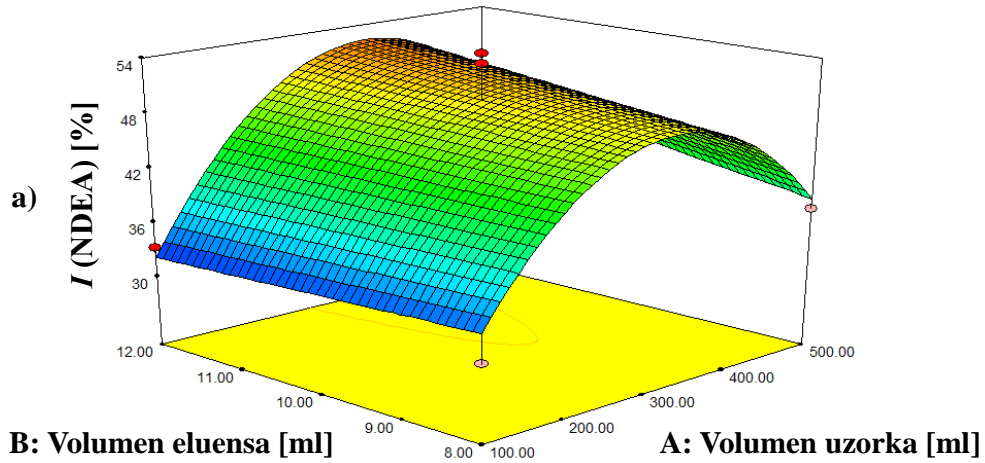
Slika P1. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NDMA



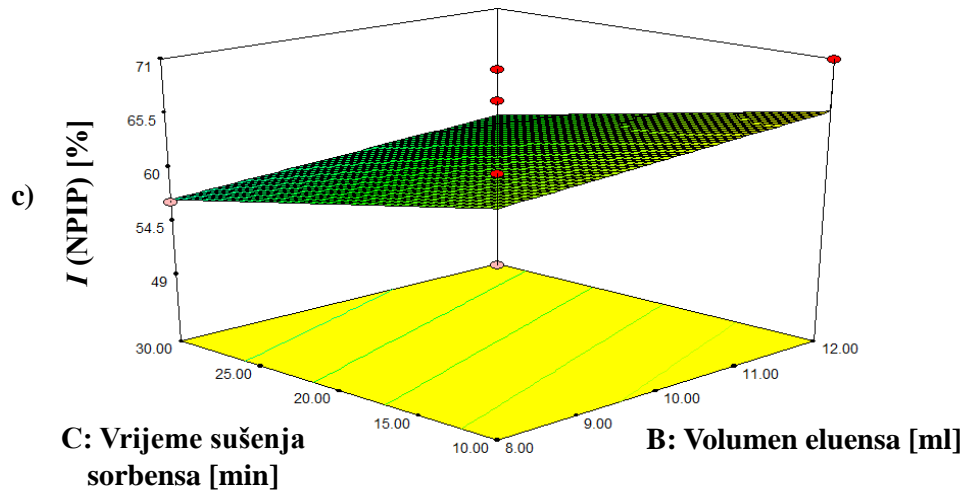
