

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje N-nitrozamina

Orešković, Patrik

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:149:116999>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Patrik Orešković

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Patrik Orešković

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRAFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE N-NITROZAMINA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Kristina Tolić Čop

Zagreb, rujan 2023.

Ponajprije se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pruženoj prilici i povjerenju pri izradi diplomskog rada. Zahvaljujem se na strpljenju, mnogobrojnim savjetima, uputama te uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem se i asistentici dr. sc. Kristini Tolić Čop na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog djela rada. Hvala na mnogobrojnim savjetima, prenesenom znanju i pristupačnosti.

Htio bih se zahvaliti i svim ostalim zaposlenicima Zavoda za analitičku kemiju koji su mi na bilo koji način pomogli i olakšali dane provedene u laboratoriju.

Želio bih se zahvaliti svim svojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene tijekom studiranja te su me uvijek poticali i bili mi podrška.

Na kraju se želim posebno zahvaliti cijeloj svojoj obitelji, a posebno roditeljima, koji su mi uvijek bili bezuslovna podrška i oslonac bez koga danas sigurno ne bi bio ovdje gdje jesam. Ovaj rad je i zasluga svih vas.

Svima velika HVALA!

SAŽETAK

N-nitrozamini su organski kemijski spojevi koji se klasificiraju kao kancerogeni za ljudsko zdravlje. Pojavljuju se svuda oko nas u raznim prehrambenim i kozmetičkim proizvodima, no posljednjih godina je otkriveno kako se u značajnoj količini javljaju kao nusprodukti dezinfekcije vode za piće korištenjem procesa poput kloriranja i kloraminacije. Vrlo je važno postići njihovu jednostavnu i brzu detekciju u vodi kako bi se odredila njezina prikladnost za piće. Cilj ovog rada je razviti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja koristi detektor s nizom dioda za određivanje *N*-nitrozamina te provesti validaciju kako bi se odredila njezina prikladnost za tu namjenu. Ispitivanja su provedena na osam *N*-nitrozamina: *N*-nitrozodi-*n*-propilamin (NDPA), *N*-nitrozopirolidin (NPYR), *N*-nitrozodietilamin (NDEA), *N*-nitrozomorfolin (NMOR), *N*-nitroso-di-*n*-butilamin (NDBA), *N*-nitrozopiperidin (NPIP), *N*-nitrozodifenilamin (NDPhA) i *N*-nitrozodimetilamin (NDMA).

Kako bi se izabrala najprikladnija pokretna faza, najprije su provedena izokratna eluiranja s acetonitrilom, etanolom i metanolom kao B fazom, dok je u sva tri slučaja MilliQ voda činila A fazu. Dobiveni su rezultati pokazali kako je kombinacija acetonitrila i MilliQ vode najbolji izbor pokretne faze za određivanje *N*-nitrozamina te su upravo oni korišteni u daljnjem istraživanju. Za razvoj metode ispitivano je više gradijenata te se u konačnici kao najbolji izbor pokazao gradijent čije vrijeme analize traje 20 minuta uz protok 0,5 mL min⁻¹. Razvijena HPLC-DAD metoda je potom validirana pri čemu su ispitane izvedbene karakteristike metode: selektivnost, linearnost, ponovljivost, međupreciznost, istinitost, granica detekcije, granica kvantifikacije te je definirano radno područje metode. Metoda se analizom uzoraka vodovodne vode pokazala selektivnom što omogućuje njezinu primjenu za određivanje *N*-nitrozamina u vodi. Postignuta je dobra linearnost ($R^2 \geq 0,995$) te je također zadovoljen kriterij za ponovljivost i međupreciznost ($RSD \leq 10\%$) za sve *N*-nitrozamine. Zadovoljavajuće iskorištenje postignuto je pri višim koncentracijama, dok za niže koncentracije nije zadovoljen kriterij prihvatljivosti za sve *N*-nitrozamine. Rezultati su pokazali kako je razvijenom HPLC-DAD metodom moguće uspješno odrediti osam ispitivanih *N*-nitrozamina te provesti njihovu kvantifikaciju. Provedenom validacijom metode potvrđena je njezina primjenjivost u svrhu određivanja *N*-nitrozamina što omogućuje primjenu ove metode za analizu uzoraka vode.

Ključne riječi: *N*-nitrozamini, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, detektor s nizom dioda, validacija metode

ABSTRACT

N-nitrosamines are organic chemical compounds which are classified as cancerogenic for humans. They appear all around us, such as food and cosmetic products but in recent years it was discovered that they appear in significant amounts as byproducts of water disinfection, such as chlorination and chloramination. It's important to achieve their simple and fast detection in water, in order to confirm water suitability for drinking. Aim of this research is to develop a high-performance liquid chromatography method with diode array detection for the determination of *N*-nitrosamines and to perform method validation to determine its fitness for purpose. Research has been carried out on eight *N*-nitrosamines: *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosomorpholine (NMOR), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), *N*-nitrosopiperidine (NPIP), *N*-nitrosodiphenylamine (NDPhA) and *N*-nitrosodimethylamine (NDMA).

To determine the best choice of the mobile phase, isocratic elution was performed with acetonitrile, ethanol, and methanol as B phase, while A phase was MilliQ water for all three cases. Obtained results have shown that combination of acetonitrile and MilliQ water was the best choice of mobile phase for *N*-nitrosamines determination, and they were used in further research. More than few gradients were tested and ultimately as the best choice was proved gradient whose analysis time lasts 20 minutes with flow rate of 0,5 mL min⁻¹. Developed HPLC-DAD method was then validated whereby the following performance characteristics were tested: selectivity, linearity, repeatability, intermediate precision, trueness, detection limit, quantification limit, and the working range. The method was proved to be selective by analyzing tap water samples, which enables its application for the determination of *N*-nitrosamine in water. The method achieved good linearity ($R^2 \geq 0.995$) and also met the criteria for repeatability and intermediate precision ($RSD \leq 10\%$) for all *N*-nitrosamines. Satisfactory recovery was achieved at higher concentrations, while the acceptance criteria for all *N*-nitrosamines was not achieved at lower concentration level. Validation results confirmed applicability of the developed HPLC-DAD method for quantitative determine of all eight tested *N*-nitrosamines in water samples.

Keywords: *N*-nitrosamines, high-performance liquid chromatography, diode array detector, method validation

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>N</i> -nitrozamini	2
2.1.1. <i>N</i> -nitrozamini u vodi	3
2.1.2. Nastanak <i>N</i> -nitrozamina	5
2.1.3. Utjecaj <i>N</i> -nitrozamina na zdravlje i okoliš.....	8
2.1.4. Analitičke metode određivanja <i>N</i> -nitrozamina	10
2.1.5. Uklanjanje <i>N</i> -nitrozamina iz vode.....	11
2.1.6. Zakonska regulativa o kontroli <i>N</i> -nitrozamina.....	12
2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	14
2.2.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	16
2.2.2. Parametri kromatografske separacije	19
2.2.3. Detektori	22
2.3. Validacija analitičkih metoda	25
2.3.1. Izvedbene karakteristike metode	25
2.3.1.1. Selektivnost	25
2.3.1.2. Linearnost.....	26
2.3.1.3. Točnost	27
2.3.1.4. Preciznost	27
2.3.1.5. Istinitost	27
2.3.1.6. Granica detekcije i kvantifikacije.....	28
2.3.1.7. Radno područje	30
2.3.1.8. Robusnost	30
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	31
3.1. Materijali	31

3.1.1. Kemikalije	31
3.1.2. <i>N</i> -nitrozamini	31
3.1.3. Kromatografska kolona	33
3.2. Instrumenti	34
3.2.1. Sustav za pročišćavanje vode	34
3.2.2. Ultrazvučna kupelj	35
3.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom	36
3.3. Metode rada.....	37
3.3.2. Priprema standardnih otopina <i>N</i> -nitrozamina u MilliQ vodi za provjeru linearnosti HPLC-DAD metode	38
3.3.3. Priprema standardnih otopina <i>N</i> -nitrozamina za određivanje preciznosti.....	39
3.3.4. Priprema vodovodne vode.....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode za određivanje <i>N</i> -nitrozamina	40
4.2. Validacija HPLC-DAD metode za određivanje <i>N</i> -nitrozamina	50
4.2.1. Selektivnost	51
4.2.2. Linearnost.....	53
4.2.3. Ponovljivost.....	59
4.2.4. Međupreciznost	63
4.2.5. Istinitost.....	69
4.2.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije	71
4.2.7. Radno područje	73
4.3. Sažetak rezultata.....	74
5. ZAKLJUČAK	75
6. LITERATURA.....	76
7. ŽIVOTOPIS	81

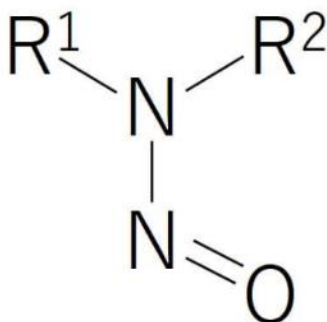
1. UVOD

Dezinfekcija vode jedan je od najvažnijih koraka pripreme vode za piće koji osigurava njezinu zdravstvenu ispravnost te suzbija rizik od štetnih mikrobioloških utjecaja na ljudsko zdravlje. Stoga je dezinfekcija vode za piće pomoću različitih oksidacijskih sredstava posebno stavljena u fokus posljednjih godina kako bi se maksimalno očuvalo ljudsko zdravlje i minimalizirao štetan utjecaj nusprodukata nastalih dezinfekcijom [1]. Pri samoj dezinfekciji dolazi do reakcije između sredstva za dezinfekciju i tvari prisutnih u vodi, pri čemu dolazi do nastanka nusprodukata koji prisutni u većoj količini mogu štetno utjecati na ljudsko zdravlje. Kloriranje je zbog svoje učinkovitosti i niske cijene jedna od najprimjenjivanijih metoda za dezinfekciju vode, no formiranje nusprodukata je ponajprije povezano upravo s tom metodom [2]. Nastali nusprodukti nerijetko pokazuju kancerogeno i mutageno djelovanje, stoga je došlo do intenzivnog razvoja novih metoda dezinfekcije vode koji uvelike umanjuju njihovo nastajanje. Kloraminacija je metoda dezinfekcije koja koristi kloramine koji bolje prodiru kroz biofilm od samoga klora, no korištenjem te metode dolazi do nastanka *N*-nitrozamina. *N*-nitrozamini su kancerogeni i reproduktivno toksični spojevi koji se aktiviraju u samom ljudskom organizmu, stoga je pri samoj dezinfekciji potrebno voditi strogu kontrolu o njihovoj prisutnosti i koncentraciji u vodi za piće [1, 3]. Kromatografija je jedna od mogućih tehnika za detektiranje i određivanje *N*-nitrozamina u vodi. Optimiranjem parametara prilikom razvoja kromatografske metode moguće je postići brzo i efikasno određivanje *N*-nitrozamina, a time i odrediti sigurnost pročišćene vode za piće te prisutnost štetnih tvari poput *N*-nitrozamina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *N*-nitrozamini

N-nitrozamini su organski kemijski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže nitrozo skupinu (NO^+) vezanu za deprotonirani amin (Slika 1.) [4].



Slika 1. Opća formula *N*-nitrozamina [5]

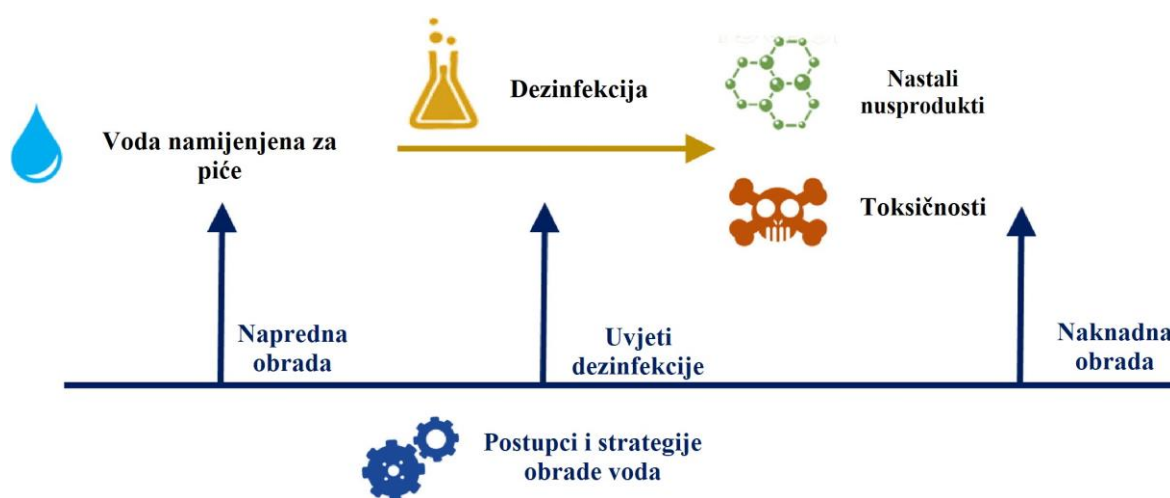
Prisutnost *N*-nitrozamina je raznolika, a moguće ih je pronaći u vodi, tlu i zraku. Prisutni su u vodama, različitim prehrambenim proizvodima, lijekovima, kozmetici, pesticidima te u stočnoj hrani, što posebno predstavlja zdravstveni rizik za ljude [4]. *N*-nitrozamini su klasificirani kao vrlo vjerojatno kancerogeni kemijski spojevi za ljudsko zdravlje, čemu u prilog ide to da su se pokazali kancerogeni prema svim životinjskim vrstama na kojima su testirani [6]. Mogućnost unošenja takvih spojeva u organizam predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik. Najčešći načini njihova unošenja u organizam su apsorpcija kroz kožu, ulazak u respiratorni sustav te kroz probavni trakt ljudi. Istraživanja su čak pokazala da do njihovog nastanka može doći *in vivo*, odnosno unutar samog organizma pri čemu dolazi do reakcije između prisutnih nitrita ili nitrata sa primarnim, sekundarnim ili tercijarnim aminima [4]. Većina *N*-nitrozamina posjeduju vrijednosti koeficijenta razdiobe ($\log K_{0/w}$) koje upućuju na njihovu veliku pokretljivost u okolišu, što predstavlja dodatni rizik za okoliš i izloženost ljudi takvim spojevima. Naime, velika pokretljivost *N*-nitrozamina uzrokuje migraciju te njihovu veću količinu u podzemnim vodama što za posljedicu uzrokuje i veću izloženost ljudi njihovom kancerogenom utjecaju [7].

2.1.1. N-nitrozamini u vodi

Dezinfekcija vode doživljava veliku primjenu početkom 20. stoljeća, čime se povećava kvaliteta pitke vode, ali i suzbija širenje raznih bolesti. Postupak dezinfekcije voda sastoji se od dodavanja odgovarajućeg dezinficijensa pri čemu se uklanjaju razni prisutni mikroorganizmi, a sam postupak predstavlja zadnji korak u provođenju kondicioniranja voda. Uklanjanje mikroorganizama (bakterije, virusi, paraziti...) iz površinskih i podzemnih voda neophodno je kako bi se suzbile infektivne bolesti koje oni mogu izazvati. Pri samoj pripremi vode za piće, ovisno o fizikalno-kemijskom sastavu, odabire se odgovarajući postupak pročišćavanja. Samo neke od najčešćih metoda obrade su:

- Koagulacija i flokulacija
- Filtracija
- Uklanjanje željeza i mangana
- Uklanjanje organskih tvari
- Dezinfekcija

Dezinfekcija vode (Slika 2.) je vrlo učinkovita metoda u obradi vode, no vrlo često rezultira stvaranjem različitih kemijskih nusprodukata koji mogu predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje. No iako stvoreni nusprodukti predstavljaju određeni rizik, veću opasnost ipak predstavljaju mikroorganizmi ako se ne uklone iz vode odgovarajućim procesom [8].



Slika 2. Shematski prikaz postupka dezinfekcije voda te procesi obrade s nastalim nusproduktima [9]

Početkom 21. stoljeća, uočeno je kako je završna dezinfekcija vode glavni izvor nastanka *N*-nitrozamina. Glavni postupak dezinfekcije koji uzrokuje njihov nastanak je kloraminacija, metoda koja se često koristi za obradu pitke vode, a za koju se donedavno smatralo da uzrokuje najmanju količinu nastalih nusprodukata (Slika 3.). Istraživanja su također pokazala kako kloriranjem podzemnih voda koje su kontaminirane amonijakom može doći do nastanka značajne količine *N*-nitrozamina u obrađenoj vodi. Reakcija kloraminacije koja uzrokuje nastanak *N*-nitrozamina je relativno spora, što znači da će s većom udaljenošću od postrojenja za obradu pitke vode do kućanstva koji konzumira tu vodu biti veća koncentracija *N*-nitrozamina u njoj. Prisutnost prekursora koji sadrže dušik tijekom procesa obrade voda, uzrokuju nastanak *N*-nitrozamina [10]. Prisutnost *N*-nitrozamina u pitkoj vodi ovisi o izvoru vode, ali i samom procesu njezine obrade. Tako je izvorna voda koja sadrži određene količine amonijaka, algi ili organskih prekursora (dimetilamin i trimetilamin) podložnija nastanku *N*-nitrozamina. Izbor sredstva za dezinfekciju je ključan korak, na način da se minimalizira nastanak toksičnih nusprodukata poput *N*-nitrozamina, a poveća se nastanak nusprodukata koji sadrže dušik te nisu toksični [11]. Pri provođenju procesa kloriranja, cilj je postići tzv. kritičnu točku kloriranja. U toj točki je količina klororganskih spojeva i kloramina minimalna, a zaostali slobodni klor se nalazi u obliku hipokloritne kiseline i hipokloritnog iona. Ukoliko nije postignuta kritična točka kloriranja, moguće je da tijekom raspada kloramina nastanu nitrozirajući spojevi koji pospješuju brz nastanak *N*-nitrozamina [7].



Slika 3. Shematski prikaz nastanka *N*-nitrozamina tijekom dezinfekcije vode [12]

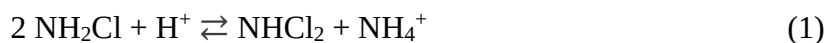
N-nitrozamini su polarni kemijski spojevi te su kao takvi dobro topljivi u vodi, što otežava njihovo uklanjanje. Također, njihova niska koncentracija u obrađenoj vodi koja je i dalje opasna za ljudsko zdravlje, predstavlja analitički problem tj. izazov u njihovom određivanju. Stoga se razvijaju nove osjetljive metode za njihovo određivanje poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti [13].

2.1.2. Nastanak *N*-nitrozamina

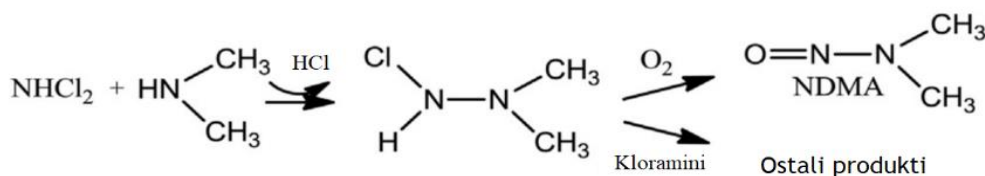
N-nitrozamini najviše nastaju tijekom procesa dezinfekcije vode primjenom kloramina, slobodnog klora, klorovog dioksida, ozona te UV zračenjem specifičnih efluenata [7]. Samo neki od nastalih *N*-nitrozamina s kojima se susrećemo su:

- *N*-nitrozomorfolin (NMOR)
- *N*-nitrozopirrolidin (NPYR)
- *N*-nitrozodietilamin (NDEA)
- *N*-nitrozodi-*n*-propilamin (NDPA)
- *N*-nitrozodi-*n*-butilamin (NDBA)
- *N*-nitrozopiperidin (NPIP)
- *N*-nitrozodimetilamin (NDMA)

Formiranje *N*-nitrozamina tijekom kloraminacije je dominantan mehanizam njihovog nastajanja. Istraživanje mehanizma reakcije nastajanja *N*-nitrozamina tijekom kloraminacije upućuje da dolazi do reakcije između monokloramina i organskih amina. Daljnjim istraživanjima došlo je do spoznaje da monokloramin ne djeluje kao dovoljno značajan prekursor te da se gotovo svaki nastanak *N*-nitrozamina može objasniti putem reakcija koje uključuju niske koncentracije dikloramina uz prisutnost monokloramina. U standardnim uvjetima obrade vode za piće, uobičajeno je monokloramin dominantna vrsta prisutnih kloramina, a dikloramin je prisutan u skladu s odgovarajućom ravnotežom:

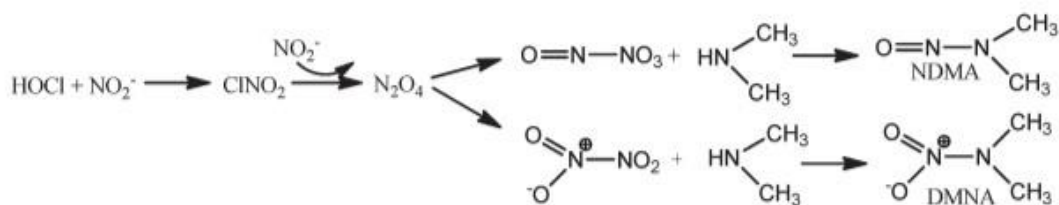


Reakcija nastanka *N*-nitrozamina (Slika 4.) odvija se tako da najprije dolazi do nukleofilnog napada sekundarnog deprotoniranog amina na dikloramin, pri čemu nastaje međuprodukt tj. klorirani nesimetrični dialkilhidrazin. Nastali međuprodukt se potom oksidira zbog prisutnosti otopljenog kisika pri čemu nastaje odgovarajući *N*-nitrozamin. Spomenuta se reakcija odvija sporo te zbog toga može uzrokovati akumulaciju nastalih spojeva u opskrbnom sustavu [14].



Slika 4. Nukleofilna supstitucija između dikloramina i sekundarnog amina te nastanak *N*-nitrozamina (NDMA) [14]

N-nitrozamini također nastaju i kao nusprodukti u procesima kloriranja voda koje sadrže nitrite. Njihov nastanak pripisuje se nastanku didušikova tetraoksida (N_2O_4). On posjeduje dva tautomerna oblika koji imaju sposobnost nitrirati ili nitrozirati amine (Slika 5.). Samu reakciju je moguće kontrolirati množinskim udjelom reaktanata tj. količinom slobodnog klora i nitrita. Odnosno, povećanjem omjera klora prema nitritu, reakcija je pomaknuta više prema nastajanju nitroamina u odnosu na *N*-nitrozamine te se na taj način može regulirati njihovo nastajanje [15].



