

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje nitrozo-spojeva

Golub, Valentino

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:149:520708>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Valentino Golub

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Valentino Golub

**RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRAFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE NITROZO-SPOJEVA**

DIPLOMSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Krešimir Košutić

Zagreb, rujan 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pruženoj prilici, detaljnim uputama, prenesenom znanju te strpljenju prilikom izrade diplomskoga rada.

Zahvaljujem mag. appl. chem. Kristini Tolić Čop na pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada, otklanjanju problema pri radu na HPLC-DAD sustavu, savjetima te prenesenom znanju.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na pomoći pri radu na instrumentu za ekstrakciju čvrstom fazom.

Zahvaljujem tehničarkama Tanji Ivančić i Slavici Kos na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, susretljivosti te ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebice zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci tijekom preddiplomskog i diplomskog studija.

Sažetak

U ovom radu razvijena je SPE-HPLC-DAD metoda za određivanje pet *N*-nitrozamina u vodi: *N*-nitrozodietilamina (NDEA), *N*-nitrozodipropilamina (NDPA), *N*-nitrozodibutilamina (NDBA), *N*-nitrozopirolidina (NPYR) i *N*-nitrozomorfolina (NMOR). Za pripremu uzorka vode primijenjena je ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) uz korištenje sorbensa od kokosovog ugljena. Uspješna kromatografska separacija svih pet analita postignuta je na Kinetex 5 μm C₁₈ koloni 100 Å, 150 x 4,6 mm, uz pokretnu fazu sastavljenu od MilliQ vode i acetonitrila te gradijentno eluiranje pri protoku 0,5 mL min⁻¹. Razvijena SPE-HPLC-DAD metoda je validirana pri čemu su ispitane sljedeće izvedbene karakteristike: selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije te točnost kroz istinitost i preciznost. Postignuta je dobra linearnost uz koeficijente korelacije veće od 0,99, dobra preciznost uz RSD < 10 % te dobro iskorištenje unutar raspona 70 – 120 % za sve ispitivane analite. Metoda je uspješno primijenjena u analizi uzoraka tijekom reverzno osmotske membranske separacije: ulazne otopine, permeata i retentata.

Ključne riječi: *N*-nitrozamini, voda, SPE-HPLC-DAD, validacija metode

Summary

In this work, a SPE-HPLC-DAD method was developed for the determination of five *N*-nitrosamines in water: *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) and *N*-nitrosomorpholine (NMOR). For the preparation of the water sample, solid phase extraction (SPE) was applied with the use of coconut charcoal sorbent. Successful chromatographic separation of all five analytes was achieved on a Kinetex 5 μm C₁₈ column 100 Å, 150 x 4.6 mm, with a mobile phase composed of MilliQ water and acetonitrile and gradient elution at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The developed SPE-HPLC-DAD method was validated by testing the following performance characteristics: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, and accuracy through trueness and precision. Good linearity with correlation coefficients higher than 0.99, good precision with RSD < 10% and good extraction recovery within the range of 70-120% for all analyzed analytes was achieved. The method was successfully applied in the analysis of samples during reverse osmosis membrane separation: feed solution and permeate and retentate.

Keywords: *N*-nitrosamines, water, SPE-HPLC-DAD, method validation

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. <i>N</i> -nitrozamini	2
2.1.1. <i>N</i> -nitrozamini u hrani	3
2.1.2. Formiranje <i>N</i> -nitrozamina.....	6
2.1.3. Detekcija <i>N</i> -nitrozamina.....	7
2.1.4. <i>N</i> -nitrozamini u vodi	10
2.1.5. <i>N</i> -nitrozamini u lijekovima	16
2.2. Tekućinska kromatografija	19
2.2.1. Zadržavanje.....	20
2.2.2. Širenje zone pika.....	22
2.2.3. Izokratno i gradijentno eluiranje.....	24
2.2.4. Van Deemterova jednađba	25
2.2.5. HPLC	26
2.2.6. Detektori	27
2.3. Validacija analitičkih metoda	29
3. Eksperimentalni dio	31
3.1. Materijali.....	31
3.1.1. Kemikalije.....	31
3.1.2. <i>N</i> -nitrozamini	31
3.1.3. Uzorci vode.....	32
3.1.4. Kromatografske kolone.....	33
3.1.5. SPE kolone i eluensi	33
3.2. Instrumenti	34
3.2.1. Analitička vaga	34
3.2.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom.....	35
3.2.3. Ekstrakcija čvrstom fazom.....	36
3.3. Metode rada	37
3.3.1. Priprema temeljnih standardnih otopina (TSO) u MilliQ vodi.....	37
3.3.2. Priprema standardnih otopina u MilliQ vodi za provjeru linearnosti HPLC-DAD metode.....	37
3.3.3. Priprema standardnih otopina u MilliQ vodi za provjeru preciznosti HPLC-DAD metode.....	38

3.3.4. Priprema standardnih otopina u MilliQ, vodovodnoj vodi i vodovodnoj vodi s Na ₂ S ₂ O ₃ za provjeru istinitosti i ponovljivosti injektiranja HPLC-DAD metode	39
3.3.5. Statistička obrada rezultata	39
4. Rezultati i rasprava	41
4.1. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode	41
4.2. Validacija HPLC-DAD metode za određivanje <i>N</i> -nitrozamina u MilliQ vodi	44
4.3. Razvoj SPE metode	56
4.3.1. SPE postupci	56
4.4. Validacija SPE-HPLC-DAD metode za određivanje <i>N</i> -nitrozamina u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi	59
4.5. Sažetak rezultata	66
4.6. Analiza realnih uzoraka HPLC-DAD metodom.....	67
5. Zaključak	71
6. Popis simbola	72
7. Literatura	77
8. Prilozi.....	83

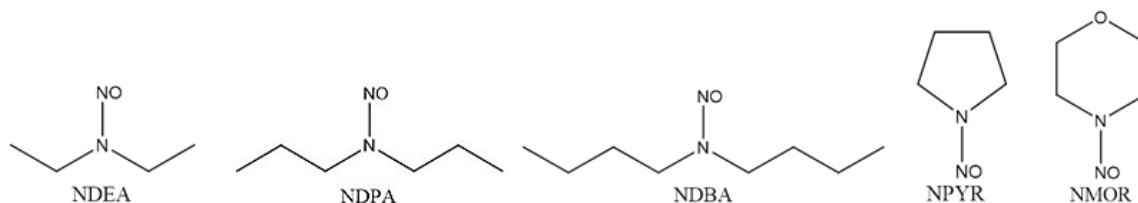
1. Uvod

Zbog vjerojatne kancerogenosti i prisutnosti u hrani, lijekovima te vodi, mnoge farmaceutske i prehrambene kompanije istražuju svojstva *N*-nitrozamina. *N*-nitrozamini su derivati sekundarnih amina, sadrže nitrozo skupinu vezanu za dušik. Prehrana predstavlja glavni izvor *N*-nitrozamina. Čovjek je često izložen niskim razinama *N*-nitrozamina, čime se pojačava kancerogeno djelovanje *N*-nitrozamina. *N*-nitrozamini nastaju reakcijom sekundarnih amina i nitrita u kiselim uvjetima. Nukleofilni anioni kataliziraju formiranje *N*-nitrozamina. Za detekciju i kvantifikaciju *N*-nitrozamina u hrani koriste se tekućinski i plinski kromatografi spregnuti s različitim vrstama detektora. *N*-nitrozamini su dezinfekcijski nusprodukti. Prekursori *N*-nitrozamina u netretiranim vodama predstavljaju najveći problem pri stvaranju *N*-nitrozamina. Potrebno je ukloniti prekursore, kako ne bi nastali *N*-nitrozamini. Metode za određivanje *N*-nitrozamina u vodi većinom se sastoje od ekstrakcije čvrstom fazom, eluiranja s diklormetanom te kromatografskom analizom vezanom s MS/MS detekcijom. *N*-nitrozamini su prisutni u niskim koncentracija i u lijekovima, poput valsartana i losartana. *N*-nitrozamini u lijekovima se određuju plinskom ili tekućinskom kromatografijom vezanom sa spregnutom spektrometrijom masa te tekućinskom kromatografijom vezanom s UV detektorom.

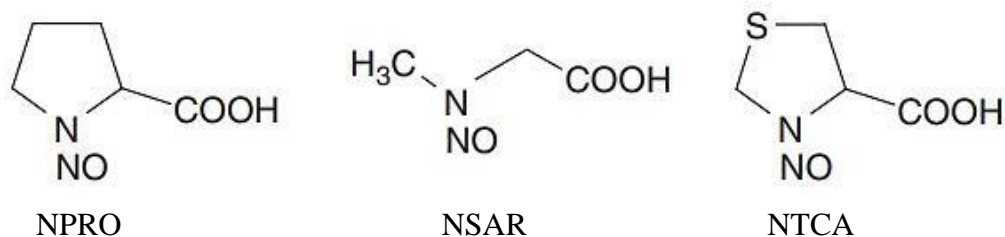
2. Opći dio

2.1. N-nitrozamini

N-nitrozamini su alifatski ili aromatski derivati sekundarnih amina, koji imaju nitrozo skupinu (-NO) vezanu za dušik. Nastaju reakcijom nitrita sa sekundarnim aminima. Također, nitrati mogu stvoriti N-nitrozamine, putem redukcije u nitrite sa slinom ili enzimima u crijevnom traktu. Mnogi N-nitrozamini su izrazito kancerogeni. Oni kontaminiraju određenu hranu, pića i vodu pri niskim razinama. N-nitrozamini niže molarne mase su izvedeni iz alkilnih ili monocikličkih sekundarnih amina. Oni su poznati kao hlapljivi N-nitrozamini (**Slika 1**). Veći i polarniji N-nitrozamini koji se mogu ekstrahirati iz hrane te izmjeriti, poznati su kao nehlapljivi N-nitrozamini. Treća klasa N-nitrozamina je prividni ukupni sadržaj N-nitrozamina (engl. *apparent sum of all N-nitroso compounds*, ATNC), koji je kombinirana mjera hlapljivih i nehlapljivih N-nitrozamina. ATNC uključuje ne identificirane molekule, poput nitrozoiranih proteina koji još nisu izolirani iz hrane. Mjerena vrijednost ATNC često znatno premašuje zbroj identificiranih hlapljivih i ne hlapljivih spojeva. Najvažniji N-nitrozamini su spojevi male molekulske mase, posebice N-nitrozodimetilamin (NDMA). Ostali važniji N-nitrozamini nastali iz sekundarnih amina, koji se najčešće nalaze u hrani su N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozometiletilamin (NMEA), N-nitrozodipropilamin (NDPA), N-nitrozodibutilamin (NDBA), N-nitrozopiperolidin (NPYR) i N-nitrozopiperidin (NPIP). Glavni nehlapljivi N-nitrozamini su nitrozoirane aminokiseline (**Slika 2**). Nitrozoirane aminokiseline uključuju N-nitrozoprolin (NPRO), N-nitrososarkozin (NSAR), N-nitrozotiazolidin-4-karboksilnu kiselinu (NTCA), N-nitrozoooksazolidin-4-karboksilnu kiselinu, N-nitrozo-2-metil-tiazolidin-4-karboksilnu kiselinu. Postoje i važni nitrozoirani produkti industrijskih kemikalija, poput dietanolamina, koji se povezuje s ne prehrambenim proizvodima, kao što je kozmetika [1].



Slika 1. Prikaz struktura hlapljivih N-nitrozamina: NDEA (N-nitrozodietilamin), N-nitrozodipropilamin (NDPA), N-nitrozodibutilamin (NDBA), NPYR (N-nitrozopiperolidin), NMOR (N-nitrozomorfolin) [1]



Slika 2. Prikaz struktura nehlapljivih *N*-nitrozamina: NPRO (*N*-nitrozoprolin), NSAR (*N*-nitrososarkozin), NTCA (*N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilna kiselina) [1]

Toksičnost *N*-nitrozamina je spoznata sredinom 1950-ih, kada je otkriveno da su kune hranjene haringama, koje su bile liječene nitritima, umirale od bolesti jetre. Sekundarni amini prirodno prisutni u ribi su reagirali s nitritom i stvorili NDMA, koji je inducirao karcinom u jetri kune. Navedeno otkriće je dovelo do analize hrane tretirane nitritima na *N*-nitrozamine. Već 1970-ih, detektirane su vrlo niske koncentracije *N*-nitrozamina primjenom plinske kromatografije vezane s analizatorom toplinske energije (engl. *thermal energy analyser*, TEA). Duhan sadrži sekundarne amine, koji nisu prisutni u hrani (nikotin) te uvijek sadrži niske razine produkata nitrozacije, kao što je *N*-nitrozo-*nor*-nikotin [1].

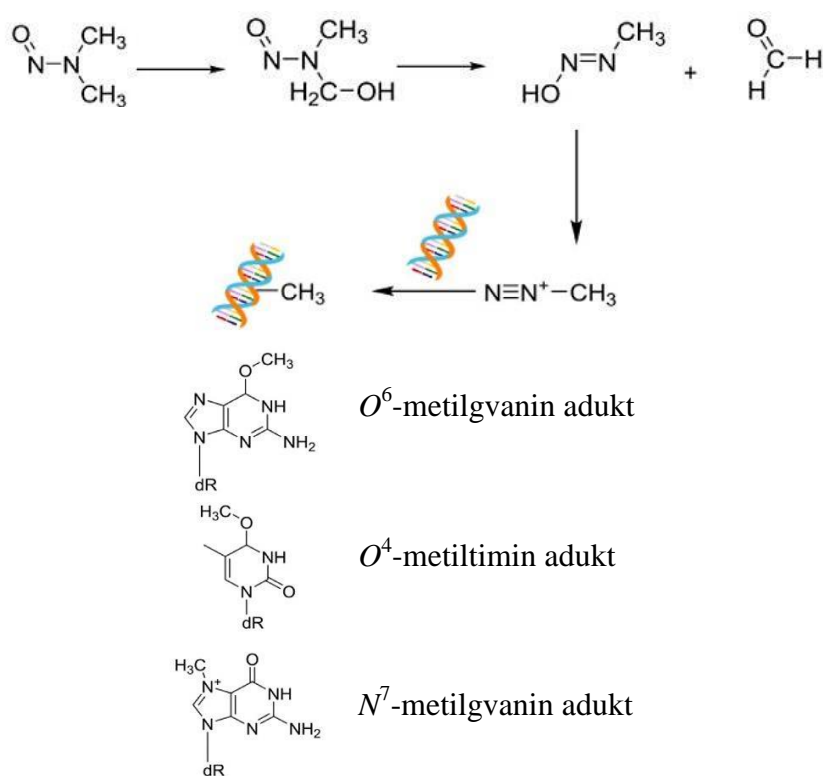
2.1.1. *N*-nitrozamini u hrani

Najčešće namirnice kontaminirane s *N*-nitrozaminima su suhomesnati proizvodi, sirevi, dimljena riba, meso, hrana sušena plinovima izgaranja (slad, mliječni proizvodi, začini), zakiseljeno povrće. Današnji sadržaj NDMA u zapadnim zemljama u većini slučajeva je manji od 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Od nehlapljivih *N*-nitrozamina, *N*-nitrozoprolin i *N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilna kiselina se najčešće nalaze u hrani. *N*-nitrozoirane aminokiseline, osim *N*-nitrososarkozina nisu mutagene, niti kancerogene. *N*-nitrososarkozin je slab karcinogen. Ubrzo nakon otkrića *N*-nitrozamina u ribama, pronađeni su u plamenom spaljenom sladu, pivu i viskijima od slada. NDMA je bio prisutan u približno 70 % testiranih piva, s prosječnim koncentracijama 2-3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Koncentracija NDMA je bila viša od ostalih *N*-nitrozamina. Prekursori NDMA su bili tercijarni amini hordenin i gramin, prirodni sastojci ječma. Razine *N*-nitrozamina u sladu su smanjene prelaskom na ne izravno zagrijavanje slada, tijekom procesa stvrdnjavanja. Međutim, dio *N*-nitrozamina se zadržao u mnogim pivima. Izvor *N*-nitrozamina je bio nitrit, koji je nastao bakterijskom redukcijom nitrata u vodi, koja se koristila za kuhanje piva [1]. Navedeni problem je riješen korištenjem kvasca s vrlo niskom razinom bakterija. NDMA je bio prisutan i u viskiju, napravljenom od slada. Prema

istraživanju iz 2003. godine, od 140 kupljenih piva približno 80 % uzoraka je sadržavalo manje od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ NDMA. Samo tri uzorka su sadržavala preko $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ NDMA. Mliječni proizvodi, poput mlijeka u prahu i sira sadrže niske koncentracije NDMA, manje od $1 \mu\text{g L}^{-1}$. NDMA nastaje u mlijeku, ako se koriste postupci sušenja s izravnim plamenom. Svinjski proizvodi (slanina, šunka) se obrađuju nitritom u obliku natrijeve i/ili kalijeve soli. Nitrit je učinkovit u sprječavanju klijanja i rasta bakterija, posebice *Clostridium botulinum*, koja proizvodi izrazito toksičan metabolit. Svinjetina sadrži sekundarne amine, dimetilamin, prolin, piperidin i pirolidin. NDMA, *N*-nitrozoprolin, *N*-nitrozopiperidin i *N*-nitrozopirolidin se najčešće nalaze u suhomesnatim proizvodima. *N*-nitrozopirolidin većinom nastaje toplinski izazvanom dekarboksilacijom nitrozoprolina ili izravnom nitrozacijom pirolidina, koji je prirodna komponenta mesnih proizvoda. Relativno visoke količine peptidno vezanog *N*-nitrozoprolina se mogu otpustiti enzimskom razgradnjom ili kemijskom hidrolizom. Navedeno se može uočiti u probavnom sustavu. Nehlapljivi *N*-nitrozo spojevi su pronađeni u dimljenim mesnim proizvodima u znatno višim koncentracijama. Primjerice, *N*-nitrozoprolin je pronađen u koncentracijama do $360 \mu\text{g kg}^{-1}$ u sušenom mesu. Dimljeno meso sadrži *N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilnu kiselinu u koncentracijama do $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Prženjem slanine, raste udio *N*-nitrozotiazolidin-4-karboksilne kiseline. Dimljeno meso sadrži i ne karcinogeni *N*-nitrozotiazolidin u koncentracijama do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. *N*-nitrozamini se rijetko nalaze u povrću, voću, žitaricama, bezalkoholnim pićima. Međutim, korištenje umjetnih gnojiva je povećalo razinu nitrata u navedenoj hrani, posebice u listastom povrću. Nitrati mogu biti prekursori za nitrite *in vivo*. *N*-nitrozamini se stvaraju tijekom kuhanja, reakcijom prirodno prisutnih amina s dušikovim monoksidom u plamenim plinovima ili ubrzavanjem reakcija amina s dušikovim monoksidom, prisutnim u hrani zbog povišenih temperatura. Kuhanje na roštilju proizvodi najvišu razinu *N*-nitrozamina zbog visoke temperature i upotrebe vrućih plinova. Široka upotreba roštilja na Dalekom Istoku, pridonosi visokoj pojavi određenih karcinoma. Kuhanje slanine u mikrovalnoj pećnici daje znatno niže razine *N*-nitrozamina, u odnosu na prženje i kuhanje hrane [1].

Preko 300 *N*-nitrozo spojeva je testirano na karcinogenost na životinjama, većina *N*-nitrozamina je pozitivna. Mnogi su također mutageni i teratogeni [1]. Karcinogen je tvar koja može uzrokovati rak. Mutagen je tvar koja može uzrokovati promjene u DNK stanicama (mutacije). Teratogen je tvar koja uzrokuje urođene mane [2]. *N*-nitrozamini se adsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta, ali se ne akumuliraju u tjelesnim tkivima. U jetri dolazi do metaboličke aktivacije mutagenih i kancerogenih svojstava *N*-nitrozamina [1].

Hidroksilacijom *N*-nitrozamina pomoću citokroma CYP2E1, dolazi do aktivacije genotoksičnosti *N*-nitrozamina i nastaje α -hidroksinitrozamin (Slika 3.). Nastali α -hidroksinitrozamin se spontano razgrađuje na alkildiazohidroksid i aldehid. Iz alkildiazohidroksida nastaje alkildiazonijev ion, te u konačnici alkil ugljikov ion. Metildiazohidroksid je aktivni metabolički međuprodukt NDMA koji se prevodi u metildiazonijev ion. Metildiazonijev ion je jaki elektrofilni alkilirajući agens, koji potiče S_N2 alkiliranje nukleofilnih mjesta u DNK. Nukleofilni karakter *N*⁷ atoma u gvaninu predstavlja poželjno mjesto za napad metildiazonijevog kationa. Osim *N*⁷ položaja u gvaninu, alkilirajući agensi mogu napasti *O*⁶ položaj u gvaninu i *O*⁴ položaj u timinu. Alkiliranjem navedenih položaja, nastaju kemijski stabilni adukti s potencijalnom mutagenošću i karcinogenošću [3].



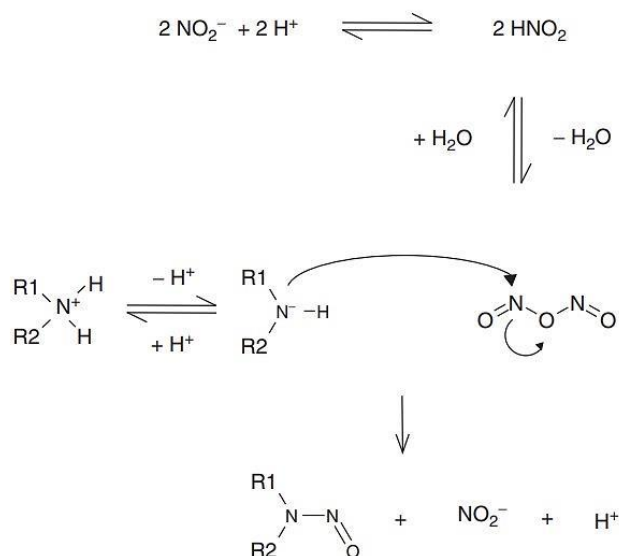
Slika 3. Prikaz bioaktivacije *N*-nitrozamina do biološki aktivnih vrsta i glavnih metaboličkih adukata [3]

Ljudi su rijetko izloženi visokim koncentracijama *N*-nitrozamina, ali su često izloženi niskim razinama u namirnicama, koje se redovito konzumiraju [1]. Navedeno je zabrinjavajuće jer *N*-nitrozamini imaju jače kancerogeno djelovanje prilikom višestruke konzumacije u malim dozama, nego pri pojedinačnoj konzumaciji u visokoj dozi. Ukupna izloženost ljudi *N*-nitrozaminima iznosi približno 1 $\mu\text{mol dan}^{-1}$. Prehrana je glavni izvor *N*-nitrozamina i čini preko 70 % ukupne izloženosti. U SAD-u maksimalni sadržaj *N*-nitrozamina u pivu i slanini

iznosi $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dok, Italija, Švicarska i Njemačka imaju ograničenje od $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ *N*-nitrozamina u pivu. Iako je količina NDMA u pivu znatno smanjena, konzumacija piva je i dalje glavni faktor, u odnosu na ukupnu izloženost *N*-nitrozaminima u prehrani. Otprilike 30 % izloženosti putem hrane proizlazi iz konzumacije piva [1].

2.1.2. Formiranje *N*-nitrozamina

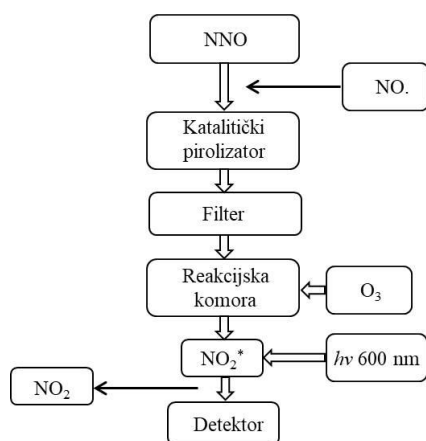
Dušikasta kiselina (HNO_2) nastaje iz nitrita pri kiselim uvjetima. Prilikom protonske katalize, nitrit i dušikasta kiselina stvaraju nitrozirajuće spojeve, dušikov(III) oksid (N_2O_3) ili dušikov(IV) oksid (N_2O_4). Nastali N_2O_3 ili N_2O_4 reagiraju sa sekundarnim aminima te nastaju *N*-nitrozamini (**Slika 4**). U vodenom kiselom mediju, samo ne protonirani aaminski dušik podliježe nitrozaciji. Pri danoj pH-vrijednosti, $\text{p}K_a$ -vrijednost amina određuje brzinu nitrozacije. Nitrozacija jako bazičnih dialkilamina ($\text{p}K_a > 9,5$) ima optimalnu vrijednost pri pH 3,5, blizu $\text{p}K_a$ -vrijednosti HNO_2 ($\text{p}K_a = 3,39$). Slabo bazični amini, poput morfolina ($\text{p}K_a = 8,7$) znatno brže nitroziraju, u odnosu na jako bazične amine [4]. Nitrozacija sekundarnih amina se odvija pri kiselom pH, kataliziraju ga nukleofilni anioni, poput tiocijanata, bromida i klorida. Dok, nitrozaciju inhibiraju askorbinska kiselina, α -tokoferol, sulfaminska kiselina i njene soli. Nitrozacija primarnih amina dovodi do alkohola, tercijarni amini mogu biti nitrozirani nakon dealkilacije [1].



Slika 4. Prikaz mehanizma stvaranja *N*-nitrozamina iz sekundarnih amina [4]

2.1.3. Detekcija *N*-nitrozamina

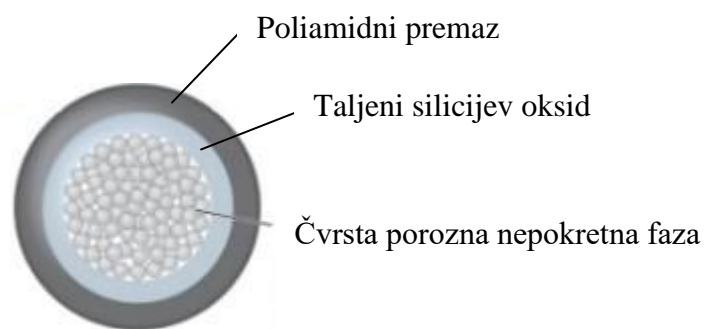
Analitičke metode za detekciju *N*-nitrozamina u hrani mogu se podijeliti na one koje određuju sadržaj hlapljivih ili nehlapljivih *N*-nitrozamina ili ATCN. Navedene metode uključuju plinsku kromatografiju (engl. *gas chromatography*, GC) i tekućinsku kromatografiju (engl. *liquid chromatography*, LC). Nakon separacije, detekcija i kvantitativno određivanje može se izvesti s analizatorom toplinske energije (TEA) specifičnim za nitrozamin ili spektrometrom masa. Detekcija *N*-nitrozamina je revolucionirana 1970-ih, uvođenjem TEA-e, kemiluminiscentnog detektora koji je bio izrazito osjetljiv i specifičan u detekciji *N*-nitrozamina. U TEA detektoru (**Slika 5.**), uzorak u obliku vrućeg plinovitog eluenta iz plinskog kromatografa, prolazi kroz katalitički pirolizator pod vakuumom na temperaturi 350-500 °C. Temperatura je dovoljno visoka da se odcijepi nitrozilni radikal iz *N*-nitrozamina. Preostali organski materijal se pirolizira u ugljikov dioksid. Produkti reakcije prolaze iz pirolizatora kroz filter. Nitrozilni radikal reagira s ozonom (O_3) te proizvodi elektronički pobuđenu vrstu (NO_2^* radikal). NO_2^* radikal se raspada u osnovno stanje, emitirajući svjetlost u bliskom infracrvenom području, koja se pretvara u električni signal pomoću osjetljivog fotomultiplikatora. Donja granica detekcije za instrument je 10 pg pri omjeru signala i šuma 3:1 [1].



Slika 5. Shematski prikaz kemiluminiscentnog detektora [1]

Hlapljivi *N*-nitrozamini se mogu separirati plinskom kromatografijom uz korištenje kromatografskih kolona s različitim punjenjima ili kapilarnim kolonama [1]. Punjene kolone (**Slika 6.**) sadrže potpuno zapakiranu nepokretnu fazu, sastavljenu od finih čestica. Zahtijevaju veliku količinu uzorka [5]. Fine čestice su čestice u zraku koje su manje od grubih čestica. Imaju aerodinamički promjer od 2,5 μm ili manji. Fine čestice uglavnom nastaju iz

plinova. Ultrafine čestice su čestice čiji je promjer manji od 0,1 μm [6]. Pošto punjene kolone sadrže fine čestice, tlak raste unutar kolone. Zbog navedenog, punjene kolone su kraće duljine od kapilarnih kolona. Komponente punjenih kolona su cijev, punjenje te čepovi na krajevima kolone. Nepokretna faza je krutina ili kapljevinna. Tekuća nepokretna faza oblaže fine čestice. Čvrsta nepokretna faza predstavlja pakiranje finih čestica te ne sadrži tekuću fazu, koja oblaže fine čestice. Punjene kolone su bolje za separaciju nepolarnih uzoraka jer je njihova cijev od nehrđajućeg čelika. Moguća su tri tipa separacija u punjenim kolonama: destilacija, plinska adsorpcija i ekstrakcija tekućina-tekućina. Punjene kolone su jeftinije, u odnosu na kapilarne kolone [5]. Punjene kolone daju široke pikove, dok kapilarne kolone oštре pikove. Kapilarne kolone daju pikove većeg intenziteta, čime je omogućena detekcija nižih koncentracija. Prema tome, kapilarne kolone imaju veću osjetljivost od punjenih kolona. Oštriji pikovi omogućuju bolju separaciju komponenata te kraće vrijeme analize [7]. Kod kapilarnih kolona (**Slika 7.**), nepokretna faza samo oblaže unutarnju površinu cijevi, a poliimidni sloj služi kao nepokretna faza. Cijela kolona nije ispunjena nepokretnom fazom. Poliimidni sloj ima karakteristično smeđe obojenje. Kapilarne kolone koriste malu količinu uzorka. Tlak koji se stvara unutar kolone je manji, u odnosu na punjene kolone. Kapilarne kolone su bolje za separaciju polarnih uzoraka jer imaju staklene cijevi [5]. Pokretna faza u plinskoj kromatografiji je inertni plin (vodik, dušik, helij, argon) [31].



Slika 6. Prikaz punjene kolone [9]



Slika 7. Prikaz kapilarne kolone [9]

Kod hlapljivih *N*-nitrozamina, relativno visoka hlapljivost daje kratka vremena zadržavanja. Kako bi se postigla visoka osjetljivost, koriste se umjereno polarne nepokretne faze. Kemijska derivatizacija nije potrebna. Kolona za plinsku kromatografiju se može povezati s TEA detektorom. Međutim, kada se koristi spektrometrija masa, hlapljivi *N*-nitrozamini, poput NDMA imaju slabi spektar masa jer je molekularni ion malen i male mase te je podložan smetnjama od koeluirajućih spojeva. Za kvantifikaciju hlapljivih *N*-nitrozamina koristi se metoda unutarnjeg standarda. Unutarnji standard se koristi za ispravljanje gubitaka tijekom analize. Izbor unutarnjeg standarda je ograničen za TEA jer se stabilni izotopi ne mogu razlikovati od izvornog spoja. Prema tome, potrebno je koristiti *N*-nitrozamin, koji nije prisutan u uzorku hrane. Često se koristi *N*-nitrozo diizopropilamin. Granica detekcije za čvrste uzorke, poput mesa i slada, koristeći metodu destilacije ili ekstrakcije na čvrstoj fazi s GC-TEA detekcijom, iznosi $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$. Većina nehlapljivih *N*-nitrozamina se može odrediti plinskom kromatografijom nakon derivatizacije kako bi se smanjila polarnost i povećala hlapljivost [1].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) se koristi za analizu nehlapljivih *N*-nitrozamina. Povezivanje HPLC-a i TEA detektora je zahtjevno, kako bi otapalo isparavalo u plin velikog volumena u TEA pirolizator. Nastali plin se mora ukloniti, kako bi se održao vakuum u reakcijskoj komori. Navedeno se može postići sa serijom „hladnih zamki“ (engl. *cold traps*), koje snižavaju temperaturu. Zadnja „hladna zamka“ sadrži smjesu izopentana i tekućeg dušika, koji kondenzira sve komponente otapala, dok NO ostaje u plinovitom stanju. Potrebna je i dodatna peć za pirolizu. Također, moguće je prikupljanje nehlapljivih *N*-nitrozamina u eluensu iz HPLC kolone te denitroziranje pomoću bromovodične kiseline, čime nastaju sekundarni amini. Nastali sekundarni amini se mogu detektirati fluorescencijskim detektorom, nakon pretvorbe u derivate dansila [1]. Mjerenje se provodi prije i nakon denitrozacije,

sadržaj nehlapljivih *N*-nitrozamina se računa kao razlika ovih mjerenja. Većina nehlapljivih *N*-nitrozamina se nije pokazala kancerogenim, čime je pao interes za njihovim određivanjem posljednjih godina [1].