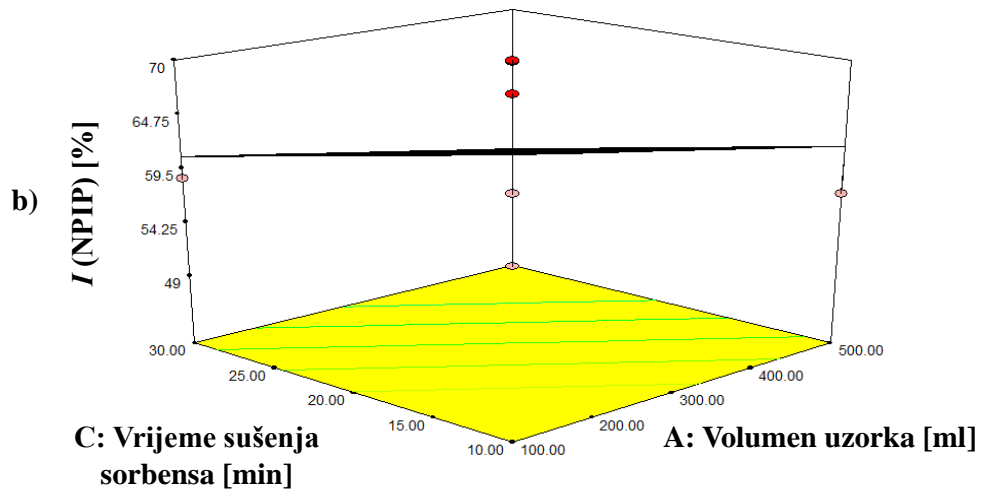
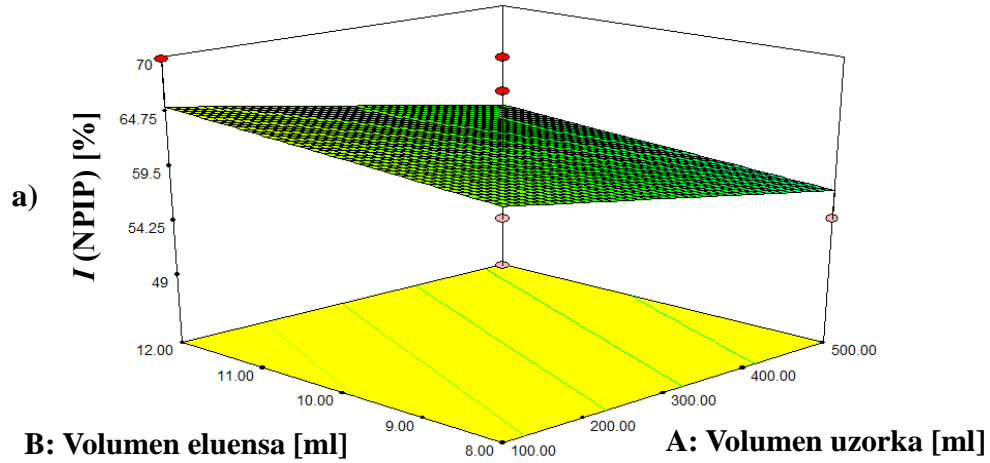
Slika P2. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NMOR