Slika 5. Mehanizam nastajanja *N*-nitrozamina kloriranjem voda koje sadrže nitrite [15]

Tijekom ozoniranja voda također može doći do nastanka *N*-nitrozamina. Točnije, ozoniranjem određenih vrsta prekursora može doći do nastanka njihovih većih koncentracija. Neki od spojeva čije ozoniranje uzrokuje doprinos povećanju količine *N*-nitrozamina su inhibitori rasta biljaka (alar), polukarbazidna sredstva za sprječavanje žućenja polimera te klorirani nesimetrični dimetilhidrazin [15].

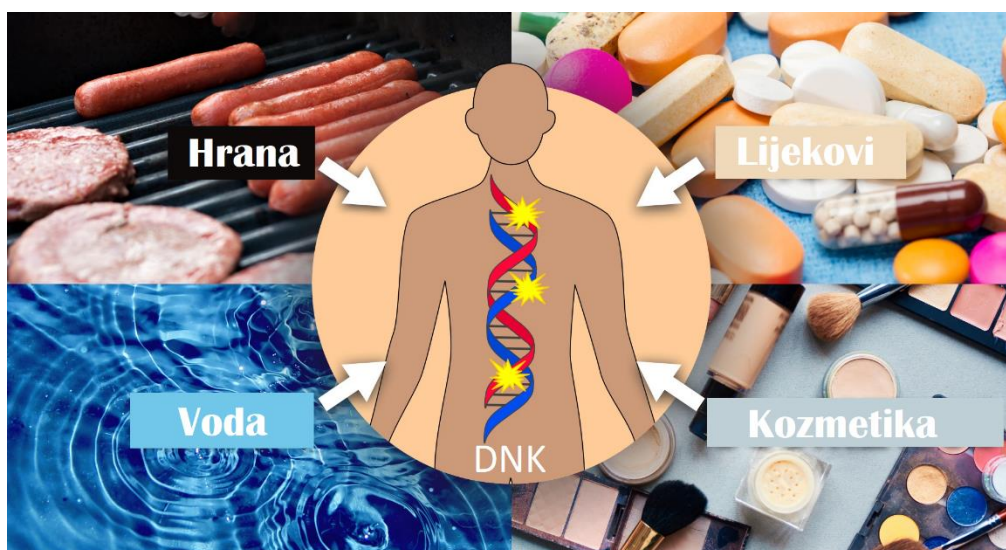
Za razliku od nastajanja *N*-nitrozamina kao nusprodukta dezinfekcije voda, podaci o njihovom stvaranju u okolišnim medijima nepotpuni su i ograničeni. Pronađeno je kako u malim količinama mogu nastati u tlu, vodi i zraku kao rezultat kemijskih, fotokemijskih i bioloških procesa. Biološki procesi uključuju reakcije sekundarnih ili tercijarnih amina s nitritima koji u okolišu nastaju mikrobiološkim djelovanjem iz amonijaka ili nitrata. Jedan od najznačajnijih predstavnika *N*-nitrozamina, NDMA, može nastati i u organizmu ljudi endogenim putem u želucu, pri čemu dolazi do reakcije između nitrata i nitrita s aminima. Također, jedan od načina njihovog nastanka u okolišu je reakcijom primarnih, sekundarnih ili tercijarnih amina s nitritima u kiselom mediju [7]. Veliki utjecaj na nastanak *N*-nitrozamina u vodi, osim bioloških faktora poput prisutnosti bioloških organizama, ima i okoliš te ljudske aktivnosti i industrija koja svojim djelovanjem može utjecati na kemijski sastav površinskih i podzemnih voda koje se koriste za piće (Slika 6.) [16].



Slika 6. Shematski prikaz izvora *N*-nitrozamina i prekursora za njihovo nastajanje [16]

2.1.3. Utjecaj *N*-nitrozamina na zdravlje i okoliš

N-nitrozamini su kemijski spojevi koji su klasificirani kao vrlo vjerojatno kancerogeni za ljude, što je utvrđeno na temelju mnogih studija provedenih na životinjama [17]. Posljednjih godina *N*-nitrozamini su privukli povećanu pozornost nakon što je otkriveno da nekoliko popularnih lijekova sadrži njihove neprihvatljive razine, što je rezultiralo njihovim povlačenjem iz uporabe [18]. EU regulatori su prvi put postali svjesni prisutnosti *N*-nitrozamina u lijekovima sredinom 2018. kada su nečistoće *N*-nitrozamina, točnije NDMA, otkrivene u lijekovima za snižavanje krvnog tlaka poznatijima i kao "sartani" [17]. Njihova prisutnost je također uočena u različitim vrstama namirnica kao što su suhomesnati proizvodi, prerađena riba, kakao, pivo i druga alkoholna pića. No ipak najvažnija skupina hrane koja doprinosi njihovoj izloženosti su meso i mesni proizvodi [19]. Iako su nađeni u mnogim različitim proizvodima (Slika 7.), njihova najveća opasnost je upravo u pitkoj vodi koja prolazi procese dezinfekcije, pri čemu kloriranje i kloraminacija uzrokuju njihov najveći nastanak [20].



Slika 7. Prikaz prisutnosti *N*-nitrozamina u različitim proizvodima [20]

Da bi do izražaja došla njihova kancerogena svojstva, *N*-nitrozamini moraju dospjeti u organizam. Elektrofili spojevi nastali jednostavnim reakcijama u metabolizmu, općenito su katalizirani i aktivirani enzimima prisutnim u organizmu te lako alkiliraju DNK čime započinje njihovo kancerogeno djelovanje [20]. Alkiliranje DNK djelovanjem *N*-nitrozamina, rezultira modifikacijom nizom dušičnih baza što uzrokuje inicijaciju kancerogenog djelovanja.

Istraživanja na kulturama ljudskih tkiva (bronhi, jednjak, mokraćni mjehur, debelo crijevo i gušterača) su pokazala da mogu lako metabolizirati jednostavne simetrične *N*-nitrozamine poput NDMA i NDEA. Dok s druge strane takva tkiva ne mogu lako metabolizirati cikličke i asimetrične *N*-nitrozamine [21].

Velika pokretljivost *N*-nitrozamina, osim njihovog kancerogenog i mutagenog djelovanja kod ljudi, čini ih velikim problemom za okoliš (Slika 8.). Naime, takvo njihovo ponašanje uzrokuje njihovu veću prisutnost u okolišu, a posebice u podzemnim i površinskim voda što ih čini još rasprostranjenijima. Podzemni vodonosnici koji se koriste za vodu za piće direktno izlažu ljudsku populaciju njihovom riziku, dok njihova prisutnost u raznim površinskim vodama utječe na životinjski i biljni svijet pri čemu oni konzumiraju takve onečišćene vode i na taj način ponovno indirektno izlažu ljude njihovoj opasnosti [7].



Slika 8. Kruženje *N*-nitrozamina u okolišu [22]

2.1.4. Analitičke metode određivanja *N*-nitrozamina

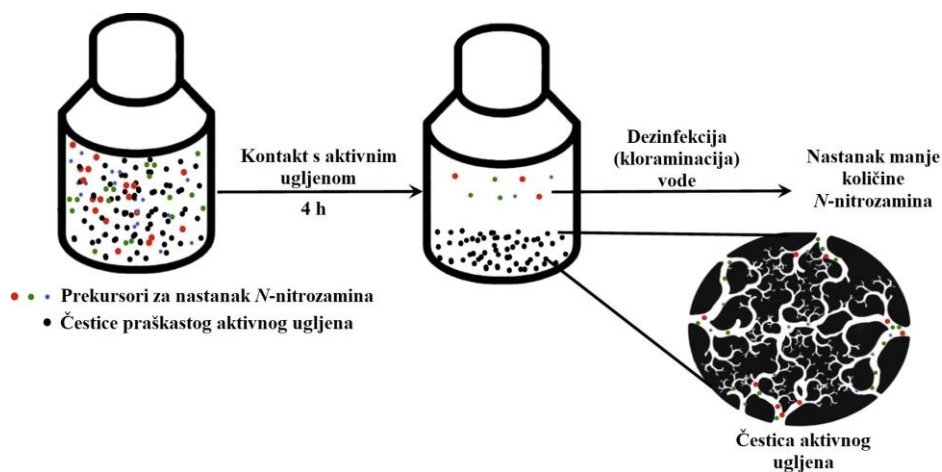
U svrhu određivanja i detekcije *N*-nitrozamina razvijene su mnoge metode, a samo neke od njih su plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) u kombinaciji s detektorom za analizu toplinske energije (engl. *thermal energy analysis*, TEA) ili plameno ionizacijskim detektorom (engl. *flame ionization detector*, FID), micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic capillary chromatography*, MECC), elektrokemijske metode i mnoge druge [23]. Za pripremu uzoraka koji se podvrgavaju različitim metodama njihova određivanja najčešće se provode: ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase extraction*, SPE), ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE), mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase microextraction*, SPME) te ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE). Za uzorke koji se nalaze u biološkim maticama, najčešće se provode SPE i LLE [23]. Za određivanje *N*-nitrozamina se analitičke metode mogu podijeliti na one koje služe za određivanje hlapljivih *N*-nitrozamina i za određivanje nehlapljivih *N*-nitrozamina. Određivanje hlapljivih *N*-nitrozamina često se provodi pomoću plinske kromatografije na kolonama s različitim punjenjem ili kapilarnim kolonama. Njihova visoka hlapljivost rezultira kratkim vremenima zadržavanja, a za postizanje visoke osjetljivosti koriste se umjereno polarne nepokretne faze. Kolona plinske kromatografije može se koristiti u kombinaciji s detektorom za analizu toplinske energije, ali i spektrometrom masa (engl. *mass spectrometry*, MS) pri čemu tada problem mogu predstavljati hlapljive tvari niže molarne mase poput NDMA, jer se dobivaju loši spektri masa zbog malenih iona koji su podložni interferenciji s drugim spojevima. Stoga se hlapljivi *N*-nitrozamini određuju i kvantificiraju metodom unutarnjeg standarda kako bi se korigirali eventualni gubitci tijekom analize. Koristeći kombinaciju plinske kromatografije s detektorom za analizu toplinske energije (GC-TEA) te ekstrakciju čvrstom fazom, granica detekcije *N*-nitrozamina za čvrste uzorke (npr. meso) iznosi oko 0,1 mg kg⁻¹ [24]. Za određivanje nehlapljivih *N*-nitrozamina, koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Za razliku od određivanja hlapljivih spojeva, povezivanje HPLC sustava s TEA detektorom prilično je teško ostvariti iz razloga što otapalo isparava u velikom volumenu u TEA pirolizatoru, a nastali plin se mora ukloniti kako bi se održao vakuum u reakcijskoj komori. Također, nehlapljivi *N*-nitrozamini se mogu prikupiti iz eluensa koji se nalazi u HPLC koloni te se mogu denitrozirati bromovodičnom kiselinom kako bi nastali sekundarni amini koji se nakon pretvorbe u derivate dansila mogu odrediti pomoću fluorescencijskog detektora (engl. *fluorescence detector*, FD). Kod korištenja ovakve tehnike,

mjerenje se provodi prije i poslije denitrozacije te se sadržaj nehlapljivih *N*-nitrozamina određuje iz dobivene razlike. Iako su metode određivanja nehlapljivih *N*-nitrozamina uspješno razvijene, posljednjih godina ipak dolazi do pada interesa za njihovo daljnje istraživanje iz razloga što se većina nehlapljivih *N*-nitrozamina pokazala manje kancerogenima za ljude [24].

2.1.5. Uklanjanje *N*-nitrozamina iz vode

Uklanjanje *N*-nitrozamina iz vode za piće moguće je postići postupcima poput adsorpcije i preoksidacije. Kako većina *N*-nitrozamina nastaje tijekom dezinfekcije vode, uklanjanje prekursora za njihovo nastajanje prije samog provođenja procesa dezinfekcije jedan je od najučinkovitijih postupaka za sprječavanje njihovog nastajanja. Neki od najpoznatijih prekursora za nastajanje *N*-nitrozamina su sekundarni amini poput dimetilamina (DMA) i dietilamina (DEA) koji mogu nastati tijekom biorazgradnje proteina, aminokiselina i ostalih bioloških tvari koje sadrže dušik. Preoksidacija je također jedan od dobrih postupaka za uklanjanje prekursora za nastanak *N*-nitrozamina. Korištenjem oksidacijskih sredstava poput ozona, permanganata i vodikova peroksida, dolazi do uklanjanja prekursora prije samog provođenja kloraminacije. Iako su istraživanja pokazala kako ovakva vrsta predobrade vode smanjuje konačnu količinu *N*-nitrozamina u vodi, moguć je nastanak drugih nusprodukata koji također imaju loše djelovanje na ljudsko zdravlje ukoliko se unesu u organizam. Adsorpcija je još jedan postupak koji se može primijeniti za uklanjanje prekursora za nastanak *N*-nitrozamina. Dokazano je kako aktivni ugljen u prahu i granulirani aktivni ugljen mogu značajno smanjiti količinu nastalih *N*-nitrozamina uklanjanjem njihovih prekursora (Slika 9.). Zeoliti se odnedavno sve više koriste kao adsorbensi zbog svojeg povoljnog utjecaja na okoliš. Istraživanja su pokazala da zbog svoje strukture zeoliti pod određenim uvjetima uspješno mogu adsorbirati preko 90 % odabranih *N*-nitrozamina, dok s druge strane nije otkriveno kako imaju mogućnost adsorbirati amine koji djeluju kao prekursori za njihovo nastajanje [25]. Korištenje membrana za reverznu osmozu također se pokazalo kao korisna metoda u svrhu uklanjanja *N*-nitrozamina, s obzirom da pokazuju i visoku učinkovitost u uklanjanju raznih organskih tvari. *N*-nitrozamini također pokazuju lako prodiranje kroz membrane. S obzirom da su hidrofilni i da se najčešće javljaju u neioniziranom obliku, njihovo uklanjanje kroz membrane uvjetovano je ponajviše njihovim steričkim preprekama. Ispitivanjima je također dokazano da porastom molarne mase *N*-nitrozamina dolazi do njihovog boljeg uklanjanja. Nadalje, nađeno je kako

porastom temperature vode dolazi do njihovog lošijeg uklanjanja, ali i da dolazi do neznatno lošijeg uklanjanja pri smanjenju pH-vrijednosti vode kao i porasta njezine ionske jakosti [26].



Slika 9. Adsorpcija prekursora za nastajanje *N*-nitrozamina na praškastom aktivnom ugljenu [27]

2.1.6. Zakonska regulativa o kontroli *N*-nitrozamina

Zbog zdravstvenog rizika, potrebno je provoditi određivanje količine *N*-nitrozamina u vodi za piće nakon procesa dezinfekcije te regulatornim smjernicama regulirati njihovu prisutnost. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) dala je preporuke za prihvatljivi dnevni unos *N*-nitrozamina (NDMA, NDEA, NMBA, NMPA, NIPEA i NDIPA) kroz korištenje lijekova. Kada govorimo o prihvatljivom dnevnom unosu *N*-nitrozamina, govorimo o pragu toksikološke zabrinutosti da je prisutna nečistoća povezana s rizikom od kancerogenih i mutagenih učinaka. Tablica 1. prikazuje definirane prihvatljive vrijednosti dnevnog unosa najčešćih *N*-nitrozamina [28].

Tablica 1. Granične vrijednosti prihvatljivog dnevnog unosa najčešćih *N*-nitrozamina [28]

<i>N</i> -nitrozamin	Granične vrijednosti prihvatljivog dnevnog (ng/dan)
NDMA	96,0
NDEA	26,5
NMBA	96,0
NMPA	26,5
NIPEA	26,5
NDIPA	26,5

Ograničenje prihvatljivog unosa predstavlja dnevnu izloženost spoju, kao što su *N*-nitrozamini, koji procjenjuje rizik od raka 1:100 000 nakon 70 godina izloženosti spoju. Važno je napomenuti kako ova ograničenja vrijede samo ako je prisutan samo jedan *N*-nitrozamin [28].

Također, 2016. je američka agencija za zaštitu okoliša (engl. *U.S. Environmental Protection Agency*, US EPA) prateći smjernice za određivanje rizika za razvoj karcinoma procijenila maksimalno dopustive koncentracije *N*-nitrozamina u vodi za piće koje iznose: NDBA (30 ng L⁻¹), NDEA (0,4 ng L⁻¹), NDMA (0,6 ng L⁻¹), NDPA (7 ng L⁻¹), NMEA (3 ng L⁻¹), NPYR (2 ng L⁻¹). U propisima Europske unije, također se regulira njihova prisutnost u kozmetičkim proizvodima (Uredba (EZ) br. 1223/2009), igračkama i balonima (Direktiva 2009/48/EZ) te gumenim varalicama za pećanje (Direktiva Komisije 93/11/EEZ), dok njihova regulacija nije posebno navedena u Direktivi o vodama (Direktiva Vijeća 98/93/EZ). Ipak, Njemačka je jedna od država koja je postavila kontrolne granice za neke *N*-nitrozamine. Središnje njemačko tijelo za zaštitu okoliša UBA (engl. *German Federal Environmental Agency*, UBA) daje preporuku kako koncentracija NDMA u vodi za piće ne smije preći 10 ng L⁻¹. U Republici Hrvatskoj ne postoji regulativa kojom su definirane maksimalno dozvoljene vrijednosti koncentracija *N*-nitrozamina u vodi te se ne provodi njihov nadzor ni kontrola u vodi za piće [7].

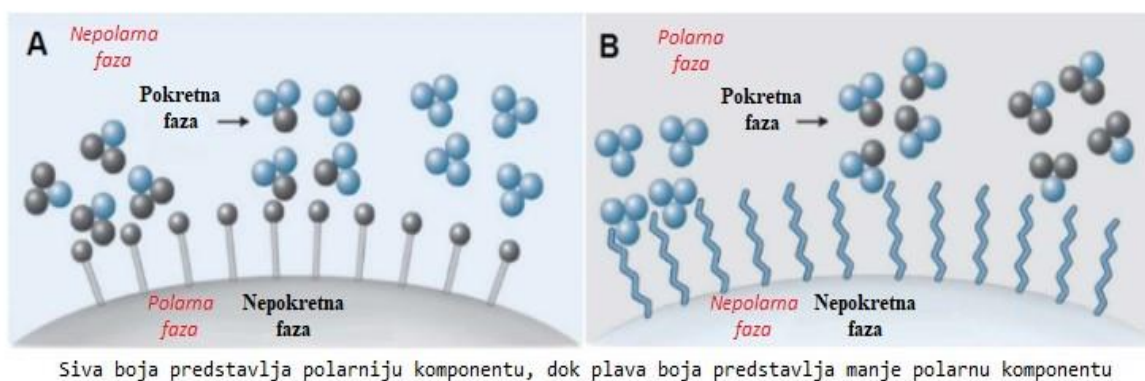
2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) je analitička tehnika razvijena krajem 1960-ih te početkom 1970-ih godina. Danas je vrlo raširena i korištena tehnika u farmaceutskoj, prehrambenoj, biotehnološkoj i polimernoj industriji, ali se koristi i u kemiji okoliša za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih kemijskih spojeva [29, 30]. Najveća prednost tekućinske nad plinskom kromatografijom je što je moguća analiza nehlapljivih analita te makromolekularnih spojeva. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se zbog svoje pouzdanosti te mogućnosti prilagođavanja sustava različitom sastavu pokretne i nepokretne faze pokazala kao kvalitetna i pouzdana tehnika. Tekuća pokretna faza kreće se u određenom smjeru. S druge strane nepokretna faza je tvar fiksirana u stupcu (koloni) pri čemu se na njezinoj površini određeno vrijeme zadržavaju spojevi tj. analiti koji se razdvajaju uslijed različitog afiniteta prema nepokretnoj i pokretnoj fazi. Waters je 1967. razvio prvi komercijalni HPLC uređaj, nazvan ALC-100 (Slika 10.). Taj je uređaj zamišljen kao analitički instrument koji se može koristiti za različite namjene te je zbog pumpe imao mogućnost raditi pri višim tlakovima [31].



Slika 10. Prvi komercijalni HPLC uređaj ALC-100 [31]

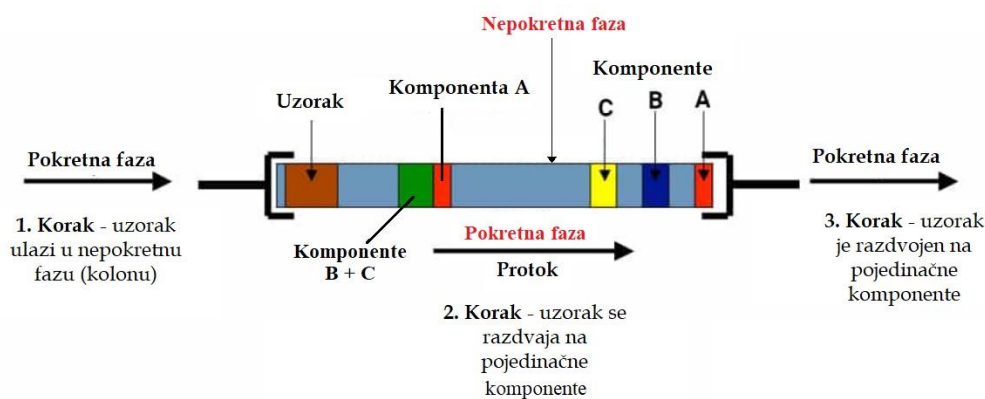
Ovisno o relativnoj polarnosti pokretne i nepokretne faze razlikujemo kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza (Slika 11.). Kromatografija normalnih faza koristi polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu pri čemu polarni analit dolazi u interakciju te se zadržava na polarnoj nepokretnoj fazi. Jačina adsorpcije se pojačava porastom polarnosti analita, a interakcije između analita i nepokretne faze zbog njihove polarne prirode povećavaju vrijeme zadržavanja. S druge strane, kromatografija obrnutih faza, koja je najčešća vrsta HPLC-a, koristi nepolarnu nepokretnu fazu i relativno polarnu pokretnu fazu. Kromatografija obrnutih faza temelji se na hidrofobnim interakcijama koje su rezultat odbijanja polarnog eluenta, relativno nepolarnog analita i nepolarne nepokretne faze. Adsorpcija analita na nepokretnu fazu proporcionalna je kontaktnoj površini nepolarnog djela molekule analita nakon interakcija u eluentu [30].