Reakcije denitrozacije se mogu koristiti za cijepanje svih nitrozo-veza u uzorku hrane. Oslobađa se dušikov monoksid, koji se može detektirati s TEA detektorom. Ovom tehnikom se može izmjeriti ATNC, ne koristi se kromatografska separacija. Bromovodik je najčešće korišteni denitrozacijski reagens. Prije otpuštanja NO skupine, anorganski nitrit, C- i S nitrozo spojevi se razgrađuju dodatkom octene kiseline u uzorak. Tekući uzorci se injektiraju u refluksnu smjesu bromovodične kiseline i octene kiseline u etil acetatu. Odcjepljena nitrozo skupina se prikuplja u struji argona kroz seriju „hladnih zamki“. Ovime se uklanjaju pare reagensa, dok prolaskom kroz alkalne zamke, uklanjaju se kiseline i prolaze u TEA detektor. Svi *N*-nitrozo spojevi iz uzorka hrane se kvantitativno prevode u NO skupinu. Kvantitativno određivanje ATNC-a provodi se injektiranjem standarda *N*-nitrozamina [1].

2.1.4. *N*-nitrozamini u vodi

Na početku 21. stoljeća, završna dezinfekcija vode za piće predstavljala je glavni izvor *N*-nitrozamina. Kloraminacija je okrivljena za stvaranje NDMA. Navedeno je bilo ironično jer se vjerovalo da kloraminacija stvara manji broj dezinfekcijskih nusprodukata, u odnosu na ostale dezinficijense. Ovo je potaknulo istraživanje mehanizama stvaranja NDMA i njegovih prekursora, kao i razvoj novih metoda analize. Ljudski kontakt s NDMA nije ograničen na vodu za piće jer su *N*-nitrozamini pronađeni i u kloriranim vodama bazena. *N*-nitrozamini su vjerojatno kancerogeni za ljude te bi mogli ozbiljno utjecati na sigurnost potrošača pitke vode. NDMA može nastati u kloraminiranim ili kloriranim vodama. *N*-nitrozamini pripadaju u kategoriju dezinfekcijskih nusprodukata (engl. *disinfection byproduct*, DBP), koji sadrže dušik. Određeni istraživači smatraju da su DBP najopasniji za ljude. Zbog visokog kancerogenog djelovanja *N*-nitrozamina, njihove najveće dopuštene koncentracije u Kanadi su postavljene na razini ng L^{-1} u vodi za piće, što uzrokuje ozbiljne analitičke probleme [10]. Kanada je izdala maksimalnu prihvatljivu koncentraciju (engl. *maximum acceptable concentration*, MAC) od 40 ng L^{-1} za NDMA u vodi za piće [11]. Nakon otkrića NDMA u vodi iz bunara, država Kalifornija je postavila MAC na 2 ng L^{-1} za NDMA. Međutim, navedena MAC je naknadno revidirana na 10 ng L^{-1} , zbog poteškoće u mjerenju izvorno predložene koncentracije NDMA. NDMA je prisutan pri koncentraciji od nekoliko ng L^{-1} u kloraminiranoj i kloriranoj vodi za piće, ali se može pojaviti u mnogo većim koncentracijama

u otpadnim vodama. Ontario je propisao privremenu maksimalno dozvoljenu koncentraciju od 9 ng L^{-1} za NDMA. Inspektorat za pitku vodu Engleske i Walesa zahtijeva razinu od 1 ng L^{-1} za NDMA. Distribucija biološki stabilne vode, koja ne zahtijeva završnu dezinfekciju kemikalijama, čini se najboljim načinom izbjegavanja prisutnosti NDMA u vodi za piće [10].

N-nitrozamini su polarni spojevi, koji su većinom topljivi u vodi (**Tablica 1.**). Njihovi koeficijenti raspodjele oktanol/voda su niski, čime ih je teško ekstrahirati s organskim otapalima. *N*-nitrozamini se ne adsorbiraju na nepolarnim površinama u značajnoj mjeri. Njihove Henry-eve konstante su male, što znači da se *N*-nitrozamini ne mogu ukloniti iz vode aeracijom. NDMA snažno apsorbira zračenje valnih duljina 225-250 nm. Ovo svojstvo se može koristiti za fotolitičku razgradnju spoja u vodi. NDMA je polarni spoj, on se ne bioakumulira, teško je biorazgradiv. Velika hidrofobnost i mala sposobnost adsorpcije *N*-nitrozamina, doprinosi velikom riziku od kontaminacije podzemnih voda [10]. Maksimalna razina onečišćenja (engl. *maximum contaminant level*, MCL) je najveća razina onečišćenja koja je dopuštena u vodi za piće. MCL se postavlja što bliže maksimalnom cilju razine onečišćenja (engl. *maximum contaminant level goal*, MCLG), koristeći najbolju, dostupnu tehnologiju obrade te uzimajući u obzir troškove. MCL-ovi su provedivi standardi. MCLG predstavlja razinu onečišćenja ispod koje nema poznatog ili očekivanog rizika za zdravlje [12]. Rizik (engl. *risk*, *R*) 10^{-5} se odnosi na jedan dodatni karcinom na 100 000 osoba za 70 godina prema MCL vrijednosti [13].

Tablica 1. Svojstva sekundarnih *N*-nitrozamina (NDEA (*N*-nitrozodietilamin), NDPA (*N*-nitrozodipropilamin), NDBA (*N*-nitrozodibutilamin), NPYR (*N*-nitrozopirrolidin), NMOR (*N*-nitrozomorfolin)) [14]

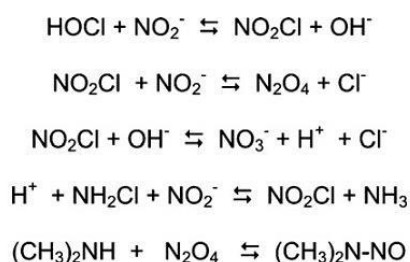
N-nitrozamin	Formula	Molekulska masa (g mol^{-1})	$\log K_{ow}$	Standardna US EPA klasifikacija	MCL za $R = 10^{-5}$ (ng L^{-1})
NDEA	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$	102,135	0,48	B2	2
NDPA	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	130,188	1,36	B2	50
NDBA	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$	158,241	2,63	B2	60
NPYR	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$	100,1	-0,19	2B (IARC)	
NMOR	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$	116,12	-0,44	2B (IARC)	

Prema standardnoj US EPA klasifikaciji kancerogenosti, NDEA, NDPA i NDBA pripadaju u B2 skupinu. B2 skupina ukazuje na kancerogenost kod životinja i neadekvatne dokaze ili bez dokaza kod ljudi [15]. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (engl. *International*

Agency for Research on Cancer, IARC), NPYR i NMOR pripadaju u 2B skupinu. 2B skupina upućuje na vjerojatnu kancerogenost *N*-nitrozamina kod ljudi [16].

U poglavlju 2.1.2. Formiranje *N*-nitrozamina je opisana nitrozacija sekundarnih amina pri kiselim uvjetima te je dan shematski prikaz stvaranja *N*-nitrozamina (**Slika 4.**). Neobrađene vode mogu sadržavati određene količine NDMA. Prekursori *N*-nitrozamina predstavljaju glavni problem pri stvaranju NDMA, jer NDMA može nastati prilikom obrade vode [10]. NDMA nastaje obradom vode samo iz spojeva koji sadrže organski dušik. Kako bi se izbjeglo stvaranje *N*-nitrozamina, potrebno je identificirati prekursore NDMA i pokušati ih ukloniti. Mogući prekursori NDMA su dimetilamin, neidentificirani organski dušik kao dio prirodne organske tvari, tercijarni ili kvarterni amini, kationski flokulanti, anionske izmjenjivačke smole [10].

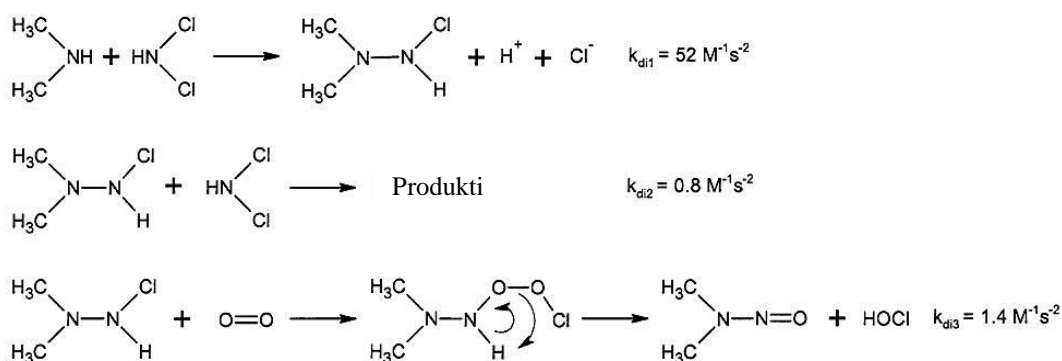
Choi i Valentini [17] su otkrili da dolazi do pojačanog stvaranja NDMA u prisutnosti slobodnog klora iz hipokloraste kiseline (HOCl) (**Slika 8.**). Smatralo se da će utjecaj HOCl biti suprotan jer HOCl brzo oksidira nitrit. Prema tome, HOCl bi trebala smanjiti formiranje NDMA pri klasičnom mehanizmu nitrozacije. Reakcijom HOCl i nitrita nastaje nitril klorid (NO₂Cl). Nitril klorid reagira s nitritom te nastaje dušikov(IV) oksid (N₂O₄). Stvaranje N₂O₄ pri pH 7 je kinetički povoljna reakcija jer nitrit (pK_a = 3,37) samostalno reagira s HOCl. Navedeno je u potpunoj suprotnosti kod klasične nitrozacije. U klasičnoj nitrozaciji pri kiselim uvjetima, favorizira se stvaranje dušikovog(V) oksida (N₂O₃). NO₂Cl hidrolizira u nitrat. Reakcija između kloramina i nitrita je znatno sporija te nastaje znatno manje međuprodukata, koji dovode do stvaranja NDMA. Dimetilamin u reakciji s N₂O₄ stvara NDMA. Mehanizam stvaranja NDMA inhibira prisutnost amonijaka [17].



Slika 8. Prikaz mehanizma nitrozacije uz HClO [17]

Schreiber i Mitch [18] su predložili drugi mehanizam stvaranja NDMA (**Slika 9.**). Prema njihovom mehanizmu, formiranje NDMA ovisi o koncentraciji dikloramina. U prvom stupnju dolazi do nukleofilne supstitucije između sekundarnog amina (dimetilamina) i dikloramina.

Produkt navedene nukleofilne supstitucije je klorirani nesimetrični dimetilhidrazin (UDMH-Cl). Nastali UDMH-Cl se oksidira s otopljenim kisikom do NDMA ili dikloraminom do ne identificiranih produkata [18]. Jedna od kritika navedenog mehanizma stvaranja NDMA je stvaranje jačeg oksidansa (HOCl) pri reakciji slabijeg oksidansa (O₂). Schreiber i Mitch [10] su navedenu kritiku opovrgnuli poboljšanim stvaranjem određenih *N*-nitrozamina (NDEA, NMOR, NPIP, NPYR) u prisutnosti dikloramina i kisika. Prikazani mehanizam na **Slici 9** predstavlja opće prihvaćeni mehanizam formiranja NDMA nakon kloraminacije vodenih otopina dimetilamina.



Slika 9. Prikaz mehanizma nitrozacije do NDMA [18]

Za određivanje *N*-nitrozamina u vodi, koriste se metode, koje se temelje na koncentriranju *N*-nitrozamina ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE), eluiranju analita s diklormetanom te kromatografskoj analizi (GC ili HPLC) s MS/MS detekcijom [10].

Ripollés i sur. [19] su razvili SPE-UHPLC-MS/MS metodu za detektiranje i kvantifikaciju osam *N*-nitrozamina u vodi za piće. Temeljne standardne otopine (TSO) koncentracija 1000 mg L⁻¹ za NDMA, NDEA, NDPA i NDBA; 500 mg L⁻¹ za NPYR, NPIP, NMOR, *N*-nitrozometiletilamin (NMEA) i *N*-nitrozodifenilamin (NDPhA); 20 mg L⁻¹ za NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄ pripremljene su u acetonu i skladištene u hladnjaku pri < -18 °C. Radne otopine smjese *N*-nitrozamina koncentracija 500 µg L⁻¹ pripremljene su razrjeđenjem pojedinačnih TSO s acetonitrilom. Međurazrjeđenja navedene smjese pripremljena su u smjesi acetonitril/voda (volumni omjer 10 % : 90 %). Radna otopina smjese NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄ koncentracije 500 µg L⁻¹ pripremljena je razrjeđenjem TSO u MilliQ vodi. Radne otopine skladištene su u hladnjaku pri 4 °C. Uzorcima vode (500 mL) dodano je 20 µL radne otopine smjese NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄ koncentracije 500 µg L⁻¹. Koncentracija NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄ u uzorcima iznosila je 20 ng L⁻¹. Prije propuštanja uzorka kroz 6 mL Restek EPA 521 SPE

kolonu s 2 g kokosovog ugljena, provedeno je kondicioniranje. Kondicioniranje se sastoji od propuštanja 2 x 3 mL diklormetana i 2 x 3 mL metanola (uz sušenje kolone), 2 x 3 mL metanola i 5 x 3 mL MilliQ vode (bez sušenja kolone). Zatim, uzorak prolazi kroz SPE kolonu uz protok od približno 10 mL min⁻¹. Nakon prolaska 500 mL uzorka kroz SPE kolonu, kolona je sušena 30 min pod vakuumom. N-nitrozamini su eluirani s 10 mL diklormetana. Nakon SPE-a, uzorcima je dodano 100 µL acetonitrila te su uparavani na rotacijskom uparivaču pri 20 - 25 °C i umjerenj struji dušika, dok se ne ukloni diklormetan. Špricom je preneseno 100 µL ekstrakta u 2 mL vijalu te je dodano 900 µL MilliQ vode. SPE postupkom uzorak je koncentriran 500 puta. Volumen injektiranja UHPLC-MS/MS sustava iznosio je 100 µL. Separacija osam N-nitrozamina provedena je na Atlantis T3 5 µm C₁₈ analitičkoj koloni, 100 x 4,6 mm uz brzinu protoka 0,8 mL min⁻¹. Promjer zrna punjenja kolone je 5 µm, 100 mm duljina kolone, 4,6 mm unutarnji promjer kolone. Separacija N-nitrozamina provedena je uz gradijentno eluiranje (**Tablica 2.**). Pokretna faza sastojala se od MilliQ vode (A) i acetonitrila (B), kojima je dodano 0,01 % mravlje kiseline. Vrijeme analize bilo je 22 min [19].

Tablica 2. Sastav pokretne faze prilikom gradijentnog eluiranja [19]

<i>t</i> / min	A / %	B / %
0-1	95	5
1,01-17	95-10	5-90
17,01-18	10	90
18,1-22	95	5

Charrois i sur. [20] su razvili SPE-GC/MS PCI metodu za kvantifikaciju osam N-nitrozamina u vodi za piće. Uz upotrebu amonijaka (plin reagens) pozitivna kemijska ionizacija (engl. *positive chemical ionization*, PCI) je selektivna ionizacija za amine i N-nitrozamine. Uzorci izvorske vode i tretirane vode skupljeni su u boce od tamnog stakla te im je dodana L-askorbinska kiselina koncentracije 20 mg L⁻¹. Navedeni uzorci skladišteni su u hladnjaku pri 4 °C. TSO pripremljene su razrjeđenjem kupljenih standardnih otopina smjese osam N-nitrozamina, izotopski obilježenih standardnih otopina NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄ s metanolom. Radne otopine smjese N-nitrozamina i NDMA-d₆ pripremljene su razrjeđenjem TSO s MilliQ vodom. Korištena SPE kolona sadrži 350 mg LiChrolut EN sorbensa (etilvinilbenzen-divinilbenzen praškasti materijal veličine 40 – 120 µm), 500 mg Amborsorb 572 sorbensa

(sferične ugljične kuglice veličine 300 – 850 μm) i staklenu vunu. SPE kolona pročišćena je s 15 mL heksana i diklormetana. Kondicioniranje se sastojalo od propuštanja 15 mL metanola i 15 mL MilliQ vode (bez sušenja kolone). Uzorcima (500 mL) dodani su 1 g NaHCO_3 ($\text{pH} = 3$) i 25 ng NDMA- d_6 . Uzorci su propušteni kroz SPE kolonu uz protoku 3 – 5 mL min^{-1} pod blagim vakuumom. Nakon prolaska uzorka, kolone su sušene pod vakuumom (- 30 kPa). *N*-nitrozamini su eluirani s 2 x 15 mL diklormetana, ekstraktu je dodano 25 ng NDPA- d_{14} i 500 μL metanola. Ekstrakti su zagrijavani pri 40 $^\circ\text{C}$ i koncentrirani pod strujom dušika do volumena od 200 μL . SPE uzorci su koncentrirani 2500 puta. Separacija osam *N*-nitrozamina provedena je na Agilent Technologies 6890N plinskom kromatografu, koji je povezan sa selektivnim detektorom mase 5973. Protok plina nosača (helij ultra visoke čistoće) iznosio je 1,3 mL min^{-1} dok je protok amonijaka iznosio 0,5 mL min^{-1} . Korištena kromatografska kolona je J&W Scientific DB-1701P kapilarna kolona. Volumen injektiranja bio je 1 μL . Duljina kolone je 30 m; 0,25 mm unutarnji promjer kolone i 0,25 μm debljina filma. Program temperature pećnice glasi: početna temperatura od 40 $^\circ\text{C}$ održavana 3 min; 4 $^\circ\text{C min}^{-1}$ do 110 $^\circ\text{C}$; 15 $^\circ\text{C min}^{-1}$ do 220 $^\circ\text{C}$; 220 $^\circ\text{C}$ održavano 2 min. Vrijeme analize iznosilo je 34,83 min [20].

Asami i sur. [21] su razvili SPE-UPLC-MS/MS metodu za kvantifikaciju NDMA u netretiranoj i tretiranoj vodi za piće. Uzorci netretirane i tretirane vode za piće prikupljeni su iz postrojenja za obradu pitke vode te skladišteni u staklenim bocama pri 4 $^\circ\text{C}$ i tamnom mjestu. Uzorcima je dodana otopina natrijevog tiosulfata. TSO pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine NDMA koncentracije 2000 mg L^{-1} u metanolu. Radne standardne otopine pripremljene su razrjeđivanjem TSO s diklormetanom te su sadržavale 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ NDMA- d_6 . Natrijev bikarbonat koncentracije 2 g L^{-1} dodan je uzorcima vode, kako bi pH uzoraka bio 8. Uzorci (500 mL) su profiltrirani kroz 0,7 μm GF/F filtre od borosilikatnog stakla te su propušteni kroz dvije Sep-Pak Plus AC-2 SPE kolone s 2 x 400 mg aktivnog ugljena pri protoku 3 – 5 mL min^{-1} . Prije propuštanja uzorka kroz SPE kolone, provedeno je kondicioniranje. Kondicioniranje se sastojalo od propuštanja 20 mL smjese diklormetana i dietiletera (volumni omjer 50:50), 20 mL metanola i 20 mL MilliQ vode. Nakon propuštanja uzorka, SPE kolone osušene su pod strujom dušika. Eluiranje je provedeno s 10 mL smjese diklormetana i dietiletera (volumni omjer 50:50) pri protoku 2 – 3 mL min^{-1} . Eluat je koncentriran do 50 μL i razrijeđen s diklormetanom do 200 μL . Korištena je kromatografska kolona ACQUITY UPLC BEH 1,7 μm C_{18} kolona 130 Å (2,1 mm x 150 mm), gdje je 1,7 μm promjer zrna punjenja, 130 Å veličina pora, 2,1 mm unutarnji promjer kolone, 150 mm

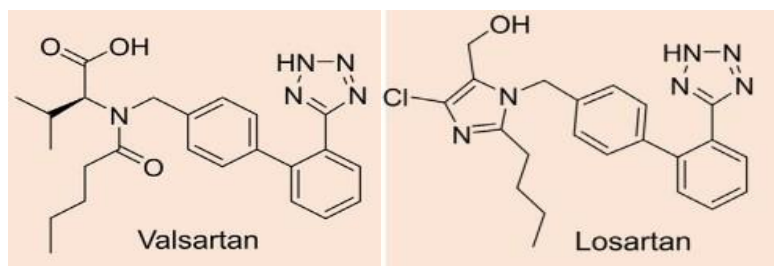
duljina kolone. Pokretna faza sastojala se od 10 mM vodene otopine amonijeva bikarbonata (A) i acetonitrila (B). Separacija NDMA i NDMA-d₆ provedena je uz gradijentno eluiranje pri protoku od 0,2 mL min⁻¹ (**Tablica 3.**). Volumen injektiranja uzorka iznosi 30 µL [21].

Tablica 3. Sastav pokretne faze prilikom gradijentnog eluiranja [21]

<i>t</i> / min	A / %	B / %
0-3,5	95	5
3,5-3,85	95-5	5-95
3,85-6,35	5	95
6,35-6,70	95	5
6,70-8,35	95	5

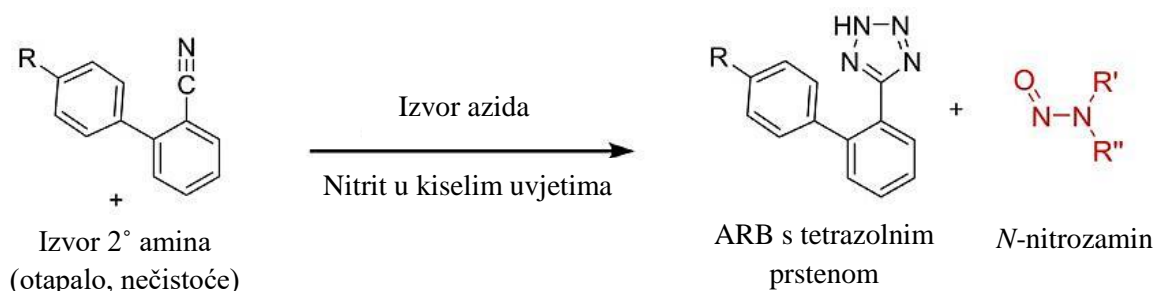
2.1.5. *N*-nitrozamini u lijekovima

U srpnju 2018. pokrenuta je sumnja da su blokatori receptora angiotenzina II (ARB) kontaminirani s *N*-nitrozaminima. NDMA je pronađen u valsartanu (**Slika 10.**). Europska medicinska agencija (engl. *European Medicines Agency*, EMA) je prva povukla proizvode valsartana u svim europskim zemljama. Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je identificirala i NDEA u proizvodima valsartana. Tek u ožujku 2019., detektirana je kontaminacija *N*-nitrozaminima u drugim sartanima, FDA je identificirala *N*-nitrozo-*N*-metil-4-aminobutirnu kiselinu (NMBA) u losartanu (**Slika 10.**) [3]. Sartani su visoko selektivni antihipertenzivi koji blokiraju aktivaciju AT1 receptora angiotenzina II. Kada su AT1 receptori aktivni, dolazi do vazokonstrikcije, otpuštanja aldosterona, povećanog izlučivanja natrija i vode, rasta krvnog tlaka. Mehanizam djelovanja sartana je sličan djelovanju antihipertenzivnih inhibitora ACE-a. Međutim, sartani ne razgrađuju ne peptid bradikinin, kao što je slučaj kod inhibitora ACE-a. Blokiranjem aktivacije ARB receptora, dolazi do vazodilatacije, smanjenja krvnog tlaka. Sartani blokiraju AT1 receptor na različite načine. Irbesartan, kandesartan i talmisartan su nekompetitivni antagonisti, dok su valsartan, losartan i eprosartan kompetitivni antagonisti. Mnogi sartani, poput valsartana i losartana, sadrže difenil s tetrazolnim prstenom u orto položaju, u odnosu na fenil-fenil vezu [22].



Slika 10. Prikaz strukture valsartana i losartana [3]

NDMA, NDEA i NMBA najvjerojatnije nastaju prilikom proizvodnje aktivnog farmaceutskog sastojka. *N*-nitrozamini koji kontaminiraju farmaceutske proizvode su većinom *N*-nitrozodialkilamini. Kontaminacija farmaceutika s *N*-nitrozaminima se odvija u prisutnosti prekursora, amina i nitrozacijskog agensa pri nitrozacijskim uvjetima (2.1.2. Formiranje *N*-nitrozamina). Sinteza ARB lijekova uključuje višestupnjevite reakcije, kojima se stvaraju bifenični analozi s kiselim centrom, poput tetrazolnog prstena u valsartanu, losartanu. Tetrazolni prsten i karboksilna skupina u ARB strukturama imitira Tyr4 fenol ili Asp1 karboksilnu skupinu angiotenzina. Prema tome, tetrazolni prsten i karboksilna skupina u ARB strukturama su ključne za njihovu farmakološku aktivnost. Bifenil tetrazol ima veću metaboličku aktivnost i bioraspoloživost, u odnosu na karboksilnu skupinu. Iz navedenoga, bifenični tetrazolni prsten se nalazi u većini ARB struktura. Iznimke su eprosartan, azilsartan i telmisartan koji sadrže karboksilnu skupinu, umjesto bifeničnog tetrazola. Međutim, pretpostavlja se da uvođenjem tetrazolnog prstena u ARB strukturu, dolazi do kontaminacije ARB-a s *N*-nitrozaminima. Adicijskom reakcijom bifeničnog nitrila s azidom (tributilkositar azid, natrijev azid) nastaje bifenični tetrazol (**Slika 11.**) [3]. Kod valsartana, tetrazolni prsten nastaje uz tributilkositar azid kao izvor azida. Pošto su azidi izrazito eksplozivni i toksični, dodaju im se nitriti u kiselim uvjetima te nastaje molekularni dušik i dušikov oksid. U prisutnosti dialkilamina u tragovima, dialkilamini reagiraju s nitritom te nastaju *N*-nitrozamini (**Slika 12.**) [3].

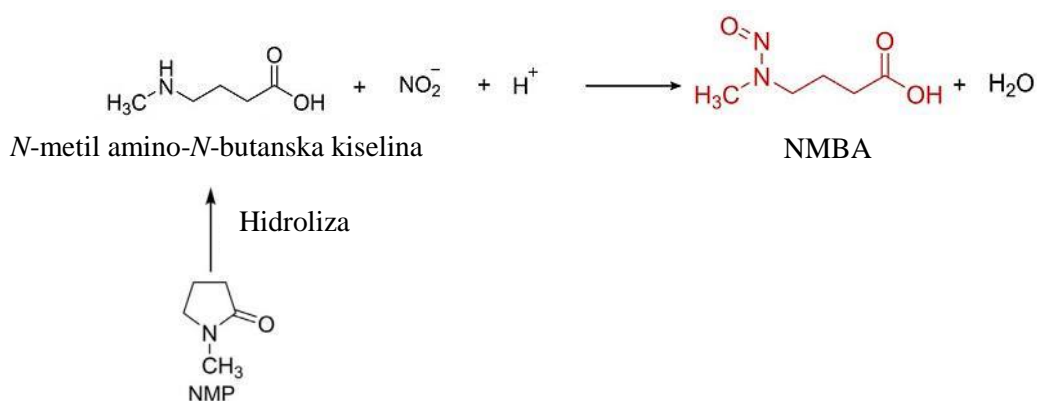


Slika 11. Prikaz stvaranja *N*-nitrozamina prilikom sinteze ARB-a s tetrazolnim prstenom [3]



Slika 12. Prikaz sinteze NDMA iz dimetilamina i nitrita [3]

Kontaminacija ARB-a s NMBA se javlja zbog prisutnosti *N*-metil pirolidinona (NMP). NMP nije reaktivan, njegovom hidrolizom nastaje *N*-metil amino-*N*-butanska kiselina, koja reagira s nitritom pri kiselim uvjetima i stvara NMBA (**Slika 13.**). Osim NDMA, NDEA i NMBA, utvrđena je kontaminacija ARB-a s *N*-nitrozodiizopropilaminom (NDIPA) i *N*-nitrozoetilizopropilaminom (NEIPA) [3].



Slika 13. Prikaz sinteze NMBA [3]

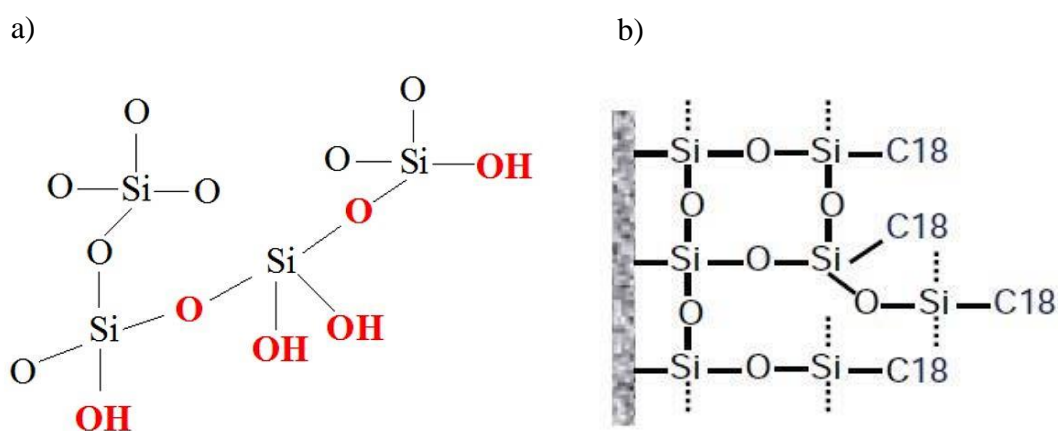
Metode za kvantifikaciju *N*-nitrozamina u lijekovima su plinska kromatografija vezana sa spregnutom spektrometrijom masa (GC-MS/MS), tekućinska kromatografija vezana sa spregnutom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) te tekućinska kromatografija vezana s UV detektorom [3]. Najveći izazov u određivanju *N*-nitrozamina u lijekovima je dobiti točne i precizne rezultate jer su *N*-nitrozamini prisutni u jako niskim koncentracijama. Kontrola nečistoća u lijekovima slijedi specifikacije koje se nalaze u farmakopejama. Primjeri farmakopeja su Farmakopeja Sjedinjenih Država (engl. *United States Pharmacopeia*, USP), Britanska farmakopeja (engl. *British Pharmacopoeia*, BP), Europska farmakopeja (engl. *European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.), Međunarodna farmakopeja (engl. *The International Pharmacopoeia*, Ph. Int.) [3]. Kako bi lijek zadovoljio međunarodno prihvaćene standarde kvalitete, provodi se analitičko ispitivanje lijekova. Korišteni standardi kvalitete su opisani u farmakopejskoj monografiji za određeni lijek. Nažalost, svi lijekovi se ne nalaze u navedenim monografijama. Farmakopejska monografija pruža detaljne parametre, koji se koriste za utvrđivanje zadovoljava li lijek ključne atribute kvalitete te može li se legalno prodavati u bilo kojoj zemlji [23]. Mnoge zemlje nemaju vlastite nacionalne farmakopeje ili nemaju

monografiju za sve korištene lijekove. Navedene zemlje prihvaćaju monografije od većih farmakopeja i Međunarodnu farmakopeju [23]. Specifikacije koje se nalaze u monografiji su daleko od savršenih, posebice kontrola nečistoća jer su dizajnirane bez mogućnosti detekcije *N*-nitrozamina u tragovima. Za kontrolu nečistoća u lijekovima, potrebno je primijeniti vlastitu znanstvenu evaluaciju mjera kontrole. Zbog povlačenja ARB lijekova diljem svijeta, javila se zabrinutost zbog moguće nestašice lijekova. U veljači 2019., FDA je povećala maksimalno dopuštenu koncentraciju NMBA u losartanu s $0,96 \text{ mg L}^{-1}$ na $9,82 \text{ mg L}^{-1}$ na šest mjeseci. Ovom mjerom se spriječila nestašica losartana. Konačni cilj FDA je da ARB u SAD-u ne sadrže *N*-nitrozamine [3].