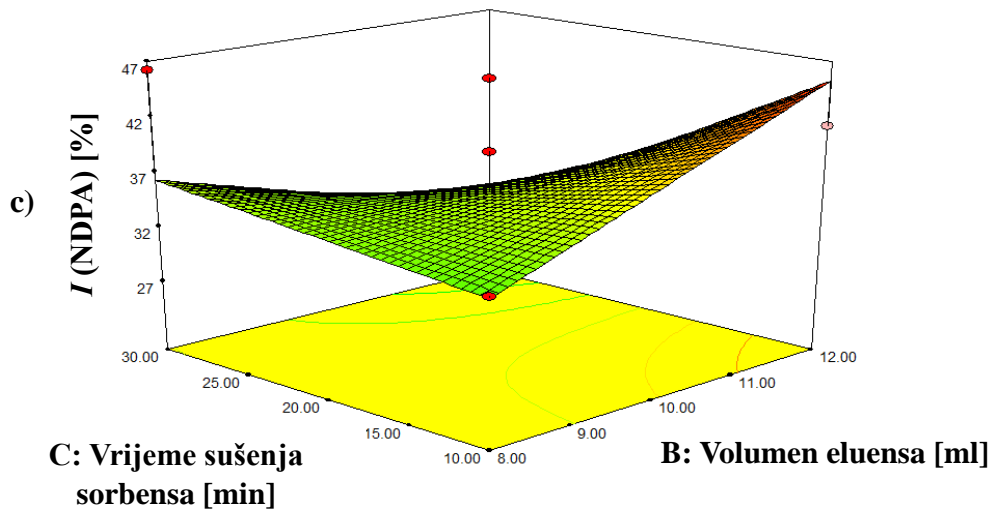
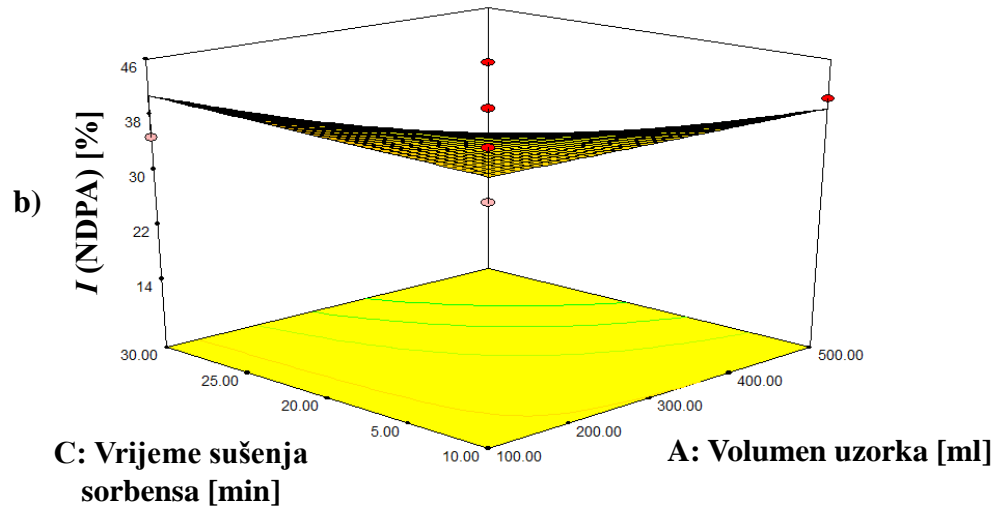
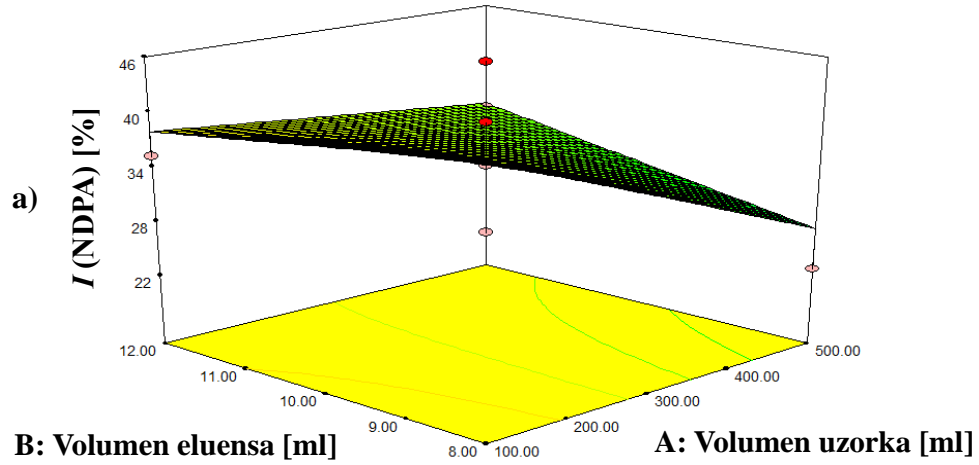
Slika P3. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NPYR