Slika 11. Shematski prikaz kromatografije normalnih faza (lijevo, A) i kromatografije obrnutih faza (desno, B) [32]

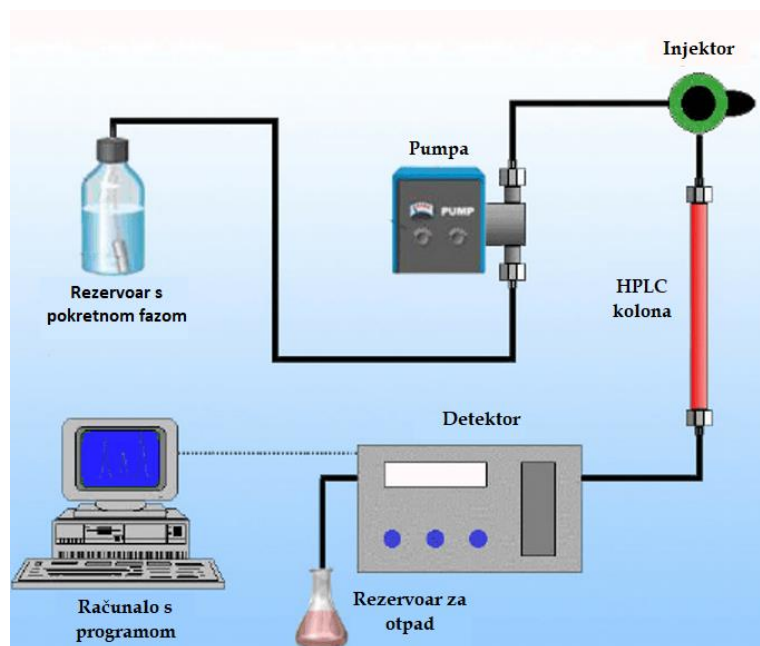
2.2.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti provodi se injektiranjem malenog volumena uzorka u tok pokretne faze koja prolazi kroz stupac (kolonu) napunjenu česticama nepokretne faze. Postupak separacija ispitivane smjese na njezine sastavnice temelji se na različitim vremenima zadržavanja svake komponente na koloni (Slika 12.). Vrijednost vremena koliko će se neka sastavnica zadržati na koloni određuje se njezinom raspodjelom između pokretne i nepokretne faze, dok raspodjela ovisi o međusobnim interakcijama između analita, pokretne i nepokretne faze. Stoga, budući da različite komponente imaju različitu pokretljivost, one će iz kolone izaći u različitom vremenu tj. imat će različito vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*, t_R) [29].



Slika 12. Shematski prikaz razdvajanja ispitivanog uzorka na sastavnice u HPLC koloni [33]

Glavni dijelovi HPLC instrumentacije su: rezervoar s pokretnom fazom, pumpa, injektor, kromatografska kolona, detektor te računalo s odgovarajućim softverom (Slika 13.) [34].



Slika 13. Glavne komponente HPLC instrumentacije [35]

Rezervoar s pokretnom fazom služi primarno za skladištenje pokretne faze pri provođenju analize. Ukoliko se koriste viskozija otapala potrebno je primijeniti veći tlak na sustav kako bi se postigao željeni protok, no takva otapala općenito zahtijevaju više vremena kako bi prošla kroz kolonu. Viskozna otapala također uzrokuju širenje pikova te se zbog toga izbjegavaju koristiti kao pokretna faza [34].

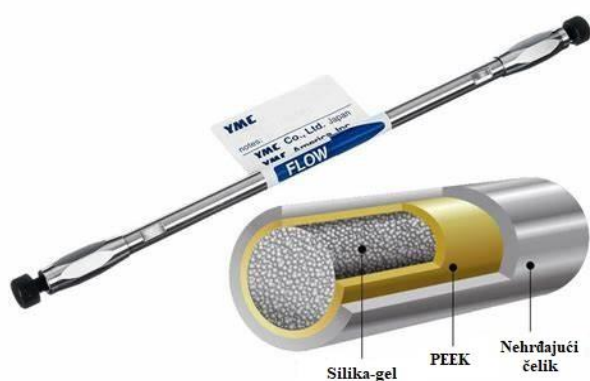
Pumpa ima ulogu provoditi pokretnu fazu kroz sustav HPLC-a pri određenoj vrijednosti protoka koji se najčešće iskazuje u jedinici mililitar u minuti (mL min^{-1}). Pumpa može pokretnu fazu provoditi kroz sustav pri konstantnom sastavu (izokratno) ili ga može mijenjati tijekom provođenja analize (gradijentno) [34].

Injektor služi za injektiranje tj. unošenje kapljevito uzorka u protok pokretne faze, a potom u HPLC sustav. Najčešće injektirani volumen ispitivanog uzorka iznosi između 5 i 20 mikrolitara [34].

HPLC kolona poznata je kao i srce kromatografskog sustava. Duljina kolone je najčešće između 5 i 30 centimetara, dok je njezin promjer između 2 i 50 milimetara (Slika 14.). Najčešće se izrađuju od nehrđajućeg čelika dok se unutar nje nalazi nepokretna faza. Pokretna faza iz rezvoara pod djelovanjem pumpe prolazi kroz kolonu pri čemu se sastojci uzorka raspodjeljuju između pokretne i nepokretne faze i dolaze do detektora u različitim vremenima [34].

Detektor ima ulogu detektirati analit i određene prisutne vrste molekula koje nakon interakcija s nepokretnom fazom dolaze do njega. Dolaskom do detektora, molekule izazivaju signal koji se detektira, a potom na računalu nastaje pripradni kromatogram koji je zaslužan za dobivanje kvantitativnih i kvalitativnih informacija o ispitivanom uzorku [34].

Računalo služi za obradu signala iz detektora i prikaz pripadajućeg kromatograma. Daje vrijednosti vremena zadržavanja pojedinih komponenata (kvalitativna analiza), ali i vrijednosti površina ispod krivulje (kvantitativna analiza) [34].



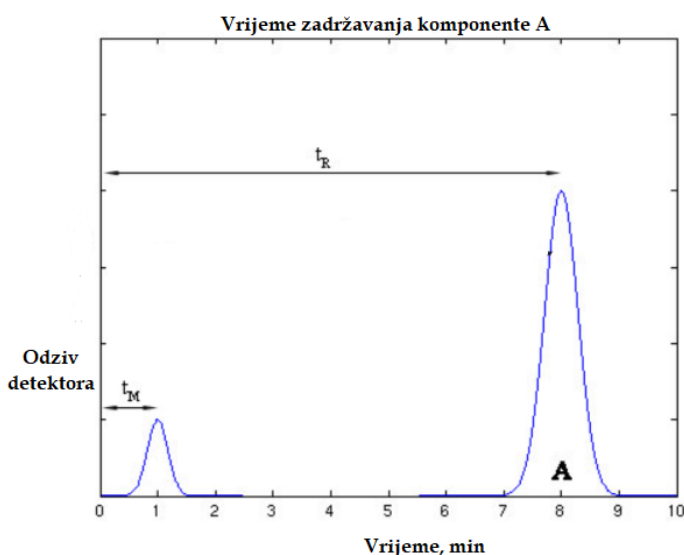
Slika 14. Prikaz HPLC kolone i njezine unutrašnjosti [36]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) u pravilu funkcionira isto kao i tekućinska kromatografija (LC), no njezine su prednosti brzina, efikasnost, osjetljivost te jednostavnost rada. Iako HPLC ima veće značenje za analitičku kemiju, tekućinska kromatografija i dalje ima mnoge različite primjene za preparativne svrhe [29].

2.2.2. Parametri kromatografske separacije

Tijekom provođenja analize, molekule uzorka prolaze kroz kromatografsku kolonu te određeno vrijeme provode u pokretnoj i na nepokretnoj fazi. Svaka molekula se u pokretnoj fazi zadrži jednako dugo, a tu pojavu nazivamo zadržano vrijeme, t_m . To vrijeme predstavlja vremenski period od trenutka injektiranja tvari koja se ne adsorbira na nepokretnu fazu pa do njezine detekcije. S druge strane, vrijeme zadržavanja uzorka (t_R) predstavlja vrijeme od trenutka unošenja uzorka u kolonu pa sve do detekcije svake komponente na izlasku iz kolone. Prilagođeno vrijeme zadržavanja (t_R'') predstavlja vrijeme koje svaka otopljena komponenta provede vezana za nepokretnu fazu (Slika 15.) [37].

$$t_R = t_m + t_R'' \quad (2)$$



Slika 15. Prikaz vremena zadržavanja uzorka i zadržanog vremena [38]

Djelotvornost kromatografske kolone

Djelotvornost kromatografske kolone upotrebljava se kada želimo usporediti učinkovitost različitih kolona. To je jedan od najčešće korištenih parametara kada želimo govoriti o djelotvornosti kolone te se izražava kao broj teorijskih odsječaka, N .

$$N = 16 \cdot \frac{t_R}{w_t} \quad (3)$$

gdje je N broj teorijskih odsječaka, t_R vrijeme zadržavanja komponente, a w_t širina pika na baznoj liniji.

Kolone koje posjeduju veće vrijednosti broja teorijskih odsječaka su djelotvornije. Također, kolone s većim vrijednostima broja teorijskih odsječaka imati će uže pikove pri određenom vremenu zadržavanja od kolona koje posjeduju manje vrijednosti broja teorijskih odsječaka. Visoka djelotvornost kromatografske kolone je posebno korisna zbog toga što se tada zahtjeva manja selektivnost [39].

Razlučivanje

Razlučivanje (R_s) je mjera mogućnosti odjeljivanja maksimuma dva različita pika u kromatogramu koja posjeduju različita vremena zadržavanja (Slika 16.). Veća R_s -vrijednost omogućuje bolje razdvajanje dvaju pikova na baznoj liniji.

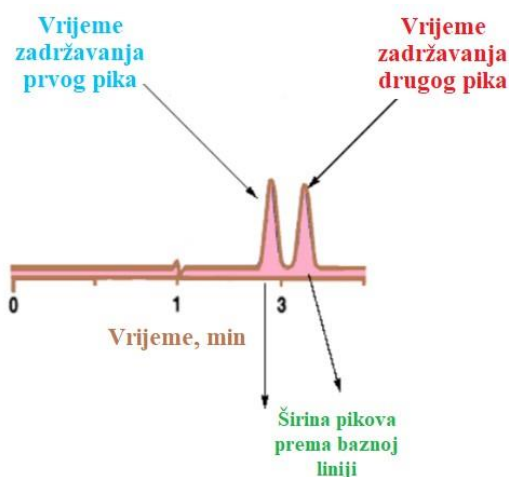
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (4)$$

gdje je R_s parametar razlučivanja, t_R vrijeme zadržavanja komponenti 1 i 2, a w širina pikova 1 i 2 na baznoj liniji.

R_s -vrijednost također uzima u obzir učinkovitost, selektivnost i vrijeme zadržavanja. Stoga poboljšanjem jednog od tih parametara dolazi do povećanja razlučivanja.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{(k + 1)} \quad (5)$$

gdje je N broj teorijskih odsječaka, α koeficijent selektivnosti te k faktor zadržavanja [39].



Slika 16. Prikaz parametra razlučivanja na kromatogramu [39]

Koeficijent selektivnosti

Koeficijent selektivnosti (α) predstavlja mjeru razlike vremena ili udaljenost između maksimuma dva različita pika. Također predstavlja omjer dvaju koeficijenata razdiobe za dvije komponente što predstavlja sposobnost odjeljivanja komponenti na koloni ($\alpha > 1$). Ukoliko je $\alpha = 1$, dva pika imaju isto vrijeme zadržavanja [39].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

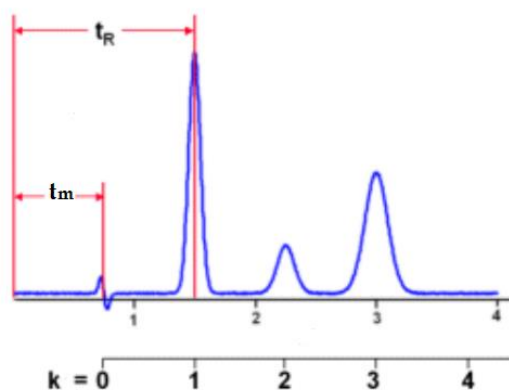
gdje je α koeficijenti selektivnost, a k faktor zadržavanja komponenti 1 i 2.

Faktor zadržavanja

Faktor zadržavanja (k) govori o vremenu koje komponenta uzorka provede na nepokretnoj fazi relativno prema vremenu koje provede u pokretnoj fazi (Slika 17.). Određuje se iz vremena zadržavanja komponente podijeljenog sa zadržanim vremenom [39].

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (7)$$

gdje je k koeficijent zadržavanja, t_R vrijeme zadržavanja komponente i t_M zadržano vrijeme.



Slika 17. Prikaz koeficijenta zadržavanja na kromatogramu [39]

2.2.3. Detektori

Detektor je dio HPLC sustava koji se nalazi neposredno iza kolone i ima ulogu detektirati sastojke ispitivanog uzorka koji izlazi iz kolone. Koncentracija pojedine komponente uzorka je proporcionalna elektroničkom signalu koji se dobiva nakon separacije u koloni [40].

Korišteni detektor treba zadovoljiti karakteristike:

- Poželjno je da daje odziv za svaku komponentu u smjesi
- Poželjno je da postoji linearna ovisnost signala o koncentraciji analita
- Odziv ne smije varirati promjenom temperature
- Mora djelovati neovisno o sastavu pokretne faze
- Poželjno je da ima sposobnost detekcije niskih koncentracija analita
- Signal mora biti stabilan i ponovljiv
- Ne smije destruktivno djelovati na analit

Detektori se dijele na dvije vrste: detektori za skupna svojstva (mjere promjene fizikalnih veličina) i detektori za specifična svojstva (mjere pojedinačna svojstva) [40].

Neki od najčešćih detektora su:

Detektor električne vodljivosti

Detektor električne vodljivosti (engl. *electrical conductivity detector*, ECD) daje odziv za svaku vrstu iona (analit i pokretnu fazu). Ova vrsta detektora mjeri vodljivost pokretne faze uz ispitivani uzorak za koji je potrebno napraviti određena podešavanja kako bi se mogao odrediti. U konačnici se dobiva vrijednost električnog otpora koji je kao rezultat direktno proporcionalan koncentraciji iona analita u uzorku [40].

Elektrokemijski detektor

Elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*, ED) mjeri struju koja je povezana s oksidacijom ili redukcijom analiziranih tvari. Njihovo djelovanje je zapravo kao amperometar ili kulometar. Prikladnost ovih detektora ovisi o volumetrijskim karakteristikama otopljenih molekula u vodenoj ili organskoj pokretnoj fazi. Detektori su osjetljivi na promjene u protoku i sastavu pokretne faze te ja za njihovu izvedbu potrebna radna elektroda, referentna elektroda i pomoćna elektroda [40].

UV/Vis detektor

UV/Vis detektor je jedan od najčešće korištenih detektora zbog toga što vrlo veliki broj spojeva može apsorbirati ultraljubičasto i vidljivo zračenje. Ispitivani uzorci daju specifične odzive koji odgovaraju određenim vrstama spojeva koji ovisno o svojim funkcionalnim skupinama i strukturi apsorbiraju zračenje. Detektori funkcioniraju tako da prolaskom upadnog elektromagnetskog zračenja kroz ćeliju detektora, dolazi do promjene intenziteta zračenja upadne zrake nakon interakcije s uzorkom [40].

Spektrometar masa

Detekcija primjenom spektrometra masa (engl. *mass spectrometer*, MS) temelji se na fragmentaciji molekula ispitivanog spoja pod utjecajem električnog polja, dok se sama separacija odvija zbog različitog omjera mase i naboja fragmentiranih molekula. Spektrometar masa karakterizira visoka selektivnosti i mogućnost detekcije niskih koncentracija (niske vrijednosti granice detekcije te granice kvantifikacije). Za primjenu takvih detektora je analit potrebno pretvoriti u ionski oblik [40].

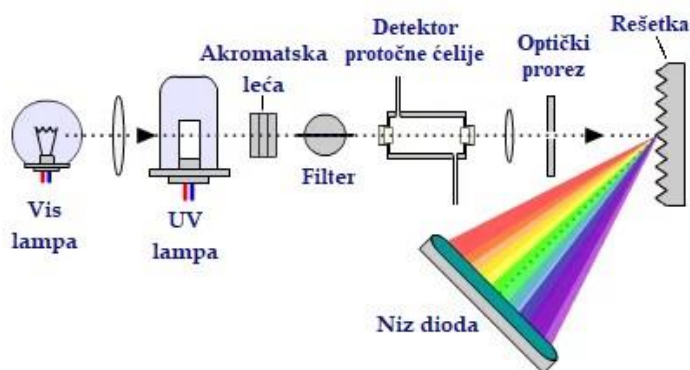
Fluorescencijski detektor

Fluorescencijski detektor (engl. *fluorescence detector*, FD) je od svih najselektivniji i najosjetljiviji detektor. Pri njegovom radu se na određenim valnim duljinama pobuđuju atomi analita koji potom emitiraju zračenje koje se detektira. Fluorescencijski detektor je 10 do 1000 puta osjetljiviji od UV detektora te je s njim moguće analizirati i uzorke koji dobro ne

apsorbiraju fluorescentno zračenje tako što se derivatiziraju fluorescentnim spojevima poput dansil klorida. Također, jedna od prednosti ovog detektora je njegova stabilnost [40].

Detektor s nizom dioda

Detektor s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) djeluje tako da se uzorak podvrgne djelovanju zračenja svih valnih duljina koje proizvodi lampa. Svjetlost se iz izvora zračenja usmjeruje kroz akromatsku leću pri čemu sva svjetlost prolazi kroz detektor i pada na holografsku rešetku, a potom na niz dioda (Slika 18.). Kromatogram se može dobiti korištenjem različitih valnih duljina pri čemu svaka valna duljina na kraju ciklusa pada na zasebnu diodu. Prednost DAD je ta što je moguće vidjeti odziv detektora za analit pri različitim valnim duljinama u samo jednom ciklusu što uvelike štedi vrijeme, energiju i uređaj [40].



Slika 18. Shematski prikaz DAD detektora [41]

2.3. Validacija analitičkih metoda

Kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka, potrebno je provesti validaciju same analitičke metode. Validacija se provodi kako bi dokazali da je neka analitička metoda zaista prikladna za određenu namjenu. Također, validacija analitičaru omogućuje razumijevanje ponašanja metode, da odredi njezina ograničenja i utvrdi zadovoljava li postavljene kriterije same izvedbe metode [42, 43].

Struka, regulativa i zakonodavstvo prihvaćaju osam osnovnih parametara, takozvanih izvedbenih karakteristika metode:

- *selektivnost / specifičnost*
- *linearnost*
- *radno područje*
- *preciznost (ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost)*
- *istinitost*
- *granica detekcije*
- *granica kvantifikacije*
- *robusnost (otpornost)*

Kombinacijom svih tih parametara određuje se plan za validaciju neke metode [42].

2.3.1. Izvedbene karakteristike metode

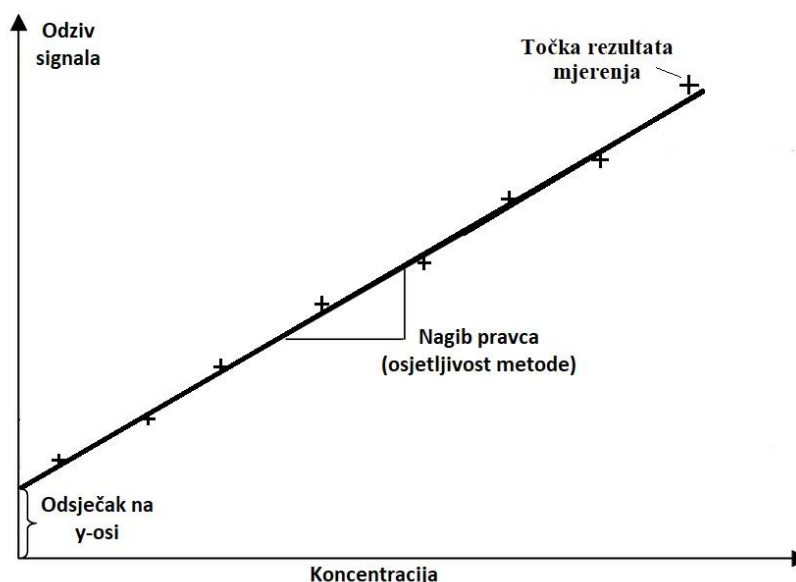
2.3.1.1. Selektivnost

Selektivnost je svojstvo analitičke metode da detektira željeni analit u prisutnosti drugih komponenata unutar matice uzorka pri određenim uvjetima ispitivanja. Važno je razlikovati pojmove specifičnosti i selektivnosti. *Specifičnost* je svojstvo metode da se odredi isključivo jedan određeni analit, dok s druge strane *selektivnost* pruža istodobno određivanje više komponenata uz uvjet da one međusobno ne interferiraju. Selektivnost je primaran i nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda. Određivanje selektivnosti se provodi usporedbom odziva metode na referentni uzorak, slijepi uzorak i analit u uzorku. U

kromatografiji, osim usporedbe kromatograma referentnog uzorka, slijepog uzorka i uzorka, dokumentiraju se i parametri o razdvojenosti i simetriji pikova [42].

2.3.1.2. Linearnost

Linearnost se definira kao svojstvo metode da unutar određenog područja daje vrijednosti tj. rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (Slika 19.). Linearnost se obično određuje mjerenjem odziva instrumenta za različite poznate koncentracije referentnog uzorka, pri čemu je preporuka koristiti najmanje pet različitih koncentracija uz ponavljanje od tri puta. Linearnost se može odrediti matematički (računski) ili grafički. Matematičko određivanje uključuje primjenu linearne regresije za dobivanje jednadžbe pravca ($y = ax + b$) nakon čega se izračuna i koeficijent korelacije (R) ili koeficijent determinacije (R^2). Dobivena vrijednost nagiba pravca (a) je parametar koji direktno govori o osjetljivosti metode, dok odsječak pravca (b) može ukazivati na prisustvo sustavne pogreške. Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita posebno su korisni zbog mogućnosti vizualnog nadzora, odnosno moguće je pratiti prisutnost odstupanja mjerenja od regresijskog pravca te odrediti odstupaju li vrijednosti jednoliko između pozitivnih i negativnih vrijednosti [42].



Slika 19. Grafički prikaz linearnosti [44]

2.3.1.3. Točnost

Točnost mjerenja je parametar koji nam govori koliko se eksperimentalno dobivena vrijednost podudara s prihvaćenom referentnom vrijednosti. Kako bi se validacijom istražio utjecaj sustavnih i slučajnih pogrešaka na pojedinačne rezultate, točnost se uobičajeno proučava kao dvije zasebne sastavnice: preciznost i istinitost [45].