2.2. Tekućinska kromatografija

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevinna, a nepokretna faza sorbens. Ona se dijeli na adsorpcijsku kromatografiju (nepokretna faza je adsorbens) i razdjelnu kromatografiju (kapljevinna nepokretna faza nanescena na čvrsti inertni nosač). Tekućinska kromatografija koristi se za separaciju nisko hlapljivih i toplinski nestabilnih smjesa, koje se ne mogu analizirati plinskom kromatografijom. Ovisno o izboru pokretne i nepokretne faze te relativnoj polarosti faza, razlikujemo kromatografiju normalne i obrnute faze [24].

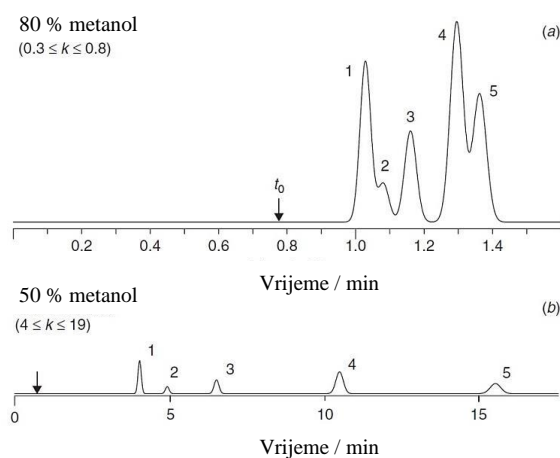
Kod kromatografije normalne faze nepokretna faza je polarna, a pokretna faza nepolarna. Pokretna faza je sustav organskih otapala uz dodatak vode ili elektrolita radi podešavanja polarosti. Neke od nepokretnih faza su silikagel (**Slika 14. a**) i aluminijev oksid [24]. Silikagel je trodimenzionalni polimer silicijeva dioksida, čija struktura sadrži funkcionalne skupine, siloksan i silanol [25].



Slika 14. Struktura a) silikagela, b) polimernog silikagela s C₁₈ skupinom [25, 26]

Kromatografija obrnutih faza uključuje nepolarnu nepokretnu fazu i polarnu pokretnu fazu. Razdvajanje analita temelji se na hidrofobnosti analita. Nepokretna faza je modificirani silikagel s alkilnim, arilnim, amino ili cijano skupinama [24]. C₁₈ skupina je najčešće upotrebljavana alkilna skupina kod silikagela modificiranog s alkilnom skupinom (**Slika 14. b**).

Najčešća pokretna faza je smjesa vode ili vodenog pufera (otapalo A) i organskog otapala (otapalo B). Nepolarne otopljene tvari zadržavaju se više (veći faktor zadržavanja, *k*), u odnosu na polarne otopljene tvari prilikom interakcije s C₁₈ nepokretnom fazom. Porastom volumnog udjela otapala B, smanjuje se *t_R* i *k* svih komponenata uzorka. Uz 80 % otapala B (metanol) postignuto je brzo eluiranje sastojaka uzorka smjese pet herbicida (1 - monolinuron, 2 - metobromuron, 3 - diuron, 4 - propazin, 5 - kloroksuron) na 150 x 4,6 mm, 5 μm C₁₈ kromatografskoj koloni, niske vrijednosti *k* te slabe separacije (**Slika 15. a**). Smanjenjem volumnog udjela metanola na 50 %, dolazi do poboljšanja separacije komponenata uzorka, dulje je vrijeme analize, a visina pikova je niža uslijed povećanja širine pikova (**Slika 15. b**) [27].

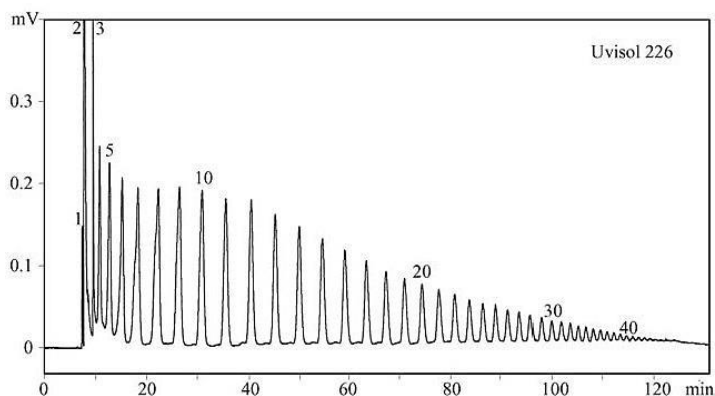


Slika 15. Separacija pet herbicida na 150 x 4,6 mm, 5 μm C₁₈ kromatografskoj koloni uz 80 % metanola (a) i 50 % metanola (b) pri protoku 2 mL min⁻¹ [27]

2.2.1. Zadržavanje

U kromatografiji mali volumen uzorka uvodi se na ulazu kromatografske kolone. Pokretna faza prenosi komponente uzorka koje su u kontaktu s nepokretnom fazom u koloni. Komponente uzorka putuju različitim brzinama i eluiraju s različitim vremenima zadržavanja iz kolone zbog različitih interakcija između komponenata uzorka i nepokretne faze [28].

Izlaz kolone spojen je na detektor, koji daje signal za sve eluirane komponente (univerzalna detekcija) ili određeni broj eluiranih komponenata (selektivna detekcija). Signali detektora prikazuju se na kromatogramu. Kromatogram je grafički prikaz ovisnosti signala detektora (y -os) o vremenu eluiranja (x -os) (**Slika 16.**) [28].



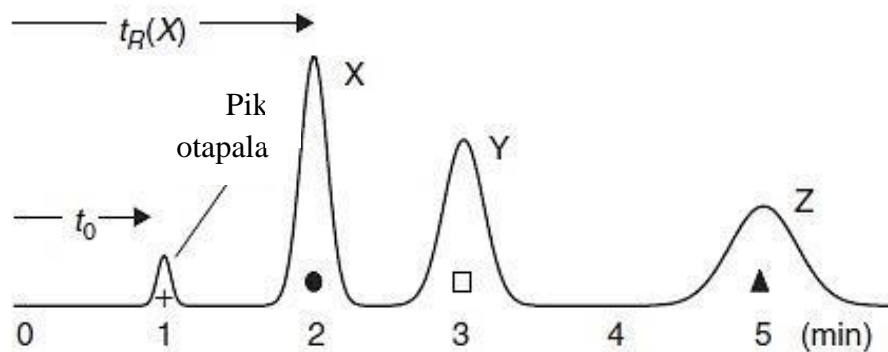
Slika 16. Kromatogram polimernih amina separiranih HPLC uz gradijentno eluiranje [28]

Faktor zadržavanja (k) definira se kao omjer količine molekula u nepokretnoj (n_s) i pokretnoj fazi (n_m) u određenom trenutku. Vrijednost k računa se prema izrazu (1) [28]:

$$k = \frac{n_s}{n_m} \quad (1)$$

Kada je n_s znatno veći od n_m , putovanje spojeva kroz kromatografski sustav je izrazito sporo, vrijeme zadržavanja analita je veliko [28].

Vrijeme zadržavanja (t_R) određene otopljene tvari predstavlja vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do trenutka pojave vrha pika na kromatogramu. Primjerice, na **Slici 17.** t_R za tri otopljene tvari iznose 2 (X), 3 (Y) i 5 (Z) min [27]. Pri 1 min nalazi se pik otapala ($t_0 = 1$ min), koji predstavlja mrtvo vrijeme (t_0). t_0 je vrijeme pri kojem komponenta putuje kroz kromatografski sustav brzinom pokretne faze, bez interakcija s nepokretnom fazom [28].



Slika 17. Kromatogram uzorka s tri otopljene tvari (X, Y i Z) [27]

Vrijeme zadržavanja računa se prema izrazu (2) [27]:

$$t_R = t_0(1 + k) \quad (2)$$

Mrtvo vrijeme jednako je omjeru mrtvog volumena (V_0) i protoka pokretne faze (F) [27]:

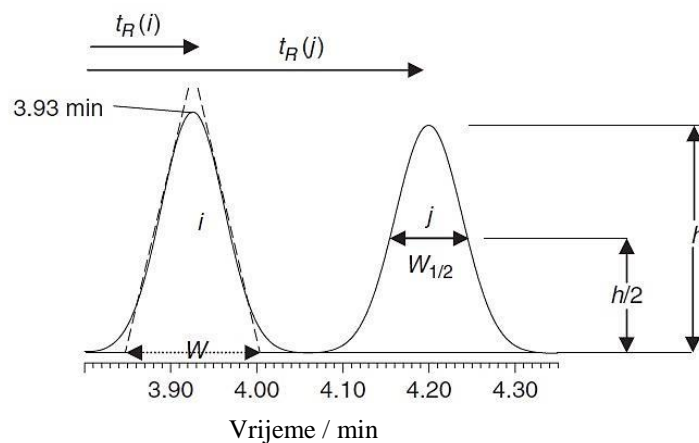
$$t_0 = \frac{V_0}{F} \quad (3)$$

V_0 predstavlja ukupni volumen pokretne faze unutar kromatografske kolone, unutar i izvan čestica kolone [27].

2.2.2. Širenje zone pika

Kod svake kromatografske analize dolazi do širenja zone pika. Fizikalni procesi koji utječu na širenje zone pika su Eddyeva difuzija, longitudinalna difuzija u pokretnoj fazi i otpor prijenosu mase u pokretnoj, nepokretnoj fazi i stagnirajućoj pokretnoj fazi [28]. Eddyeva difuzija javlja se zbog prisutnosti kanala različitih duljina i širina u poroznim strukturama. Ona je glavni uzrok širenja zone pika u LC. Kod punjenih kolona Eddyeva difuzija proporcionalna je veličini zrna punjenja. Longitudinalna difuzija prisutna je u pokretnoj fazi zbog prelaska otopljenih tvari iz područja veće u područje niže koncentracije. Longitudinalno širenje zone pika proporcionalno je koeficijentu difuzije. Pošto je brzina difuzije znatno veća u plinovima nego u kapljevina, longitudinalno širenje zone pika ima veliki utjecaj u GC. Širenje zone pika radi otpora prijenosu mase javlja se zbog prijelaza analita iz jedne u drugu fazu difuzijom i konvekcijom. Otpor prijenosu mase obrnuto je proporcionalan konstantama difuzije u obje faze [28].

Širina pika može se izraziti na više načina, jedni od njih su širina pika u baznoj liniji (W) i širina pika na polovici visine ($W_{1/2}$). Kod pika i (Slika 18.) povučene su tangente kroz točke infleksije, W je određena sjecištima tangenata i bazne linije [27]. Na piku j prikazana je $W_{1/2}$ (Slika 18.).



Slika 18. Prikaz širine bazne linije pika (W) i širine linije pika na polovici visine ($W_{1/2}$) [27]

Učinkovitost kolone (N) je kvantitativna veličina kojom se opisuje širenje kromatografske zone. N se izražava brojem teorijskih odsječaka prema izrazu (4) [27]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4)$$

Što je veća vrijednost N , pikovi su uži te je bolja separacija pikova na kromatogramu. Uz pretpostavku da pik ima oblik Gaussove krivulje, širina pika (W) opisuje se standardnom devijacijom Gaussove krivulje (σ) po izrazu $W = 4 \sigma$. Prema tome, izraz za N glasi [27]:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (5)$$

N se može izraziti i preko izraza (6):

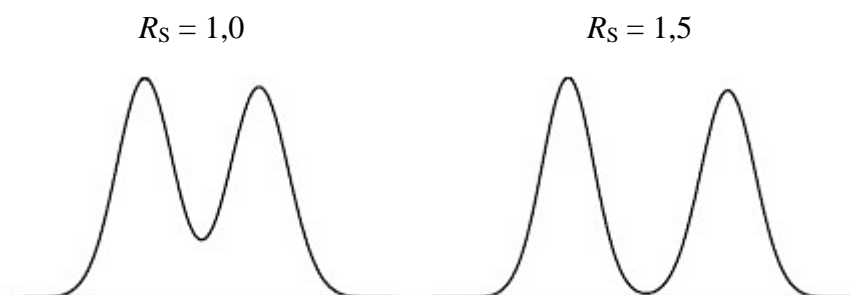
$$N = \frac{L}{H} \quad (6)$$

gdje je L duljina kromatografske kolone, H visina teorijskog odsječka [28].

Razlučivanje (R_S) je udaljenost između dva susjedna pika i i j , podijeljena sumom širina pikova u baznoj liniji pika. R_S se računa prema izrazu (7) [28]:

$$R_S = \frac{2[t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j} \quad (7)$$

Uz $R_S = 1,5$ dva pika odvojena su na baznoj liniji, dok uz $R_S = 1,0$ dolazi do 2 %-tnog preklapanja pikova uz pretpostavku da pikovi imaju oblik Gaussove krivulje (**Slika 19**).



Slika 19. Djelomična ($R_S = 1,0$) i potpuna ($R_S = 1,5$) separacija dva susjedna pika [27]

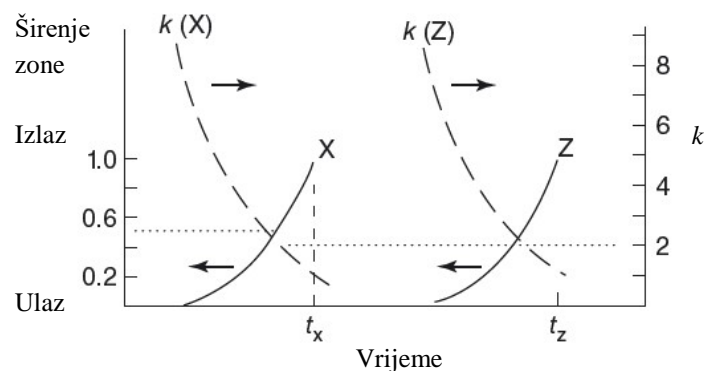
Razlučivanje dva pika određeno je s k , N i separacijskim faktorom (α). α je jednak omjeru faktora zadržavanja dva pika k_2 i k_1 , računa se prema izrazu (8):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (8)$$

gdje je $k_2 > k_1$ [28].

2.2.3. Izokratno i gradijentno eluiranje

Tijekom izokratnog eluiranja sastav pokretne faze se ne mijenja, dok se kod gradijentnog eluiranja sastav pokretne faze mijenja. Poželjno je da su vrijednosti k tijekom izokratnog eluiranja u rasponu $1 < k < 10$. Kada navedeno nije moguće, ne dolazi do potpune separacije analita uz izokratno eluiranje. Gradijentnim eluiranjem moguće je eluiranje svakog analita iz uzorka pri optimalnim uvjetima. Početna pokretna faza u gradijentnom eluiranju je „slaba“ (niski volumni udio otapala B), s vremenom raste volumni udio otapala B. Ovime se postiže kraće vrijeme analize te bolja separacija u odnosu na izokratno eluiranje. Tijekom gradijentnog eluiranja može se odrediti prosječni faktor zadržavanja, k^* . Na **Slici 20** prikazano je širenje zone prvog (X) i zadnjeg (Z) pika uz odgovarajuće vrijednosti k i k^* tijekom gradijentnog eluiranja. Analit s najslabijim zadržavanjem (X) najbrže putuje kroz kromatografsku kolonu, pri vremenu zadržavanja (t_X) analit X izlazi iz kolone te se javlja pik (X) na kromatogramu. k^* -vrijednost odgovara vrijednosti k , kada je pik putovao kroz polovicu kolone. Zbog sličnog načina putovanja različitih komponenata uzorka tijekom gradijentnog eluiranja, k^* -vrijednosti približno su jednake za sve pikove, a time i širine pikova [29].



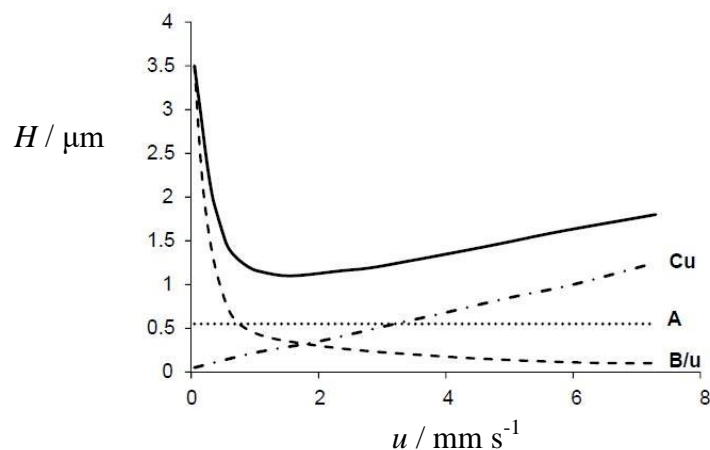
Slika 20. Prikaz širenja zone prvog (X) i zadnjeg (Z) pika tijekom gradijentnog eluiranja [29]

2.2.4. Van Deemterova jednadžba

Van Deemterova jednadžba je empirijska jednadžba koja daje informacije o učinkovitosti kromatografske analize [30]. Navedena jednadžba glasi:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (9)$$

gdje se koeficijent A odnosi na Eddyevu difuziju, B na longitudinalnu difuziju u pokretnoj fazi, C na otpor prijenosu mase u nepokretnoj fazi (GC) ili obje faze (LC), a u je linearna brzina [28]. Ovisnost H o u (**Slika 21.**) predstavlja grafički prikaz van Deemterove jednadžbe.



Slika 21. Van Deemterov graf [28]

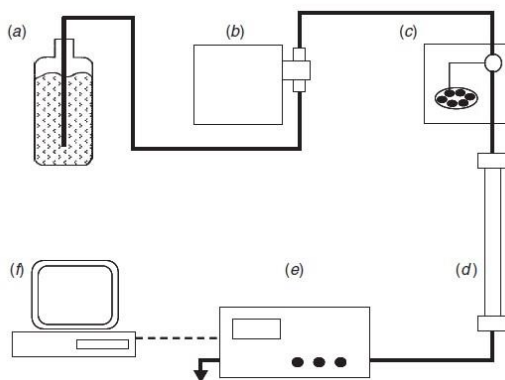
A ne ovisi o brzini, postiže najmanje vrijednosti kada su mala zrna punjenja kolone te sličnih dimenzija. Pošto se B smanjuje s povećanjem brzine protoka, B je podijeljena s u . C je posljedica kinetičkog otpora koji predstavlja vremenski odmak pri prelasku iz plinske

pokretne faze u nepokretnu fazu i natrag. Porastom protoka plina, sve više molekula na nepokretnoj fazi zaostaje za molekulama u pokretnoj fazi. C je proporcionalan u [30].

2.2.5. HPLC

Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su pumpa, injektor, kolona, detektor i računalo (**Slika 22.**). Otapalo se prenosi između navedenih dijelova kroz cijevi od nehrđajućeg čelika ili PEEK cijevi [26]. PEEK (polieter-eter-keton) je kristalni termoplastični polimerni materijal čija temperatura tališta iznosi 334 °C. On ima visoku mehaničku čvrstoću, otporan je na visoke temperature, kiseline, lužine, habanje [31].

Otapala za pokretnu fazu transportiraju se iz spremnika u komoru za miješanje, gdje se miješaju u zadanom volumnom omjeru. Iz komore dolaze do injektora uzorka. Injektor uzorka može biti ručni ili potpuno automatiziran. Injektor s kapilarnom cijevi unosi alikvot uzorka u pokretnu fazu. Uzorak s pokretnom fazom ulazi u kromatografsku kolonu, komponente uzorka dolaze u interakciju s nepokretnom fazom kolone. Pošto svaki analit ima različita fizikalno-kemijska svojstva, interakcije s nepokretnom fazom su različite a time se ostvaruje i različito vrijeme zadržavanja. Detektor mjeri električne signale analita, na računalo se prikazuje kromatogram. Analiti otopljeni u pokretnoj fazi nakon detektora skupljaju se u spremnicima za otpadna organska otapala [32].



Slika 22. Osnovni dijelovi HPLC-a: spremnik za pokretnu fazu (a), pumpa (b), automatski injektor (c), kolona (d), detektor (e), računalo (f) [33]

Jedan od glavnih problema vezanih uz HPLC je *carryover*. Direktnim injektiranjem uzorka niske koncentracije nakon uzorka visoke koncentracije, dolazi do *carryovera*. Točnije, prenosi se dio uzorka visoke koncentracije na uzorak niže koncentracije. U kromatogramu uzorka

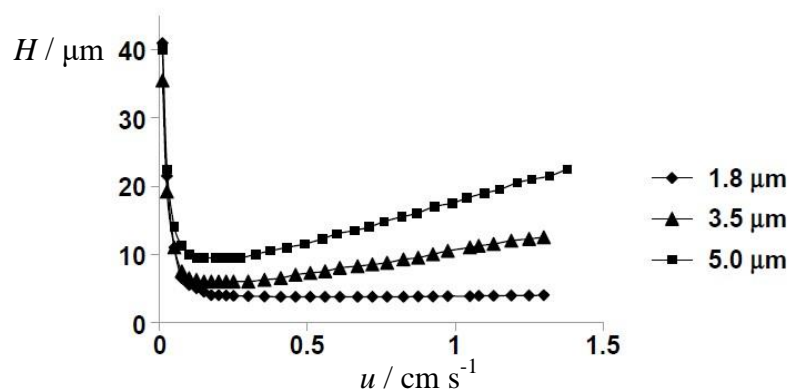
niske koncentracije, javlja se pik uzorka visoke koncentracije. Kako bi se izbjegnulo *carryover*, potrebno je injektirati slijepu probu između uzoraka [26].

Nepokretna faza HPLC kolone sadrži sferične čestice jednakih veličina [26]. HPLC kolone dolaze u različitim dimenzijama, veličinama čestica, pora, unutarnjeg promjera kolone (**Slika 23.**).



Slika 23. HPLC kolone [34]

Smanjenjem veličine čestica punjenja kolone, smanjuje se teorijska visina odsječka, odnosno veća je učinkovitost kolone (**Slika 24.**). Porastom brzine protoka pokretne faze, ne dolazi do velikog porasta H -vrijednosti kod 1,8 μm čestica [26].



Slika 24. Van Deemterov graf kolona s različitim veličinama česticama [26]

2.2.6. Detektori

Kromatografski detektor pretvara fizičko ili kemijsko svojstvo eluiranog analita u električni signal, koji se može povezati s koncentracijom analita. HPLC detektori nalaze se iza kromatografske kolone, kako bi se smanjilo širenje zone pika nakon izlaska iz kolone. GD i GK izravno su povezane s koncentracijom uzorka u detektorskoj ćeliji. Kod UV detektora

intenzitet signala raste s dužinom detektorske ćelije, odnosno niža je GD. Međutim, detektorska ćelija mora imati što manji volumen, kako bi se smanjilo širenje zone pika izvan kromatografske kolone [33]. Kod detektorskih ćelija promjera < 1 mm smanjuje se intenzitet signala zbog raspršivanja svjetlosti u ćeliji [35]. Navedeni problem riješen je oblaganjem unutarnje površine detektorske ćelije s reflektirajućim materijalom. Ovime je smanjeno širenje zone pika [33].

Volumen kromatografskog pika (V_p) ovisi o širenju zone pika unutar kolone (V_{p0}) i širenju zone pika izvan kolone (dodatni faktori). V_p računa se prema izrazu (10):

$$V_p = (V_{p0}^2 + 4V_s^2 + V_{pl}^2 + V_{det}^2 + V_{ds}^2)^{0,5} \quad (10)$$

gdje je V_s volumni doprinos injektiranja, V_{pl} doprinos cijevi i armature, V_{det} doprinos detektorske ćelije, V_{ds} doprinos podatkovnog sustava [35].

Kako bi smanjilo širenje zone pikova, V_{det} mora biti manji od jedne desetine V_p . Izraz za V_p glasi:

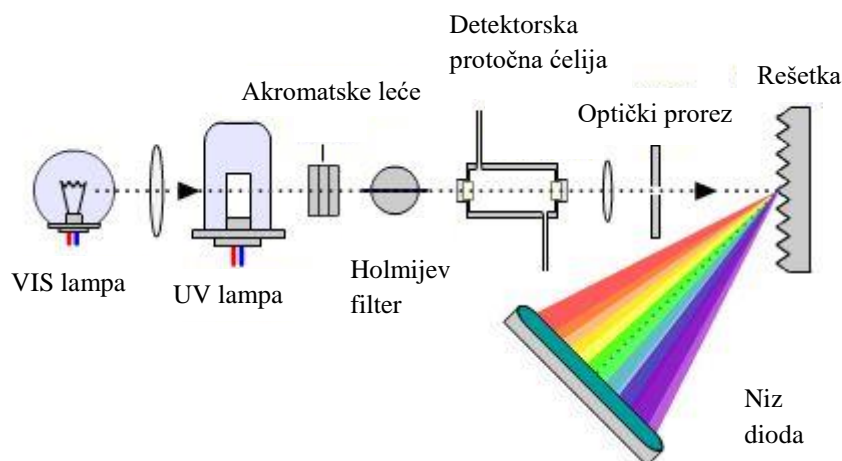
$$V_p = WF \quad (11)$$

gdje je W širina pika u baznoj liniji, F protok pokretne faze [33].

U detektorskoj protočnoj ćeliji detektiraju se analiti. Primjeri HPLC detektora su: UV-Vis, spektrometar masa, fluorescencijski, konduktometrijski [33].

UV-Vis detektori su najčešće korišteni HPLC detektori, koji se temelje na apsorpciji UV i Vis svjetlosti. Izmjerena apsorbcija proporcionalna je koncentraciji uzorka prema Beerovom zakonu. Prema konfiguraciji UV detektori dijele se na detektore fiksne valne duljine, detektore promjenjive valne duljine i DAD detektore [33].

DAD detektori (**Slika 25.**) sadrže od 128 do čak 4096 svjetlosnih dioda. Svaka dioda predstavlja drugu valnu duljinu. Svjetlost prvo prolazi kroz uzorak, udara u rešetku te se rasprši na nizu dioda [31]. Za razliku od ostalih detektora, DAD detektor koristi polikromatsku svjetlost, odnosno moguće je istovremeno prikupljati podatke pri više valnih duljina [26]. Ovime je omogućena analiza više analita iz jednog uzorka. Pošto se spektri svih prisutnih analita iz uzorka generiraju u isto vrijeme, DAD doprinosi identifikaciji pikova [33].



Slika 25. DAD detektor [36]

2.3. Validacija analitičkih metoda

Prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017, validacija je verifikacija da su utvrđeni zahtjevi prikladni za namjeravanu upotrebu. Verifikacija je osiguranje objektivnog dokaza da promatrani predmet ispunjava utvrđene zahtjeve [37]. Validacija metode potvrđuje je li metoda prikladna za određenu namjenu. Potrebno je validirati nestandardne metode, metode razvijene u laboratoriju, standardne metode koje su korištene izvan predviđene namjene, modificirane standardne metode [38]. Validacijom se određuju izvedbene karakteristike metode:

1. Selektivnost/specifičnost

Selektivnost je sposobnost detektiranja i kvantificiranja željenog analita uz izolaciju analita od interferencija ekstrakcijom selektivnim otapalom, kromatografskim ili drugim odvajanjem faza, specifičnim biokemijskim reakcijama, nuklearnom magnetskom rezonancijom, infracrvenom spektrometrijom ili spektrometrijom masa [39].

Specifičnost je sposobnost nedvosmislene procjene analita u prisutnosti drugih komponenata. Druge komponente označavaju nečistoće, matricu, degradante [40].

2. Linearnost

Linearnost je sposobnost dobivanja rezultata mjerenja koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku unutar određenog raspona koncentracija [40].

3. Granice detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije (GD) je najniža koncentracija analita koja se može detektirati metodom uz određenu razinu pouzdanosti [38].

Granica kvantifikacije (GK) je najniža koncentracija analita koja se može kvantificirati metodom uz određenu razinu pouzdanosti [38].

4. Točnost

Točnost predstavlja bliskost slaganja između izmjerene vrijednosti i prave, referentne vrijednosti [40]. Određuje se procjenom sustavne (istinitost) i slučajne pogreške (preciznost) [41].

5. Istinitost

Istinitost izražava slaganje beskonačnog broja ponovljenih mjerenja i prave vrijednosti. Istinitost se izražava kao iskorištenje. Sustavna pogreška uzrok je razlike između srednje vrijednosti ponovljenih mjerenja i prave vrijednosti [41].

6. Preciznost

Preciznost izražava bliskost slaganja niza mjerenja iz istoga uzorka. Ona se iskazuje preko ponovljivosti, međupreciznosti i obnovljivosti. Ponovljivost je preciznost pri istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Međupreciznost izražava varijacije unutar laboratorija u različitim danima, s različitim analitičarima, opremom. Obnovljivost predstavlja preciznost između više laboratorija, ispituje se prilikom normizacije metoda u okviru međulaboratorijskih usporedbenih ispitivanja [40].

7. Radno područje

Radno područje predstavlja interval unutar kojega metoda daje rezultate s definiranom nesigurnošću. GK je donja granica radnog područja, dok gornji dio raspona čine koncentracije pri kojima dolazi do znatnog odstupanja osjetljivosti metode [38].

8. Robusnost

Robusnost je sposobnost analitičkog postupka da daje nepromijenjene rezultate uslijed malih, nenamjernih varijacija eksperimentalnih uvjeta. Ona je indikator pouzdanosti metode [40].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Popis kemikalija i proizvođača kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu rada navedeni su u **Tablici 4.**

Tablica 4. Popis kemikalija i proizvođača kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	CAS-No	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	CH ₃ CN	p.a.	75-05-8	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Mravlja kiselina	CH ₂ O ₂	p.a.	64-18-6	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
Metanol	CH ₃ OH	p.a.	67-56-1	Avantor Performance Materials Poland S. A., Gliwice, Poljska
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂	p.a.	75-09-2	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Natrijev tiosulfat	Na ₂ S ₂ O ₃	p.a.	7772-98-7	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska

3.1.2. N-nitrozamini

U **Tablicama 5. i 6.** navedena su fizikalno-kemijska svojstva pet ispitivanih *N*-nitrozamina (NMOR, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA). *N*-nitrozamini su dezinfekcijski nusprodukti (engl. *disinfection byproducts*, DBP) koji uglavnom nastaju prilikom dezinfekcije vode za piće kloraminom [42], ali mogu nastati i prilikom korištenja drugih dezinfekcijskih sredstva poput ozona i klorovog dioksida [43].

Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva NMOR-a, NPYR-a, NDEA-a

Ime	NMOR [44]	NPYR [46]	NDEA [47]
Molekulska formula	$C_4H_8N_2O_2$	$C_4H_8N_2O$	$C_4H_{10}N_2O$
Molarna masa	116,12 g mol ⁻¹	100,12 g mol ⁻¹	102,14 g mol ⁻¹
CAS broj	59-89-2	930-55-2	55-18-5
Topljivost u vodi, <i>S</i>	92,8 g L ⁻¹	52,9 g L ⁻¹	106,2 g L ⁻¹
Naziv po IUPAC-u	4-nitrozomorfolin	1-nitrozopirolidin	<i>N,N</i> -dietilnitrozni amid
Vrelište	225 °C [45]	214 °C	177 °C
Talište	-	-	< 25 °C
p <i>K</i> _a	3,14	3,3	3,14

Tablica 6. Fizikalno-kemijska svojstva NDPA-a i NDBA-a

Ime	NDPA [45]	NDBA [49]
Molekulska formula	$C_6H_{14}N_2O$	$C_8H_{18}N_2O$
Molarna masa	130,19 g mol ⁻¹	158,24 g mol ⁻¹
CAS broj	621-64-7	924-16-3
Topljivost u vodi, <i>S</i>	9,9 g L ⁻¹ [48]	1,27 g L ⁻¹ (pri 24 °C) [45]
Naziv po IUPAC-u	<i>N,N</i> -dipropilnitrozni amid	<i>N,N</i> -dibutilnitrozni amid
Vrelište	206 °C	237 °C
Talište	-	< 25 °C
p <i>K</i> _a	3,18 [48]	3,14

3.1.3. Uzorci vode

U radu je korištena MilliQ voda, vodovodna voda i vodovodna voda s dodatkom Na₂S₂O₃.

MilliQ voda pripremljena je korištenjem Milli-Q sustava (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, SAD).

Vodovodna voda uzorkovana je u laboratoriju Zavoda za analitičku kemiju. Vodovodna voda uzorkovana je nakon 3 min propuštanja vodovodne vode iz slavine. Nakon 3 min propuštanja vodovodne vode, vodovodna voda skupljena je u čaši od 1000 mL.

Vodovodna voda s dodatkom Na₂S₂O₃ pripremljena je otapanjem 50 g Na₂S₂O₃ u 500 mL uzorkovane vodovodne vode. Na₂S₂O₃ je dodan vodovodnoj vodi kako bi se smanjio utjecaj matrice vodovodne vode na određivanje pet *N*-nitrozamina (analiti).

3.1.4. Kromatografske kolone

Korištene kromatografske kolone su Kinetex 5 μm C₁₈ 100 Å kolona, Synergi™ 4 μm Fusion-RP 80 Å kolona i Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN kolona.

Nepokretna faza u Kinetex 5 μm C₁₈ koloni 100 Å, 150 x 4,6 mm, je C₁₈ lanac s trimetilsililnom skupinom promjera zrna punjenja 5 μm .

Synergi™ 4 μm Fusion-RP 80 Å kolona ima promjer zrna punjenja 4 μm . Nepokretna faza je polarno ugrađen C₁₈ lanac s trimetilsililnom skupinom. Veličina pora i unutarnji promjer kolone su 80 Å, odnosno 4,6 mm. Duljina kolone je 150 mm. Navedena kolona koristi se za separaciju smjesa s polarnim i nepolarnim komponentama.

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-CN kolona ima promjer zrna punjenja 2,7 μm . Nepokretna faza pripremljena je kemijskim vezanjem monosloja dimetil-cijanopropilsilana na poroznu ljusku silicijevog dioksida. Duljina kolone je 150 mm. Unutarnji promjer kolone i veličina pora iznose 4,6 mm, odnosno 120 Å.

3.1.5. SPE kolone i eluensi

Oasis HLB 3 mL polipropilenske SPE kolone sadrže 60 mg HLB sorbensa. HLB sorbens je kopolimerni sorbens obrnute faze koji se koristi za ekstrakciju kiselih, bazičnih i neutralnih spojeva iz različitih matrica. Navedeni sorbens je kopolimer divinilbenzena i vinil pirolidinona. Pirolidinon djeluje kao hidrofilna skupina i poboljšava zadržavanje određenih polarnih analita [50]. Pošto je HLB sorbens vlažan u kontaktu s vodom, on postiže visoko zadržavanje te obnovljivost i kada je sorbens suh. Veličina pora i čestica sorbensa iznose 80 Å, odnosno 30 μm .

Supelco Supelclean™ 6 mL polipropilenske SPE kolone sadrže 2 g kokosova ugljena (sorbens). Koriste se za analizu vode za piće, podzemnih i otpadnih voda. Mehanizam zadržavanja je mehanizam obrnute faze. Navedene kolone razvijene su specifično za EPA metodu 521 „Određivanje *N*-nitrozamina u vodi za piće primjenom ekstrakcije čvrstom fazom i plinske kromatografije na kapilarnoj koloni s injektiranjem velikog volumena i spregnute spektrometrije masa s kemijskom ionizacijom“ [51].

Korišteni eluensi su metanol i diklormetan.

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument koji mjeri masu uz visoku razinu točnosti, uz očitavanje od 0,1 mg ili manje. Ona je ograđena staklenim pokrovom, kako bi se uzorak i posuda zaštitili od strujanja zraka. Strujanje zraka dovodi do nestabilnosti i netočnih rezultata. Analitičke vage tvrtke Mettler Toledo imaju kapacitet vaganja 52 – 520 g i očitavanje 0,1 – 0,002 mg. Vaganje primjenom navedenih vaga temelji se na kompenzaciji elektromagnetske sile. Mjerna ćelija stvara kompenzacijsku silu, koja suzbija djelovanje sile predmeta stavljenog na mjernu podlogu. Iznos kompenzacijske elektromagnetske sile definira težinu predmeta. Rezultat vaganja prikazuje se na zaslonu vage. Analitičku vagu potrebno je umjeriti. Umjeravanje analitičkih vaga provode ovlašteni servisni tehničari prema standardnom postupku [52]. Umjeravanje se provodi kako bi se postigli pouzdani i precizni rezultati vaganja. Prilikom umjeravanja referentni uteg postavlja se na mjernu plohu vage. Uspoređuje se razlika između očitane i stvarne vrijednosti utega. Sa završetkom umjeravanja isporučuje se certifikat, koji ukazuje je li vaga zadovoljila potrebne zahtjeve [53]. U ovome radu korištena je analitička vaga Metler Toledo XA105 DualRange (**Slika 26.**). Specifikacije navedene analitičke vage prikazane su u **Tablici 7.**



Slika 26. Analitička vaga Metler Toledo XA105 DualRange

Tablica 7. Specifikacije analitičke vage Metler Toledo XA105 DualRange [54]

Maksimalni kapacitet	120 g
Ponovljivost	0,01 mg (0 - 41 g)
	0,1 mg (41 - 120 g)
Odstupanje linearnosti	± 0,2 mg
Pomak osjetljivosti	0,8 mg (100 g)
Očitanje	0,1 mg

3.2.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom

Detekcija i kvantifikacija *N*-nitrozamina provedena je na Waters 2795 Alliance HPLC sustavu s 2996 DAD detektorom (**Slika 27.**). Postupkom pranja (engl. *wet prime*) čiste se linijski vakuumski otplinjač, igla i ventil za ubrizgavanje uzorka [55]. Postupak pranje sastojao se u propuštanju MilliQ vode kroz HPLC sustav 8 min pri protoku 5 mL min⁻¹. Zatim je propušten acetonitril tijekom 8 min pri protoku 5 mL min⁻¹. Nakon postupka pranja, provedeno je pranje igle. Pranje unutrašnje i vanjske strane igle (engl. *wash needle*) sastojalo se u propuštanju 600 µL 20 %-tne otopine acetonitrila u MilliQ vodi kroz četiri ciklusa pranja. Pranjem šprice (engl. *refresh syringe*) uklanjaju se tragovi otapala iz prethodne analize, mjhurići zraka iz cijevi za pokretnu fazu ili šprice [56]. Pranje šprice sastojalo se u propuštanju 600 µL acetonitrila kroz šest ciklusa. Kondicioniranje kolone sastojalo se u propuštanju acetonitrila kroz 5 µm Kinetex 100 Å, 4,6 x 150 mm kromatografsku kolonu pri protocima 0,1 – 0,5 mL min⁻¹. Ekvilibriranje kolone provodi se kako bi se HPLC sustav pripremio na početne uvjete analize. U ovome radu početni uvjeti analize su 5 % otapala B (acetonitril). Pošto se kondicioniranje provodi pri 100 % otapala B, potrebno je postepeno smanjivati volumni udio otapala B do 5 %. HPLC sustav stabiliziran je 10 min na 90 % otapala B, 10 min na 50 % otapala B. Zatim je provedeno ekvilibriranje kromatografske kolone s 5 % otapala B (30 min). Tijekom ekvilibriranja uključena je UV lampa, kako bi se pripremila za rad. Radni tlak tijekom ekvilibriranja kolone iznosio je 66 bar.

Vrijeme ekvilibriranja kolone (t_{eq}) računa se prema izrazu (12):

$$t_{eq} = \frac{10V_m}{F} \quad (12)$$

gdje je V_m volumen praznine u kromatografskoj koloni, F protok pokretne faze [57].

V_m se računa prema izrazu (13):

$$V_m = 0,7 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (13)$$

gdje je r unutarnji polumjer kolone, L duljina kolone [57].

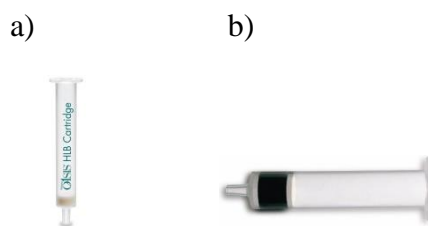
Prema izrazu (12) t_{eq} 5 μm Kinetex 100 Å, 4,6 x 150 mm kolone iznosi 34 min. Nakon ekvilibriranja, pokrenuta je analiza uzoraka. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 20 μL , a vrijeme analize 30 min. Analiti su detektirani pri valnim duljinama: 238,8 nm (NMOR); 230,8 nm (NPYR); 231,8 nm (NDEA); 233,8 nm (NDPA, NDBA).



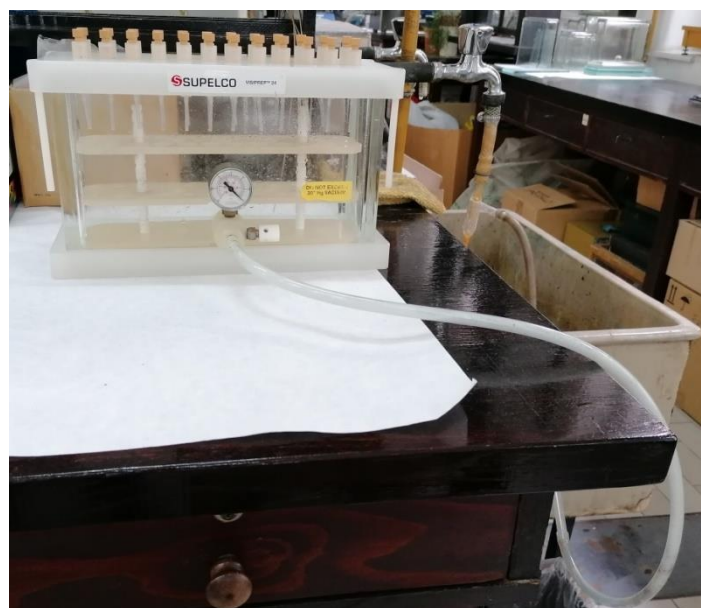
Slika 27. Waters 2795 Alliance HPLC system s 2996 DAD detektorom

3.2.3. Ekstrakcija čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) provedena je s otopinama smjese pet *N*-nitrozamina različitih koncentracija (Tablica 9.) uz 3 mL Oasis SPE kolone s HLB sorbensom i 6 mL Supelclean™ SPE kolone s kokosovim ugljenom (**Slika 28.**). Korišteni je uređaj Supelco Visiprep SPE (**Slika 29.**) koji omogućuje istodobnu ekstrakciju 24 uzoraka. Patentirani vijčani ventili unutar svakog ulaza za SPE kolone omogućuju preciznu kontrolu protoka kroz kolonu [58]. Okretanjem ventila za tlak, regulira se radni tlak. Radni tlak iznosio je 50 kPa, dok maksimalno dozvoljeni tlak iznosi 68 kPa.



Slika 28. Prikaz a) 3 mL Oasis SPE kolone s HLB sorbentsom [59], b) 6 mL Supelclean™ SPE kolone s kokosovim ugljenom [60]



Slika 29. Supelco Visiprep SPE

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema temeljnih standardnih otopina (TSO) u MilliQ vodi

TSO koncentracije 100 mg L^{-1} pripremljene su vaganjem 10 mg svakog od ispitivanih *N*-nitrozamina (NMOR, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA) na analitičkoj vazi Metler Toledo XA105 DualRange. Odvage su prenesene u odmjerne tikvice od 100 mL, tikvice su nadopunjene do oznake MilliQ vodom.

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

Pripremljeno je 13 standardnih otopina smjese pet *N*-nitrozamina u rasponu koncentracija $0,01 - 10 \text{ mg L}^{-1}$. U odmjernu tikvicu od 10 mL dodan je određeni alikvot TSO, ovisno o željenoj koncentraciji standardne otopine (**Tablica 8.**). Zatim su tikvice nadopunjene do

oznake s MilliQ vodom. Svaka standardna otopina injektirana je jednom. Otopine koncentracija 1; 3,25; 5,5; 7,75 i 10 mg L⁻¹ pripremljene su iz odgovarajućeg alikvota TSO. Standardne otopine koncentracija 0,1; 0,325; 0,55 i 0,775 pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine koncentracije 10 mg L⁻¹. Otopine koncentracija 0,01; 0,0325; 0,055 i 0,0775 pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine koncentracije 1 mg L⁻¹.

Tablica 8. Priprema standardnih otopina smjese pet *N*-nitrozamina za ispitivanje linearnosti i ponovljivosti injektiranja HPLC-DAD metode

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

3.3.3. Priprema standardnih otopina u MilliQ vodi za provjeru preciznosti HPLC-DAD metode

Za provjeru ponovljivosti HPLC-DAD metode pripremljene su otopine smjese pet *N*-nitrozamina koncentracija 0,01; 0,0325; 0,055; 0,0775; 0,1 i 10 mg L⁻¹ u MilliQ vodi (**Tablica 8.**). Svaka od navedenih otopina prenesena je u vijalu te je injektirana 10 puta.

Za provjeru međupreciznosti HPLC-DAD metode pripremljene su otopine smjese pet *N*-nitrozamina koncentracija 10; 3,25 i 1 mg L⁻¹ u MilliQ vodi u tri različita dana (**Tablica 8.**).

3.3.4. Priprema standardnih otopina u MilliQ, vodovodnoj vodi i vodovodnoj vodi s Na₂S₂O₃ za provjeru istinitosti i ponovljivosti injektiranja SPE-HPLC-DAD metode

100 mL standardne otopine smjese pet *N*-nitrozamina koncentracije 0,1 mg L⁻¹ (MilliQ i vodovodna voda) i 500 mL otopina koncentracije 0,02 mg L⁻¹ (MilliQ voda) pripremljene su izravno iz TSO (**Tablica 9**). Dobiveni ekstrakti injektirani su dva puta u HPLC-DAD sustavu.

500 mL otopine koncentracije 0,002 mg L⁻¹ (MilliQ i vodovodna voda) pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine koncentracije 1 mg L⁻¹. 500 mL otopine koncentracije 0,00016 mg L⁻¹ (MilliQ, vodovodna voda i vodovodna voda s Na₂S₂O₃) pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine koncentracije 0,08 mg L⁻¹. 500 mL otopine koncentracije 0,0001 mg L⁻¹ (MilliQ, vodovodna voda i vodovodna voda s Na₂S₂O₃) pripremljene su međurazrjeđenjem iz TSO i standardne otopine koncentracije 0,05 mg L⁻¹ (**Tablica 8**). Ekstrakti navedenih otopina injektirani su tri puta u HPLC-DAD sustavu.

Tablica 9. Priprema standardnih otopina za provjeru istinitosti i ponovljivosti injektiranja SPE-HPLC-DAD metode

γ / mg L ⁻¹	Faktor razrjeđenja	Volumen TSO-e / mL	Volumen odmjerne tikvice / mL
100	1	-	-
0,1	1000	0,1	100
0,02	5000	0,1	500
0,002	50000	0,01	500
0,00016	625000	0,0008	500
0,0001	1000000	0,0005	500

3.3.5. Statistička obrada rezultata

Ponovljivost je iskazana kao relativno standardno odstupanje (RSD, %) koje je određeno iz površina pikova pri različitim koncentracijama unutar linearnog područja. Dixon-ovim testom (Q-test) odbačene su sumnjive vrijednosti te su označene crvenom bojom (**Tablice P1-P5**). Kako bi se proveo Q-test, potrebno je izračunati Q_{max} i Q_{min} prema izrazima (14) i (15):

$$Q_{max} = \frac{x_n - x_{n-1}}{w} \quad (14)$$

$$Q_{min} = \frac{x_1 - x_2}{w} \quad (15)$$

gdje je w raspon mjerenja, x_n najveća izmjerena vrijednost, x_{n-1} druga najveća izmjerena vrijednost, x_1 najmanja izmjerena vrijednost, x_2 druga najmanja izmjerena vrijednost [61]. Zatim se uspoređuju izračunate Q -vrijednosti s tabličnim Q -vrijednostima uz 90 %-tnu razinu pouzdanosti, $Q_{90\%}$ (**Tablica 10.**). Ako je izračunata Q -vrijednost veća od $Q_{90\%}$, mjerenje je sumnjivo te se odbacuje. Ako je izračunata Q -vrijednost manja od $Q_{90\%}$, mjerenje nije sumnjivo te se ne odbacuje.

Tablica 10. Prikaz $Q_{90\%}$ uz 90 %-tnu razinu pouzdanosti za različiti broj mjerenja (n) [61]

n	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$Q_{90\%}$	0,94	0,76	0,64	0,56	0,51	0,47	0,44	0,41	0,39	0,37

Izračunate su srednje vrijednosti površina kromatografskih pikova (\bar{x}), standardno odstupanje (s) i relativno standardno odstupanje (RSD). Za manji broj mjerenja (2-20 mjerenja), s se računa prema izrazu (16):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (16)$$

gdje je x_i pojedinačna vrijednost površine pika, \bar{x} srednja vrijednost površine kromatografskih pikova i n broj mjerenja [61]. RSD se računa prema formuli (17):

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (17)$$

Međupreciznost je iskazana kao RSD, nije proveden Q-test kod međupreciznosti zbog malog broja mjerenja (3 mjerenja).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode

Tijekom razvoja i optimizacije HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozaimina u vodi ispitane su kromatografske kolone različitih punjenja i različitih dimenzija te nepokretne faze različitog sastava.

Prva ispitana pokretna faza za kromatografsku separaciju 10 mg L⁻¹ otopine tri *N*-nitrozaimina (NDEA, NDPA, NDBA) kromatografijom obrnutih faza je MilliQ voda (A) i metanol (B) uz izokratno eluiranje. U **Tablici 11.** navedeni su sastavi pokretne faze ispitani uz izokratno eluiranje. Vrijeme analize iznosilo je 20 min. Korištena je Kinetex 5 μm C₁₈ kromatografska kolona.

Tablica 11. Sastav pokretne faze uz izokratno eluiranje s pokretnom fazom MilliQ voda (A) i metanol (B)

A / %	B / %
90	10
80	20
70	30
60	40
50	50

Pri niti jednom od ispitanih izokratnih eluiranja s metanolom kao organskom fazom (**Tablica 11.**) nisu uočena tri pika *N*-nitrozaimina. To nam ukazuje da, ili nije došlo do separacije pa je uočen manji broj pikova, ili je trajanje eluiranja od 20 min prekratko što je i potvrđeno uočavanjem pikova na kromatogramu slijepog uzorka koji je analiziran neposredno nakon standarda *N*-nitrozaimina.

Sljedeća ispitana pokretna faza bila je smjesa MilliQ vode (A) i acetonitrila (B). Ispitani sastavi pokretne faze pri izokratnom eluiranju bili su jednaki ispitanim sastavima prilikom izokratnog eluiranja pokretne faze MilliQ voda i metanol (**Tablica 11.**). Vrijeme analize povećano je s dosadašnjih 20 min na 30 min. Pri sastavu pokretne faze 40 % B te 50 % B separirana su tri *N*-nitrozaimina unutar 30 min analize. Kod pokretne faze s 50 % B, pikovi su većega intenziteta i manjih vrijednosti t_R , u odnosu na pokretnu fazu s 40 % B. Na **Slici P1.** nalazi se kromatogram 10 mg L⁻¹ otopine tri *N*-nitrozaimina pri izokratnom eluiranju uz 50 %

B. Pikovi *N*-nitrozamina javljaju se pri $t_R = 4,14$ min (NDEA), $t_R = 6,41$ min (NDPA) i $t_R = 12,44$ min (NDBA).

Ispitana je i pokretna faza 1 %-tna mravlja kiselina u MilliQ vodi (A) i 1 %-tna mravlja kiselina u metanolu (B). Analizirana je 10 mg L^{-1} otopina tri *N*-nitrozamina pri ranije navedenim udjelima organske i vodene faze (**Tablica 11.**) uz izokratno eluiranje. Vrijeme analize iznosilo je 30 min. Jedino kod pokretne faze s 50 % B došlo je do potpune separacije tri *N*-nitrozamina (**Slika P2.**). Na **Slici P2.** uočavaju se signali *N*-nitrozamina pri $t_R = 4,27$ min (NDEA), $t_R = 8,02$ min (NDPA), $t_R = 25,04$ min (NDBA).

U sljedećem koraku ispitana je separacija pet *N*-nitrozamina (NMOR, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA) u smjesi pri koncentraciji svakog analita 10 mg L^{-1} , s pokretnom fazom sastavljenom od 1 %-tne mravlje kiseline u MilliQ vodi i 1 %-tne mravlje kiseline u acetonitrilu u različitim volumnim omjerima (**Tablica 11.**) uz izokratno eluiranje. Niti u jednom od ovih eksperimenata nije došlo do potpune separacije *N*-nitrozamina. Najbolja separacija *N*-nitrozamina postignuta je uz 40 % B (**Slika P3.**). Signali NMOR-a i NPYR-a su preklapljeni. Pikovi *N*-nitrozamina nalaze se pri $t_R = 3,57$ min (NMOR), $t_R = 3,69$ min (NPYR), $t_R = 4,66$ min (NDEA), $t_R = 9,02$ min (NDPA), $t_R = 24,31$ min (NDBA).

Već je ranije navedena pokretna faza MilliQ voda (A) i acetonitril (B) pri kojoj dolazi do potpune separacije tri *N*-nitrozamina (**Slika P1.**). Ista pokretna faza korištena je za separaciju pet *N*-nitrozamina. Međutim, pri ispitanim izokratnim eluiranjima nije došlo do potpunog odvajanja svih *N*-nitrozamina. Najučinkovitija separacija *N*-nitrozamina postignuta je pri sastavu pokretne faze od 40 % B (**Slika P4.**). Pik NMOR-a ($t_R = 3,59$ min) preklapljen je s pikom NPYR-a (3,69 min). Ostali pikovi nalaze se pri 4,71 (NDEA); 9,21 (NDPA) i 24,80 min (NDBA).

Ista pokretna faza korištena je za separaciju pet *N*-nitrozamina sa Synergi™ 4 μm Fusion-RP kolonom. Pri niti jednom od ispitanih izokratnih eluiranja nije došlo do potpune separacije *N*-nitrozamina. Najbolja separacija i pikovi najvećeg intenziteta postignuti su pri sastavu pokretne faze od 40 % B (**Slika P5.**). Pikovi *N*-nitrozamina nalaze se pri 4,86; 5,09; 7,19 i 15,72 min. Vrijeme analize od 30 min nije dovoljno za separaciju svih pet *N*-nitrozamina, odnosno pik jednog *N*-nitrozamina pojavljuje se na kromatogramu slijepog uzorka analiziranog neposredno nakon analize standarda *N*-nitrozamina, pri 7,26 min uz sastav pokretne faze od 50 % B.

Pet *N*-nitrozamina djelomično je separirano s Agilent kolonom pri sastavu pokretne faze od 40 % acetonitrila (**Slika P6.**). Pri navedenom izokratnom eluiranju, pikovi su najvećeg intenziteta. Uočeno je preklapanje dva pika *N*-nitrozamina pri 4,21 min, što je potvrđeno analizom UV-spektra u piku. Zadnji eluirani *N*-nitrozamin ima vrijeme zadržavanja $t_R = 8,71$ min. Pikovi preostala dva *N*-nitrozamina javljaju se pri 4,71 i 6,14 min.

Od svih ispitanih pokretnih faza, s pokretnom fazom MilliQ voda (A) i acetonitril (B) dobiveni su pikovi najvećeg intenziteta, šumova nema ili su zanemarivi u odnosu na pikove *N*-nitrozamina. Sa Synergi kolonom postignuta je najslabija separacija, vrijeme analize od 30 min nije bilo dovoljno za separaciju *N*-nitrozamina. Agilent i Kinetex kolone omogućuju djelomičnu separaciju *N*-nitrozamina unutar 30 min analize uz izokratno eluiranje. Pošto nije moguća potpuna separacija *N*-nitrozamina uz izokratno eluiranje, sljedeći korak bio je ispitivanje gradijentnog eluiranja na Kinetex i Agilent kolonama.

Na Agilent i Kinetex kolonama ispitivano je gradijentno eluiranje *N*-nitrozamina (**Tablica 12.**). Pikovi NMOR-a i NPYR-a nisu u potpunosti separirani na Agilent koloni (**Slika P7.**). Uz Kinetex kolonu NMOR i NPYR separirani su u potpunosti (**Slika P8.**). Iz navedenog razloga odabrana je Kinetex kolona za separaciju *N*-nitrozamina. Vrijeme analize iznosilo je 35 min.

Tablica 12. Sastav pokretne faze prilikom gradijentnog eluiranja

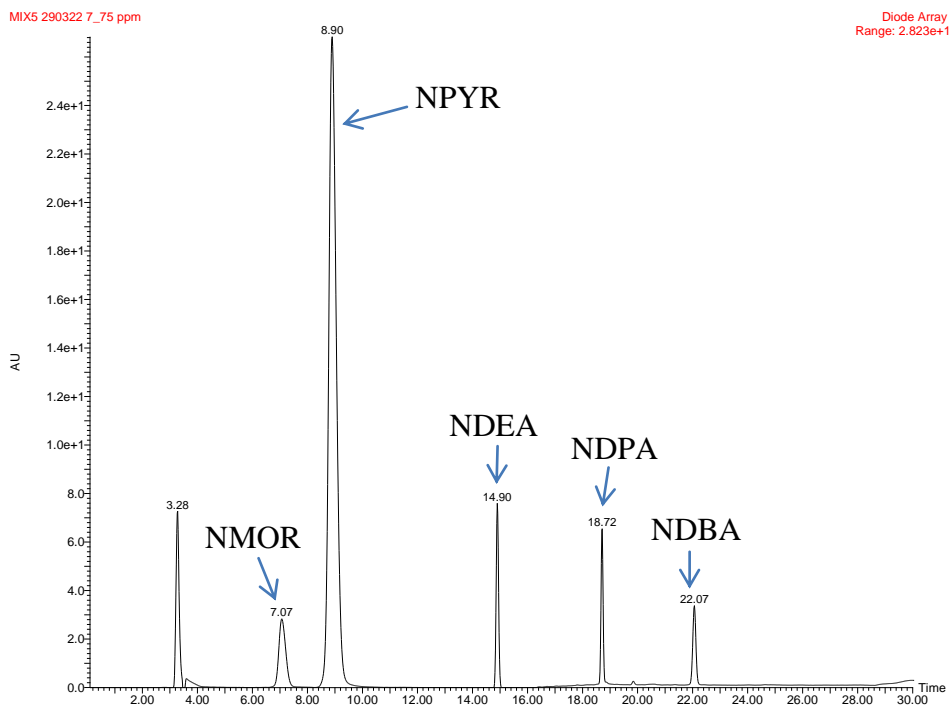
<i>t</i> / min	A / %	B / %
0-7,50	95	5
7,51-15	95-40	5-60
15,01-30	40	60
30,01-35	95	5

U sljedećim eksperimentima ispitani su različiti gradijenti tako je mijenjano vrijeme i nagib gradijenta. Optimalni gradijent za separaciju pet *N*-nitrozamina naveden je u **Tablici 13.** Analiza je skraćena s 35 min na 30 min.

Tablica 13. Sastav pokretne faze uz gradijentno eluiranje

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

Ispitivani *N*-nitrozamini separirani su na Kinetex 5 μm C_{18} koloni, čija je nepokretna faza izrazito nepolarna. Što je *N*-nitrozamin nepolarniji, on će se više zadržati na nepokretnoj fazi u C_{18} koloni. Porastom nepolarnog karaktera *N*-nitrozamina, raste t_R . Prema navedenom, NDBA je najnepolarniji, a NMOR najpolarniji od ispitivanih *N*-nitrozamina. NDBA se najduže, a NMOR najkraće zadržava na nepokretnoj C_{18} fazi u Kinetex koloni (**Slika 30.**).



Slika 30. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina koncentracije $7,75 \text{ mg L}^{-1}$ u MilliQ vodi

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

Validacija HPLC-DAD metode za određivanje pet *N*-nitrozamina u MilliQ vodi obuhvaća određivanje selektivnosti, linearnosti, ponovljivosti, međupreciznosti, istinitosti, granice detekcije i granice kvantifikacije. U **Tablici 14.** nalaze se kriteriji prihvatljivosti za navedene izvedbene karakteristike. Dobra laboratorijska praksa (DLP) je sustav kvalitete koji se odnosi

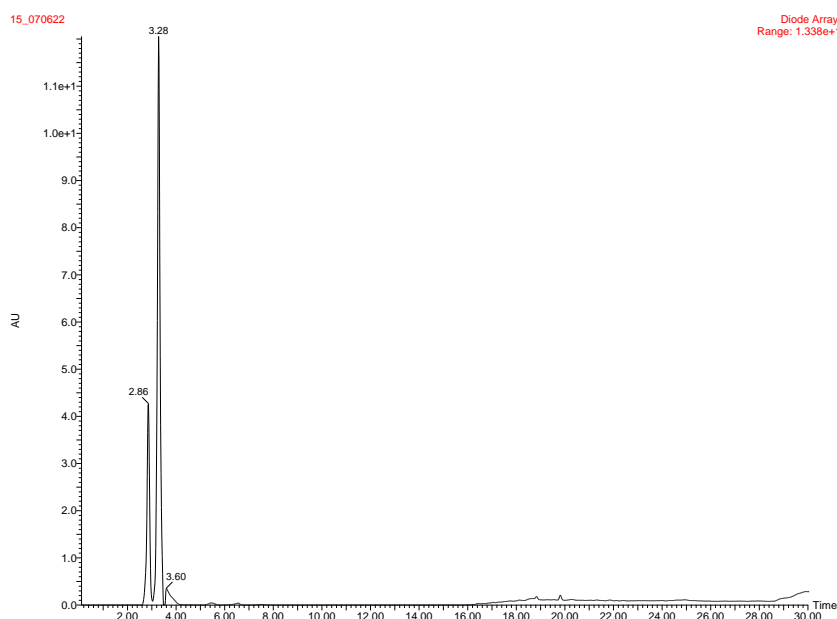
na organizaciju i uvjete u kojima se neklinička ispitivanja planiraju, provode, nadgledaju, zapisuju, pohranjuju i dostavljaju izvješća [62].