Slika P4. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NDEA

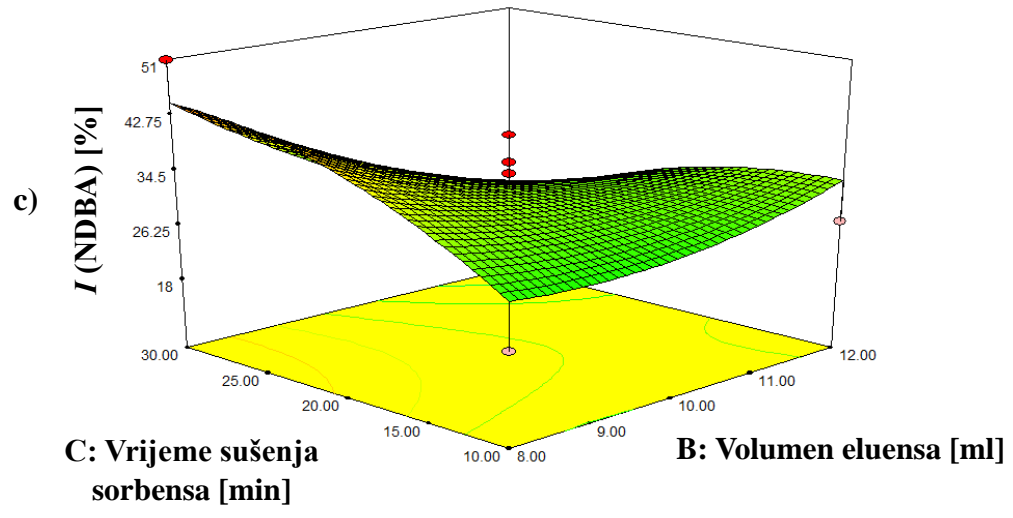
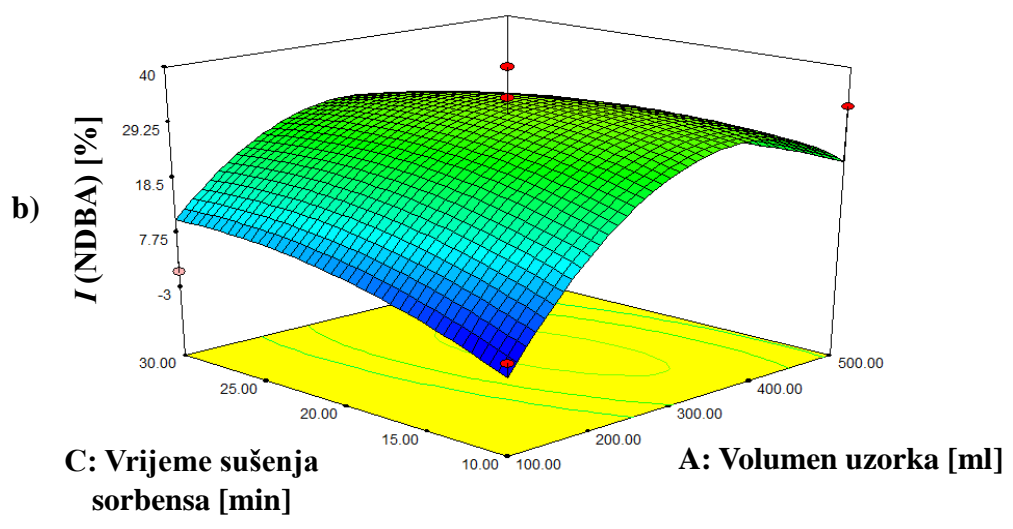
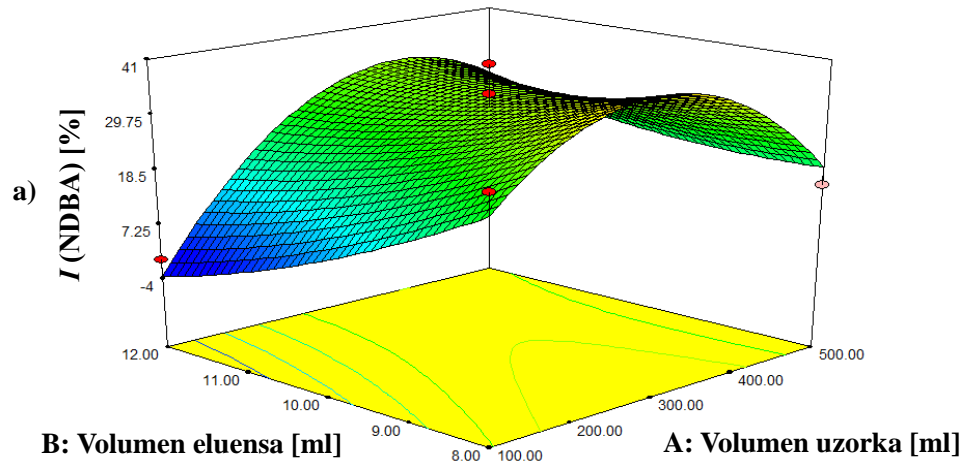


Slika P5. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NPIP



Slika P6. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NDPA





Slika P7. Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za NDBA

## 9. ŽIVOTOPIS

Martina Vuković [REDACTED] Pohađala je Osnovnu školu Markuševac, nakon čega upisuje III. Gimnaziju u Zagrebu, opći smjer. Maturirala je 2017. godine te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Kemija i inženjerstvo materijala. Tijekom fakultetskog obrazovanja odradila je stručnu praksu u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, u Odjelu za pripravu testnih reagensija. U srpnju 2021. godine završava preddiplomski studij obranom završnog rada pod nazivom „Validacija HPLC-PDA metode za određivanje ciprofloksacina u vodi“ čime je stekla akademski naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka kemijskog inženjerstva. Iste godine upisuje diplomski studij Kemije i inženjerstva materijala na istoimenom fakultetu. Za vrijeme fakultetskog obrazovanja 2019., 2021., 2022. i 2023. godine obavljala je posao demonstratora iz kolegija Kemijska analiza materijala, a 2023. godine i iz kolegija Kemija okoliša na Zavodu za analitičku kemiju čime je nastojala prenijeti svoja znanja i iskustva na mlađe naraštaje.