2.3.1.4. Preciznost

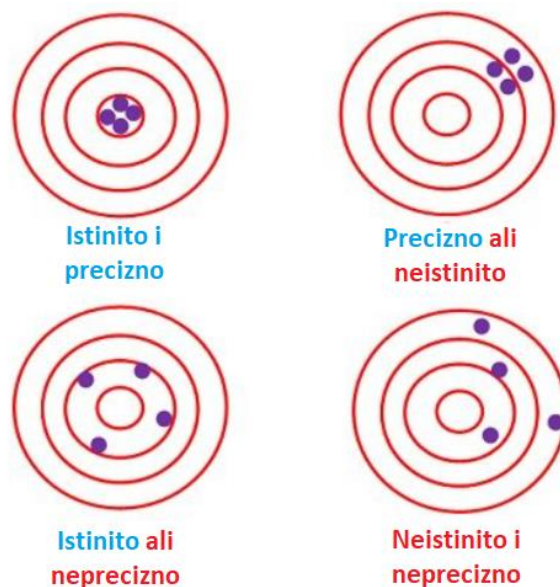
Preciznost se određuje kao slaganje rezultata niza mjerenja istog homogenog uzorka pri točno određenim uvjetima. Ovisno o uvjetima određivanja razlikujemo:

- *preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost* - podrazumijeva rad jednog laboratorija, istog analitičara i provođenje u kratkom vremenskom razdoblju.
- *međupreciznost* - preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju pri čemu dolazi do očekivanih promjena nekih uvjeta. Moguće promjene uvjeta su rad različitih analitičara, korištenje različitih instrumenta, korištenje reagensa iz različitih boca ili reagensa različitih dobavljača. Kod određivanja međupreciznosti posebno je važno mjerenja koja se ponavljaju provoditi u uvjetima što sličnijim kao pri rutinskoj uporabi metode.
- *Preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost* - promjenljivi uvjeti uključuju različite laboratorije, a određuje se u svrhu normiranja metode te se rijetko provodi kao sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij [42].

2.3.1.5. Istinitost

Istinitost metode se definira kao stupanj podudaranja stvarne vrijednosti (referentne vrijednosti) i srednje vrijednosti dobivene provođenjem nekog postupka beskonačni broj puta. Numerička vrijednost istinitosti se iskazuje kao sustavno odstupanje (engl. *bias*), vrijednost koja se dobiva kao razlika između rezultata aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti ili kao njihov međusobni odnos što je posebno korisno pri određivanju iskorištenja [42].

Iako se često poistovjećuju pojmovi istinitosti i točnosti, važno ih je razlikovati i znati njihovu definiciju. Također, uz istinitost je važno postići i preciznost dobivenih rezultata (Slika 20.).



Slika 20. Prikaz preciznosti i istinitosti [46]

Istinitost se vrlo često iskazuje preko vrijednosti iskorištenja. Sama vrijednost iskorištenja se računa prema izrazu:

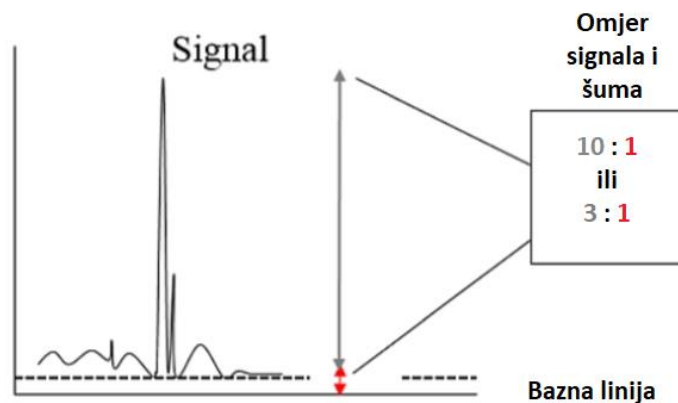
$$\text{Iskorištenje} = \frac{\bar{x}}{T} \cdot 100 \% \quad (8)$$

gdje je $\bar{x}$ srednja vrijednost koncentracije ponovljenih mjerenja standardnih otopina, a T koncentracija analita u standardnoj otopini.

2.3.1.6. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije predstavljaju najmanju količinu analita u uzorku koju je moguće detektirati odnosno kvantificirati uz odgovarajuću točnost (preciznosti i istinitost). Njihovo se određivanje provodi razrjeđivanjem temeljne standardne otopine, a sama procjena može biti vizualna na temelju poznavanja omjera signala i šuma ili pak statistička na temelju poznavanja standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca. Vizualna procjena se primjenjuje kod neinstrumentalnih i instrumentalnih metoda, ali uglavnom samo za granicu detekcije, a određuje se najmanji signal koji se može prepoznati. Omjer signala i šuma se može

primijeniti samo na one analitičke postupke kod kojih postoji bazna linija, a prihvaćaju se omjeri 3:1 za granicu detekcije i 10:1 za granicu kvantifikacije (Slika 21.).



Slika 21. Vizualna procjena granice detekcije i kvantifikacije [47]

Statistički se granice detekcije i kvantifikacije određuju na temelju vrijednosti standardnog odstupanja signala i vrijednosti nagiba pravca [42]. Računski se granica detekcije određuje prema sljedećem izrazu:

$$GD = \frac{3,3 \cdot s}{b} \quad (9)$$

gdje s predstavlja standardno odstupanje ponovljivosti mjerenja pri najnižoj koncentraciji unutar linearnog područja, dok je b nagib kalibracijskog pravca čija se granica detekcije određuje.

Granica kvantifikacije se računski određuje prema izrazu:

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

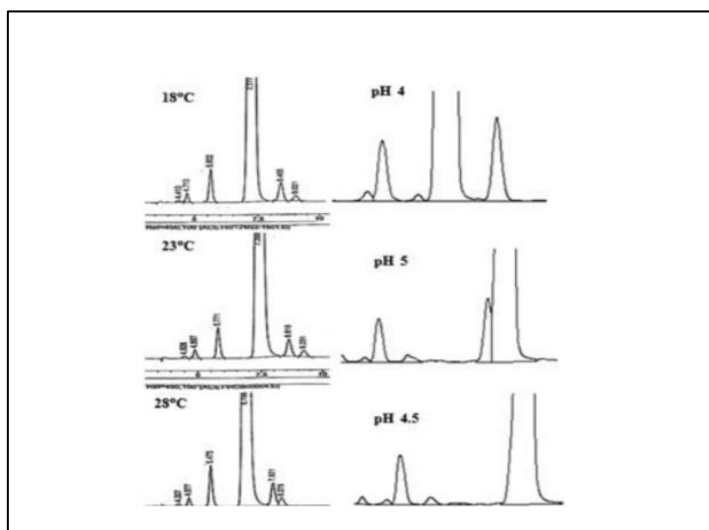
pri čemu oznake u izrazu imaju jednako značenje kao i za granicu detekcije [48].

2.3.1.7. Radno područje

Radno područje je raspon koji se nalazi između gornje i donje koncentracijske granice analita pri čemu su granice uključene, a omogućuje kvantifikaciju uzorka uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Za određivanje radnog područja nije potrebno provoditi zasebna ispitivanja i mjerenja, već se zaključci o granicama određuju na temelju linearnosti te rezultata ispitivanja istinitosti i preciznosti. Često je radno područje određeno svrhom metode te nema potrebe za određivanjem krajnjih vrijednosti, no ipak se sužavanjem radnog područja postižu bolje vrijednosti istinitosti i preciznosti metode [42].

2.3.1.8. Robusnost

Robusnost (otpornost) se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, nenamjerne promjere radnih uvjeta ispitivane metode. Određivanje postojanosti se ponajprije provodi kako bi se odredio utjecaj malih promjena radnih uvjeta na dobivene rezultate. Takvo određivanje posebno je korisno u razvoju metode jer pomaže otkriti optimalne uvjete za njezinu izvedbu i govori nam što je potrebno tijekom njezine provedbe nadzirati. Ukoliko promjena nekog radnog uvjeta u konačnici ne utječe bitno na rezultat, može se zaključiti kako se ispitani raspon radnih uvjeta nalazi unutar područja robusnosti metode. S druge strane, uvjete za koje je utvrđeno da utječu na vrijednost dobivenih rezultata potrebno je držati pod nadzorom i jasno ih definirati u opisu same metode. Jedan od primjera utjecaja promjene radnih uvjeta na rezultate je utjecaj temperature kolone i pH-vrijednosti pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji (Slika 22.) [42].



Slika 22. Utjecaj temperature kolone i pH pokretne faze na postojanost metode [42]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tablica 2. prikazuje popis korištenih kemikalija, formula, njihovih čistoća i proizvođača koji su korišteni za izvođenje eksperimentalnog dijela.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	CH ₃ CN	<i>purissimum pro chromatographia</i>	Fisher Scientific, Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo
Etanol (96 %)	C ₂ H ₅ OH	<i>p.a.</i>	KEFO, Sisak, Hrvatska
Metanol	CH ₃ OH	<i>purissimum pro chromatographia</i>	Avantor Performance Materials Poland S. A., Gliwice, Poljska

3.1.2. N-nitrozamini

Ispitivani N-nitrozamini su: N-nitrozodi-n-propilamin (NDPA), N-nitrozopirolidin (NPYR), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozomorfolin (NMOR), N-nitrozo-di-n-butilamin (NDBA), N-nitrozopiperidin (NPIP), N-nitrozodifenilamin (NDPhA) i N-nitrozodimetilamin (NDMA).

Popis ispitivanih osam *N*-nitrozamina i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava nalazi se u Tablici 3. i Tablici 4.

Tablica 3. Fizikalno kemijska svojstva NDPA-a, NPYR-a, NDEA-a i NMOR-a [7], [49 - 53]

Spoj	NDPA	NPYR	NDEA	NMOR
CAS	621-64-7	100-75-4	55-18-5	59-89-2
Molekulska formula	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	C ₄ H ₈ N ₂ O	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂
Molarna masa, g/mol	130,19	100,12	102,14	116,12
Vrelište, °C	206,00	219,00	172,00	224,00
Dipolni moment	3,77	3,74	3,72	2,68
Gustoća, g/cm ³	0,9163	1,0631	0,9422	1,0300
Topljivost u vodi, mg/L	1,30·10 ⁴	1,00·10 ⁶	1,06·10 ⁵	1,00·10 ⁶
pK _a	3,30	3,30	3,32	3,14

Tablica 4. Fizikalno kemijska svojstva NDBA-a, NPIP-a, NDPhA-a i NDMA-a [7], [49], [54 - 57]

Spoj	NDBA	NPIP	NDPhA	NDMA
CAS	924-16-3	100-75-4	86-30-6	62-75-9
Molekulska formula	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	C ₂ H ₆ N ₂ O
Molarna masa, g/mol	158,24	114,08	198,22	74,08
Vrelište, °C	235,00	219,00	101,00	304,00
Dipolni moment	3,82	3,37	3,38	3,71
Gustoća, g/cm ³	0,9009	1,0631	1,2300	1,0048
Topljivost u vodi, mg/L	395,60	7,65·10 ⁴	35,00	1,00·10 ⁶
pK _a	3,30	3,30	3,13	3,22

3.1.3. Kromatografska kolona

Korištena je kromatografska kolona *Kinetex* C₁₈ (Slika 23.) proizvođača Phenomenex. Nepokretnu fazu čini lanac C₁₈ s trimetilsililnom skupinom, čiji je promjer zrna punjenja 5 µm te veličina pora promjera 100 Å. Dimenzije kromatografske kolone su 150 x 4,6 mm.



Slika 23. Korištena Kinetex kolona

3.2. Instrumenti

3.2.1. Sustav za pročišćavanje vode

Sustav za dobivanje MilliQ vode koristi se kao alat za dobivanje ultra čiste vode koja se koristi pri provođenju eksperimentalnog djela zbog svoje izuzetne čistoće te niske količine prisutnih iona i mikroorganizama. MilliQ voda se dobiva pročišćavanjem vode kroz niz filtera, a sam sustav za pročišćavanje vode određuje koncentraciju iona u vodi mjerenjem električnog otpora, pri čemu nakon provođenja vode kroz set filtera njezin specifičan otpor iznosi barem $10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ [58]. U ovom radu korišten je *Milli-Q Reagent Grade Water System, Millipore Corporation* (Burlington, SAD) (Slika 24.).



Slika 24. Milli-Q Reagent Grade Water System, Millipore Corporation

3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj se koristi za uklanjanje plinova iz pokretne faze koja se koristi pri kromatografskoj analizi, ali i za čišćenje raznog laboratorijskog posuđa. Zrak i ostali plinovi koji su otopljeni u otapalu pokretne faze apsorbiraju ultrazvučnu energiju pri čemu nastaju kavitacijski mjehurići koji izlaze iz otapala te pritom imaju mogućnost čišćenja laboratorijskog posuđa. Ultrazvučna kupelj se puni s vodom, a ispod same posude kupelji smještene su ultrazvučne sonde koje djeluju u kupelji na uzorak [59]. U ovom radu korištena je ultrazvučna kupelj *UZ 20R, Iskra* (Ljubljana, Slovenija) (Slika 25.).



Slika 25. Ultrazvučna kupelj UZ 20R, Iskra

3.2.3. Uređaj za filtraciju

Prije pripreme otopine smjese *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi, vodovodna je voda profiltrirana kako bi se iz nje uklonile prisutne suspendirane čestice te eventualne nečistoće. Filtracija je provedena na uređaju za filtraciju *PALL Life Sciences* (Washington, SAD) (Slika 26.) pri čemu je također korišten polipropilenski membranski filter GH Polypro, 47 mm, 0,45 µm.



Slika 26. Uređaj za filtraciju PALL Life Sciences

3.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti korištena je za određivanje ispitivanih *N*-nitrozamina i validaciju razvijene metode. Analiza je provedena na uređaju *Agilent 1100 Series* s DAD detektorom, *Agilent Technologies* (Santa Clara, SAD) (Slika 27.)



Slika 27. Uređaj Agilent 1100 Series s DAD detektorom, Agilent Technologies

3.3. Metode rada

3.3.1. Provođenje HPLC analize s DAD detektorom

Postupak određivanja *N*-nitrozamina proveden je na *Agilent 1100 Series* kromatografskom sustavu s DAD detektorom na Kinetex C₁₈ koloni. Prije same analize potrebno je u posude u kojima se nalaze pokretne faze pripremiti čista otapala koja se koriste u analizi, a zatim ih degazirati 15 minuta na ultrazvučnoj kupelji. Najprije se postupkom pranja (engl. *purge*) pročišćavaju cjevčice i HPLC sustav kako bi se uklonile eventualne nečistoće i otapalo zaostalo od prethodne analize. Tim se postupkom dovodi nova pokretna faza, a provodi se tako da se 8 minuta kroz sustav propušta čista MilliQ voda pri protoku od 5 mL min⁻¹, a zatim isto toliko vremena i acetonitril pri istom protoku. Kondicioniranje kolone provedeno je propuštanjem čistog acetonitrila kroz Kinetex C₁₈ kolonu pri čemu je protok iznosio 0,5 mL min⁻¹. Nakon kondicioniranja kolone provedeno je ekvilibriranje kolone kako bi se sustav pripremio za početne uvjete analize. Vrijeme ekvilibriranja kolone (t_{eq}) računa se prema izrazu:

$$t_{eq} = 10 \cdot V_m \cdot F \quad (11)$$

pri čemu je V_m volumen šupljina u kromatografskoj koloni, a F protok pokretne faze.

V_m se računa prema izrazu:

$$V_m = 0,7 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (12)$$

Pri čemu je r promjer kolone, a L duljina kolone.

Ekvilibracija Kinetex C₁₈ kolone provedana je kroz 34 minute, a tijekom njezina provođenja se uključuje UV lampa i sustav za termostatiranje kolone kako bi sustav bio spreman za rad prije početka analize. Ekvilibriranje je provedeno na početnim uvjetima analize koji su u ovom radu 5 % otapala B (acetonitril) i 95 % otapala A (MilliQ voda). Tijekom analize se između injektiranja različitih uzoraka provodilo pranje igle s 50 % otopinom acetonitrila koja se svježja priprema prije analize i stavlja u HPLC sustav. Volumen injektiranog uzorka tijekom analize iznosio je 20 µL.

3.3.2. Priprema standardnih otopina *N*-nitrozamina u MilliQ vodi za provjeru linearnosti HPLC-DAD metode

Za određivanje linearnosti HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina pripremljeno je 13 standardnih otopina smjese osam *N*-nitrozamina. Koncentracije otopina nalaze se u rasponu od 0,01 - 10,0 mg L⁻¹ te su pripremljene u odmjernim tikvicama od 10,0 mL. Otopine su pripremljene na način da je u svaku odmjernu tikvicu dodan određeni volumen temeljne standardne otopine (TSO), koncentracije 100 mg L⁻¹, ovisno o željenoj koncentraciji (Tablica 5.).

Tablica 5. Priprema standardnih otopina smjese osam *N*-nitrozamina za određivanje linearnosti

γ , mg L ⁻¹	Faktor razrjeđenja	Volumen TSO, mL	Volumen odmjerne tikvice, mL
0,01	10000	0,001	10,0
0,0325	3077	0,00325	10,0
0,055	1818	0,0055	10,0
0,0775	1290	0,00775	10,0
0,1	1000	0,01	10,0
0,325	308	0,0325	10,0
0,55	182	0,055	10,0
0,775	129	0,0775	10,0
1	100	0,1	10,0
3,25	31	0,325	10,0
5,50	18	0,55	10,0
7,75	13	0,775	10,0
10	10	1	10,0

Nakon što je u odmjernu tikvicu dodan odgovarajući volumen TSO, do oznake se nadopunjuje s MilliQ vodom te dobro promućka. Standardne otopine koncentracije 0,01; 0,0325, 0,055 i 0,0775 mg L⁻¹ pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine svakog *N*-nitrozamina koncentracije 1 mg L⁻¹. Standardne otopine koncentracije 0,1; 0,325; 0,55 i 0,775 mg L⁻¹ pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine svakog *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹. Standardne otopine koncentracije 1; 3,25; 5,50; 7,75 i

10 mg L⁻¹ pripremljene su iz TSO. Za određivanje linearnosti, svaka je smjesa standardnih otopina *N*-nitrozamina injektirana tri puta te je kao rezultat uzeta njihova aritmetička sredina.

3.3.3. Priprema standardnih otopina *N*-nitrozamina za određivanje preciznosti

Za procjenu parametra preciznosti (ponovljivosti i međupreciznosti) pripremljene su tri standardne otopine smjese *N*-nitrozamina, pri čemu su njihove koncentracije bile unutar linearnog područja i to: 0,0775 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹. Korištene otopine nisu one pripremljene za određivanje linearnosti, već su pripremljene nove otopine smjesa. Otopine prethodno navedenih koncentracija pripremljene su razrjeđenjem TSO *N*-nitrozamina u MilliQ vodi, pri čemu je u odmjerne tikvice otpipetiran odgovarajući volumen TSO te je potom tikvica nadopunjena do oznake vodom.

Ponovljivost

Za provjeru parametra ponovljivosti pripremljene su otopine smjesa *N*-nitrozamina koncentracija 0,0775 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹ u MilliQ vodi. Svaka je otopina različite koncentracije analizirana 5 puta kako bi se odredila ponovljivost.

Međupreciznost

Provjera međupreciznosti provedena je na isti način kao i provjera ponovljivost, ali u vremenskom odmaku od pet dana. Tako su dobiveni novi setovi mjernih podataka za koncentracije 0,0775 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹ te je uspoređivanjem dobivenih vrijednosti određena međupreciznost.

3.3.4. Priprema vodovodne vode

Vodovodna voda uzorkovana je na Zavodu za analitičku kemiju. Vodovodna voda je uzorkovana 1 minutu nakon propuštanja vodovodne vode kroz slavinu. Nakon 1 minute propuštanja, voda je sakupljena u čaši od 1000 mL nakon čega je provedena njezina filtracija. Na uređaj za filtraciju položen je filter papir te je uzorkovana vodovodna profiltrirana kako bi se uklonile suspendirane čestice i prisutne nečistoće. Nakon filtracije je vodovodna voda skladištena i korištena u daljnjem tijeku ispitivanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina

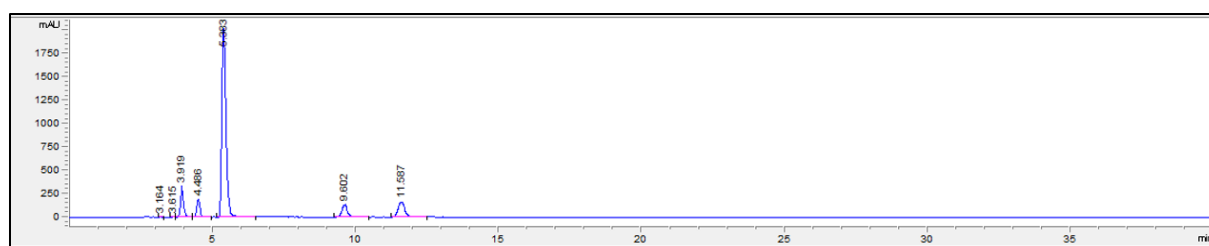
Tijekom razvoja HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina u vodi ispitani su različiti gradijenti te različite pokretne faze na korištenoj Kinetex C₁₈ koloni.

Najprije je smjesa osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ podvrgnuta izokratnom eluiranju, pri čemu je u kromatografiji obrnutih faza kao pokretna faza korištena MilliQ voda (A) u kombinaciji s tri različita organska otapala (B): acetonitril, etanol i metanol. Korištena su četiri različita sastava uz izokratno eluiranje, pri čemu je vrijeme analize iznosilo 40 minuta (Tablica 6.).