Tablica 14. Prikaz izvedbenih karakteristika i kriterija prihvatljivosti HPLC-DAD metode

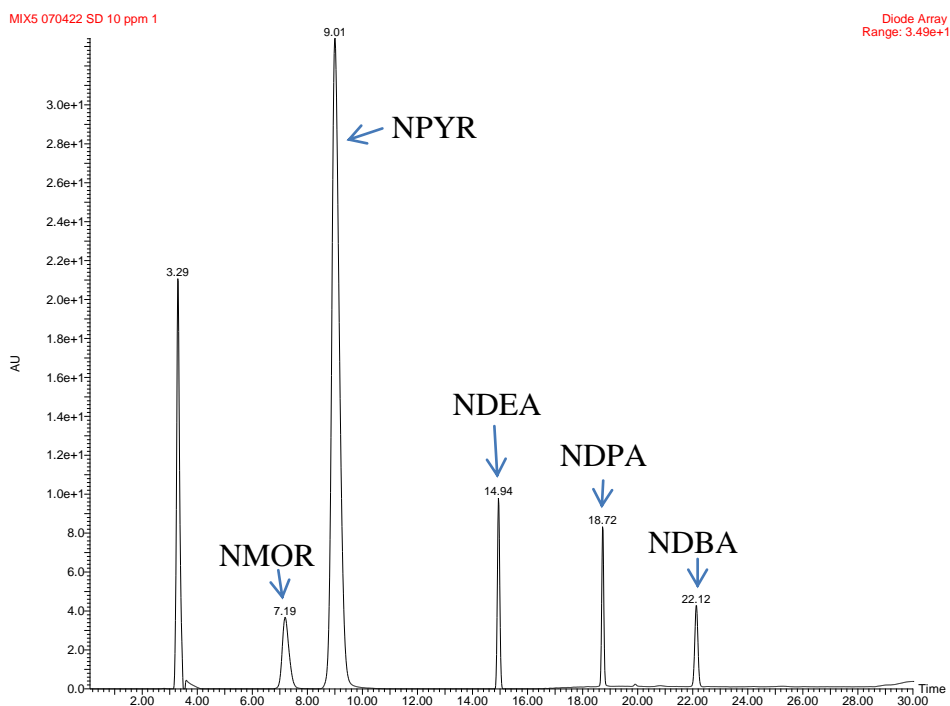
Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	informacija
Linearnost	$R^2 > 0,99$ (DLP)
Preciznost (ponovljivost)	RSD < 10 % (DLP)
Preciznost (međupreciznost)	RSD < 15 % (DLP)
Istinitost (iskorištenje)	70 - 120 % [19]
Granica detekcije	3,33 ng L ⁻¹ [63]
Granica kvantifikacije	10 ng L ⁻¹ [63]

Selektivnost

Selektivnost HPLC-DAD metode za ispitivane *N*-nitrozamine određena je usporedbom kromatograma vodovodne vode i standardne 10 mg L⁻¹ otopine pet *N*-nitrozamina. Kromatogram vodovodne vode (**Slika 31.**) sadrži tri pika pokretne faze, čija vremena zadržavanja (t_R) iznose 2,86; 3,28 i 3,60 min. Pikovi pokretne faze se nalaze i na kromatogramu standardne 10 mg L⁻¹ otopine *N*-nitrozamina (**Slika 32.**), pri 3,29 min i 3,61 min. Na **Slici 3.** uočavaju se i pikovi analita pri 7,19 min (NMOR); 9,01 min (NPYR); 14,94 min (NDEA); 18,72 min (NDPA); 22,12 min (NDBA). Navedeno potvrđuje da je HPLC-DAD metoda selektivna za ispitivane *N*-nitrozamine u vodovodnoj vodi.



Slika 31. Kromatogram vodovodne vode



Slika 32. Kromatogram standardne 10 mg L⁻¹ otopine *N*-nitrozamina

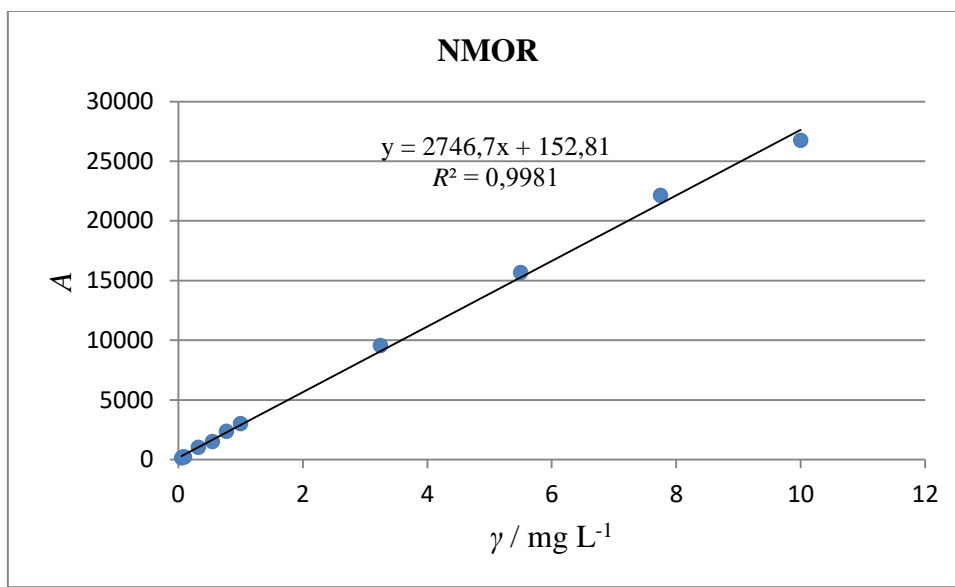
Linearnost

Linearnost HPLC-DAD metode određena je izradom kalibracijskog pravca. Korištena kalibracijska metoda je metoda vanjskog standarda. Za kalibracijski pravac pripravljeno je 13 otopina smjese pet *N*-nitrozamina (NMOR, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA) u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,01 - 10 mg L⁻¹. *N*-nitrozaminima su određene površine pikova za navedeni raspon koncentracija (**Tablica 15.**). Svaka kalibracijska otopina mjerena je jednom.

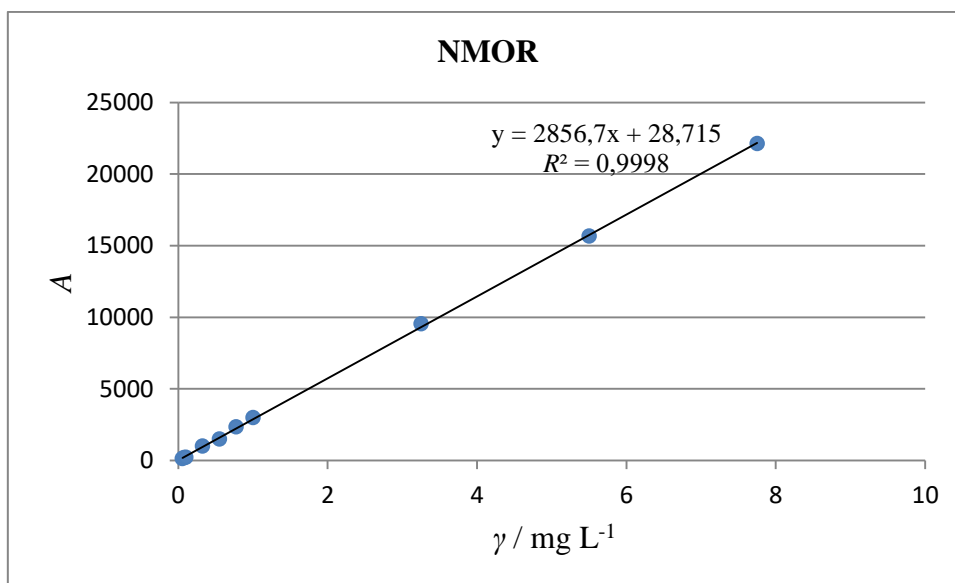
Tablica 15. Prikaz koncentracija kalibracijskih otopina (γ) i površina pikova (A)

γ / mg L ⁻¹	A(NMOR)	A(NPYR)	A(NDEA)	A(NDPA)	A(NDBA)
0,01	-	379,06	-	15,78	-
0,0325	-	1155,03	-	44,93	-
0,055	124,2	1869,27	158,94	76,58	37,74
0,0775	194,06	2811,02	256,27	136,02	82,94
0,1	210,28	3376,78	299,18	159,06	121,24
0,325	1002,12	11706,52	1049,22	633,27	633,27
0,550	1484,99	18485,47	1674,23	1034,43	846,77
0,775	2341,53	26645,57	2429,74	1505,48	1201,52
1	2991,97	33536,44	3086,84	2027,14	1638,51
3,25	9529,07	102984,76	9811,14	6639,09	5146,72
5,50	15657,28	170087,94	16103,31	11472,10	8679,62
7,75	22121,54	239822,50	22268,35	15566,78	11912,33
10	26727,72	290291,59	26598,76	18371,50	13844,44

Za NMOR nije uočen pik pri koncentracijama 0,01 i 0,0325 mg L⁻¹. Kalibracijski pravac za NMOR izrađen je u rasponu koncentracija 0,055 – 10 mg L⁻¹ (Slika 33.). Izuzimanjem točke (10 mg L⁻¹, 26727,72) iz jednadžbe kalibracijskog pravca, postignuto je bolje slaganje eksperimentalnih rezultata i regresijskog pravca. Odnosno, veća je vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9998$) (Slika 34.). Jednadžba pravca za NMOR u rasponu 0,055 – 7,75 mg L⁻¹ glasi $A = 2856,7 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 28,715$.

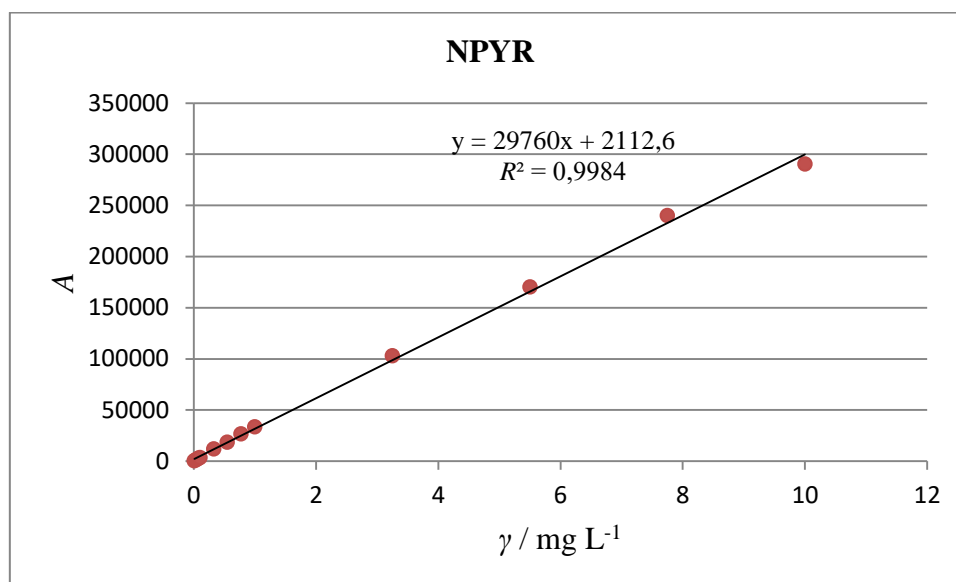


Slika 33. Kalibracijski pravac za NMOR u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 10 mg L⁻¹

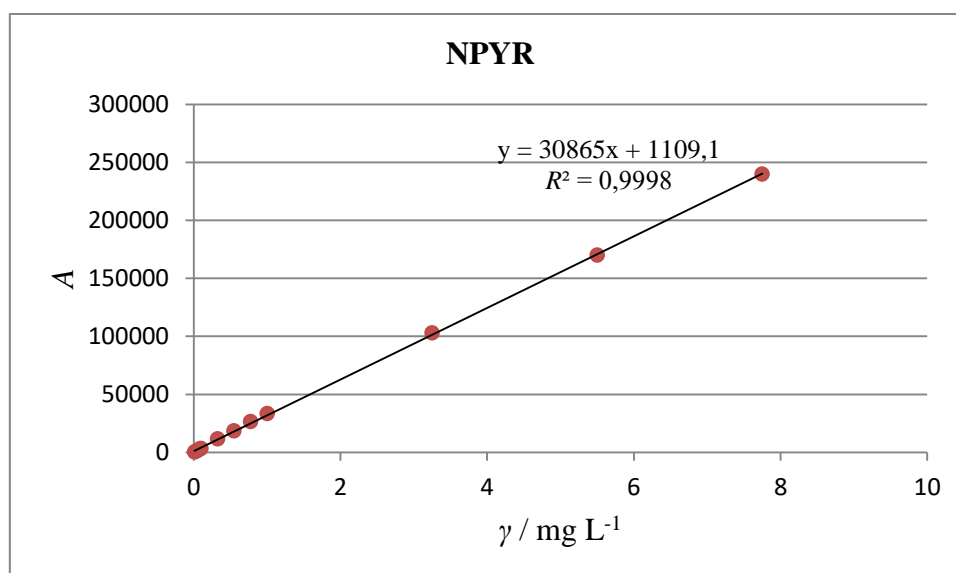


Slika 34. Kalibracijski pravac za NMOR u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 7,75 mg L⁻¹

Kalibracijski pravac za NPYR izrađen je u rasponu koncentracija 0,01 – 10 mg L⁻¹ (Slika 35.). Izuzimanjem točke (10 mg L⁻¹, 290291,59) iz jednadžbe pravca, postiže se veća vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9998$) (Slika 36.). Jednadžba kalibracijskog pravca za NPYR u rasponu 0,01 – 7,75 mg L⁻¹ glasi $A = 30865 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 1109,1$.



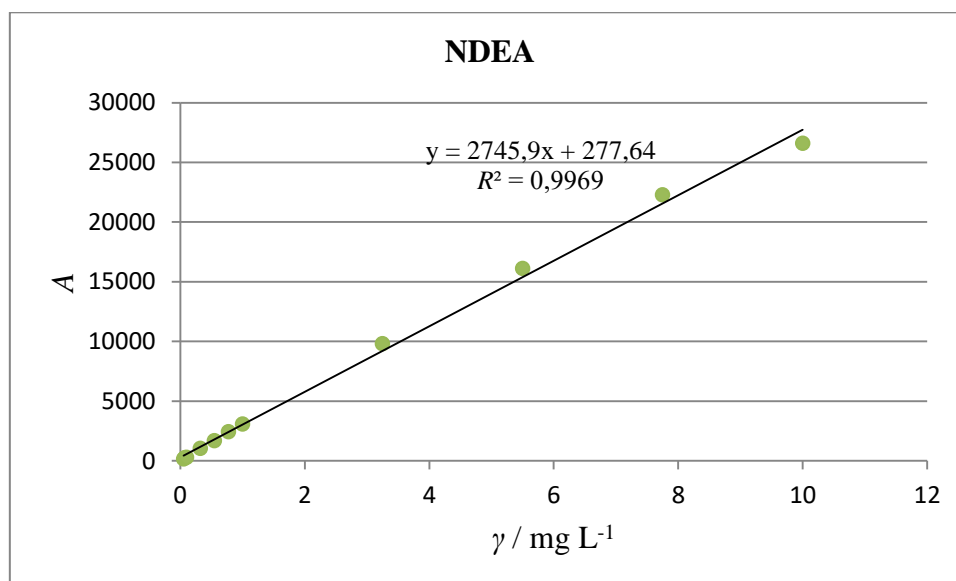
Slika 35. Kalibracijski pravac za NPYR u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,01 - 10 mg L⁻¹



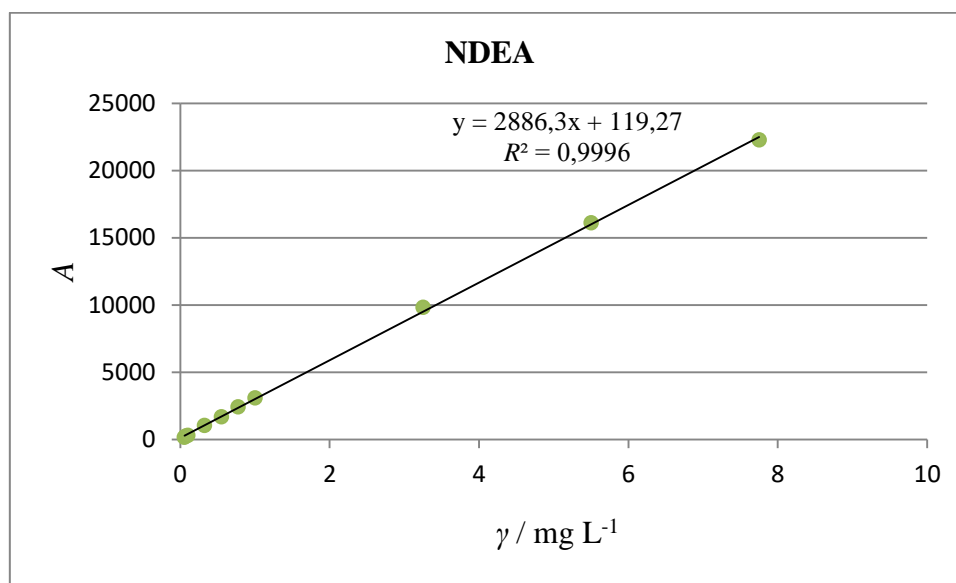
Slika 36. Kalibracijski pravac za NPYR u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,01 - 7,75 mg L⁻¹

Za NDEA nisu uočeni pikovi pri 0,01 i 0,0325 mg L⁻¹. Kalibracijski pravac za NDEA izrađen je u rasponu koncentracija 0,01 – 10 mg L⁻¹ (Slika 37.). Izuzimanjem točke (10 mg L⁻¹,

26598,76) iz jednadžbe pravca radi prevelikog odstupanja od kalibracijskog pravca, postignuta je veća vrijednost $R^2 = 0,9996$ (Slika 38.). Jednadžba kalibracijskog pravca za NDEA u rasponu 0,055 – 7,75 mg L⁻¹ glasi $A = 2886,3 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 119,27$.



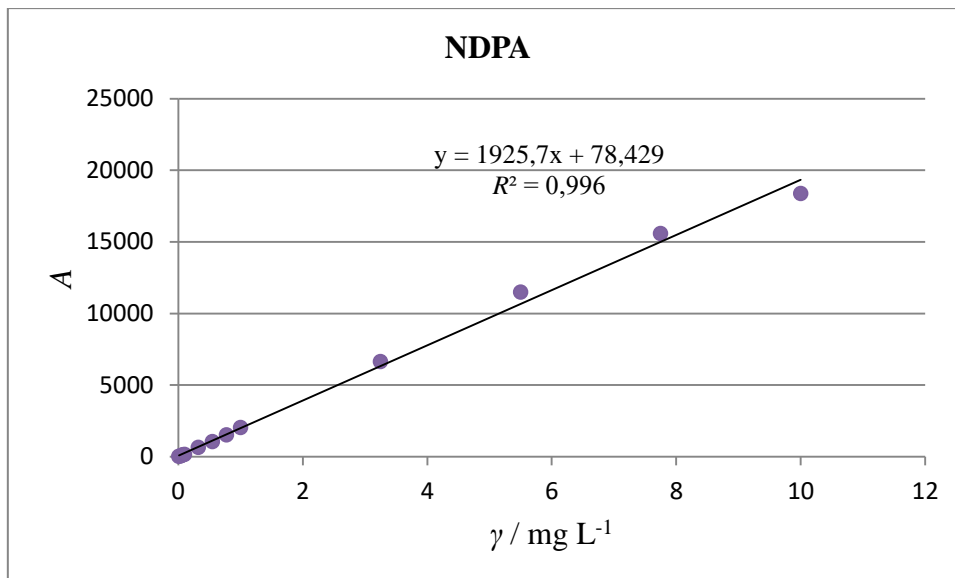
Slika 37. Kalibracijski pravac za NDEA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 10 mg L⁻¹



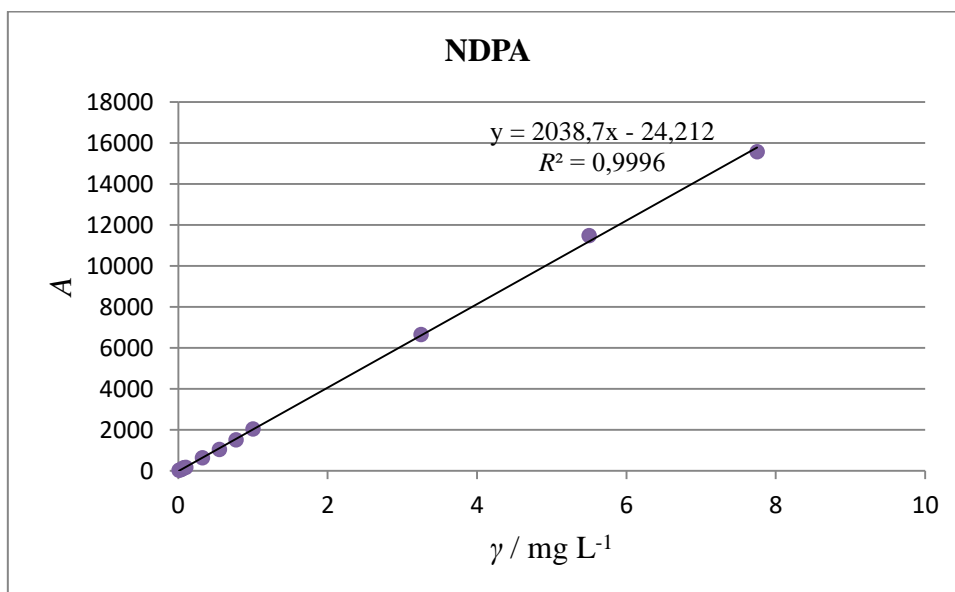
Slika 38. Kalibracijski pravac za NDEA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 7,75 mg L⁻¹

Kalibracijski pravac za NDPA izrađen je u rasponu koncentracija 0,01 – 10 mg L⁻¹ (Slika 39.). Izuzimanjem točke (10 mg L⁻¹, 18371,50) iz jednadžbe pravca, postignuta je veća

vrijednost $R^2 = 0,9996$ (**Slika 40.**). Jednadžba kalibracijskog pravca za NDPA u rasponu 0,01 – 7,75 mg L^{-1} glasi $A = 2038,7 \text{ L mg}^{-1} \gamma - 24,212$.



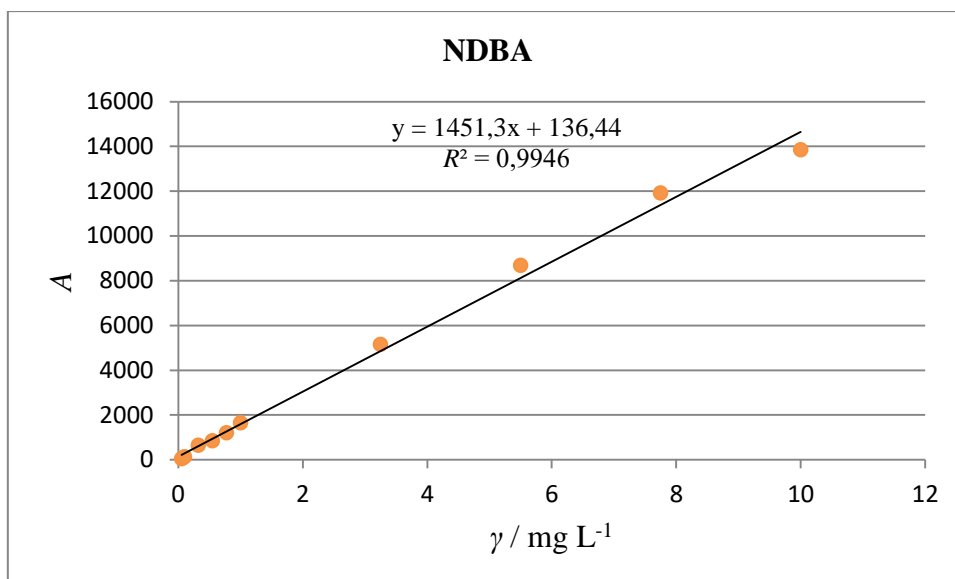
Slika 39. Kalibracijski pravac za NDPA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,01 - 10 mg L^{-1}



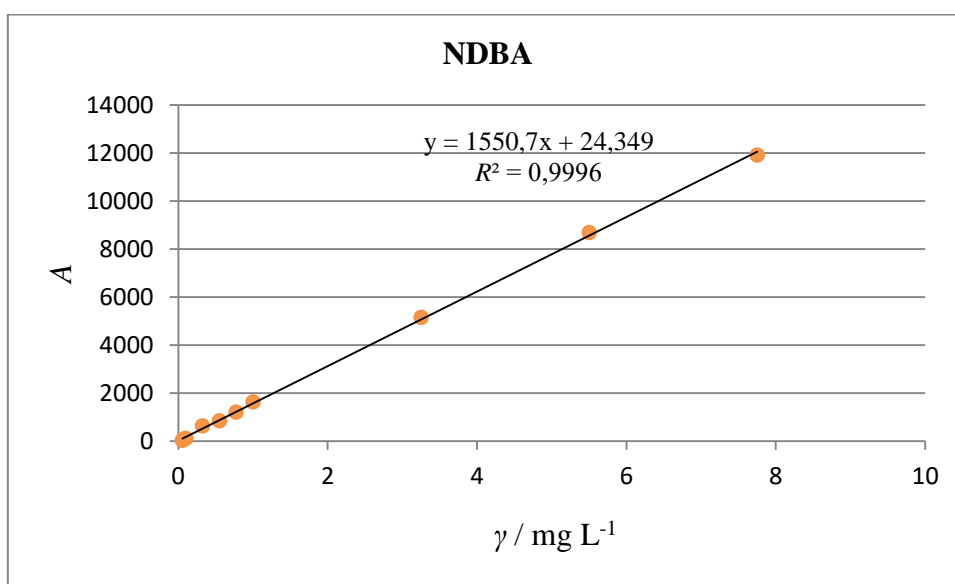
Slika 40. Kalibracijski pravac za NDPA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,01 - 7,75 mg L^{-1}

Za NDPA nisu uočeni pikovi pri 0,01 i 0,0325 mg L^{-1} . Kalibracijski pravac za NDPA izrađen je u rasponu koncentracija 0,055 – 10 mg L^{-1} (**Slika 41.**). Izuzimanjem točke (10 mg L^{-1} , 13844,44) iz jednadžbe kalibracijskog pravca postiže se bolje slaganje eksperimentalnih

rezultata i regresijskog pravca ($R^2 = 0,9996$) (**Slika 42.**). Jednadžba kalibracijskog pravca za NDBA u rasponu 0,055 – 7,75 mg L⁻¹ glasi $A = 1550,7 L \text{ mg}^{-1} \gamma + 24,349$.



Slika 41. Kalibracijski pravac za NDBA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 10 mg L⁻¹



Slika 42. Kalibracijski pravac za NDBA u MilliQ vodi u rasponu koncentracija 0,055 - 7,75 mg L⁻¹

Sažetak rezultata linearnosti za ispitivane *N*-nitrozamine nalazi se u **Tablici 16.**

Tablica 16. Rezultati linearnosti za *N*-nitrozamine

<i>N</i> -nitrozamin	Raspon koncentracija / mg L ⁻¹	Jednadžba pravca	<i>R</i> ²
NMOR	0,055 – 10	$A = 2746,7 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 152,81$	0,9981
	0,055 – 7,75	$A = 2856,7 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 28,715$	0,9998
NPYR	0,01 – 10	$A = 29760 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 2112,6$	0,9984
	0,01 – 7,75	$A = 30865 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 1109,1$	0,9998
NDEA	0,055 – 10	$A = 2745,9 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 277,64$	0,9969
	0,055 – 7,75	$A = 2886,3 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 119,27$	0,9996
NDPA	0,01 – 10	$A = 1925,7 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 78,429$	0,996
	0,01 – 7,75	$A = 2038,7 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma - 24,212$	0,9996
NDBA	0,055 – 10	$A = 1451,3 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 136,44$	0,9946
	0,055 – 7,75	$A = 1550,7 \text{ L mg}^{-1} \cdot \gamma + 24,349$	0,9996

*R*² svakog kalibracijskog pravca do 10 mg L⁻¹ zadovoljava kriterij prihvatljivosti (*R*² > 0,99). Također, *R*² svakog kalibracijskog pravca do 7,75 mg L⁻¹ je veći od kriterija prihvatljivosti (*R*² > 0,99). Regresijski model zadovoljio je kriterij prihvatljivosti za linearnost za ispitivane *N*-nitrozamine. Nagib kalibracijskog pravca govori o osjetljivosti metode. Što je veći nagib pravca, veća je osjetljivost metode. Nagibi kalibracijskih pravaca do 7,75 mg L⁻¹ glase: 2856,7 L mg⁻¹ (NMOR), 30865 L mg⁻¹ (NPYR), 2886,3 L mg⁻¹ (NDEA), 2038,7 L mg⁻¹ (NDPA), 1550,7 L mg⁻¹ (NDBA). Iz navedenih nagiba kalibracijskih pravaca, zaključuje se da je velika osjetljivost metode za svaki *N*-nitrozamin. Najveća osjetljivost metode postignuta je za NPYR, dok je najmanja osjetljivost za NDBA.

Ponovljivost

Preciznost je iskazana preko ponovljivosti i međupreciznosti. Podaci za ponovljivost mjerenja nalaze se u **Tablicama P1-P5**. Rezultati ponovljivosti mjerenja *N*-nitrozamina prikazani su u **Tablici 17**.

Tablica 17. Prikaz rezultata ponovljivosti za ispitivane *N*-nitrozamine

<i>N</i> -nitrozamin	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{x}	s	RSD / %	
NMOR	0,055	128,51	8,07	6,28	
	0,0775	198,40	6,66	3,36	
	0,1	219,64	10,46	4,76	
	10	28660,99	105,34	0,37	
NPYR	0,01	345,59	21,82	6,31	
	0,0325	1175,21	12,61	1,07	
	0,055	1973,76	15,02	0,76	
	0,0775	2798,66	31,44	1,12	
	0,1	3307,75	71,66	2,17	
10	311630,83	1311,47	0,42		
	NDEA	0,055	171,47	1,45	0,84
		0,0775	256,27	4,88	1,90
		0,1	299,18	8,16	2,73
		10	27672,18	110,51	0,40
NDPA	0,01	14,94	1,27	8,50	
	0,0325	50,49	2,62	5,19	
	0,055	96,07	1,42	1,48	
	0,0775	133,60	2,27	1,70	
	0,1	161,42	4,97	3,08	
	10	17639,74	109,65	0,62	
NDBA	0,055	65,24	5,89	9,03	
	0,0775	80,59	6,35	7,88	
	0,1	126,24	8,27	6,55	
	10	11899,58	53,81	0,45	

Kod ispitivanih *N*-nitrozamina niže RSD vrijednosti postignute su pri višim koncentracijama, dok su veće RSD vrijednosti postignute pri nižim koncentracijama. Navedeno je očekivano jer je poznato da je preciznost pri niskim koncentracijama analita, u blizini granice kvantifikacije, niža. Svi *N*-nitrozamini pri ispitivanim koncentracijama imaju RSD < 10 %, odnosno zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za ponovljivost mjerenja.

Međupreciznost

Međupreciznost je određena iz površina pikova *N*-nitrozamina pri koncentracijama 10; 3,25 i 1 mg L⁻¹ u tri različita dana analize. Podaci mjerenja prikazani su u **Tablici P6.**, dok su rezultati prikazani u **Tablici 18.**

Tablica 18. Prikaz rezultata međupreciznosti za ispitivane *N*-nitrozamine

<i>N</i> -nitrozamin	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	\bar{x}	s	RSD / %
NMOR	10	29207,44	653,68	2,24
	3,25	9509,26	274,40	2,88
	1	2970,73	19,43	0,65
NPYR	10	313314,78	7120,12	2,27
	3,25	103642,19	2447,01	2,36
	1	33130,76	317,10	0,96
NDEA	10	29083,98	667,00	2,29
	3,25	9812,94	106,04	1,08
	1	3022,68	20,05	0,66
NDPA	10	19999,86	405,40	2,03
	3,25	6856,17	81,84	1,19
	1	2083,41	21,21	1,02
NDBA	10	15460,77	376,63	2,44
	3,25	5112,50	210,78	4,12
	1	1507,42	83,14	5,52

Manje vrijednosti RSD postignute su pri većim koncentracijama ispitivanih *N*-nitrozamina, dok su veće vrijednosti RSD postignute pri nižim koncentracijama. RSD < 15 % je kriterij prihvatljivosti za međupreciznost mjerenja. Kod svih mjerenja, RSD je manje od 15 %, odnosno zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za međupreciznost.

Granice detekcije i kvantifikacije

Granica kvantifikacije (GK) izražena prema Međunarodnom vijeću za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), računa se po izrazu (18):

$$GK = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (18)$$

gdje je s standardno odstupanje ponovljivosti mjerenja pri najnižoj koncentraciji unutar linearnog područja za određeni *N*-nitrozamin, b nagib kalibracijskog pravca do 7,75 mg L⁻¹ [41].

Granica detekcije izražena prema ICH-u, računa se prema izrazu (19) [41]:

$$GD = \frac{3,3 \cdot s}{b} \quad (19)$$

U **Tablici 19.** prikazane su računski određene GK i GD za ispitivane *N*-nitrozamine. Najnižu GD i GK ima NDEA, dok najvišu GD i GK ima NDBA.

Tablica 19. Prikaz računski određenih GK i GD ispitivanih *N*-nitrozamina

<i>N</i> -nitrozamin	<i>s</i>	<i>b</i> / L mg ⁻¹	GK / μg L ⁻¹	GD / μg L ⁻¹
NMOR	8,07	2856,7	28,25	9,32
NPYR	21,82	30865	7,07	2,33
NDEA	1,45	2886,3	5,02	1,66
NDPA	1,27	2038,7	6,23	2,06
NDBA	5,89	1550,7	37,98	12,53

Kromatografski pikovi ispitivanih *N*-nitrozamina pri eksperimentalno određenim GK prikazani su na **Slikama P9-P13.** Eksperimentalno definirane GK (**Tablica 20.**) određene su iz najniže koncentracije kalibracijskih otopina u rasponu koncentracija 0,01 – 10 mg L⁻¹, pri kojoj se može integrirati površina pika *N*-nitrozamina. Kako bi se računski odredile GK i GD, određene su eksperimentalno definirane GK. Uvrštavanjem standardne devijacije ponovljenih mjerenja pri eksperimentalno definiranoj GK u izraz (18) i (19) te nagiba kalibracijskog pravca do 7,75 mg L⁻¹, računski su određene GK i GD za ispitivane *N*-nitrozamine. Kako bi se definirala donja granica radnog područja pojedinog *N*-nitrozamina, potrebno je definirati eksperimentalno određenu GK.

Tablica 20. Prikaz eksperimentalno određenih GK ispitivanih *N*-nitrozamina

<i>N</i> -nitrozamin	GK / μg L ⁻¹
NMOR	55,0
NPYR	10,0
NDEA	55,0
NDPA	10,0
NDBA	55,0

Računski dobivene GK i GD veće su od zakonski propisanih GK (10 ng L⁻¹) i GD (3,33 ng L⁻¹) za *N*-nitrozamine u vodi za piće u Njemačkoj i Kaliforniji [63]. Prema tome, računski određene GK i GD ne zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Kako bi se osiguralo postizanje potrebnih GK za ispitivane *N*-nitrozamine, potrebno je razviti metodu pripreme uzorka kojom se uzorak koncentrira. U kromatografskoj analizi uzoraka vode, kao metoda pripreme i koncentriranja uzorka uobičajeno se koristi ekstrakcija čvrstom fazom (SPE).

GK (0,48 ng L⁻¹) i GD (0,16 ng L⁻¹) koje su odredili Du i Ran [64] manje su od zakonski propisanih GK i GD u Njemačkoj i Kaliforniji. Određivanjem *N*-nitrozamina u vodi UHPLC-MS/MS QqQ metodom [64], zadovoljeni su kriteriji prihvatljivosti za GK i GD.

Radno područje

Radno područje omeđeno je donjom granicom (GK) i gornjom granicom. Gornja granica je koncentracija kod koje nema značajnog odstupanja od osjetljivosti [41]. NMOR, NDEA i NDBA imaju radno područje od 0,055 mg L⁻¹ do 7,75 mg L⁻¹. Radno područje NPYR-a i NDPA-a je od 0,01 mg L⁻¹ do 7,75 mg L⁻¹.

4.3. Razvoj SPE metode

4.3.1. SPE postupci

Prvi ispitani SPE postupak započinje kondicioniranjem Oasis HLB kolone s 5 mL diklormetana, 5 mL metanola i 5 mL MilliQ vode (bez sušenja kolone). Nakon toga, 100 mL uzorka propušteno je kroz SPE kolonu. Nakon što je 100 mL otopine uzorka prošlo kroz SPE kolonu, kolona je sušena 5 min pod vakuumom. Eluiranje je provedeno s dva obroka od 5 mL diklormetana ili metanola. Zatim, provedeno je uparivanje ekstrakta do suha na rotacijskom uparivaču pri 25 °C. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL početnog sastava pokretne faze (95 % MilliQ voda, 5 % acetonitril).

Na Oasis HLB kolonama provedeno je koncentriranje 100 mL 0,1 mg L⁻¹ otopine smjese pet *N*-nitrozamina u MilliQ i vodovodnoj vodi. Otopine *N*-nitrozamina analizirane su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. Svaka otopina injektirana je dva puta. Rezultati mjerenja prikazani su u **Tablici 21**.

Tablica 21. Prikaz iskorištenja i RSD vrijednosti nakon SPE-HPLC-DAD analize otopina *N*-nitrozamina koncentracije 0,1 mg L⁻¹ svakog analita

MilliQ voda				
Eluens	CH ₂ Cl ₂		CH ₃ OH	
Analit	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %
NMOR	6,10	-	1,04	3,67
NPYR	3,17	117,80	1,01	0,68
NDEA	10,88	121,97	2,39	-
NDPA	15,48	131,45	2,16	104,58
NDBA	19,52	105,03	6,86	67,14
Vodovodna voda				
Eluens	CH ₂ Cl ₂		CH ₃ OH	
Analit	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %
NMOR	3,20	27,15	1,84	12,08
NPYR	3,03	14,59	2,00	12,79
NDEA	6,97	4,99	0,49	-
NDPA	12,62	2,81	0,56	88,13
NDBA	24,75	39,33	2,37	71,21

Niti jedan od ispitivanih *N*-nitrozamina ne zadovoljava kriterij prihvatljivosti za iskorištenje (**Tablica 21.**). Uz diklormetan kao eluens postignuta su veća iskorištenja, u odnosu na metanol za sve *N*-nitrozamine. Jedan od mogućih razloga niskih iskorištenja je hlapljenje analita prilikom uparavanja do suha na rotacijskom uparivaču. Potrebno je produljiti vrijeme sušenja sorbensa. Ponovljivost mjerenja izrazito je loša u MilliQ i vodovodnoj vodi za oba ispitana eluensa. Na **Slici P14.** prikazan je kromatogram 0,1 mg L⁻¹ otopine smjese pet *N*-nitrozamina nakon SPE-HPLC-DAD analize. Na kromatogramu se vide svi pikovi ispitivanih *N*-nitrozamina, ali su vrijednosti površina pikova znatno manje, u odnosu na kontrolnu, standardnu 10 mg L⁻¹ otopinu.

Optimalni SPE postupak proveden je s 500 mL uzorka vode s dodanim *N*-nitrozaminima uz 6 mL Supelclean™ SPE kolone s kokosovim ugljenom. Tijekom ekstrakcije početne otopine koncentriraju se 500 puta. Prije propuštanja uzorka kroz Supelclean™ SPE kolone, provedeno je kondicioniranje SPE kolona. Kondicioniranje se sastojalo u propuštanju 2 x 3 mL diklormetana i 2 x 3 mL metanola (bez sloja otapala iznad sorbensa nakon propuštanja obroka otapala), 2 x 3 mL metanola i 5 x 3 mL MilliQ vode (bez sušenja kolone). Zatim se uzorak propušta kroz SPE kolonu uz protok od približno 10 mL min⁻¹. Nakon propuštanja 500 mL uzorka kroz SPE kolonu, kolona je sušena 30 min pod vakuumom. *N*-nitrozamini su eluirani s

10 mL diklormetana [19]. Nakon SPE-a, uzorcima je dodano 500 μL acetonitrila te su uparavani pri 25 °C na rotacijskom uparivaču 5 min (dok se ne ukloni diklormetan, a zaostane acetonitril). Nakon uparavanja, preostali volumen iz okrugle tikvice premješten je u odmjernu tikvicu od 1 mL, tikvica je nadopunjena do oznake s MilliQ vodom. Pripremljeni ekstrakt analiziran je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda.

Na Supelco Supelclean™ kolonama pri opisanim optimalnim uvjetima provedeno je koncentriranje 500 mL 0,02 mg L⁻¹ (MilliQ voda); 0,002 mg L⁻¹ (MilliQ i vodovodna voda); 0,00016 mg L⁻¹ (MilliQ, vodovodna voda i vodovodna voda s Na₂S₂O₃) i 0,0001 mg L⁻¹ (MilliQ, vodovodna voda i vodovodna voda s Na₂S₂O₃) otopina smjese pet *N*-nitrozamina. Dobiveni ekstrakti injektirani su tri puta u HPLC-DAD sustavu.

Za 0,02 mg L⁻¹ otopinu u MilliQ vodi za sve *N*-nitrozamine postignute su znatno bolje ponovljivosti, u odnosu na 0,1 mg L⁻¹ otopine koje su ekstrahirane s Oasis HLB kolonama. Svi ispitivani *N*-nitrozamini zadovoljili su kriterij prihvatljivosti za ponovljivost mjerenja (**Tablica 24.**). Kromatogram navedenog ekstrakta prikazan je na **Slici P15.**

U ekstraktima uzoraka vode (MilliQ i vodovodna voda) s koncentracijom pojedinih *N*-nitrozamina 0,002 mg L⁻¹ detektirani su svi *N*-nitrozamini (**Slika P16.**). Također, zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za ponovljivost (**Tablica 24.**).

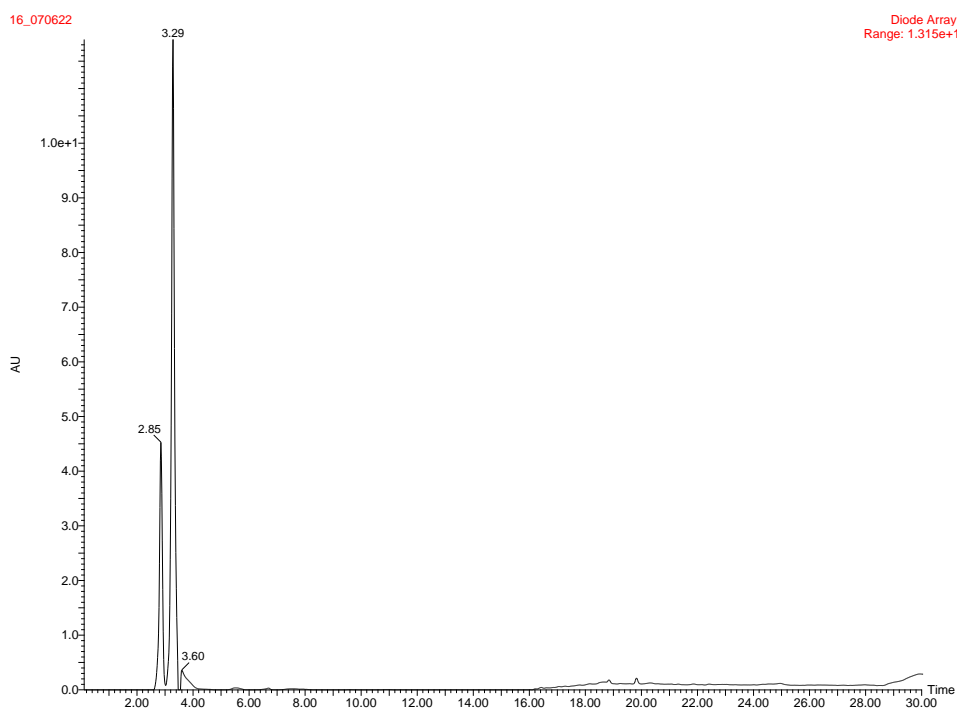
Na kromatogramima ekstrakata uzoraka vode (MilliQ, vodovodnoj vodi i vodovodnoj vodi s Na₂S₂O₃) koncentracija 0,00016 mg L⁻¹ detektiran je pik NDEA-a. Međutim, pored pika NDEA-a nalazi se pik manjeg intenziteta koji povećava površinu pika *N*-nitrozamina (**Slika P17.**). Površina pika NDEA-a znatno je veća od površine pika u kontrolnoj standardnoj 0,08 mg L⁻¹ otopini. Prema tome, nije moguće kvantificirati NDEA u otopini koncentracije 0,00016 mg L⁻¹. Svi *N*-nitrozamini zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za ponovljivost (**Tablica 25.**).

Na kromatogramima ekstrakata vode (vodovodna voda i vodovodna voda s Na₂S₂O₃) koncentracije 0,0001 mg L⁻¹ detektirani su pikovi NDEA-a (**Slika P18.**), ali nije detektiran pik u standardnoj otopini koncentracije 0,05 mg L⁻¹ jer GK NDEA-a u MilliQ vodi iznosi 0,055 mg L⁻¹. Prema tome, nije moguće kvantificirati NDEA u ekstraktu vodene otopine koncentracije 0,0001 mg L⁻¹. Zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za ponovljivost mjerenja (**Tablica 26.**).

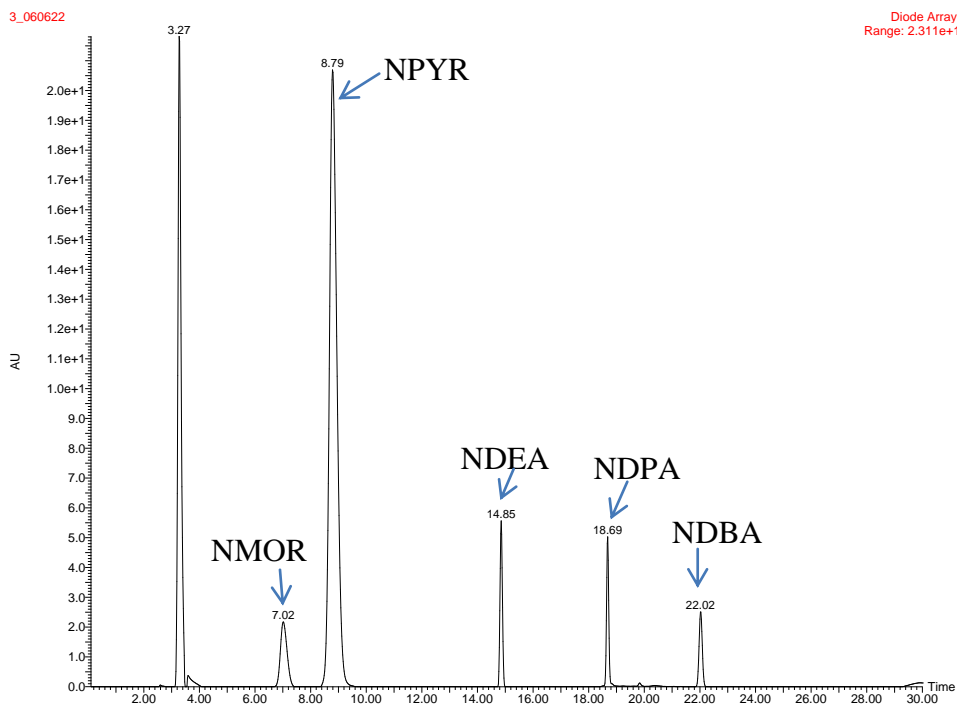
4.4. Validacija SPE-HPLC-DAD metode za određivanje *N*-nitrozamina u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi

Selektivnost

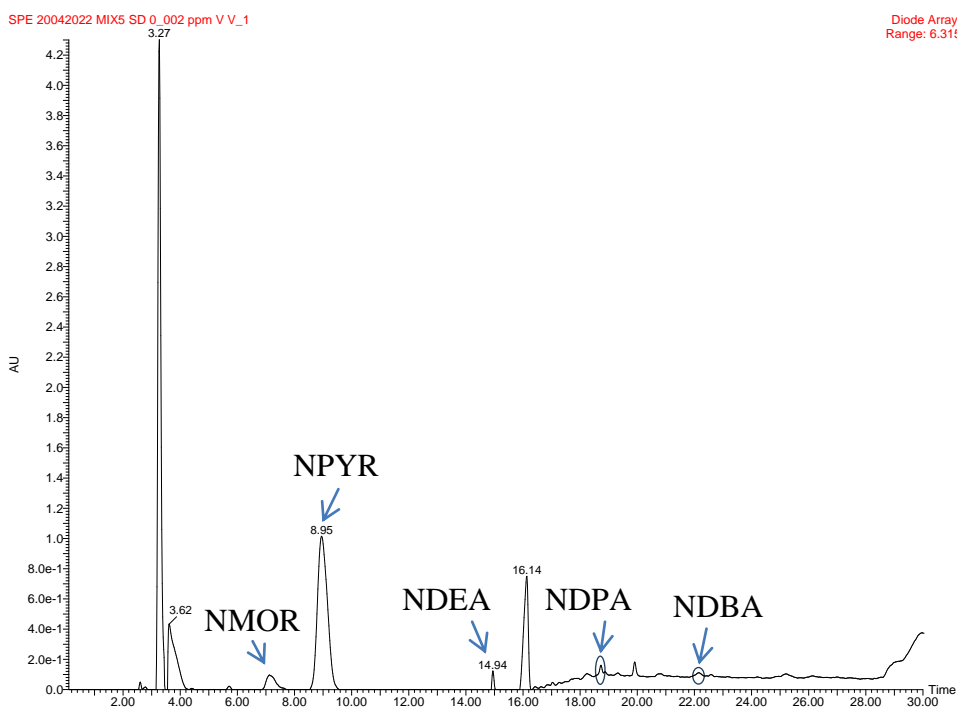
Selektivnost SPE-HPLC-DAD metode ispitana je usporedbom kromatograma vodovodne vode (slijepi uzorak), standarda smjese *N*-nitrozamina koncentracije 5,5 mg L⁻¹ i smjese ispitivanih *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi koncentracije 0,1 mg L⁻¹. Na kromatogramu slijepog uzorka vodovodne vode nalaze se pikovi pokretne faze pri 2,85; 3,29 i 3,60 min (**Slika 43.**). Kromatogram standarda smjese *N*-nitrozamina koncentracije 5,5 mg L⁻¹ sadrži pikove pokretne faze pri 3,27 min i 3,59 min (**Slika 44.**). Na **Slici 44.** detektirani su i pikovi pri 7,02 min (NMOR); 8,79 min (NPYR); 14,85 min (NDEA); 18,69 min (NDPA); 22,02 min (NDBA). Kromatogram smjese ispitivanih *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi koncentracije 0,1 mg L⁻¹ sadrži pikove pokretne faze pri 2,79; 3,27 i 3,62 min (**Slika 45.**). Na kromatogramu na **Slici 45.** uočavaju se i pikovi pri 7,12 min (NMOR); 8,95 min (NPYR); 14,94 min (NDEA); 18,72 min (NDPA); 22,15 min (NDBA). Ovime je potvrđena selektivnost SPE-HPLC-DAD metode za ispitivane *N*-nitrozamine u vodovodnoj vodi.



Slika 43. Kromatogram slijepog uzorka vodovodne vode



Slika 44. Kromatogram standardne 5,5 mg L⁻¹ otopine *N*-nitrozamina



Slika 45. Kromatogram 0,1 mg L⁻¹ otopine *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi

Granica kvantifikacije

SPE-HPLC-DAD analiza provedena je na četiri otopine različitih koncentracija *N*-nitrozamina u MilliQ vodi. Najniža koncentracija pojedinog *N*-nitrozamina pri kojoj se može integrirati

pik analita, predstavlja eksperimentalno određenu granicu kvantifikacije (**Tablica 22.**). Najnižu GK imaju NPYR i NDPA, a najvišu GK ima NDEA.

Tablica 22. Prikaz eksperimentalno određenih GK ispitivanih *N*-nitrozamina SPE-HPLC-DAD metodom

<i>N</i> -nitrozamin	GK / ng L ⁻¹
NMOR	160
NPYR	100
NDEA	2000
NDPA	100
NDBA	160

Eksperimentalno određene GK veće su od zakonski propisane GK *N*-nitrozamina u vodi za piće (10 ng L⁻¹) u Njemačkoj i Kaliforniji [63]. Prema tome, nije zadovoljen kriterij prihvatljivosti za GK. Tijekom ekvilibriranja HPLC-DAD metode na početne uvjete (95 % MilliQ vode, 5 % acetonitrila), tlak je iznosio 63,5 bar. Korištena Kinetex C₁₈ kolona ima promjer zrna punjenja 5 μm. Prema van Deemterovoj jednadžbi, Eddyeva difuzija (koeficijent A) smanjuje se smanjenjem zrna punjenja kolone, a time i visina teorijskog odsječka. Smanjenjem visine teorijskog odsječka, veća je učinkovitost kolone, kraće je vrijeme analize te je veći radni tlak. Ripollés i sur. [19] ostvarili su GK (3 – 6 ng L⁻¹) i GD (1 – 2 ng L⁻¹) niže od zakonski propisane GK i GD u Njemačkoj i Kaliforniji. Iznimka je NDBA čija GD i GK iznosi 8 ng L⁻¹, odnosno 24 ng L⁻¹. Ripollés i sur. [19] nisu koristili HPLC, nego UHPLC. Promjer zrna punjenja korištene UHPLC kolone iznosio je 1,8 μm. Princip rada UHPLC-a jednak je principu HPLC-a. Kolone za UHPLC imaju promjer zrna punjenja manji od 2 μm, čime se ostvaruje bolje kromatografsko razlučivanje i bolja osjetljivost te kraće vrijeme analize, u odnosu na HPLC. Kod UHPLC-a se primjenjuju tlakovi do 100 MPa, što nije moguće kod HPLC-a [30].

Granica detekcije

Eksperimentalne GD jednake su jednoj trećini eksperimentalno određenih GK pojedinih *N*-nitrozamina. Eksperimentalno određene GD (**Tablica 23.**) veće su od zakonski propisanih GD *N*-nitrozamina u vodi za piće (3,33 ng L⁻¹) u Njemačkoj i Kaliforniji [63], odnosno nije zadovoljen kriterij prihvatljivosti za GD. Najniže GD imaju NPYR i NDPA, a najvišu GD ima NDEA.

Tablica 23. Prikaz eksperimentalno određenih GD ispitivanih *N*-nitrozamina

<i>N</i> -nitrozamin	GD / ng L ⁻¹
NMOR	53,33
NPYR	33,33
NDEA	666,67
NDPA	33,33
NDBA	53,33

Istinitost i preciznost

Iskorištenje je izračunato prema izrazu (20):

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\bar{x}}{T} \cdot 100 \% \quad (20)$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost ponovljenih mjerenja standardnih otopina, T koncentracija analita u standardnoj otopini [41]. Prilikom izračuna iskorištenja, u izraz (20) umjesto koncentracija uvrštene su površine ispod kromatografskih pikova s obzirom da su proporcionalne koncentraciji. Podaci mjerenja nakon SPE-HPLC-DAD analize početnih otopina koncentracija 0,02 mg L⁻¹; 0,002 mg L⁻¹; 0,00016 mg L⁻¹ i 0,0001 mg L⁻¹ nalaze se u **Tablicama P7-P13**. Rezultati navedenih mjerenja prikazani su u **Tablicama 24-26**.

Tablica 24. Prikaz iskorištenja i RSD vrijednosti nakon SPE-HPLC-DAD analize

Analit	MilliQ voda				Vodovodna voda	
	0,02 mg L ⁻¹		0,002 mg L ⁻¹		0,002 mg L ⁻¹	
	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %
NMOR	65,82	0,70	86,07	1,38	75,84	0,36
NPYR	66,84	0,65	86,44	1,38	78,03	2,13
NDEA	59,58	0,59	80,74	2,24	47,32	2,70
NDPA	64,23	0,48	82,61	0,73	11,81	2,29
NDBA	88,13	0,57	81,58	0,82	6,32	2,77

Tablica 25. Prikaz iskorištenja i RSD vrijednosti nakon SPE-HPLC-DAD analize otopina koncentracije 0,00016 mg L⁻¹

Analit	MilliQ voda		Vodovodna voda		Vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃	
	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %
NMOR	7,52	4,80	66,33	1,88	-	-
NPYR	90,50	0,20	98,57	0,94	19,61	0,94
NDPA	64,34	3,73	80,57	2,20	70,32	1,33
NDBA	69,82	1,91	72,12	1,60	69,30	1,11

Tablica 26. Prikaz iskorištenja i RSD vrijednosti nakon SPE-HPLC-DAD analize otopina koncentracije 0,0001 mg L⁻¹

Analit	MilliQ voda		Vodovodna voda		Vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃	
	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %	Iskorištenje / %	RSD / %
NMOR	-	-	100,27	15,24	-	-
NPYR	90,39	0,54	95,96	1,19	71,59	1,52
NDPA	89,26	4,48	105,38	3,01	66,16	2,94
NDBA	-	-	52,39	1,54	64,96	1,81

Ripollés i sur. [19] su razvili SPE-UHPLC-MS/MS metodu za detektiranje i kvantifikaciju osam *N*-nitrozamina. Među ispitivanim *N*-nitrozaminima su i NMOR, NPYR, NDEA, NDPA i NDBA. U **Tablici 27.** prikazana su iskorištenja i RSD vrijednosti prije dodatka surogat unutarnjih standarada (NDMA-d₆ i NDPA-d₁₄), koje su objavili Ripollés i sur. [19].

Tablica 27. Prikaz iskorištenja i RSD vrijednosti za *N*-nitrozamine u vodi za piće objavljene u radu Ripollésa i sur. [19]

<i>N</i> -nitrozamin	Iskorištenje (10 ng L ⁻¹) / %	RSD / %	Iskorištenje (100 ng L ⁻¹) / %	RSD / %
NMOR	86	23	78	25
NPYR	89	29	81	22
NDEA	82	33	63	35
NDPA	87	33	52	34
NDBA	66	45	38	30

Iz **Tablice 27.** može se uočiti da su postignuta niža iskorištenja s otopinom više koncentracije *N*-nitrozamina (100 ng L^{-1}), u odnosu na otopinu niže koncentracije (10 ng L^{-1}) u vodovodnoj vodi. Navedeno je u korelaciji s rezultatima postignutim u ovome radu s iskorištenjima u slučaju MilliQ i vodovodne vode kod SPE-HPLC-DAD metode. NDBA je iznimka od navedenog zaključka. NDBA ima veće iskorištenje pri većoj koncentraciji ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$; 88,13 %), nego pri nižoj koncentraciji ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$; 81,58 %) u MilliQ vodi. Iskorištenja svih *N*-nitrozamina iz $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ uzorka vodovodne vode su manja, u odnosu na uzorak MilliQ vode s istom koncentracijom analita. Za razliku od MilliQ vode, vodovodna voda ima vrlo kompleksnu matricu. Nakon prolaska uzorka kroz SPE kolonu, preporuča se ispiranje sorbensa, kako bi se desorbirale nepoželjne komponente matrice sa sorbensa [65]. Kao što je ranije spomenuto, SPE postupak u ovome radu ne uključuje korak ispiranja te bi se u nastavku istraživanja trebalo ispitati učinkovitost ekstrakcije s uključenim korakom ispiranja.

Iznosi iskorištenja za uzorke MilliQ vode u koncentraciji analita od $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ slični su iznosima koje su objavili Ripollés i sur. [19] pri 10 ng L^{-1} . NPYR ima najveće iskorištenje (86,44 %) za $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ uzorak MilliQ vode. Sva iskorištenja *N*-nitrozamina za $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ uzorak MilliQ vode veća su od 70 % (**Tablica 24.**), odnosno zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Dok, pri istoj koncentraciji u uzorku vodovodne vode, samo NMOR i NPYR zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Za uzorke MilliQ vode s koncentracijom analita $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ samo NDBA (88,13 %) zadovoljava kriterij prihvatljivosti. U uzorku MilliQ vode koncentracije $0,00016 \text{ mg L}^{-1}$ analita samo NPYR zadovoljava kriterij prihvatljivosti. Pri istoj koncentraciji u uzorku vodovodne vode, samo NMOR ne zadovoljava kriterij prihvatljivosti. Dok, u uzorku vodovodne vode s dodatkom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ samo NDPA ima iskorištenje veće od 70 %. Za uzorak MilliQ vode koncentracije $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ analita, NPYR i NDPA zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Za NDBA nije zadovoljen kriterij prihvatljivosti u uzorku vodovodne vode pri istoj koncentraciji. U uzorku vodovodne vode s $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ i koncentraciji analita od $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$, samo je za NPYR zadovoljen kriterij prihvatljivosti. Nakon dodatka surogat unutarnjih standarada uzorcima, iskorištenja SPE-UHPLC-MS/MS metode pri koncentracijama analita od 10 i 100 ng L^{-1} nalaze se u rasponu 90 – 120 % [19].

Ponovljivost injektiranja SPE-HPLC-DAD metode određena je iz površina pikova otopina koncentracija 0,02; 0,002; 0,00016 i $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$. Pripremljeni uzorci propušteni su jednom kroz SPE. Dobiveni ekstrakti injektirani su tri puta u HPLC-DAD sustavu. Podaci za izračun ponovljivosti injektiranja prikazani su u **Tablicama P7-P13.** Izračunate RSD vrijednosti ponovljivosti injektiranja prikazane su u **Tablicama 24-26.** Pri svim ispitivanim

koncentracijama (**Tablice 24-26.**), osim u $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ uzorku vodovodne vode (NMOR), RSD vrijednosti manje su od 10 %. *N*-nitrozamini su zadovoljili kriterij prihvatljivosti za ponovljivost injektiranja SPE-HPLC-DAD metode. Pri višim koncentracijama postignute su niže RSD vrijednosti, a pri nižim koncentracijama veće RSD vrijednosti. Ripollés i sur. [19] imaju veće RSD vrijednosti ($\text{RSD} > 20 \%$) prije dodatka surogat unutarnjih standarada (**Tablica 27.**). Dodatkom surogat unutarnjih standarada uzorcima, RSD vrijednosti SPE-UHPLC-MS/MS metode manje su od 20 % [19]. Postignute RSD vrijednosti SPE-UHPLC-MS/MS metode su zadovoljavajuće.

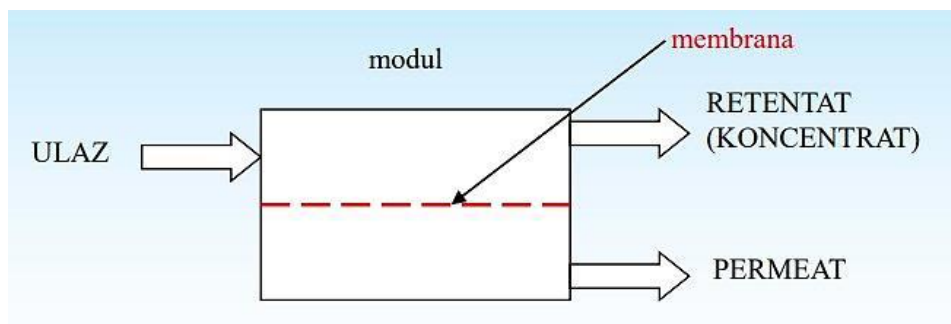
4.5. Sažetak rezultata

Tablica 28. Rezultati validacije SPE-HPLC-DAD metode

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati	Zadovoljava kriterij
Selektivnost	informacija	Slike 43 - 45.	DA
Linearnost	$R^2 > 0,99$	0,9981 (NMOR); 0,9984 (NPYR); 0,9969 (NDEA); 0,996 (NDPA); 0,9946 (NDBA) (pravac do 10 mg L ⁻¹)	DA
		0,9998 (NMOR, NPYR); 0,9996 (NDEA, NDPA, NDBA) (pravac do 7,75 mg L ⁻¹)	
Ponovljivost	RSD < 10 %	4,06 % (NMOR); 1,05 % (NPYR); 1,84 % (NDEA); 2,35 % (NDPA); 1,52 % (NDBA)	DA
Iskorištenje	70-120 %	86,07 % (NMOR); 86,44 % (NPYR); 80,74 % (NDEA); 82,61 % (NDPA); 81,58 % (NDBA) (0,002 mg L ⁻¹ u MilliQ vodi)	DA
Granica kvantifikacije	10 ng L ⁻¹	100 ng L ⁻¹ (NPYR, NDPA), 160 ng L ⁻¹ (NMOR, NDBA), 2000 ng L ⁻¹ (NDEA)	NE
Granica detekcije	3,33 ng L ⁻¹	33,33 ng L ⁻¹ (NPYR, NDPA), 53,33 ng L ⁻¹ (NMOR, NDBA), 666,67 ng L ⁻¹ (NDEA)	NE

4.6. Analiza realnih uzoraka HPLC-DAD metodom

HPLC-DAD metodom analizirani su NDEA, NDPA i NDBA u realnim uzorcima, početne otopine te izlaznim strujama permeata i retentata. Tlačnim membranskim separacijskim procesom (Slika 46.) ulazna (početna) otopina pomoću membrane razdvaja se na retentat (koncentrat) i permeat [66]. Korištene su reverzno osmotska ACM1 membrana i njezina modifikacija (modificirana mACM1 membrana), uz ulaznu otopinu ($c_{\text{ulaz}} = 3 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 46. Shema membranskog separacijskog procesa [67]

Uvrštavanjem dobivenih srednjih vrijednosti površina pikova *N*-nitrozamina u permeatima, retentatima i ulaznim otopinama u jednadžbu kalibracijskog pravca do $7,75 \text{ mg L}^{-1}$, dobivene su stvarne koncentracije *N*-nitrozamina. Stvarne koncentracije NDEA-a, NDPA-a i NDBA-a u ulaznim otopinama, retentatima i permeatima te RSD vrijednosti dva injeckiranja iste otopine prikazane su u **Tablicama 29-31**. Površine ispod kromatografskih pikova u ulaznim otopinama, retentatima i permeatima navedene su u **Tablicama P14-16**.