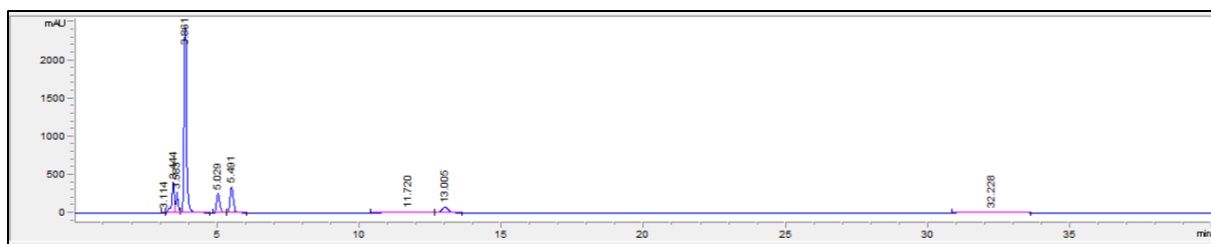
Tablica 6. Sastav pokretne faze pri izokratnom eluiranju

Analiza	A, %	B, %
1.	80	20
2.	60	40
3.	40	60
4.	20	80

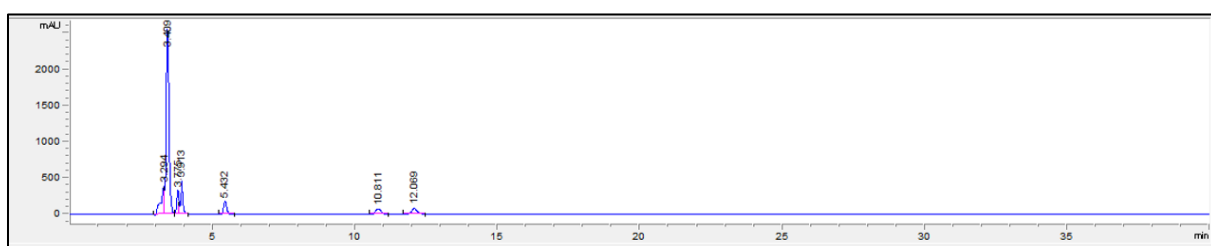
Najprije je provedeno izokratno eluiranje s pokretnom fazom sastavljenom od MilliQ vode (A) i metanola (B). Rezultati izokratnog eluiranja prikazani su na Slikama 28. - 31.



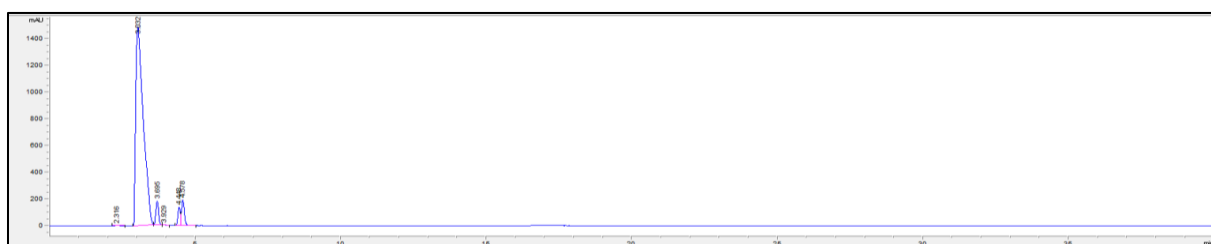
Slika 28. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 20 % metanola



Slika 29. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % metanola



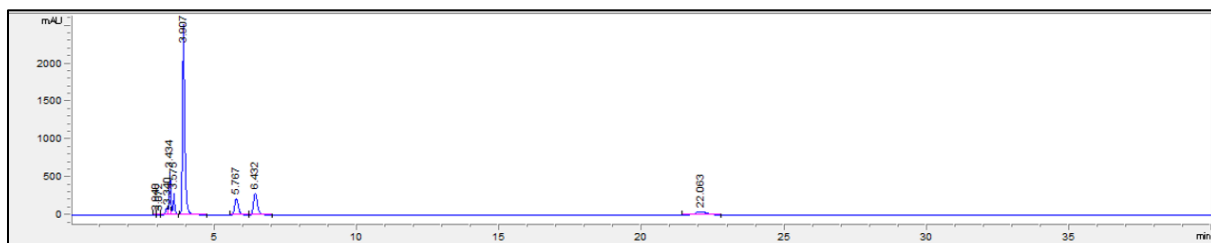
Slika 30. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 60 % metanola



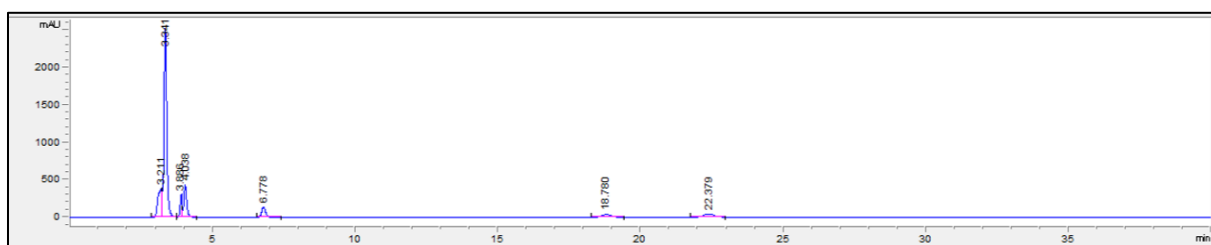
Slika 31. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 80 % metanola

Iz rezultata se uočava kako pri niti jednom izokratnom eluiranju nema prisutnih svih osam *N*-nitrozamina. Također je moguće uočiti kako se povećanjem udjela metanola smanjuje vrijeme zadržavanja što nam govori kako se porastom udjela metanola smanjuje vrijeme zadržavanja spojeva na nepokretnoj fazi te prije izlaze iz kolone. Pri udjelu metanola od 40 % i 60 % se uočava šest pikova što je najveći broj detektiranih analita, dok je najmanji broj pikova pri eluiranju s 80 % metanola, kada su uočljiva samo četiri pika. Rezultati analize nam ukazuju da pri izokratnom eluiranju s MilliQ vodom (A) i metanolom (B) nije moguće postići dobru separaciju te da dolazi do preklapanja pikova različitih analita. Trajanje eluiranja iznosi 40 minuta što je dovoljno kako bi svaki analit iz smjese napustio kromatografsku kolonu i u konačnici bio separiran.

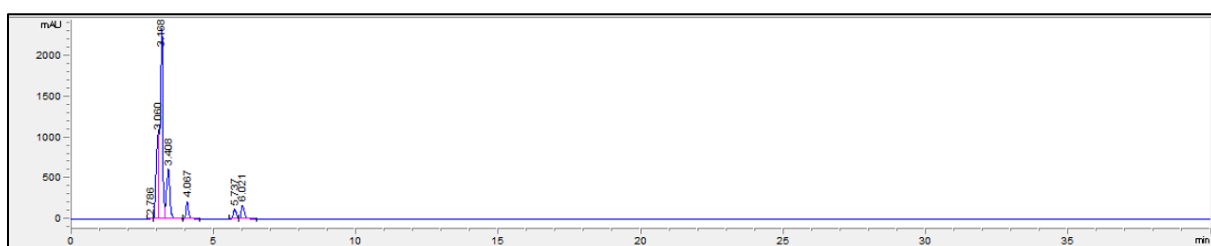
Sljedeće je provedeno izokratno eluiranje s pokretnom fazom sastavljenom od MilliQ vode (A) i etanola (B), pri čemu su rezultati prikazani na Slikama 32. - 35.



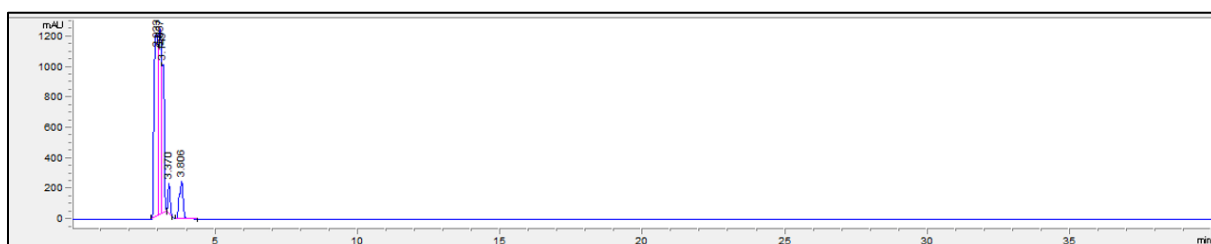
Slika 32. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 20 % etanola



Slika 33. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % etanola



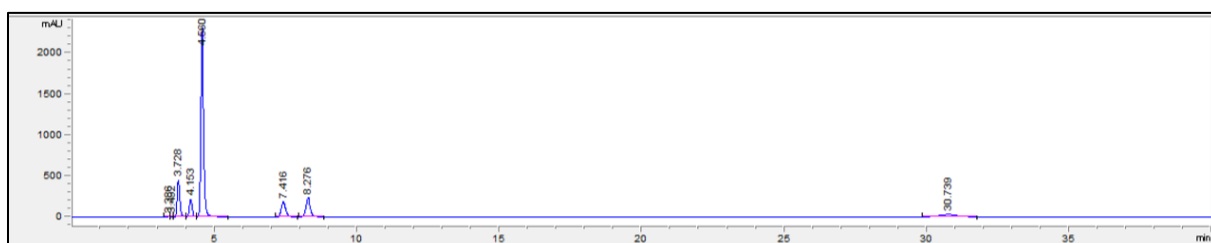
Slika 34. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 60 % etanola



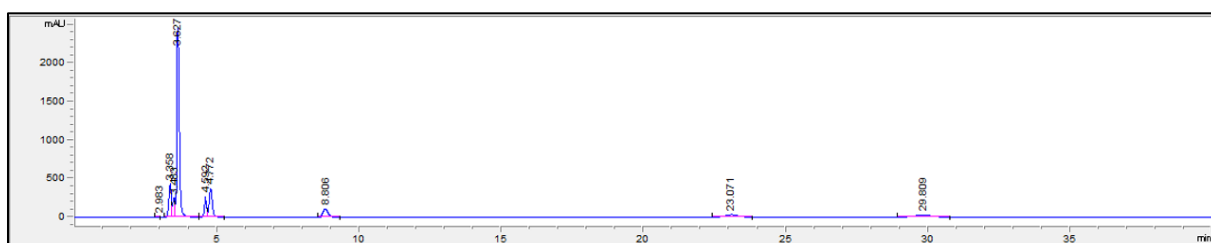
Slika 35. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 80 % etanola

Na temelju dobivenih kromatograma uočavamo kako pri izokratnom eluiranju nema prisutnih svih osam pikova za niti jedan sastav pokretne faze. Kao i s korištenjem metanola, uočavamo da porastom udjela etanola (B) dolazi do smanjenja vremena zadržavanja. Pri izokratnom eluiranju s pokretnom fazom koja sadrži udio etanola 20 % uočavamo najbolju separaciju i najveći broj prisutnih pikova. Za veće udjele etanola uz kraće vrijeme zadržavanja, smanjuje se i razlučivanje te broj pikova. Etanol se stoga pokazao kao dobar izbor otapala pokretne faze prateći zelenu kemiju, no izokratno eluiranje nije pokazalo dobru separaciju pikova uz izostanak separacije svih osam analita.

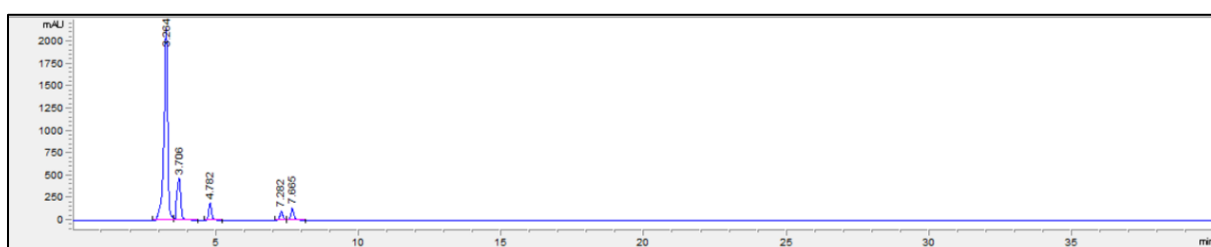
Posljednje je smjesa podvrgnuta izokratnom eluiranju s pokretnom fazom sastavljenom od MilliQ vode (A) i acetonitrila (B), a pripadni kromatogrami su prikazani na Slikama 36. - 39.



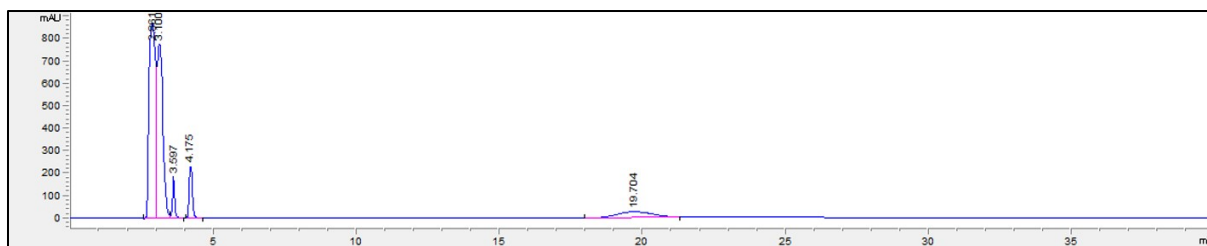
Slika 36. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 20 % acetonitrila



Slika 37. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % acetonitrila



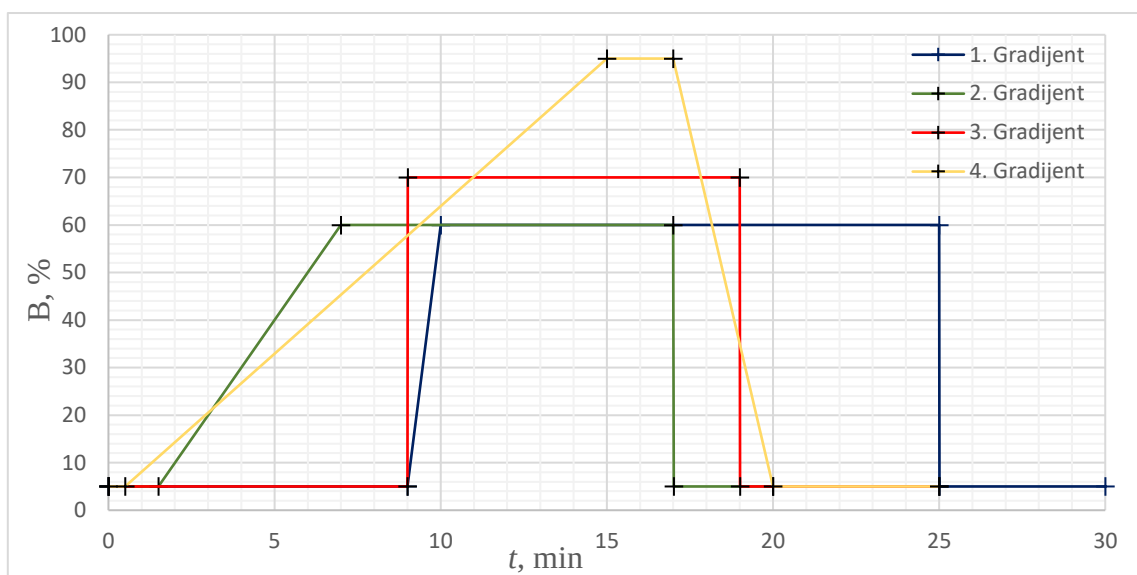
Slika 38. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 60 % acetonitrila



Slika 39. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 80 % acetonitrila

Iz dobivenih rezultata uočavamo kako se izokratnim eluiranjem s pokretnom fazom koju čine MilliQ voda (A) i acetonitril (B) i dalje ne postiže separacija svih osam pikova, osim uz pokretnu fazu s 40 % acetonitrila kada je moguće uočiti prisutnost svih osam pikova koji nisu potpuno separirani. U tom slučaju njihova loša separacija onemogućava njihovo točno određivanje odnosno kvantifikaciju. To nam ukazuje da *N*-nitrozamini pri takvom eluiranju posjeduju vrlo bliske vrijednosti vremena zadržavanja što uzrokuje preklapanje njihovih pikova i onemogućuje određivanje površine ispod pojedinačnih pikova. Takvo ponašanje na kromatogramu uočavamo prisutnošću preklapljenih pikova tj. jednog većeg pika. Porastom udjela acetonitrila uočava se trend smanjenja vremena zadržavanja te smanjenja separacije pikova. Općenito se uočava kako s manjim udjelom organskog otapala u pokretnoj fazi dolazi do porasta vremena zadržavanja i dolazi do bolje separacije pikova. U usporedbi s metanolom i etanolom, pri udjelu acetonitrila od 60 % uočava se bolja separacija prisutnih pikova, no i dalje problem predstavlja njihovo preklapanje, zbog čega se pri tom udjelu uočava samo pet pikova što takvo eluiranje čini lošim izborom. U usporedbi s drugim otapalima, acetonitril je pokazao kako daje pikove najbolje simetrije i relativno najbolju separaciju, stoga je u daljnjem tijeku istraživanja razvijanje i optimiranje metode provedeno s pokretnom fazom koju čine MilliQ voda i acetonitril.

U daljnjem razvoju i optimizaciji metode za određivanje *N*-nitrozamina, osmišljena su četiri različita gradijentna eluiranja u svrhu što bolje separacije pikova, njihove identifikacije te što kraćeg vremena analize kako bi se u konačnici provelo njihovo određivanje i validacija metode. Na Slici 40. prikazana je promjena udjela acetonitrila (B) tijekom gradijentnog eluiranja za sva četiri ispitivana gradijenta.

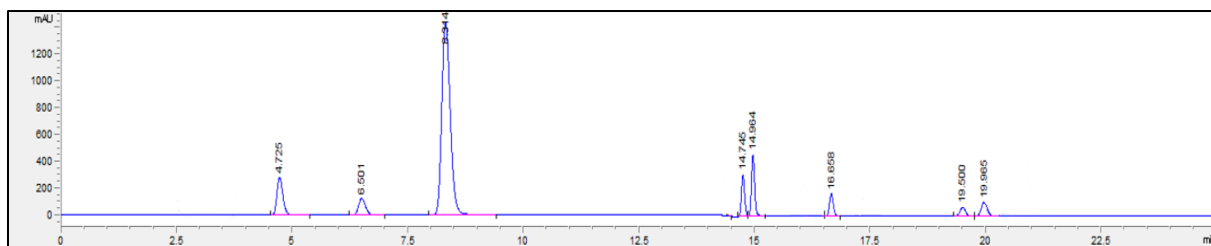


Slika 40. Prikaz promjene udjela acetonitrila (B) tijekom gradijentnog eluiranja za četiri ispitivana gradijenta

Smjesa osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L^{-1} podvrgnuta je najprije prvom gradijentnom eluiranju čiji se sastav pokretne faze nalazi u Tablici 7. Kao otapala u pokretnoj fazi korišteni su MilliQ voda (A) i acetonitril (B). Vrijeme analize trajalo je 30 minuta. Dobiveni kromatogram za prvi gradijent nalazi se na Slici 41.

Tablica 7. Sastav pokretne faze tijekom prvog gradijentnog eluiranja

Vrijeme, min	A, %	B, %
0,00	95	5
9,00	95	5
10,00	40	60
25,00	40	60
25,01	95	5
30,00	95	5

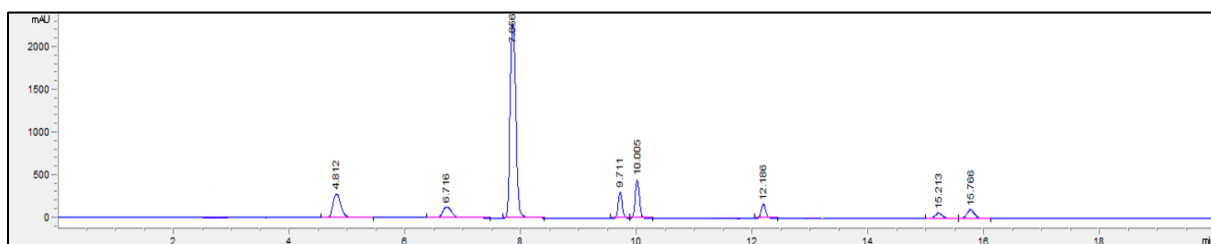


Slika 41. Kromatogram dobiven za prvi gradijent

Smjesa osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ podvrgnuta je zatim drugom gradijentnom eluiranju čiji se sastav pokretne faze nalazi u Tablici 8. Kao otapala u pokretnoj fazi korišteni su MilliQ voda (A) i acetonitril (B). Vrijeme analize je trajalo kraće i to 20 minuta. Dobiveni kromatogram za drugi gradijent nalazi se na Slici 42.

Tablica 8. Sastav pokretne faze tijekom drugog gradijentnog eluiranja

Vrijeme, min	A, %	B, %
0,00	95	5
1,50	95	5
7,00	40	60
17,00	40	60
17,01	95	5
20,00	95	5

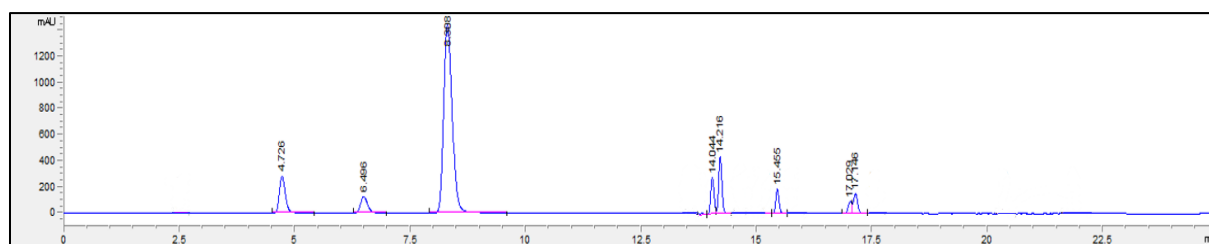


Slika 42. Kromatogram dobiven za drugi gradijent

Smjesa osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ podvrgnuta je potom trećem gradijentnom eluiranju čiji se sastav pokretne faze nalazi u Tablici 9. Kao otapala u pokretnoj fazi korišteni su MilliQ voda (A) i acetonitril (B). Vrijeme analize je trajalo 25 minuta. Dobiveni kromatogram za treći gradijent nalazi se na Slici 43.

Tablica 9. Sastav pokretne faze tijekom trećeg gradijentnog eluiranja

Vrijeme, min	A, %	B, %
0,00	95	5
9,00	95	5
9,01	30	70
19,00	30	70
19,01	95	5
25,00	95	5

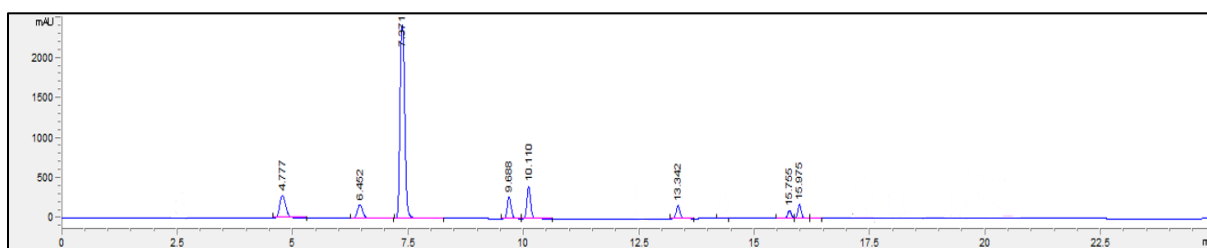


Slika 43. Kromatogram dobiven za treći gradijent

Smjesa osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ podvrgnuta je u konačnici i četvrtom gradijentnom eluiranju čiji se sastav pokretne faze nalazi u Tablici 10. Kao otapala u pokretnoj fazi korišteni su MilliQ voda (A) i acetonitril (B). Vrijeme analize trajalo je 25 minuta. Dobiveni kromatogram za četvrti gradijent nalazi se na Slici 44.