Tablica 29. Stvarne koncentracije *N*-nitrozamina u ulaznim otopinama

<i>N</i> -nitrozamin	$c_{\text{stvarna}} / \text{mg L}^{-1}$	RSD* / %
1 NDEA mACM1	3,09	0,37
2 NDEA mACM1	3,01	1,25
1 NDEA ACM1	2,89	0,48
2 NDEA ACM1	2,87	0,33
1 NDPA mACM1	0,0159	-
2 NDPA mACM1	0,0514	20,89
1 NDPA ACM1	2,71	4,33
2 NDPA ACM1	2,93	4,44
1 NDBA mACM1	2,82	0,83
2 NDBA mACM1	2,76	0,48
1 NDBA ACM1	2,68	0,01
2 NDBA ACM1	2,28	0,48

*za NDEA i NDPA unutar 2 dana, za NDBA unutar 1 dana

Tablica 30. Stvarne koncentracije *N*-nitrozamina u retentatima

<i>N</i> -nitrozamin	$c_{\text{stvarna}} / \text{mg L}^{-1}$	RSD / %
1 NDEA mACM1	3,93	0,10
2 NDEA mACM1	3,81	1,08
1 NDEA ACM1	3,40	1,28
2 NDEA ACM1	3,22	0,90
1 NDPA mACM1	3,66	4,20
2 NDPA mACM1	3,70	4,37
1 NDPA ACM1	3,28	3,62
2 NDPA ACM1	3,37	0,92
1 NDBA mACM1	3,32	1,00
2 NDBA mACM1	3,42	0,06
1 NDBA ACM1	3,04	1,67
2 NDBA ACM1	3,18	3,23

Tablica 31. Stvarne koncentracije *N*-nitrozamina u permeatima

<i>N</i> -nitrozamin	$c_{\text{stvarna}} / \text{mg L}^{-1}$	RSD / %
1 NDEA mACM1	0,2888	0,42
2 NDEA mACM1	0,2308	0,76
1 NDEA ACM1	0,1467	0,15
2 NDEA ACM1	0,1575	1,65
1 NDPA mACM1	0,1114	1,55
2 NDPA mACM1	0,0880	1,49
1 NDPA ACM1	0,0876	2,69
2 NDPA ACM1	0,0727	0,34
1 NDBA mACM1	< 0,055 (GK)	3,60
2 NDBA mACM1	< 0,055 (GK)	1,24
1 NDBA ACM1	< 0,055 (GK)	5,40
2 NDBA ACM1	< 0,055 (GK)	4,68

Faktor odbijanja (engl. *rejection factor*, *R*) određen je iz rezultata HPLC-DAD analize ulazne otopine i permeata. *R* je izračunat prema izrazu (21):

$$R = 1 - \frac{c_p}{c_f} \quad (21)$$

gdje je c_p koncentracija analita u permeatu, c_f koncentracija analita u ulaznoj otopini. Umjesto c_p i c_f u izraz (21) uvrštene su površine ispod kromatografskih pikova. Podaci za izračun *R* prikazani su u **Tablici P17**. Izračunati *R* faktori nalaze se u **Tablici 32**.

Tablica 32. Prikaz iznosa R faktora za realne uzorke

1 NDEA mACM1	2 NDEA mACM1	1 NDEA ACM1	2 NDEA ACM1
0,8945	0,9109	0,9359	0,9317
1 NDPA mACM1	2 NDPA mACM1	1 NDPA ACM1	2 NDPA ACM1
0,9667	0,9745	0,9719	0,9792
1 NDBA mACM1	2 NDBA mACM1	1 NDBA ACM1	2 NDBA ACM1
$R > 0,9751$	$R > 0,9745$	$R > 0,9738$	$R > 0,9693$

Površine pikova NDPA-a određene za ulazne otopine za mACM1 membranu bile su izrazito niske i previše odstupaju od 3 mg L^{-1} koncentracije. Iz navedenog razloga, nazivna koncentracija (3 mg L^{-1}) odabrana je za početnu koncentraciju ulazne otopine NDPA-a te je uvrštena u jednadžbu kalibracijskog pravca NDPA-a do $7,75 \text{ mg L}^{-1}$ ($A = 2038,7 \text{ L mg}^{-1} \gamma - 24,212$). Izračunata površina pika NDPA-a u ulaznoj otopini (A_f) korištena je za izračun R .

U permeatu koncentracije NDBA-a niže su od GK, uvrštena je GK u jednadžbu kalibracijskog pravca NDBA-a do $7,75 \text{ mg L}^{-1}$ ($A = 1550,7 \text{ L mg}^{-1} \gamma + 24,349$). Izračunata površina pika NDBA-a u permeatu (A_p) uvrštena je u izraz (21) za R faktor. Prema tome, R faktor veći je od izračunate vrijednosti.

mACM1 i ACM1 membrane postižu zadovoljavajuće vrijednosti R faktora (**Tablica 32.**) za sve N -nitrozamine. Uočava se da porastom molarne mase N -nitrozamina, raste vrijednost R faktora. Prema tome, mACM1 i ACM1 membrane najučinkovitije separiraju NDBA. Dok je najmanja učinkovitost separacije ostvarena za NDEA. $R = 0,9792$ označava da je ACM1 membrana separirala 97,92 % NDPA-a iz ulazne otopine nazivne koncentracije 3 mg L^{-1} .

ACM1 označava komercijalnu reverzno osmotsku membranu prije aktivacije organskim otapalom. Nazivne karakteristike ACM1 membrane definirane su od strane proizvođača u **Tablici 33.** U laboratoriju su uspoređeni R faktor i permeabilnost vode kroz membranu s podacima od proizvođača. Zadovoljavajuće je slaganje vrijednosti R faktora deklarirane od strane proizvođača i testirane u laboratorijskom RO uređaju. Veliko je odstupanje vrijednosti fluksa u laboratoriju i od strane proizvođača za ACM1 membranu.

Tablica 33. Nazivne karakteristike TriSep™ ACM1 membrane

TriSep™ ACM1			
Proizvođač		Laboratorij	
Početna otopina	bočata voda	R (NaCl) / %	99,5 ± 0,1
Tip membrane	neporozna (engl. <i>tight</i>)	R (CaCl ₂) / %	99,2 ± 0,0
pH raspon (25 °C)	2-11	Fluks / L m ⁻² h ⁻¹	28,9
Fluks / L m ⁻² h ⁻¹	42,5		
R (NaCl)	99,5 %		
Veličina pora / MWCO	-		
Polimer	poliamid-TFC		

Bočata voda je voda slanosti između slatke i morske vode. Slanost označava koncentraciju otopljenih soli u vodi. Soli u bočatoj vodi prisutne su pri koncentracijama 1000 – 10000 mg L⁻¹ (ppm). Bočata voda uspješno se može tretirati membranskim procesima reverzne osmoze i nanofiltracije. Desalinacija je proces uklanjanja otopljenih mineralnih soli (i drugih prisutnih tvari) iz slane vode reverznom osmozom ili destilacijom, čime se dobiva voda za piće. U postupku reverzne osmoze primjenjuju se tlakovi veći od 20 bar na ulaznu otopinu (slanu vodu). Otopljene soli i druge tvari ne prolaze kroz polupropusnu membranu praktički više od 99 %, za razliku od molekula vode [68]. Granična molekulska masa (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO) je najniža molekulska masa pri kojoj membrana zadržava više od 90 % otopljene tvari poznate molekulske mase [69]. TriSep™ ACM1 membrana je tankoslojna kompozitna (engl. *thin-film composite*, TFC) membrana. TFC membrane sastoje se od gornjeg selektivnog sloja (najčešće poliamida, PA), polisulfonskog sloja i polieterskog tkanja (porozni potporni sloj). Poliamidni gornji sloj omogućuje visoko zadržavanje otopljenih tvari te propusnost vode [70].

Modificirana mACM1 membrana nastala je aktivacijom ACM1 membrane s 1-propanolom u vremenu od 60 min. Nazivne karakteristike mACM1 membrane navedene su u **Tablici 34.**

Tablica 34. Nazivne karakteristike mACM1 membrane

R (NaCl) / %	99,3
R (CaCl ₂) / %	99,3
Fluks / L m ⁻² h ⁻¹	43,4

R faktori NaCl i CaCl₂ uz mACM1 membranu približno su jednaki R faktorima uz ACM1 membranu. Aktivacijom ACM1 membrane značajno se povećao fluks vode kroz membranu (**Tablica 34.**), smanjenje R faktora najizraženije je za NDEA (**Tablica 32.**).

5. Zaključak

U ovome radu razvijena je i validirana SPE-HPLC-DAD metoda za detekciju i kvantifikaciju pet *N*-nitrozamina (NMOR, NPYR, NDEA, NDPA, NDBA) u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi.

Na temelju rezultata validacije izvedeni su sljedeći zaključci:

- Selektivnost SPE-HPLC-DAD metode potvrđena je usporedbom kromatograma vodovodne vode, standarda smjese pet *N*-nitrozamina i smjese pet *N*-nitrozamina u vodovodnoj vodi.
- Zadovoljen je kriterij prihvatljivosti za linearnost ($R^2 > 0,99$), odnosno potvrđena je linearna ovisnost površine ispod kromatografskih pikova o masenoj koncentraciji ispitivanih *N*-nitrozamina.
- Uz $RSD < 10\%$ ispitivanih *N*-nitrozamina potvrđena je ponovljivost injektiranja SPE-HPLC-DAD metode.
- Istinitost metode iskazana je iskorištenjem. Svi ispitivani *N*-nitrozamini zadovoljili su kriterij prihvatljivosti za iskorištenje (70 – 120 %) u otopini smjese pet *N*-nitrozamina koncentracije $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ u MilliQ vodi.
- Ni za jedan od ispitivanih *N*-nitrozamina nisu zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti postavljeni za granicu detekcije ($\gamma < 3,33 \text{ ng L}^{-1}$) i granicu kvantifikacije ($\gamma < 10 \text{ ng L}^{-1}$) te metoda nije prikladna za analizu *N*-nitrozamina u vodi za piće. Međutim, razvijena metoda može se koristiti za analizu *N*-nitrozamina u otpadnim vodama. Granice kvantifikacije mogle bi se sniziti povećanjem početnog volumena uzorka za SPE s 500 mL na 1 L. Također, korištenje MS/MS detektora umjesto DAD detektora, omogućilo bi određivanje nižih koncentracija ispitivanih *N*-nitrozamina.

R faktori ispitivanih *N*-nitrozamina (NDEA, NDPA i NDBA) u realnim uzorcima postižu zadovoljavajuće vrijednosti uz ACM1 i mACM1 membrane.

6. Popis simbola

A – površina ipod kromatografskih pikova

A_f – površina pika analita u početnoj otopini

A_p – površina pika analita u permeatu

ARB – blokatori receptora angiotenzina II

α – separacijski faktor

ATNC – prividni ukupni sadržaj *N*-nitrozamina

BP – Britanska farmakopeja

c_f – koncentracija analita u početnoj otopini

c_p – koncentracija analita u permeatu

DAD – detektor s nizom dioda

DBP – dezinfekcijski nusprodukt

DLP – dobra laboratorijska praksa

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EMA – Europska medicinska agencija

F – protok pokretne faze

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove

γ – masena koncentracija kalibracijskih otopina

GC – plinska kromatografija

GD – granica detekcije

GK – granica kvantifikacije

H – visina teorijskog odsječka

HLB sorbens – kopolimerni sorbens obrnute faze

HNO₂ – dušikasta kiselina

HOCl – hipoklorasta kiselina

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka

ICH – Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu

k – faktor zadržavanja

k^* – prosječni faktor zadržavanja

K_{ow} – koeficijent raspodjele oktanol/voda

L – duljina kromatografske kolone

LC – tekućinska kromatografija

MAC – maksimalna prihvatljiva koncentracija

MCL – maksimalna razina onečišćenja

MCLG – maksimalni cilj razine onečišćenja

MWCO – granična molekulska masa

n – broj mjerenja

N – učinkovitost kolone

n_m – pokretna faza

n_s – nepokretna faza

NaHCO₃ – natrijev hidrogenkarbonat

Na₂S₂O₃ – natrijev tiosulfat

NDBA – *N*-nitrozodibutilamin

NDEA – *N*-nitrozodietilamin

NDIPA – *N*-nitrozodiizopropilamin

NDMA – *N*-nitrozodimetilamin

NDPA – *N*-nitrozodipropilamin

NDPhA – *N*-nitrozodifenilamin

NEIPA – *N*-nitrozoetilizopropilamin

NMBA – *N*-nitrozo-*N*-metil-4-aminobutirna kiselina

NMEA – *N*-nitrozometiletilamin

NMOR – *N*-nitrozomorfolin

NMP – *N*-metil pirolidinon

NO₂Cl – nitril klorid

NPIP – *N*-nitrozopiperidin

NPRO – *N*-nitrozoprolin

NPYR – *N*-nitrozopirolidin

NSAR – *N*-nitrozosarkozin

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

O₃ – ozon

PCI – pozitivna kemijska ionizacija

PEEK – polieter-eter-keton

Ph. Eur. – Europska farmakopeja

Ph. Int. – Međunarodna farmakopeja

Q-test – Dixon-ov test

Q_{90%} – tablična vrijednost uz 90 %-tnu razinu pouzdanosti

r – unutarnji polumjer kolone

R – faktor odbijanja

R^2 – koeficijent determinacije

R_s – razlučivanje

RSD – relativno standardno odstupanje

σ – standardna devijacija Gaussove krivulje

s – standardno odstupanje

SPE – ekstrakcija čvrstom fazom

t_0 – mrtvo vrijeme

t_{eq} – vrijeme ekvilibriranja kolone

t_R – vrijeme zadržavanja

T – koncentracija analita u standardnoj otopini

TEA – analizator toplinske energije

TFC – tankoslojna kompozitna membrana

TSO – temeljna standardna otopina

u – linearna brzina

UDMH-Cl – klorirani nesimetrični dimetilhidrazin

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti

USP – Farmakopeja Sjedinjenih Država

V_0 – mrtvi volumen

V_{det} – doprinos detektorske ćelije

V_{ds} – doprinos podatkovnog sustava

V_m – volumen praznine

V_p – volumen kromatografskog pika

V_{p0} – širenje zone pika unutar kolone

V_{pl} – doprinos cijevi i armature

V_s – volumni doprinos injektiranja

W – širina pika u baznoj liniji

$W_{1/2}$ – širina pika na polovici visine

\bar{x} – srednja vrijednost površina ispod kromatografskih pikova

7. Literatura

- [1] 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.
- [2] https://www.ccohs.ca/products/Supplements/MSDS_FTSS/msdsINTGUIDE.html (pristup 7. ožujka 2022.)
- [3] B. Tuesuwan i V. Vongsutilers, Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: Threat, impact, and control, *J. Pharm. Sci.* 110(9) (2021) 3118-3128.
- [4] M. Habermeyer, G. Eisenbrand, *N*-nitrosamines, including *N*-nitrosoaminoacids and potential further nonvolatiles, u: R. H. Stadler, D. R. Lineback (ur.), Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks. 1. izdanje, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009, str. 365-386
- [5] <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-packed-column-and-capillary-column/> (pristup 13. ožujka 2022.)
- [6] https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/indoor-air-pollution/glossary/def/fine-particles-ultrafine-particles.htm (pristup 13. ožujka 2022.)
- [7] <https://www.shimadzu.eu/tech-support/fundamentals-gc/columns> (pristup 13. ožujka 2022.)
- [8] Z. Es'haghi, Photodiode Array Detection in Clinical Applications; Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages, u: J.-W. Shi (ur.), Photodiodes - Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics, IntechOpen, 1. izdanje, Rijeka, 2011, str. 165-166.
- [9] <https://agora.cs.wcu.edu/~huffman/lectures/chromotography.html#org4cb055d> (pristup 8. svibnja 2022.)
- [10] J. Nawrocki i P. Andrzejewski, Nitrosamines and water, *J. Hazard. Mater.* 189 (2011) 1-18.

- [11] <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table.html> (pristup 9. svibnja 2022.)
- [12] https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-06/documents/npwdr_complete_table.pdf (pristup 8. svibnja 2022.)
- [13] <https://www.cdc.gov/healthywater/global/household-water-treatment/chlorination-byproducts.html> (pristup 8. svibnja 2022.)
- [14] <https://www.epa.gov/dwreginfo/drinking-water-regulations> (pristup 14. ožujka 2022.)
- [15] <https://www.epa.gov/system/files/documents/2022-01/dwtable2018.pdf> (pristup 8. svibnja 2022.)
- [16] <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> (pristup 8. svibnja 2022.)
- [17] J. Choi i R. L. Valentine, *N*-nitrosodimethylamine formation by free-chlorine-enhanced nitrosation of dimethylamine, *Environ. Sci. Technol.* 37(21) (2003) 4871-4876.
- [18] I. M. Schreiber i W. A. Mitch, Nitrosamine formation pathway revisited: the importance of chloramine speciation and dissolved oxygen, *Environ. Sci. Technol.* 40(19) (2016) 6007-6014.
- [19] C. Ripollés, E. Pitarch, J. V. Sancho, F. J. López, F. Hernández, Determination of eight nitrosamines in water at the ng L⁻¹ levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 702(1) (2011) 62-71.
- [20] J. W. Charrois, M. W. Arend, K. L. Froese, S. E. Hrudey, Detecting *N*-nitrosamines in Drinking Water at Nanogram per Liter Levels Using Ammonia Positive Chemical Ionization, *Environ. Sci. Technol.* 38(18) (2004) 4835-4841.
- [21] M. Asami, M. Oya, K. Kosaka, A nationwide survey of NDMA in raw and drinking water in Japan, *Sci. Total Environ.* 407(11) (2009) 3540-3545.
- [22] A. Ladhari, G. La Mura, C. Di Marino, G. Di Fabio, A. Zarrelli, Sartans: What they are for, how they degrade, where they are found and how they transform, *Sustain. Chem. Pharm.* 20 (2021) 1-14.

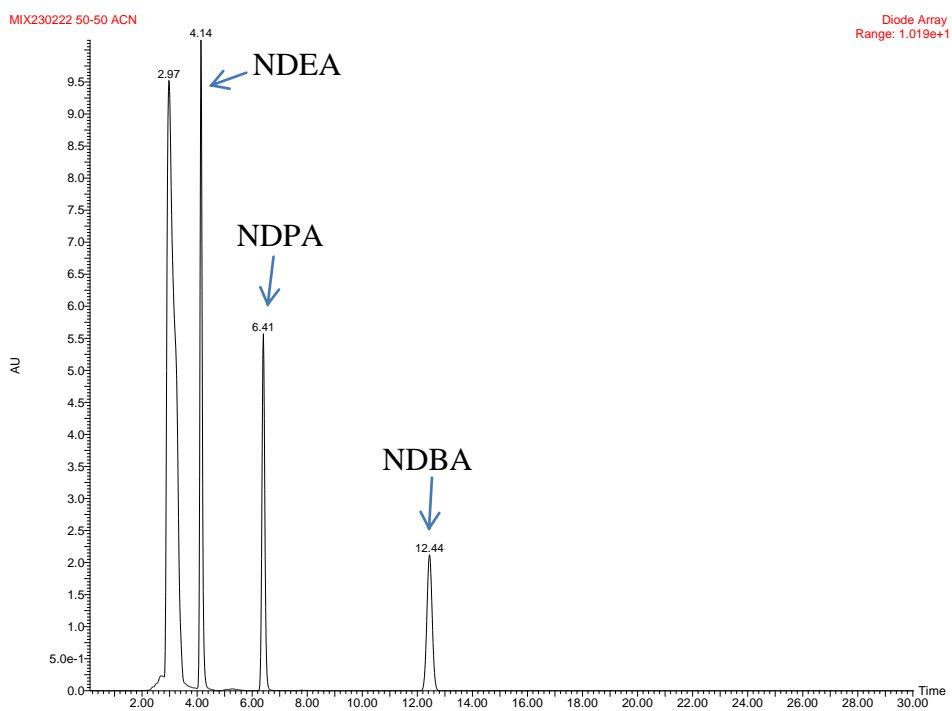
- [23] L. Roth, M. Adler, T. Jain, D. Bempong, Monographs for medicines on WHO's Model List of Essential Medicines, Bull. W. H. O. 96(6) (2018) 378-385.
- [24] M. Kaštelan-Macan, Separacija i izolacija analita, u: D. Bešenić (ur.), Kemijska analiza u sustavu kvalitete, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 222-223
- [25] T. A. Hamza, A. H. Sherif, E. A. Abdalla, A novel approach to reinforce provisional material using silica gel powder, Stomatological Dis. Sci. 1 (2017) 3-7.
- [26] E. Lundanes, L. Reubsaet, T. Greibrokk, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), u: Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods, 1. izdanje, John Wiley & Sons, Weinheim, 2013, str. 47-84.
- [27] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Basic Concepts and the Control of Separation, u: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. izdanje, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, str. 23-53.
- [28] E. Lundanes, L. Reubsaet, T. Greibrokk, General Concepts, u: Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods, 1. izdanje, John Wiley & Sons, Weinheim, 2013, str. 2-12.
- [29] J. W. Dolan i L. R. Snyder, Gradient Elution Chromatography, u: R. A. Meyers (ur.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, 2018, str. 1-19.
- [30] M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, Ultra performance liquid chromatography (UPLC)-a review, Austin J. Anal. Pharm. Chem. 2(6) (2015) 1-5.
- [31] <https://www.jwellchina.com/hr/peekppsu-rodboardpipe-extrusion-line-232.html> (pristup 28. lipnja 2022.)
- [32] <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/high-performance-liquid-chromatography/hplc-system-simply-explained> (pristup 30. lipnja 2022.)
- [33] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Detection, u: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. izdanje, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, str. 149-165.
- [34] <https://export.vwr.com/store/product/16966917/hplc-columns-avantor-ace-c18-300-5-m> (pristup 1. srpnja 2022.)

- [35] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Equipment, u: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. izdanje, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, str. 131.
- [36] <https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever> (pristup 27. lipnja 2022.)
- [37] HRN EN ISO/IEC 17025:2017 Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (ISO/IEC 17025:2017; EN ISO/IEC 17025:2017)
- [38] B. Magnusson i U. Ornemark (ur.), Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2. izdanje, 2014, str. 7-27.
- [39] S. Bratinova, B. Raffael, C. Simoneau, Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials, JRC Sci. Tech. Rep., EUR 24105 EN, 1. izdanje, 2019, str. 19
- [40] I. H. T. Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1) 1(20) (2005) 4-5.
- [41] S. Babić, 5. predavanje kolegija Upravljanje kvalitetom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
- [42] R. Shen i S. A. Andrews, Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection, Water Res. 45(2) (2011) 944-952.
- [43] M. Sgroi, F. G. A. Vagliasindi, S. A. Snyder, P. Roccaro, *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) and its precursors in water and wastewater: A review on formation and removal, Chemosphere 19 (2018) 685-703.
- [44] <https://contaminantdb.ca/contaminants/CHEM003975> (pristup 17. srpnja 2022.)
- [45] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristup 17. srpnja 2022.)
- [46] <https://foodb.ca/compounds/FDB008291> (pristup 17. srpnja 2022.)
- [47] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8732709.htm (pristup 17. srpnja 2022.)

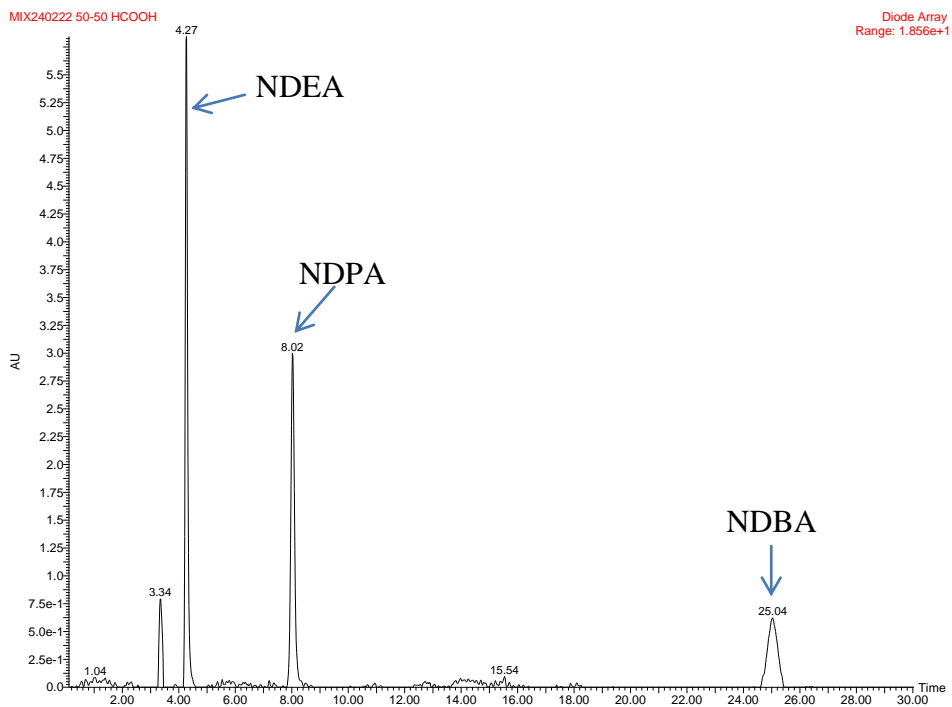
- [48] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7400641.htm (pristup 17. srpnja 2022.)
- [49] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0358200.htm (pristup 17. Srpnja 2022.)
- [50] https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf (pristup 21. lipnja 2022.)
- [51] J. W. Munch i M. V. Bassett, Method 521: Determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography with large volume injection and chemical ionization tandem mass spectrometry (MS/MS), National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. Environ. Prot. Agency, Cincinnati, 2004.
- [52] https://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/analytical-balances.html (pristup 16. srpnja 2022.)
- [53] <https://www.mt.com/hr/hr/home/library/FAQ/laboratory-weighing/Balance-Scale-Service-Calibration.html> (pristup 17. srpnja 2022.)
- [54] <https://www.desertcart.hr/products/13409395-mettler-toledo-xa-105-du-dual-range-analytical-balance-with-draft-shield-120-g-capacity-0-1-mg-readability> (pristup 17. srpnja 2022.)
- [55] Introduction to the Waters 2790 Separations Module, u: Waters 2790 Separations Module, Operator's Guide, Waters, Milford, str. 36
- [56] Operating the 2790 from the Front Panel, u: Waters 2790 Separations Module, Operator's Guide, Waters, Milford, str. 138
- [57] <https://www.pharmaceuticsky.com/2022/05/what-is-hplc-column-conditioning-how.html> (pristup 15. srpnja 2022.)
- [58] https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/supelco-visiprep-spe-vacuum-manifold-24-port_13530 (pristup 5. srpnja 2022.)

- [59] <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat094226-oasis-hlb-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-1.html> (pristup 5. srpnja 2022.)
- [60] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/supelco/57144u> (pristup 5. srpnja 2022.)
- [61] S. Babić, 3. predavanje kolegija Upravljanje kvalitetom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
- [62] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_07_73_1709.html (pristup 12. lipnja 2022.)
- [63] A. Yahaya, D. Babatunde, L. W. Olaniyan, O. Agboola, Application of chromatographic techniques in the analysis of total nitrosamines in water, *Heliyon* 6(3) (2020) 1-8.
- [64] https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/Agilent_ASMS_2019_TP_188_Poster_a7535330cf/Agilent_ASMS_2019_TP188_Poster.pdf (pristup 27. svibnja 2022.)
- [65] F. Poole i S.K. Poole, Principles and Practice of Solid-Phase Extraction, u: J. Pawliszyn (ur.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 1. izdanje, Academic Press, Amsterdam, 2012, str. 273-297.
- [66] D. Dolar, Molekulske separacije, laboratorijske vježbe, interna skripta za studente, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
- [67] D. Dolar, Nastavni tekstovi iz kolegija Molekulske separacije, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
- [68] <https://www.freshwatersystems.com/blogs/blog/what-is-brackish-water-and-how-do-you-treat-it> (pristup 23. srpnja 2022.)
- [69] <https://synderfiltration.com/learning-center/articles/membranes/molecular-weight-cut-off/> (pristup 23. srpnja 2022.)
- [70] A. F. Alsayed i M. A. Ashraf, Modified nanofiltration membrane treatment of saline water, u: P. Samui, H. Bonakdari i R. C. Deo (ur.), *Water Engineering Modeling and Mathematic Tools*, 1. izdanje, Elsevier, Chennai, 2021, str. 28, 29.