Tablica 10. Sastav pokretne faze tijekom četvrtog gradijentnog eluiranja

Vrijeme, min	A, %	B, %
0,00	95	5
0,50	95	5
15,00	5	95
17,00	5	95
20,00	95	5
25,00	95	5



Slika 44. Kromatogram dobiven za četvrti gradijent

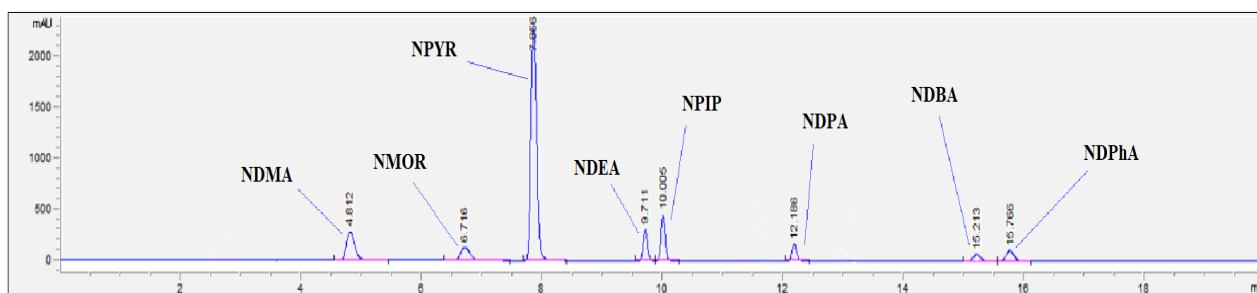
Uspoređujući dobivene rezultate za različita gradijentna eluiranja, zaključujemo kako se drugi gradijent pokazao kao najbolji izbor za određivanje *N*-nitrozamina u vodi. Vrijeme trajanja analize drugog gradijenta je najkraće što daje veliku prednost ovoj metodi, no također se postiže i najbolja separacija pikova u smjesi tj. postiže se najbolja razlučivost. Prvi gradijent zahtjeva najduže vrijeme analize i to 30 minuta, što predstavlja nedostatak. Uočavamo kako se pri tom gradijentnom eluiranju pojavljuje svih osam pikova iz smjese, ali da dolazi do njihovog preklapanja na četrnaestoj minuti. Također, uočavamo kako se između osme i četrnaeste minute ne javlja niti jedan pik što predstavlja dodatni problem jer se tako odužuje vrijeme analize te se na kromatogramu javlja prazan prostor. Ispitivani drugi gradijent pokazao se kao najbolji izbor za određivanje *N*-nitrozamina u vodi, naime vrijeme analize je najkraće i to 20 minuta što daje prednost ovoj metodi. Gradijentnim eluiranjem se također pojavljuje svih osam pikova pri čemu se postiže najbolja razlučivost u odnosu na druge ispitivane gradijente. Za razliku od prethodnog gradijenta, u ovoj metodi se ne pojavljuje prazan prostor te se zadnji *N*-nitrozamin pojavljuje u petnaestoj minuti. Treći ispitivani gradijent zahtjeva nešto više vremena i to 25 minuta, pri čemu se između osme i četrnaeste minute ponovno pojavljuje prazan prostor na kromatogramu što produljuje vrijeme trajanja analize. U ovom ispitivanom

gradijentu dolazi do preklapanja između zadnja dva pika te se općenito postiže lošija razlučivost pikova, što je ovaj gradijent odbacilo kao mogućnost za korištenje u daljnjoj analizi. Posljednji četvrti gradijent po trajanju je jednak trećem gradijentu, no na kromatogramu se ne pojavljuje prazan prostor. Ovim gradijentom je kao i kod prethodna tri moguće odrediti svih osam pikova, no kod posljednja dva pika se postiže lošija razlučivost što odbacuje ovaj gradijent u daljnjoj analizi. Na temelju provedene analize sa sva četiri gradijenta, rezultati su pokazali kako drugi gradijent (Tablica 8.) zahtjeva najkraće vrijeme analize i postiže najbolju razlučivost svih osam pikova te se zbog toga daljnji eksperimentalni postupak provodio s drugim ispitivanim gradijentom.

Kako bi se identificirao svaki pik u smjesi tj. odredilo kojem kemijskom spoju iz smjese odgovara pojedini pik, svaki je kemijski spoj iz smjese koncentracije 10 mg L⁻¹ zasebno analiziran odabranim gradijentom. Vremena zadržavanja svakog *N*-nitrozamina su prikazana u Tablici 11., dok je kromatogram s identificiranim pikovima prikazan na Slici 45.

Tablica 11. Vrijeme zadržavanja svakog *N*-nitrozamina u smjesi

<i>N</i> -nitrozamin	Vrijeme zadržavanja (<i>t_R</i>), min
NDPA	12,186
NPYR	7,856
NDEA	9,711
NMOR	6,716
NDBA	15,213
NPIP	10,005
NDPhA	15,766
NDMA	4,812



Slika 45. Identificirani *N*-nitrozamini u smjesi pri gradijentnom eluiranju

Kako se u ovom radu provodi kromatografija obrnutih faza, Kinetex C₁₈ kolona predstavlja nepokretnu fazu koja je izrazito nepolarna, dok je pokretna faza koju čine MilliQ voda (A) i acetonitril (B) izrazito polarna. Kako će se nepolarniji *N*-nitrozamini duže zadržati na nepolarnoj nepokretnoj fazi, doći će do duljeg vremena zadržavanja na njoj. Dok će se s druge strane polarniji *N*-nitrozamini manje zadržati na nepolarnoj nepokretnoj fazi te će biti nošeni u polarnoj pokretnoj fazi. Stoga je na temelju takvog ponašanja moguće predvidjeti polarnost ispitivanih *N*-nitrozamina. NDPhA je najnepolarniji spoj, dok ga prema rastućoj polarnosti slijede: NDBA, NDPA, NPIP, NDEA, NPYR, NMOR te u konačnici spoj koji posjeduje najveću polarnost od svih ispitivanih *N*-nitrozamina, NDMA.

4.2. Validacija HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina

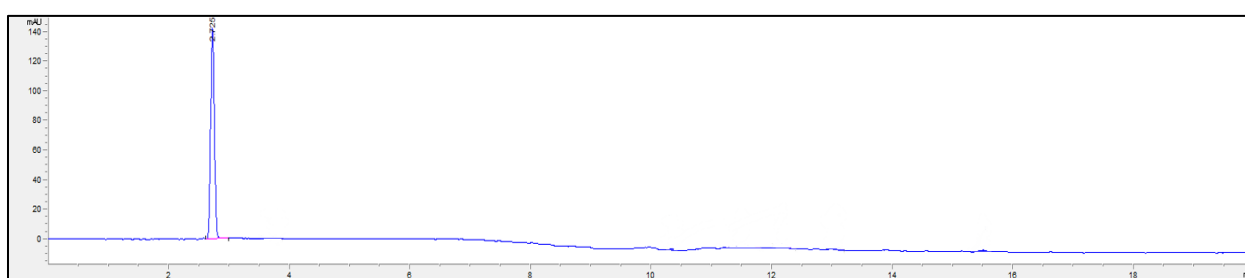
Validacija HPLC-DAD metode za određivanje osam *N*-nitrozamina u vodi provedena je određivanjem sljedećih izvedbenih karakteristika metode: selektivnost, linearnost, istinitost (iskorištenje), preciznost (ponovljivost i međupreciznost), granica detekcije i granica kvantifikacije. Kriteriji prihvatljivosti za izvedbene karakteristike nalaze se u Tablici 12.

Tablica 12. Izvedbene karakteristike i njihovi kriteriji prihvatljivosti [60]

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	Nisu prisutni interferirajući pikovi
Linearnost	$R^2 \geq 0,995$
Preciznost (ponovljivost)	$RSD \leq 10 \%$
Preciznost (međupreciznost)	$RSD \leq 10 \%$
Istinitost (iskorištenje)	80 - 120 %
Granica detekcije	Informacija
Granica kvantifikacije	Informacija

4.2.1. Selektivnost

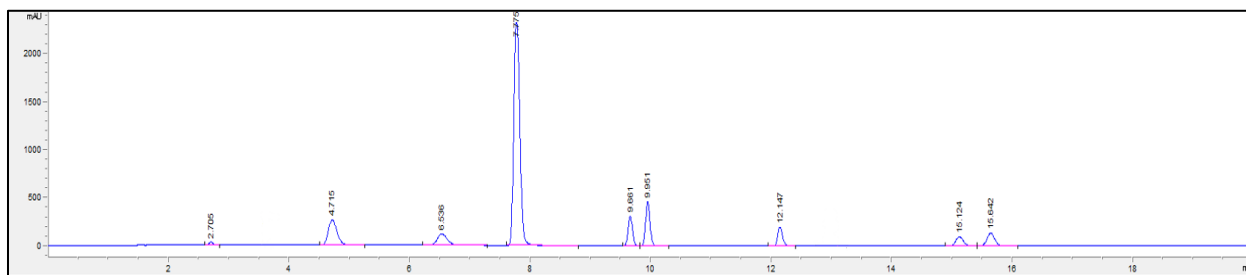
Selektivnost HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina u vodi ispitana je uspoređivanjem kromatograma smjese osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ u vodovodnoj vodi sa smjesom standardnih otopina osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ pri čemu je snimljen i kromatogram same vodovodne vode (slijepa proba). Na kromatogramu vodovodne vode (Slika 46.) uočava se jedan pik koji pripada upravo uzorku vodovodne vode te posjeduje vrijeme zadržavanja (t_R) 2,725 minuta. Na kromatogramu nisu uočeni interferirajući pikovi s vremenima zadržavanja koja se preklapaju s vremenima zadržavanja ispitivanih analita.



Slika 46. Kromatogram vodovodne vode

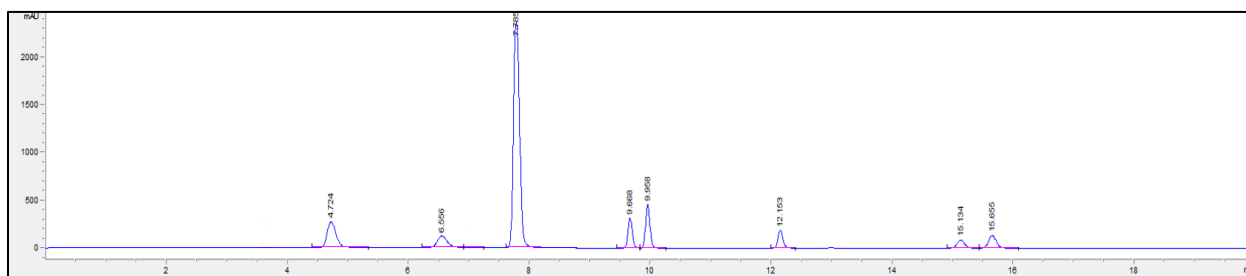
Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L⁻¹ u vodovodnoj vodi (Slika 47.) prikazuje prisutnost svih osam pikova *N*-nitrozamina pri čemu se njihova vremena zadržavanja skoro potpuno slažu s prethodno dobivenim podacima vremena zadržavanja svakog spoja (Tablica 11.). Također je na kromatogramu smjese osam *N*-nitrozamina

koncentracije 10 mg L^{-1} u vodovodnoj vodi uočen pik koji predstavlja uzorak vodovodne vode na 2,705 minuta.



Slika 47. Kromatogram smjese osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L^{-1} u vodovodnoj vodi

Usporedbom kromatograma smjese osam *N*-nitrozamina koncentracije 10 mg L^{-1} u vodovodnoj vodi s kromatogramom smjese standardnih 10 mg L^{-1} otopina osam *N*-nitrozamina u MilliQ vodi (Slika 48.) uočavamo dobro poklapanje vremena zadržavanja svih ispitivanih analita.



Slika 48. Kromatogram smjese standardnih 10 mg L^{-1} otopina osam *N*-nitrozamina u MilliQ vodi

Iz dobivenih kromatograma i svega navedenog možemo zaključiti kako je HPLC-DAD metoda za određivanje *N*-nitrozamina selektivna za njihovo određivanje u vodovodnoj vodi.

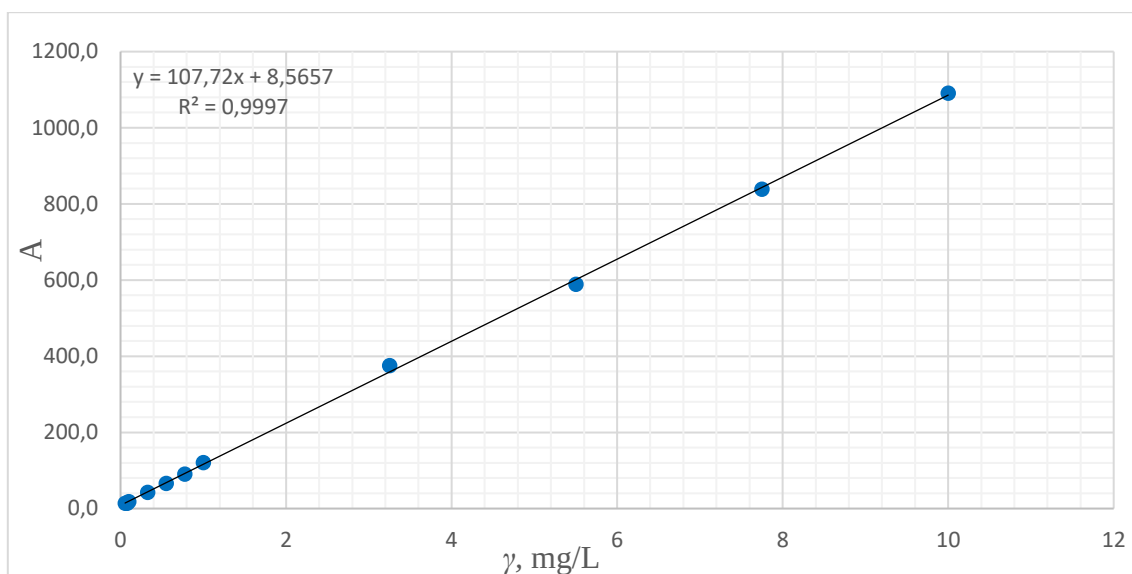
4.2.2. Linearnost

Linearnost HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina određena je izradom kalibracijskog (umjernog) pravca. U svrhu izrade kalibracijskog pravca, pripremljeno je 13 otopina u MilliQ vodi koje predstavljaju smjese osam *N*-nitrozamina (NDPA, NPYR, NDEA, NMOR, NDBA, NPIP, NDPhA i NDMA), pri čemu im se koncentracije nalaze u rasponu od 0,01 - 10 mg L⁻¹. Kako bi se odredila linearnost, određuju su površine pikova za svaki *N*-nitrozamin u smjesi pri svakoj koncentraciji. Svaka kalibracijska otopina smjese osam *N*-nitrozamina injektirana je tri puta, a vrijednost površine je iskazana kao srednja vrijednost njihovih mjerenja (Tablica 13.).

Tablica 13. Tablični prikaz vrijednosti površina pikova (*A*) za svaki *N*-nitrozamin u smjesi pri različitoj koncentraciji

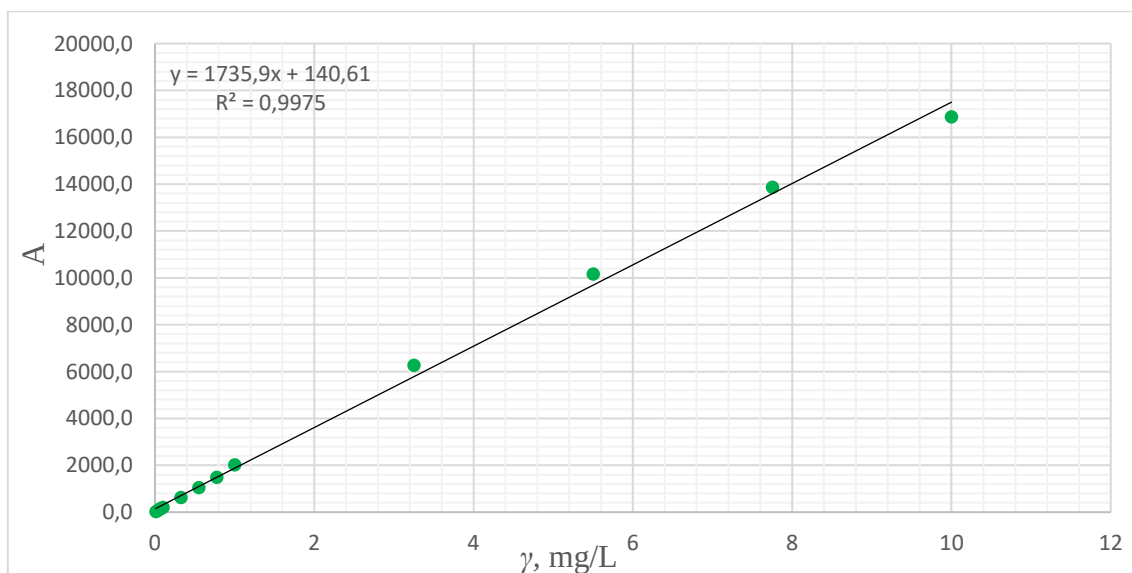
	Površina pikova <i>N</i> -nitrozamina							
γ , mg L ⁻¹	NDPA	NPYR	NDEA	NMOR	NDBA	NPIP	NDPhA	NDMA
0,01	-	23,8	-	-	-	-	-	-
0,0325	-	68,8	5,8	-	-	14,5	-	9,6
0,0550	13,9	114,0	9,3	-	-	19,7	-	14,7
0,0775	14,2	160,0	15,6	23,2	10,4	24,0	9,9	21,5
0,1	18,4	196,9	17,6	14,4	10,7	29,4	12,4	28,2
0,325	42,6	626,7	54,5	52,8	24,6	81,2	36,1	86,7
0,550	66,2	1046,3	90,8	93,2	41,9	133,1	60,5	148,3
0,775	90,0	1489,5	129,6	119,9	61,1	184,0	83,2	208,5
1	120,6	2017,7	167,7	151,9	81,9	245,3	114,2	284,0
3,25	375,1	6271,7	535,3	511,3	270,7	775,6	379,0	880,6
5,50	589,1	10166,1	871,3	755,7	424,2	1259,7	622,5	1454,5
7,75	838,8	13858,1	1241,5	1136,5	612,3	1794,9	906,8	2080,4
10	1090,4	16866,1	1607,7	1384,6	804,6	2300,1	1173,2	2655,3

Za NDPA nisu uočeni pikovi pri koncentracijama 0,01 i 0,0325 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,055 - 10 mg L⁻¹ (Slika 49.). Jednadžba pravca NDPA glasi: $A = 107,72 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 8,5657$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9997.



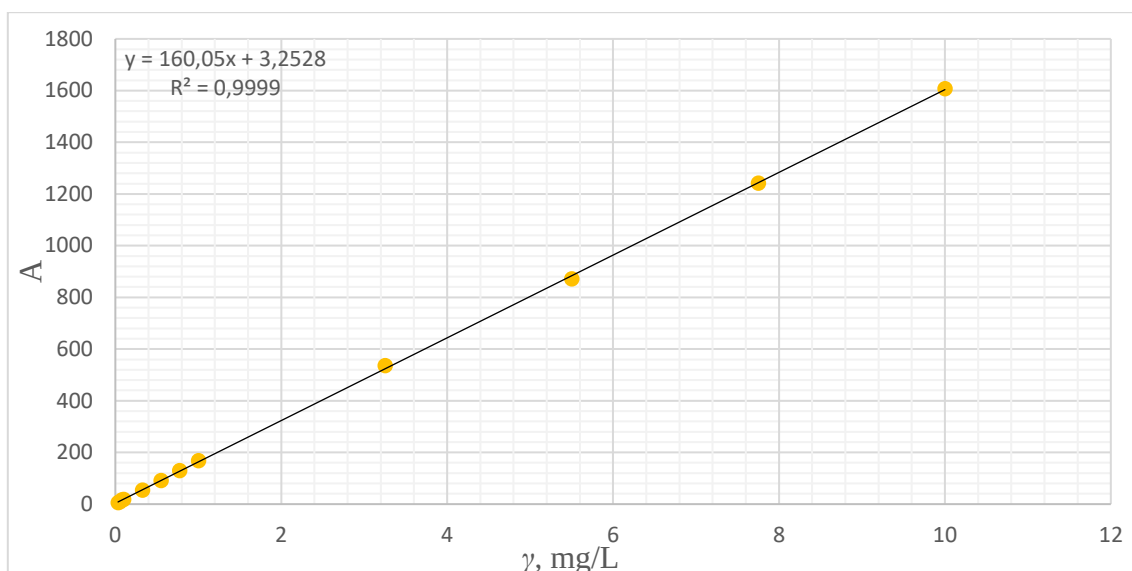
Slika 49. Kalibracijski pravac za NDPA u koncentracijskom rasponu 0,055 - 10 mg L⁻¹

Za NPYR su uočeni pikovi pri svim koncentracijama te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,01 - 10 mg L⁻¹ (Slika 50.). Jednadžba pravca NPYR glasi: $A = 1735,9 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 140,61$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9975.



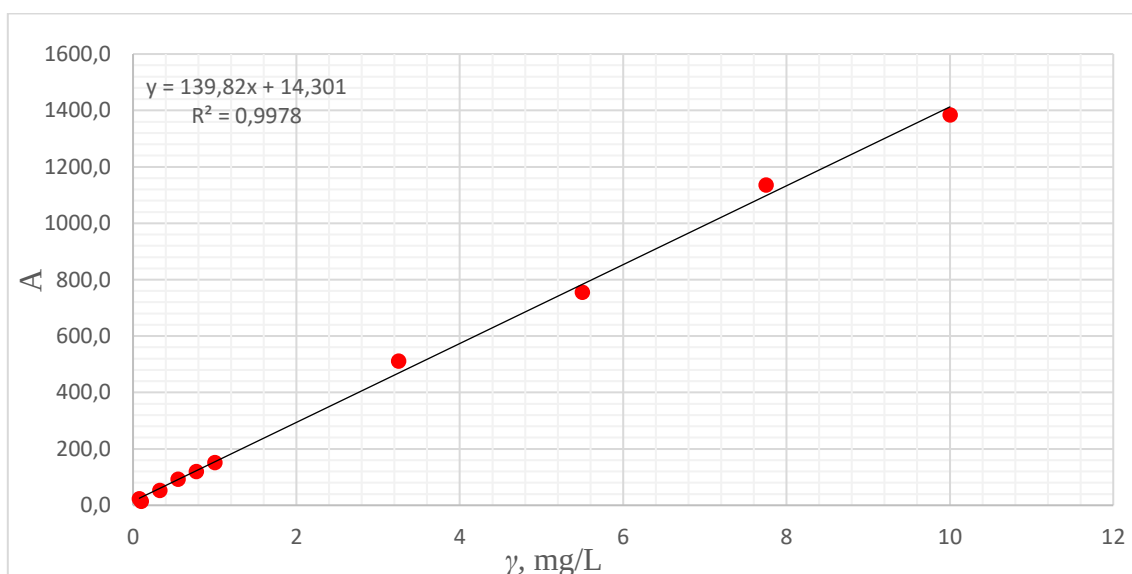
Slika 50. Kalibracijski pravac za NPYR u koncentracijskom rasponu 0,01 - 10 mg L⁻¹

Za NDEA nije uočen pik za koncentraciju 0,01 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0325 - 10 mg L⁻¹ (Slika 51.). Jednadžba pravca NDEA glasi: $A = 160,05 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 3,2528$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9999.



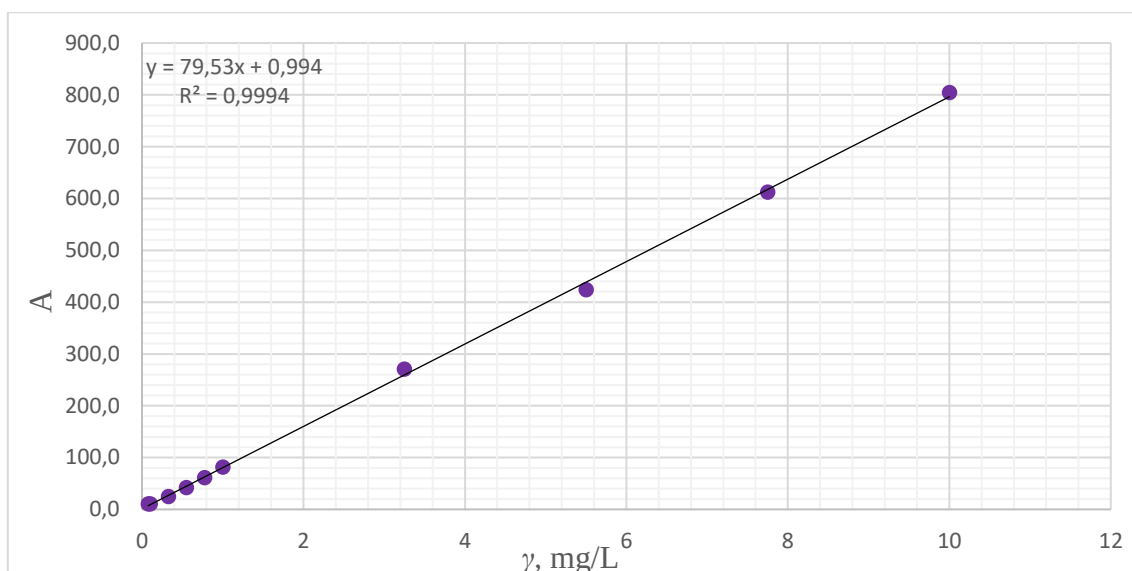
Slika 51. Kalibracijski pravac za NDEA u koncentracijskom rasponu 0,0325 - 10 mg L⁻¹

Za NMOR nisu uočeni pikovi pri koncentracijama 0,01; 0,0325 i 0,0550 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0775 - 10 mg L⁻¹ (Slika 52.). Jednadžba pravca NMOR glasi: $A = 139,82 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 14,301$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9978.



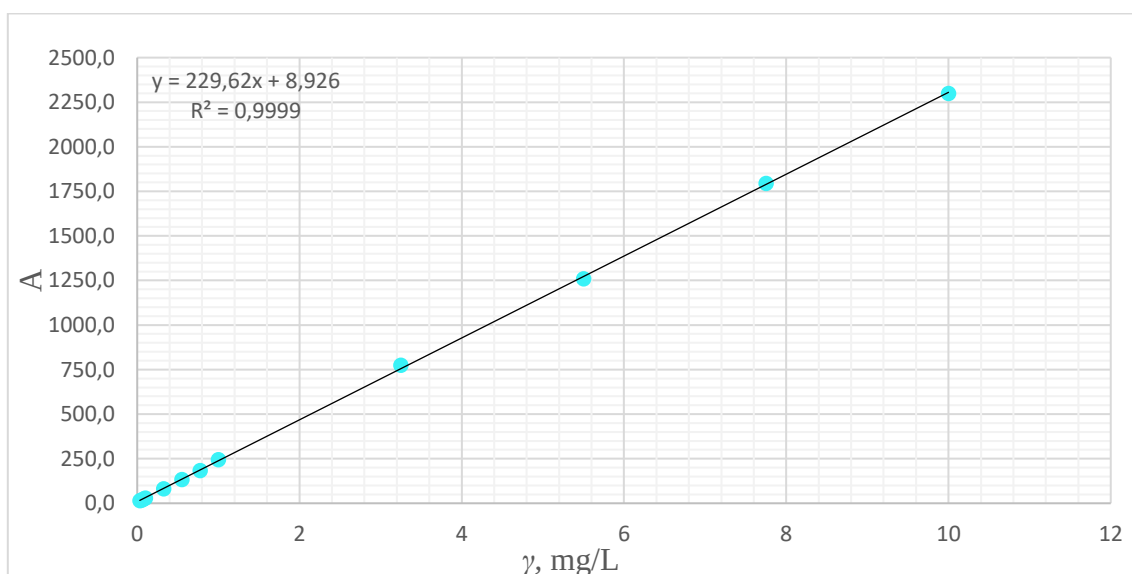
Slika 52. Kalibracijski pravac za NMOR u koncentracijskom rasponu 0,0775 - 10 mg L⁻¹

Za NDBA nisu uočeni pikovi pri koncentracijama 0,01; 0,0325 i 0,0550 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0775 - 10 mg L⁻¹ (Slika 53.). Jednadžba pravca NDBA glasi: $A = 79,53 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 0,994$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9994.



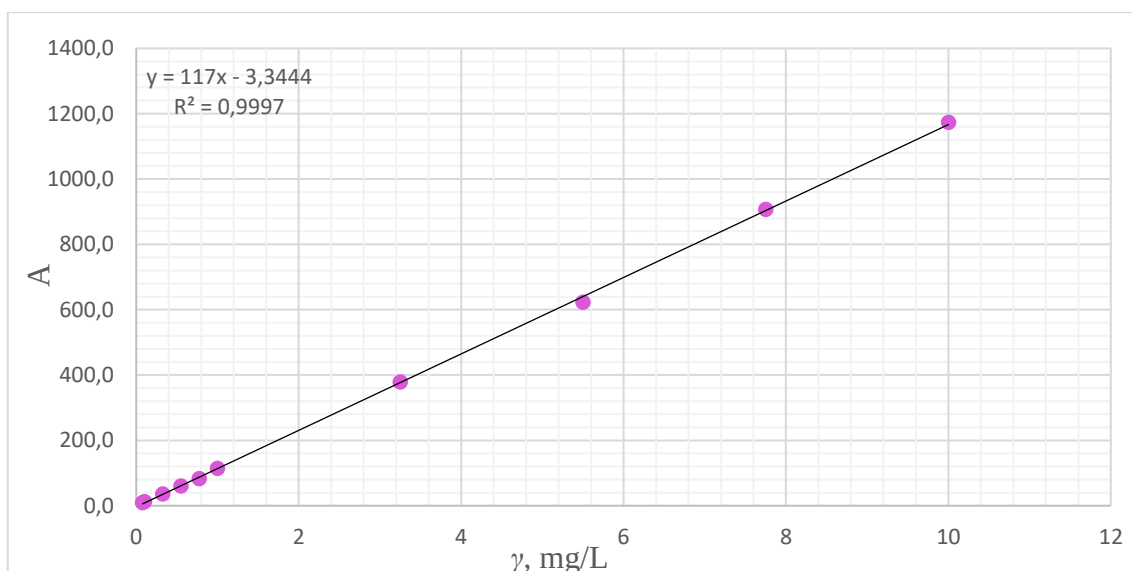
Slika 53. Kalibracijski pravac za NDBA u koncentracijskom rasponu 0,0775 - 10 mg L⁻¹

Za NPIP nije uočen pik za koncentraciju 0,01 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0325 - 10 mg L⁻¹ (Slika 54.). Jednadžba pravca NPIP glasi: $A = 229,62 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 8,926$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9999.



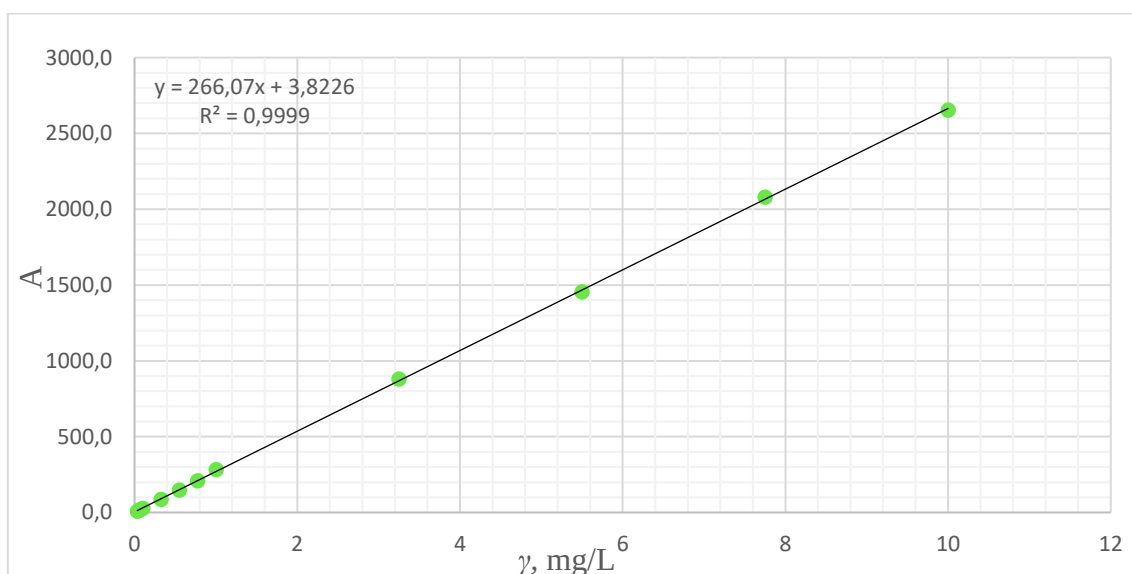
Slika 54. Kalibracijski pravac za NPIP u koncentracijskom rasponu 0,0325 - 10 mg L⁻¹

Za NDPhA nisu uočeni pikovi pri koncentracijama 0,01; 0,0325 i 0,0550 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0775 - 10 mg L⁻¹ (Slika 55.). Jednadžba pravca NDPhA glasi: $A = 117 \text{ L mg}^{-1} \gamma - 3,3444$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9997.



Slika 55. Kalibracijski pravac za NDPhA u koncentracijskom rasponu 0,0775 - 10 mg L⁻¹

Za NDMA nije uočen pik za koncentraciju 0,01 mg L⁻¹ te je stoga kalibracijski pravac za određivanje linearnosti konstruiran u rasponu od 0,0325 - 10 mg L⁻¹ (Slika 56.). Jednadžba pravca NDMA glasi: $A = 266,07 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 3,8226$, dok koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9999.



Slika 56. Kalibracijski pravac za NDMA u koncentracijskom rasponu 0,0325 - 10 mg L⁻¹

Tablica 14. prikazuje sažetak rezultata za određivanje linearnosti svih osam *N*-nitrozamina u smjesi.

Tablica 14. Rezultati linearnosti svih *N*-nitrozamina

Uzorak	Raspon koncentracija, mg L ⁻¹	Jednadžba pravca	R^2
NDPA	0,055 – 10	$A = 107,72 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 8,5657$	0,9997
NPYR	0,01 – 10	$A = 1735,9 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 140,61$	0,9975
NDEA	0,0325 – 10	$A = 160,05 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 3,2528$	0,9999
NMOR	0,0775 – 10	$A = 139,82 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 14,301$	0,9978
NDBA	0,0775 – 10	$A = 79,53 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 0,994$	0,9994
NPIP	0,0325 – 10	$A = 229,62 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 8,926$	0,9999
NDPhA	0,0775 – 10	$A = 117 \text{ L mg}^{-1} \gamma - 3,3444$	0,9997
NDMA	0,0325 – 10	$A = 226,07 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 3,8226$	0,9999

Iz dobivenih rezultata uočljivo je da dobiveni koeficijenti determinacije (R^2) za sve *N*-nitrozamine zadovoljavaju definirani kriterij prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,995$). Najveće vrijednosti koeficijenta determinacije određene su za NDEA, NPIP i NDMA pri čemu iznose 0,9999, dok je s druge strane najmanja vrijednost koeficijenta determinacije određena za NPYR pri čemu iznosi 0,9975. Također, regresijskom analizom dobivene su i vrijednosti jednadžbe pravca svih ispitivanih *N*-nitrozamina u njihovom koncentracijskom području. Iz nagiba pravca, koji direktno predstavlja osjetljivost metode, moguće je uočiti kako NPYR posjeduje najveću osjetljivost, dok NDBA posjeduje najmanju osjetljivost metode. Promatranjem koncentracijskih raspona za svaki *N*-nitrozamin uočava se kako je linearnost NPYR-a u najvećem koncentracijskom rasponu i to 0,01 - 10 mg L⁻¹, dok je kod NMOR, NDBA i NDPhA koncentracijski raspon najmanji i to 0,0775 - 10 mg L⁻¹.

4.2.3. Ponovljivost

Preciznost je iskazana kao ponovljivost i međupreciznost. Ponovljivost je određena ispitivanjem pet otopina koncentracija $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} u MilliQ vodi te su dobiveni podaci za ponovljivost mjerenja prikazani u Tablicama 15 - 22. Rezultati određivanja ponovljivosti sumarno su prikazani u Tablici 23.

Tablica 15. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDPA

NDPA			
Broj mjerenja	$A,$ $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$	$A,$ 1 mg L^{-1}	$A,$ 10 mg L^{-1}
1.	14,0	110,8	1021,0
2.	13,9	110,2	1019,6
3.	14,9	109,7	1025,1
4.	12,8	110,7	1018,3
5.	14,7	114,5	1023,4

Tablica 16. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NPYR

NPYR			
Broj mjerenja	$A,$ $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$	$A,$ 1 mg L^{-1}	$A,$ 10 mg L^{-1}
1.	148,8	1995,5	16441,1
2.	150,2	2041,9	16546,6
3.	148,1	2032,7	16783,6
4.	156,8	2003,3	16596,2
5.	149,9	2000,7	16635,1

Tablica 17. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDEA

NDEA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	12,5	163,0	1580,8
2.	12,7	164,0	1579,6
3.	12,1	163,1	1578,5
4.	12,3	162,3	1580,5
5.	12,4	163,8	1577,2

Tablica 18. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NMOR

NMOR			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	16,5	142,8	1429,9
2.	13,8	142,0	1385,5
3.	14,2	126,7	1423,8
4.	13,9	147,7	1353,0
5.	14,5	139,3	1416,1

Tablica 19. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDBA

NDBA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	9,8	71,9	704,1
2.	9,6	68,5	702,9
3.	8,4	70,0	699,2
4.	8,7	69,0	696,3
5.	7,7	70,6	697,3

Tablica 20. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NPIP

NPIP			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	29,9	243,5	2289,5
2.	27,6	243,7	2292,7
3.	29,6	244,4	2292,8
4.	28,8	242,6	2299,6
5.	27,5	242,5	2289,5

Tablica 21. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDPhA

NDPhA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	11,0	105,4	1156,4
2.	10,6	106,5	1149,0
3.	9,7	107,9	1151,2
4.	9,5	109,5	1149,2
5.	10,5	106,4	1146,9

Tablica 22. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDMA

NDMA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	21,0	278,6	2645,9
2.	22,8	270,1	2643,9
3.	23,5	276,2	2648,0
4.	23,7	272,4	2650,6
5.	22,2	274,0	2643,9

Tablica 23. Prikaz rezultata ponovljivosti za ispitivane *N*-nitrozamine

Uzorak	γ , mg L ⁻¹	$\bar{x}$	s	RSD, %
NDPA	0,0775	14,06	0,83	5,88
	1	111,18	1,91	1,72
	10	1021,48	2,77	0,27
NPYR	0,0775	150,76	3,81	2,53
	1	2014,82	20,97	1,04
	10	16600,52	125,55	0,76
NDEA	0,0775	12,4	0,25	2,02
	1	163,24	0,68	0,42
	10	1579,32	1,49	0,09
NMOR	0,0775	14,58	1,11	7,60
	1	139,70	7,87	5,64
	10	1401,66	32,11	2,29
NDBA	0,0775	8,84	0,87	9,82
	1	70,00	1,34	1,92
	10	699,96	3,42	0,49
NPIP	0,0775	28,68	1,11	3,86
	1	243,34	0,80	0,33
	10	2292,82	4,12	0,18
NDPhA	0,0775	10,26	0,63	6,19
	1	107,14	1,59	1,49
	10	1150,54	3,61	0,31
NDMA	0,0775	22,64	1,09	4,82
	1	274,26	3,30	1,20
	10	2646,46	2,87	0,11

Za svih osam ispitivanih *N*-nitrozamina zadovoljen je kriterij prihvatljivosti ($RSD \leq 10\%$) za ponovljivost metode. Također, moguće je uočiti kako su za manje vrijednosti koncentracija analita određene veće RSD vrijednosti zbog manje preciznosti metode pri nižim koncentracijama (bliskim koncentraciji kvantifikacije). U konačnici je moguće konstatirati kako je ponovljivost, kao izvedbena karakteristika metode, zadovoljena.

4.2.4. Međupreciznost

Međupreciznost je određena iz površina pikova ispitivanih *N*-nitrozamina pri koncentracijama $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} u dva različita dana pri vremenskom razmaku od pet dana. Postupak određivanja međupreciznosti je jednak onome za određivanje ponovljivosti. Podaci dobiveni za određivanje ponovljivosti mjerenja za drugi dan prikazani u Tablicama 24 - 31., dok su rezultati određivanja ponovljivosti za drugi dan prikazani su u Tablici 32.

Tablica 24. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDPA, drugi dan

NDPA			
Broj mjerenja	A, $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$	A, 1 mg L^{-1}	A, 10 mg L^{-1}
1.	15,4	107,5	1000,4
2.	14,0	115,9	1005,0
3.	13,8	106,9	1006,1
4.	13,8	109,0	999,8
5.	14,5	107,3	998,1

Tablica 25. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NPYR, drugi dan

NPYR			
Broj mjerjenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	154,0	1993,1	16408,2
2.	149,3	1990,9	16883,0
3.	152,0	1984,9	16704,4
4.	151,3	1987,5	16971,9
5.	150,1	1990,6	16454,1

Tablica 26. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDEA, drugi dan

NDEA			
Broj mjerjenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	12,3	161,7	1566,0
2.	12,5	163,7	1569,1
3.	12,0	162,7	1562,4
4.	13,4	161,8	1565,4
5.	11,4	160,7	1557,1

Tablica 27. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NMOR, drugi dan

NMOR			
Broj mjerjenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	14,3	142,9	1429,8
2.	13,9	157,5	1415,2
3.	15,1	145,6	1404,2
4.	14,7	143,5	1406,9
5.	14,6	140,7	1380,2

Tablica 28. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDBA, drugi dan

NDBA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	9,7	65,0	666,2
2.	8,5	64,8	664,4
3.	9,0	63,6	662,1
4.	8,9	66,1	664,3
5.	9,2	62,3	664,3

Tablica 29. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NPIP, drugi dan

NPIP			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	29,2	242,1	2283,7
2.	29,2	241,2	2292,1
3.	28,2	242,2	2282,1
4.	28,6	241,1	2283,1
5.	26,5	241,1	2264,7

Tablica 30. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDPhA, drugi dan

NDPhA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	10,3	104,6	1141,7
2.	8,6	103,3	1143,4
3.	10,1	101,8	1140,2
4.	10,2	101,0	1141,9
5.	9,3	105,9	1147,8

Tablica 31. Površine kromatografskih pikova za određivanje ponovljivosti mjerenja za NDMA, drugi dan

NDMA			
Broj mjerenja	A, 0,0775 mg L ⁻¹	A, 1 mg L ⁻¹	A, 10 mg L ⁻¹
1.	21,7	287,2	2641,3
2.	22,2	285,6	2648,9
3.	21,0	286,3	2641,0
4.	24,3	278,8	2659,4
5.	24,2	284,4	2649,9

Tablica 32. Prikaz rezultata ponovljivosti za ispitivane *N*-nitrozamine, drugi dan

Uzorak	γ , mg L ⁻¹	$\bar{x}$	s	RSD, %
NDPA	0,0775	14,30	0,68	4,74
	1	109,32	3,76	3,44
	10	1001,88	3,48	0,35
NPYR	0,0775	151,34	1,82	1,20
	1	1989,40	3,21	0,16
	10	16684,32	250,91	1,50
NDEA	0,0775	12,32	0,73	5,95
	1	162,12	1,13	0,70
	10	1564,00	4,53	0,29
NMOR	0,0775	14,52	0,45	3,10
	1	146,06	6,64	4,55
	10	1407,26	18,12	1,29
NDBA	0,0775	9,06	0,44	4,85
	1	64,36	1,45	2,26
	10	664,26	1,45	0,22
NPIP	0,0775	28,34	1,11	3,93
	1	241,54	0,56	0,23
	10	2281,14	10,02	0,44
NDPhA	0,0775	9,70	0,73	7,54
	1	103,32	2,00	1,94
	10	1143,00	2,91	0,25
NDMA	0,0775	22,78	1,50	6,59
	1	284,46	3,33	1,17
	10	2648,10	7,55	0,29

Kako bi se odredila međupreciznost, odnosno vrijednost relativnog standardnog odstupanja izraženog u postocima, u izračun su obuhvaćeni mjerni podaci za ponovljivost metode prvog i drugog dana zajedno (Tablica 33.).

Tablica 33. Izračunate RSD vrijednosti za određivanje međupreciznosti mjerenja za oba dana

Uzorak	γ , mg L ⁻¹	s	RSD, %
NDPA	0,0775	0,72	5,10
	1	2,98	2,70
	10	10,75	1,06
NPYR	0,0775	2,64	1,74
	1	19,48	0,97
	10	192,19	1,15
NDEA	0,0775	0,51	4,15
	1	1,06	0,65
	10	8,68	0,55
NMOR	0,0775	0,80	5,48
	1	7,64	5,35
	10	24,76	1,76
NDBA	0,0775	0,66	7,36
	1	3,25	4,84
	10	18,98	2,78
NPIP	0,0775	1,06	3,72
	1	1,15	0,47
	10	9,49	0,42
NDPhA	0,0775	0,71	7,11
	1	2,64	2,51
	10	5,04	0,44
NDMA	0,0775	1,23	5,45
	1	6,22	2,23
	10	5,46	0,21

Određivanjem RSD vrijednosti, uočavamo kako su manje vrijednosti ponovno očekivano postignute pri višim koncentracijama. Uzimajući u obzir postavljeni kriterij ($10 \% \leq \text{RSD}$) za određivanje međupreciznosti, uočavamo kako je on zadovoljen za sva mjerenja te je moguće zaključiti kako je izvedbena karakteristika zadovoljena.

4.2.5. Istinitost

Istinitost dobivenih rezultata se kvantitativno određuje kao odstupanje srednje izmjerene koncentracije od njezine prave vrijednosti ili pak kao iskorištenje. Za određivanje istinitosti obuhvaćene su tri koncentracije unutar linearnog područja: $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} .

Za određivanje istinitosti uzete su srednje vrijednosti površina ponovljenih mjerenja (Tablica 23.), nakon čega su iz dobivene linearnosti (jednadžbe pravca) određene njihove koncentracije te je izračunato njihovo iskorištenje prema izrazu (8).

U Tablici 34. su prikazane dobivene vrijednosti iskorištenja.

Tablica 34. Prikaz dobivenih rezultata istinitosti (iskorištenja) za ispitivane *N*-nitrozamine

Uzorak	γ , mg L ⁻¹	$\bar{\gamma}$, mg L ⁻¹	Iskorištenje, %
NDPA	0,0775	0,05	64,52
	1	0,95	95,00
	10	9,40	94,00
NPYR	0,0775	0,01	12,90
	1	1,08	108,00
	10	9,48	94,80
NDEA	0,0775	0,06	77,42
	1	1,00	100,00
	10	9,85	98,50
NMOR	0,0775	0,002	2,58
	1	0,90	90,00
	10	9,92	99,20
NDBA	0,0775	0,10	129,03
	1	0,87	87,00
	10	8,79	87,90
NPIP	0,0775	0,09	116,13
	1	1,02	102,00
	10	9,95	99,50
NDPhA	0,0775	0,12	154,84
	1	0,94	94,00
	10	9,86	98,60
NDMA	0,0775	0,08	103,22
	1	1,20	120,00
	10	11,69	116,90

Promatrajući dobivene rezultate iskorištenja za koncentracije 0,0775 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹ uočavamo kako je zadovoljen kriterij prihvatljivosti (80 - 120 %) za sve *N*-nitrozamine pri 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹, dok su značajna odstupanja prisutna pri koncentraciji 0,0775 mg L⁻¹. Pri koncentraciji 0,0775 mg L⁻¹ uočavamo veća odstupanja od koncentracije analita u standardnoj otopini, pri čemu je kriterij prihvatljivosti iskorištenja zadovoljen samo

za NPIP i NDMA. Promatrajući vrijednosti iskorištenja za koncentracije 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} uočavamo kako svi *N*-nitrozamini zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za zadovoljavanje istinitosti kao izvedbene karakteristike metode. Stoga, možemo reći kako je zadovoljena istinitost metode za sve *N*-nitrozamine pri vrijednosti koncentracije veće od 1 mg L^{-1} . Uzimajući u obzir vrijednosti rezultata za koncentraciju $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$ uočavamo da dolazi do većih odstupanja vrijednosti iskorištenja, pri čemu kriterij prihvatljivosti zadovoljavaju samo NPIP i NDMA. Možemo stoga zaključiti za sve tri ispitivane koncentracije kako svi uzorci pri 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za istinitost metode, dok pri koncentraciji $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$ zadovoljavaju samo NPIP i NDMA.

4.2.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (GD) predstavlja najnižu koncentraciju koju je moguće detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti. Granica detekcije izračunata je prema izrazu (9).

Granica kvantifikacije (GK) predstavlja najnižu koncentraciju koju je s određenom preciznošću moguće kvantitativno odrediti. Granica kvantifikacije izračunata je prema izrazu (10).

Računski određene granice detekcije i granice kvantifikacije za svih osam ispitivanih *N*-nitrozamina u MilliQ vodi nalaze se u Tablici 35.

Tablica 35. Vrijednosti računski dobivenih granica detekcije i granica kvantifikacije ispitivanih *N*-nitrozamina

Uzorak	s	<i>b</i> , L mg ⁻¹	GK, μg L ⁻¹	GD, μg L ⁻¹
NDPA	0,83	107,72	25,43	77,05
NPYR	3,81	1735,90	7,24	21,95
NDEA	0,25	160,05	5,15	15,62
NMOR	1,11	139,82	26,20	79,39
NDBA	0,87	79,53	35,96	108,98
NPIP	1,11	229,62	15,95	48,34
NDPhA	0,63	117,00	17,77	53,85
NDMA	1,09	226,07	15,91	48,22

Vrijednosti standardnog odstupanja ponovljivosti mjerenja određene su pri 0,0775 mg L⁻¹ za određivanje ponovljivosti metode, dok je vrijednost nagiba kalibracijskog pravca (*b*) dobivena određivanjem linearnosti metode.

Iz dobivenih rezultata uočavamo kako su računski najniže granice detekcije i kvantifikacije određene za NDEA, što znači da će se u smjesi svih *N*-nitrozamina moći detektirati i kvantificirati pri najnižoj koncentraciji. S druge strane, za NDBA su određene najveće granice detekcije i kvantifikacije što nam govori kako će se u smjesi svih *N*-nitrozamina detektirati i kvantificirati tek pri višim koncentracijama.

Osim računski dobivenih granica kvantifikacije, određene su i eksperimentalno potvrđene granice kvantifikacije pri kojima su zadovoljeni kriteriji izvedbenih karakteristika metode. Dobivene vrijednosti predstavljaju najniže vrijednosti koncentracija kalibracijskog pravca. Eksperimentalno određene granice kvantifikacije prikazane su u Tablici 36.

Tablica 36. Eksperimentalno određene granice kvantifikacije

<i>N</i> -nitrozamin	NDPA	NPYR	NDEA	NMOR	NDBA	NPIP	NDPhA	NDMA
Granica kvantifikacije, mg L ⁻¹	0,0550	0,01	0,0325	0,0775	0,0775	0,0325	0,0775	0,0325

4.2.7. Radno područje

Radno područje metode predstavlja interval između donje i gornje koncentracijske granice ispitivanog analita. Granice predstavljaju vrijednosti unutar kojih je potvrđena linearnost te se analit može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću istinitosti i preciznosti. Donja granica predstavlja granicu kvantifikacije analita, dok gornja granica predstavlja najveću vrijednost koncentracije kalibracijskog pravca.

Vrijednosti donje i gornje koncentracije ispitivanih *N*-nitrozamina tj. njihovo radno područje nalaze se u Tablici 37.

Tablica 37. Radno područje ispitivanih *N*-nitrozamina

Uzorak	Donja granica, mg L ⁻¹	Gornja granica, mg L ⁻¹
NDPA	0,0550	10
NPYR	0,01	10
NDEA	0,0325	10
NMOR	0,0775	10
NDBA	0,0775	10
NPIP	0,0325	10
NDPhA	0,0775	10
NDMA	0,0325	10

4.3. Sažetak rezultata

Tablica 38. Sažetak rezultata validacije HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina

Izvedbena značajka	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati	Zadovoljava kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	Nisu prisutni interferirajući pikovi	<i>Slike 46. - 48.</i>	DA
Linearnost	$R^2 \geq 0,995$	0,9997 (NDPA); 0,9975 (NPYR); 0,9999 (NDEA); 0,9978 (NMOR); 0,9994 (NDBA); 0,9999 (NPIP); 0,9997 (NDPhA); 0,9999 (NDMA)	DA
Preciznost			
Ponovljivost	$RSD \leq 10 \%$	<i>Tablica 23.</i>	DA
Međupreciznost	$RSD \leq 10 \%$	<i>Tablica 33.</i>	DA
Istinitost			
Iskorištenje	80 - 120 %	<i>Tablica 34.</i>	DA (Pri 1 i 10 mg L ⁻¹)
Granica detekcije	Informacija	77,05 µg L ⁻¹ (NDPA); 21,95 µg L ⁻¹ (NPYR); 15,62 µg L ⁻¹ (NDEA); 79,39 µg L ⁻¹ (NMOR); 108,98 µg L ⁻¹ (NDBA); 48,34 µg L ⁻¹ (NPIP); 53,85 µg L ⁻¹ (NDPhA); 48,22 µg L ⁻¹ (NDMA)	/
Granica kvantifikacije	Informacija	0,0550 mg L ⁻¹ (NDPA); 0,01 mg L ⁻¹ (NPYR); 0,0325 mg L ⁻¹ (NDEA); 0,0775 mg L ⁻¹ (NMOR); 0,0775 mg L ⁻¹ (NDBA); 0,0325 mg L ⁻¹ (NPIP); 0,0775 mg L ⁻¹ (NDPhA); 0,0325 mg L ⁻¹ (NDMA)	/
Radno područje	Informacija	Donja granica svakog <i>N</i> -nitrozamina jednaka je granici kvantifikacije, dok gornja granica svakog <i>N</i> -nitrozamina iznosi 10 mg L ⁻¹	/

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem uspješno je razvijena brza metoda za određivanje osam *N*-nitrozamina u vodi pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda. Kao pokretna faza najbolje se pokazala kombinacija otapala koju čine MilliQ voda i acetonitril, no veliki potencijal su također pokazali etanol i metanol u kombinaciji s MilliQ vodom. Kako bi se odredila primjenjivost ove metode, provedena je i njezina validacija uz odgovarajuće kriterije prihvatljivosti. Iz dobivenih rezultata zaključuje se:

- Metoda je selektivna za određivanje svih osam *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi.
- S obzirom na kriterij prihvatljivosti linearnosti ($R^2 \geq 0,995$), potvrđena je linearnost metode za svih osam ispitivanih *N*-nitrozamina te zaključujemo da je površina pikova iz dobivenih kromatograma za svaki spoj direktno proporcionalna njegovoj koncentraciji.
- Temeljem rezultata ispitivanja zaključujemo kako su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti izvedbenih karakteristika ponovljivosti i međupreciznosti ($RSD \leq 10 \%$) te da je preciznost razvijene metode zadovoljavajuća.
- Potvrđena je istinitost metode za svih osam *N*-nitrozamina za koncentracije veće od 1 mg L^{-1} , dok je pri $0,0775 \text{ mg L}^{-1}$ istinitost metode zadovoljena samo za dva *N*-nitrozamina i to NPIP i NDMA.
- Eksperimentalno i računski su uspješno određene i granice detekcije te granice kvantifikacije za sve ispitivane *N*-nitrozamine.
- Uspješno je definirano i radno područje za ispitivane *N*-nitrozamine pri čemu je donju granicu odredila eksperimentalno određena granica kvantifikacije, dok gornja granica za svaki spoj iznosi 10 mg L^{-1} .

U konačnici možemo zaključiti kako je razvijena HPLC-DAD metoda uspješna za određivanje svih osam *N*-nitrozamina u vodi te je validacijom potvrđena njezina primjenjivost za njihovo određivanje s obzirom da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za svaku ispitivanu izvedbenu karakteristiku metode.

6. LITERATURA

- [1] A. F. Gilca, C. Teodosiu, S. Fiore, and C. P. Musteret, Emerging disinfection byproducts: A review on their occurrence and control in drinking water treatment processes, *Chemosphere* 259 (2020) 1-17.
- [2] N. Chaukura, S. S. Marais, W. Moyo, N. Mbali, L. C. Thakalekoala, T. Ingwani, B. B. Mamba, P. Jarvis, T. T. I. Nkambule, Contemporary issues on the occurrence and removal of disinfection byproducts in drinking water - A review, *J. Environ. Chem. Eng.* 8 (2020) 1-14.
- [3] N. T. Crosby and R. Sawyer, *N-Nitrosamines: A Review of Chemical and Biological Properties and Their Estimation in Foodstuffs*, *Advances in food research* 22 (1976) 1-71.
- [4] K. A. Rostkowska, K. Zwierz, A. Róžański, J. Moniuszko-Jakoniuk, A. Roszczenko, Formation and metabolism of *N*-nitrosamines, *Pol. J. Environ. Stud.* 7 (1998) 321-325.
- [5] <https://www.eurofins.co.jp/eurofins-biopharma-product-testing-kyoto/services/impurity-testing/nitrosamine-testing/> (Pristup 03.05.2023.)
- [6] J. L. Brown, *N-Nitrosamines*, *Occup. Med.* 14 (1999) 839-848.
- [7] S. Morović, K. Košutić, B. Babić, and D. Ašperger, Sudbina *N*-nitrozamina u okolišu i primjenljivi postupci njihovog uklanjanja iz voda, *Hrvatske vode* 29 (2021) 175-186.
- [8] N. Omerdić, Stručni prikaz: Kloriranje vode, *Hrvatske vode* 29 (2021) 133-138.
- [9] Y. Du, X. T. Lv, Q. Y. Wu, D. Y. Zhang, Y. T. Zhou, L. Peng, H. Y. Hu, Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review, *Journal of Environmental Sciences* 58 (2017) 51-63.
- [10] J. Nawrocki, P. Andrzejewski, Nitrosamines and water, *J. Hazard Mater* 189 (2011) 1-18.
- [11] Z. Chen, L. Yang, Y. Huang, P. Spencer, W. Zheng, Y. Zhou, S. Jiang, W. Ye, Y. Zheng, W. Qu, Carcinogenic risk of *N*-Nitrosamines in Shanghai Drinking Water: Indications for the Use of Ozone Pretreatment, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 7007-7018.
- [12] Y. Yang, Z. Zheng, D. Zhang, C. Zhou, and X. Zhang, Ultrasonic degradation of nitrosodipropylamine (NDPA) and nitrosodibutylamine (NDBA) in water, *Environmental Science and Pollution Research* 27 (2020) 29143-29155.

- [13] Y. Kadmi, L. Favier, and D. Wolbert, *N*-nitrosamines, emerging disinfection by-products of health concern: an overview of occurrence, mechanisms of formation, control and analysis in water, *Water Supply* 15 (2015) 11-25.
- [14] S. W. Krasner, W. A. Mitch, D. L. McCurry, D. Hanigan, P. Westerhoff, Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: A review, *Water Res.* 47 (2013) 4433-4450.
- [15] A. D. Shah, W. A. Mitch, Halonitroalkanes, Halonitriles, Haloamides, and *N*-Nitrosamines: A Critical Review of Nitrogenous Disinfection Byproduct Formation Pathways, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 119-131.
- [16] T. Zeng, C. M. Glover, E. J. Marti, G. C. Woods-Chabane, T. Karanfil, W. A. Mitch, E. R. V. Dickenson, Relative Importance of Different Water Categories as Sources of *N*-Nitrosamine Precursors, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 13239-13248.
- [17] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities> (Pristup 05.05.2023.)
- [18] J. C. Beard, T. M. Swager, An Organic Chemist's Guide to *N*-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants, *J. Org. Chem.* 86 (2021) 2037-2057.
- [19] <https://www.efsa.europa.eu/en/news/nitrosamines-food-raise-health-concern> (Pristup 05.05.2023.)
- [20] Y. Li, S. S. Hecht, Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic *N*-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 4559-4606.
- [21] A. R. Tricker, R. Preussmann, Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential, *Mutation Research/Genetic Toxicology* 259 (1991) 277-289.
- [22] X. Chen, G. Huang, C. An, Y. Yao, S. Zhao, Emerging *N*-nitrosamines and *N*-nitramines from amine-based post-combustion CO₂ capture - A review, *Chemical Engineering Journal* 335 (2018) 921-935.
- [23] Y. Liu, X. Guo, Z. Wang, Q. Zhang, Q. Ma, Q. Lv, Research progress of *N*-nitrosamine detection methods: a review, *Bioanalysis* 14 (2022) 1123-1135.

- [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- 415.
- [25] Q. Wu, H. Shi, Y. Ma, C. Adams, H. Jiang, J. Wang, T. Eichholz, T. Timmons, Removal of N-nitrosamine precursors in drinking water system using adsorption methods, Sep. Purif. Technol. 156 (2015) 972-979.
- [26] H. Takeuchi, N. Yamashita, N. Nakada, H. Tanaka, Removal Characteristics of N-Nitrosamines and Their Precursors by Pilot-Scale Integrated Membrane Systems for Water Reuse, Int. J. Environ. Res. Public Health 15 (2018) 1960-1976.
- [27] W. Beita-Sandí, M. S. Ersan, H. Uzun, T. Karanfil, Removal of N-nitrosodimethylamine precursors with powdered activated carbon adsorption, Water Res. 88 (2016) 711-718.
- [28] <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications> (Pristup 28.05.2023.)
- [29] A. Abdu Hussen, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review, Annals of Advances in Chemistry 6 (2022) 10-20.
- [30] R. Malviya, V. Bansal, O. Pal, P. Sharma, High performance liquid chromatography: A short review, Journal of Global Pharma Technology 2 (2010) 22-26.
- [31] <https://cen.acs.org/articles/94/i24/50-years-HPLC.html> (Pristup 09.05.2023.)
- [32] <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/need-help-solving-homework-questions-related-analytical-chemistry-choices-second-image-100-q73771678> (Pristup 09.05.2023.)
- [33] <https://laboratoryinfo.com/hplc/> (Pristup 10.05.2023.)
- [34] <https://chemistnotes.com/organic/high-pressure-liquid-chromatography-hplc-principle-instruments-and-applications/> (Pristup 10.05.2023.)
- [35] <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/main-hplc-components.html> (Pristup 10.05.2023.)
- [36] <https://whatishplc.com/hplc/hplc-column/> (Pristup 11.05.2023.)
- [37] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Zagreb (2003), 217-279.

- [38] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography) (Pristup 11.05.2023.)
- [39] R. Sankar, Fundamental Chromatographic Parameters, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 55 (2020) 46-50.
- [40] A. Sunil, HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review, Organic & Medicinal Chemistry International Journal 6 (2018) 1-4.
- [41] <https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever> (Pristup 13.05.2023.)
- [42] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda - osnovna načela, Svijet po mjeri 1 (2012) 61-64.
- [43] A. Badr, Validation of an Analytical Procedure, u: Y. Shoyama (ur.), Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, InTech, Hrvatska, 2011, str. 17-24.
- [44] P. Konieczka, The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System, Crit. Rev. Anal. Chem. 37 (2007) 173-190.
- [45] The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem, 2014, str. 30-34.
- [46] <https://illustrationprize.com/hr/370-accuracy-amp-precision.html> (Pristup 14.05.2023.)
- [47] <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/limit-of-detection-quantification> (Pristup 14.05.2023.)
- [48] <https://www.linkedin.com/pulse/limit-detection-quantitation-lod-loq-muhammad-aazim-khan> (Pristup 02.06.2023.)
- [49] H. Takeuchi, N. Yamashita, N. Nakada, and H. Tanaka, Removal Characteristics of *N*-Nitrosamines and Their Precursors by Pilot-Scale Integrated Membrane Systems for Water Reuse, Int. J. Environ. Res. Public Health 15 (2018) 1960-1976.
- [50] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodipropylamine> (Pristup 19.05.2023.)
- [51] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosopiperidine> (Pristup 19.05.2023.)

- [52] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5921> (Pristup 19.05.2023.)
- [53] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosomorpholine>
(Pristup 19.05.2023.)
- [54] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodibutylamine>
(Pristup 19.05.2023.)
- [55] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosopiperidine> (Pristup 19.05.2023.)
- [56] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodiphenylamine>
(Pristup 19.05.2023.)
- [57] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodimethylamine>
(Pristup 19.05.2023.)
- [58] <https://www.apswater.com/article.asp?id=335&title=What+is+Milli%2DQ+Water>
(Pristup 23.05.2023.)
- [59] <https://www.besttechnologyinc.com/faq/degassing-ultrasonic-cleaning-tanks/>
(Pristup 23.05.2023.)
- [60] <https://www.chromatographyonline.com/view/validation-of-stability-indicating-hplc-methods-for-pharmaceuticals-overview-methodologies-and-case-studies> (Pristup 31.05.2023.)

7. ŽIVOTOPIS

Patrik Orešković [REDACTED] 2013. godine završava osnovnu školu dr. Ante Starčevića u Zagrebu te iste godine upisuje jezičnu XVIII. gimnaziju u Zagrebu. Po završetku srednje škole 2017. godine te uspješnim polaganjem državne mature upisuje preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradio je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za fizičku kemiju, Laboratorij za održivu i primijenjenu kemiju. Koautor je znanstvenog članka *"Scale-Up of Agrochemical Urea-Gypsum Cocrystal Synthesis Using Thermally Controlled Mechanochemistry"* objavljenog u časopisu ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2022., na kojem je radio tijekom odrađivanja stručne prakse. Završni rad pod nazivom *"Spektrofotometrijsko određivanje konstante disocijacije"* izradio je na Zavodu za analitičku kemiju te je 2021. njegovom obranom završio preddiplomski studij Kemije i inženjerstva materijala. Iste godine upisuje diplomski studij Kemije i inženjerstva materijala na istoimenom fakultetu. Od 2021. do 2023. godine radio je kao demonstrator na vježbama iz Kemijske analize materijala na Zavodu za analitičku kemiju. Također, koautor je i znanstvenog rada *"Priprava i karakterizacija hidrogelova iz izvanstanične matrice svinjske jetre za 3D tisak u tkivnom inženjerstvu"* koji je u akademskoj godini 2022./23. prijavljen za dodjelu Rektorove nagrade. Od stranih jezika govori engleski i španjolski jezik.