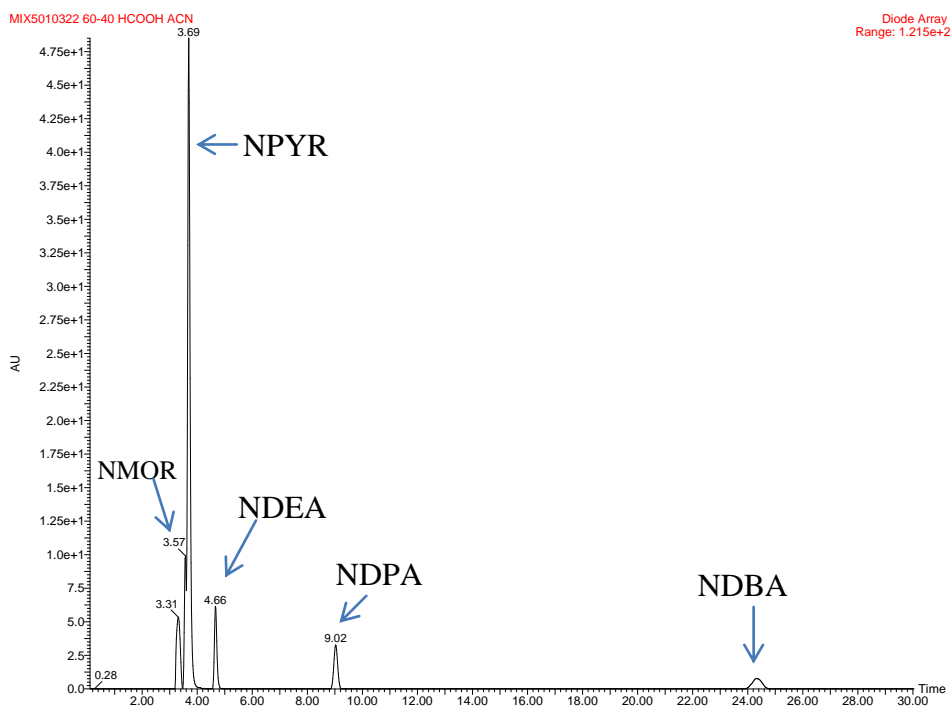
8. Prilozi



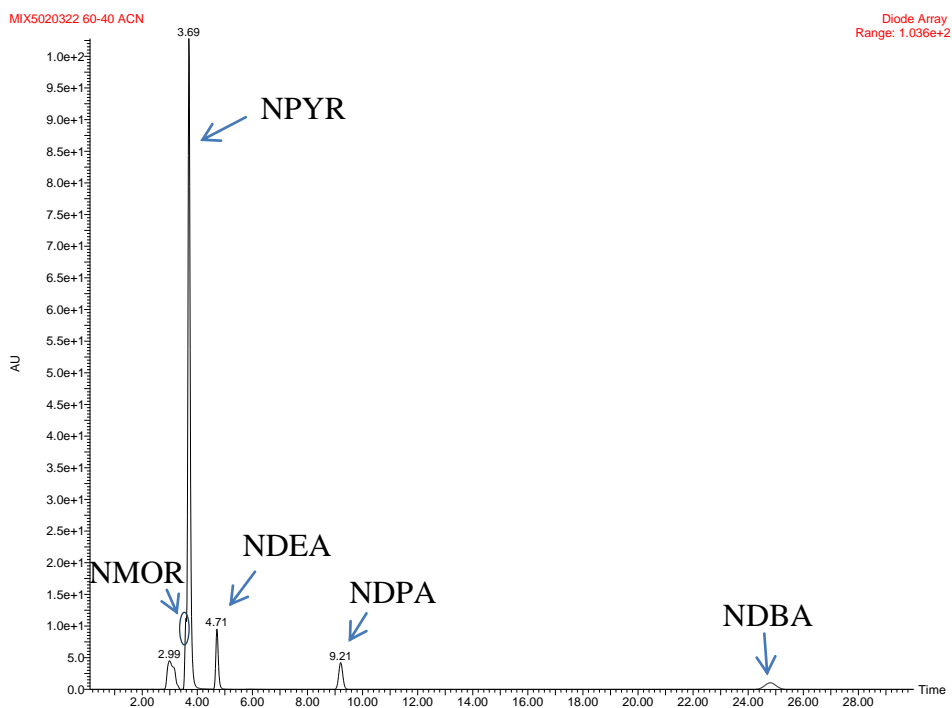
Slika P1. Kromatogram 10 mg L^{-1} otopine tri *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju uz 50 % B (acetonitril)



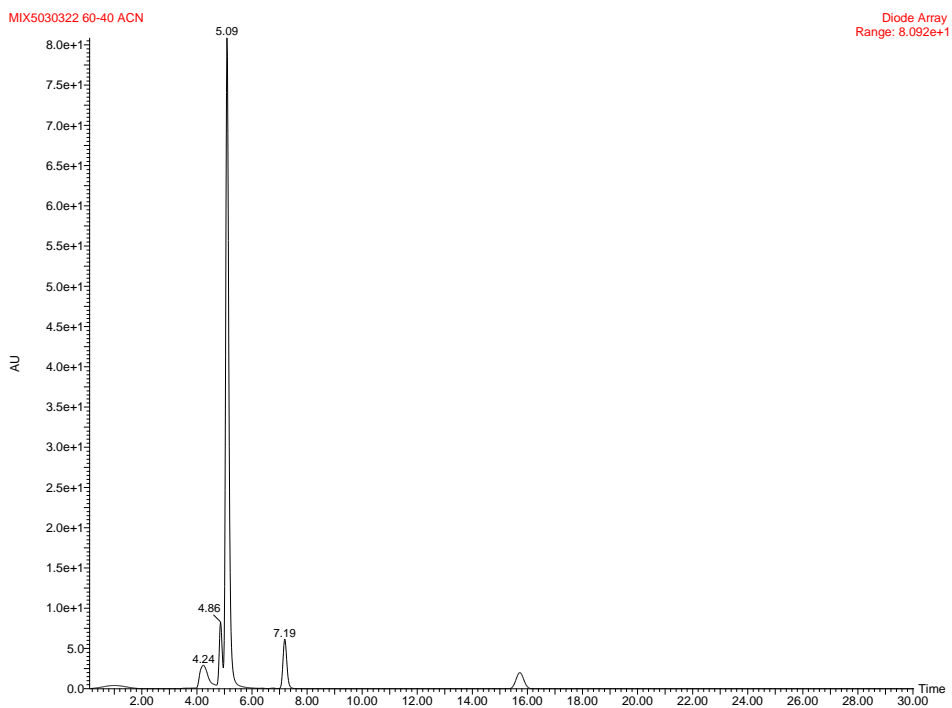
Slika P2. Kromatogram 10 mg L^{-1} otopine tri *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju uz 50 % B (1 % HCOOH u metanolu)



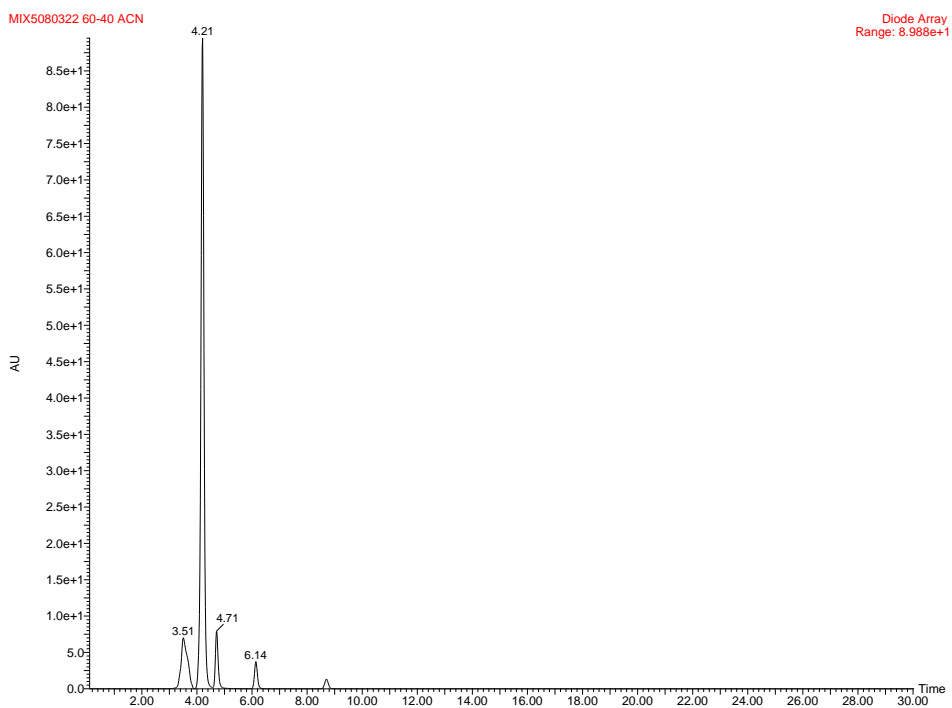
Slika P3. Kromatogram 10 mg L^{-1} otopine pet *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju uz 40 % B (1 % HCOOH u acetonitrilu)



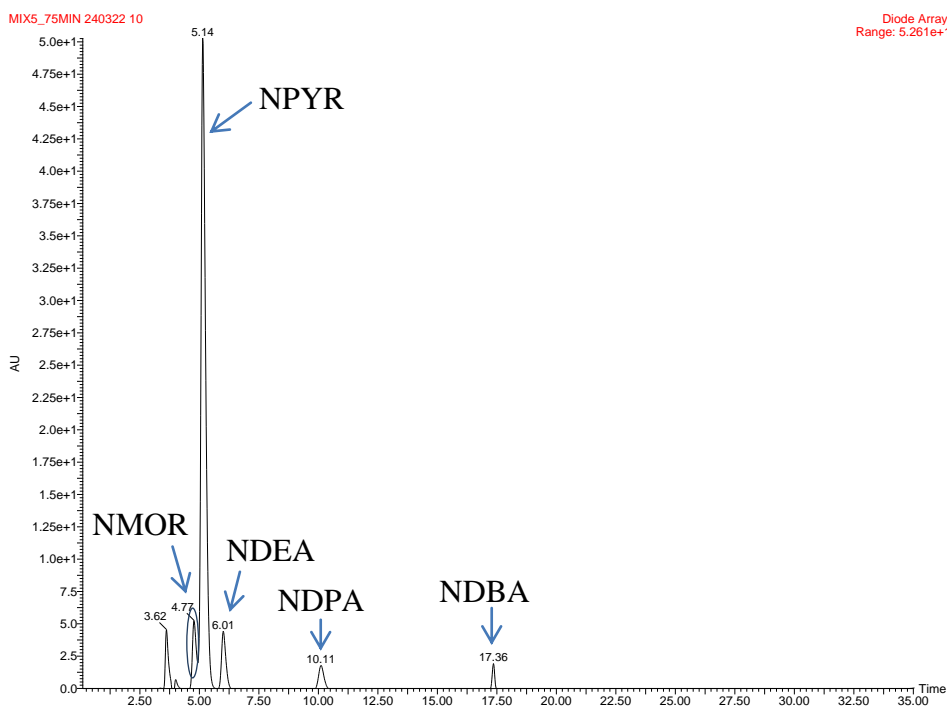
Slika P4. Kromatogram 10 mg L^{-1} otopine pet *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % B (acetonitril) uz Kinetex kolonu



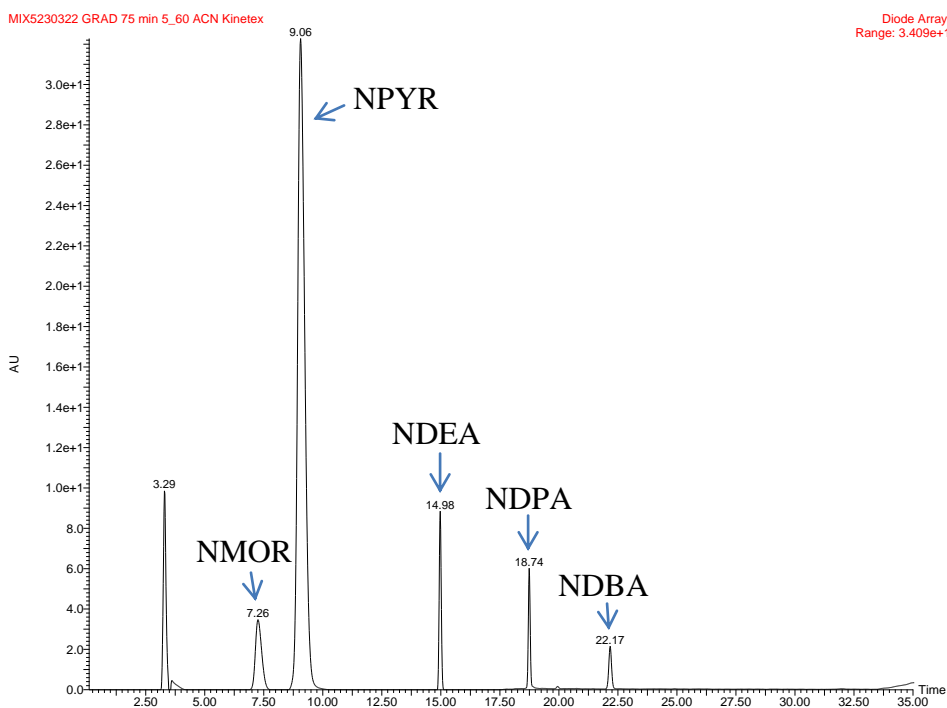
Slika P5. Kromatogram 10 mg L⁻¹ otopine pet *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % B (acetonitril) uz Synergi kolonu



Slika P6. Kromatogram 10 mg L⁻¹ otopine pet *N*-nitrozamina pri izokratnom eluiranju s 40 % B (acetonitril) uz Agilent kolonu



Slika P7. Kromatogram 10 mg L⁻¹ otopine pet *N*-nitrozamina pri gradijentnom eluiranju uz Agilent kolonu



Slika P8. Kromatogram 10 mg L⁻¹ otopine pet *N*-nitrozamina pri gradijentnom eluiranju uz Kinetex kolonu

Tablica P1. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja ponovljivosti mjerenja

N-nitrozamin			NMOR		
Broj mjerenja	A (0,0325 mg L ⁻¹)	A (0,055 mg L ⁻¹)	A (0,0775 mg L ⁻¹)	A (0,1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)
1.	-	131,3	201,8	204,2	28126,75
2.	-	116,52	203,88	217,9	28593,39
3.	-	133,4	202,73	230,48	28761,7
4.	-	94	193,32	227	28557,58
5.	-	139,2	187,14	220,39	28544,35
6.	-	123,92	155,38	235,67	28818,98
7.	-	-	206,59	217,81	28533,57
8.	-	121,36	194,88	206,09	28728,6
9.	67,42	133,89	203,14	210,55	28710,21
10.	-	-	192,1	226,35	28700,54
\bar{x}	-	128,51	198,40	219,64	28660,99
<i>s</i>	-	8,07	6,66	10,46	105,34
RSD / %	-	6,28	3,36	4,76	0,37

Tablica P2. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja ponovljivosti mjerenja

N-nitrozamin			NPYR			
Broj mjerenja	A (0,01 mg L ⁻¹)	A (0,0325 mg L ⁻¹)	A (0,055 mg L ⁻¹)	A (0,0775 mg L ⁻¹)	A (0,1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)
1.	359,34	1181,53	1970,01	2746,36	3392,1	305977,03
2.	328,25	1188,22	1960,63	2774,53	3399,13	310705,97
3.	357,87	1190,67	1949,72	2783,66	3339,55	313367,88
4.	310,67	1183,28	1970,33	2789,36	3393,1	310397,03
5.	375,64	1166,19	1965,36	2811,51	3259,64	310005,06
6.	324,38	1184,05	1990,75	2779,48	3286,4	313577,44
7.	338,04	1177,5	1992,66	2819,98	3323,94	310468,97
8.	-	1167,23	1993,83	2810,49	3240,51	312196
9.	368,73	1158,22	1980,18	2862,18	3216,65	311880,63
10.	347,41	1155,19	1964,11	2809,05	3226,49	312078,53
\bar{x}	345,59	1175,21	1973,76	2798,66	3307,75	311630,83
<i>s</i>	21,82	12,61	15,02	31,44	71,66	1311,47
RSD / %	6,31	1,07	0,76	1,12	2,17	0,42

Tablica P3. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja ponovljivosti mjerenja

Broj mjerenja	N-nitrozamin		NDEA		
	A (0,0325 mg L ⁻¹)	A (0,055 mg L ⁻¹)	A (0,0775 mg L ⁻¹)	A (0,1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)
1.	110,76	-	250,63	308,81	27233,25
2.	-	-	248	307,38	27614,67
3.	-	172,48	-	312,04	27837,48
4.	-	-	257,14	301,81	27598,68
5.	-	-	257,48	295,04	27546,15
6.	-	169,81	-	298,64	27851,61
7.	-	-	258,63	295,1	27558,04
8.	-	-	261,67	295,23	27667,02
9.	-	172,13	261,59	287,22	27692,11
10.	-	-	254,99	290,58	27683,84
\bar{x}	-	171,47	256,27	299,18	27672,18
<i>s</i>	-	1,45	4,88	8,16	110,51
RSD / %	-	0,84	1,90	2,73	0,40

Tablica P4. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja ponovljivosti mjerenja

Broj mjerenja	N-nitrozamin		NDPA			
	A (0,01 mg L ⁻¹)	A (0,0325 mg L ⁻¹)	A (0,055 mg L ⁻¹)	A (0,0775 mg L ⁻¹)	A (0,1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)
1.	15,27	52,46	95,89	133,05	166,88	17407,68
2.	13,39	51,21	97,21	134,05	166,32	17621,27
3.	15,21	52,97	94,62	135,49	165,36	17780,89
4.	17,01	53,51	93	133,36	167,42	17656,49
5.	20,1	52,25	95,45	132,35	156,37	17601,26
6.	16,73	51,4	96,33	130,69	161,59	17760,53
7.	13,5	49,59	97,65	138,01	162,33	17546,97
8.	14,77	45,67	97,18	130,25	155,9	17716,17
9.	14,3	47,16	96,24	133,95	154,97	17614,74
10.	14,31	48,71	97,15	134,79	157,1	17691,44
\bar{x}	14,94	50,49	96,07	133,60	161,42	17639,74
<i>s</i>	1,27	2,62	1,42	2,27	4,97	109,65
RSD / %	8,50	5,19	1,48	1,70	3,08	0,62

Tablica P5. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja ponovljivosti mjerenja

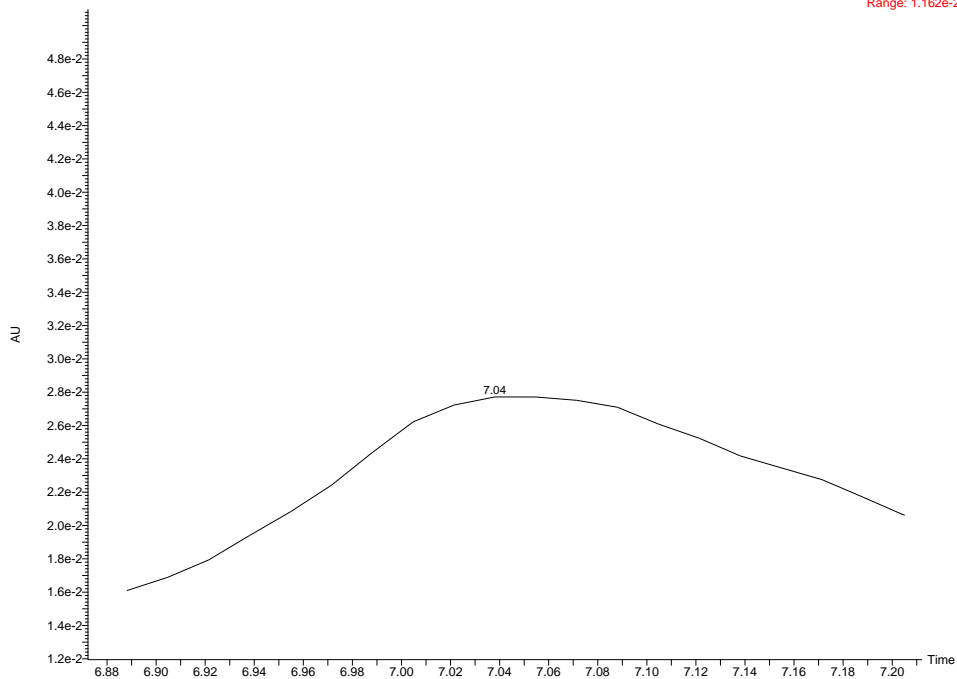
Broj mjerenja	N-nitrozamin		NDBA	
	A (0,055 mg L ⁻¹)	A (0,0775 mg L ⁻¹)	A (0,1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)
1.	66,3	77,59	125,19	11852,58
2.	55,38	77,6	122,46	11987,7
3.	63,71	81,45	132,95	11982,78
4.	69,29	82,46	121,73	11928,62
5.	64,7	150,12	126,53	11856,66
6.	67,44	82,56	129,93	11916,75
7.	68,3	67,69	121,78	11835,7
8.	75,76	80,41	144,43	11900,41
9.	56,88	84,13	113,36	11870,18
10.	64,64	91,44	124,03	11864,41
\bar{x}	65,24	80,59	126,24	11899,58
s	5,89	6,35	8,27	53,81
RSD / %	9,03	7,88	6,55	0,45

Tablica P6. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja međupreciznosti mjerenja

	NMOR			NPYR		
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (3,25 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)	A (3,25 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)
1.	29817,21	9475,21	2954,66	319989,47	104363,83	32766,57
2.	28517,29	9799,1	2992,33	305820,22	105647,23	33345,68
3.	29287,83	9253,48	2965,2	314134,66	100915,52	33280,04
\bar{x}	29207,44	9509,26	2970,73	313314,78	103642,19	33130,76
s	653,68	274,40	19,43	7120,12	2447,01	317,10
RSD / %	2,24	2,88	0,65	2,27	2,36	0,96
	NDEA			NDPA		
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (3,25 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)	A (3,25 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)
1.	29754,98	9844,91	2999,56	20465,98	6950,56	2058,91
2.	28421,06	9899,32	3035,23	19729,41	6805,12	2095,61
3.	29075,91	9694,6	3033,25	19804,18	6812,82	2095,7
\bar{x}	29083,98	9812,94	3022,68	19999,86	6856,17	2083,41
s	667,00	106,04	20,05	405,40	81,84	21,21
RSD / %	2,29	1,08	0,66	2,03	1,19	1,02
	NDBA					
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (3,25 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)			
1.	15831,8	5269,8	1603,02			
2.	15471,73	4873,01	1467,3			
3.	15078,77	5194,68	1451,95			
\bar{x}	15460,77	5112,50	1507,42			
s	376,63	210,78	83,14			
RSD / %	2,44	4,12	5,52			

MIX5 300322_0_055 ppm 6

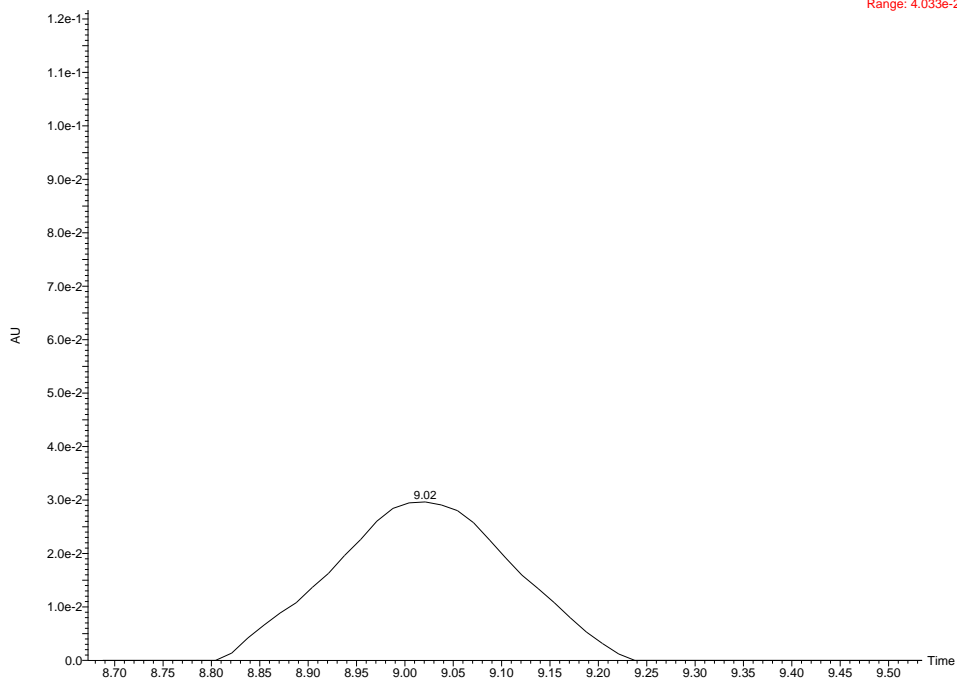
Diode Array
Range: 1.162e-2



Slika P9. Kromatografski pik NMOR-a pri $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ uz $t_R = 7,04 \text{ min}$

MIX5 300322_0_01 ppm 7

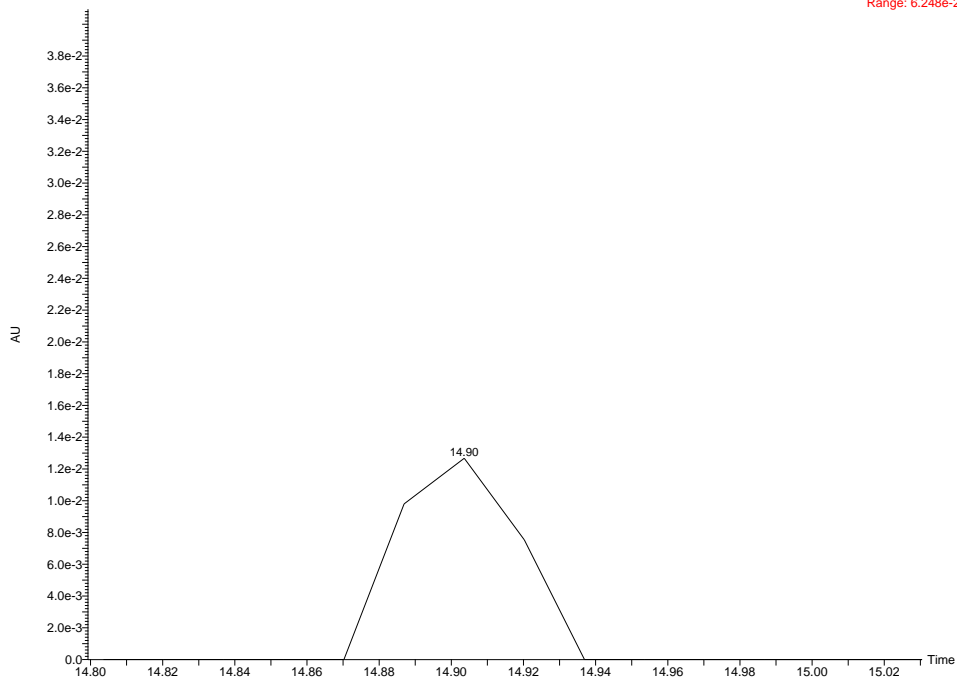
Diode Array
Range: 4.033e-2



Slika P10. Kromatografski pik NPYR-a pri $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ uz $t_R = 9,02 \text{ min}$

MIX5 300322 0_055 ppm 3

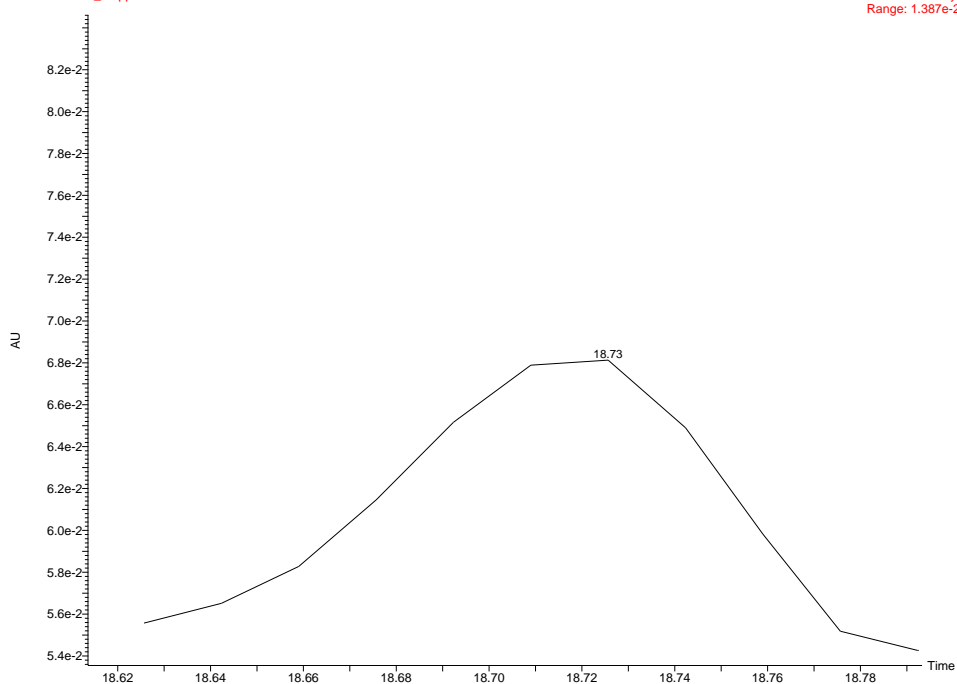
Diode Array
Range: 6.248e-2



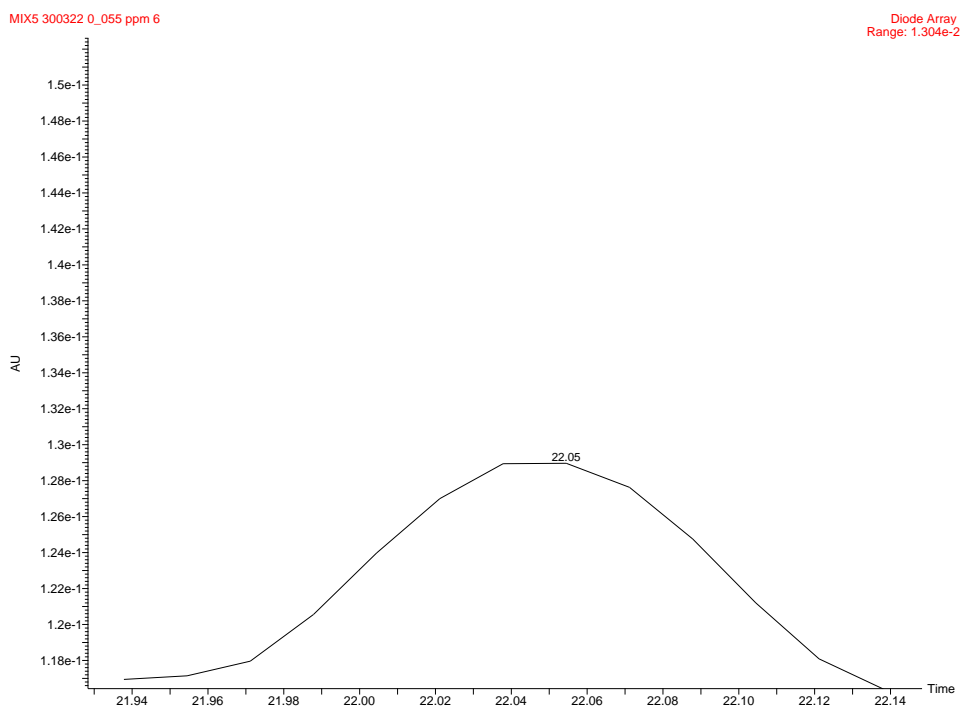
Slika P11. Kromatografski pik NDEA-a pri $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ uz $t_R = 14,90 \text{ min}$

MIX5 300322 0_01 ppm 8

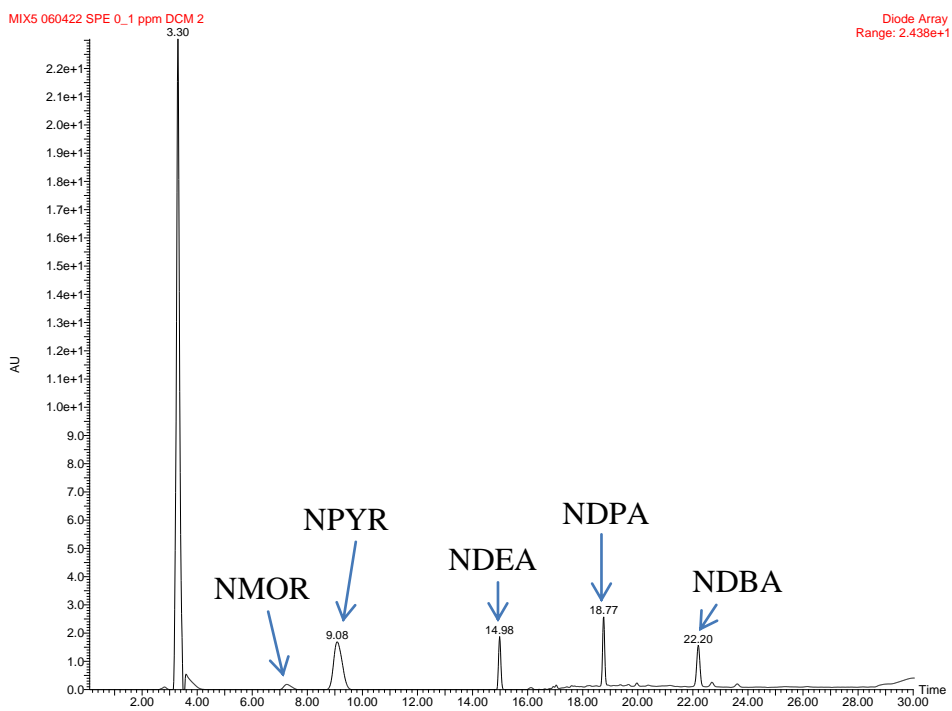
Diode Array
Range: 1.387e-2



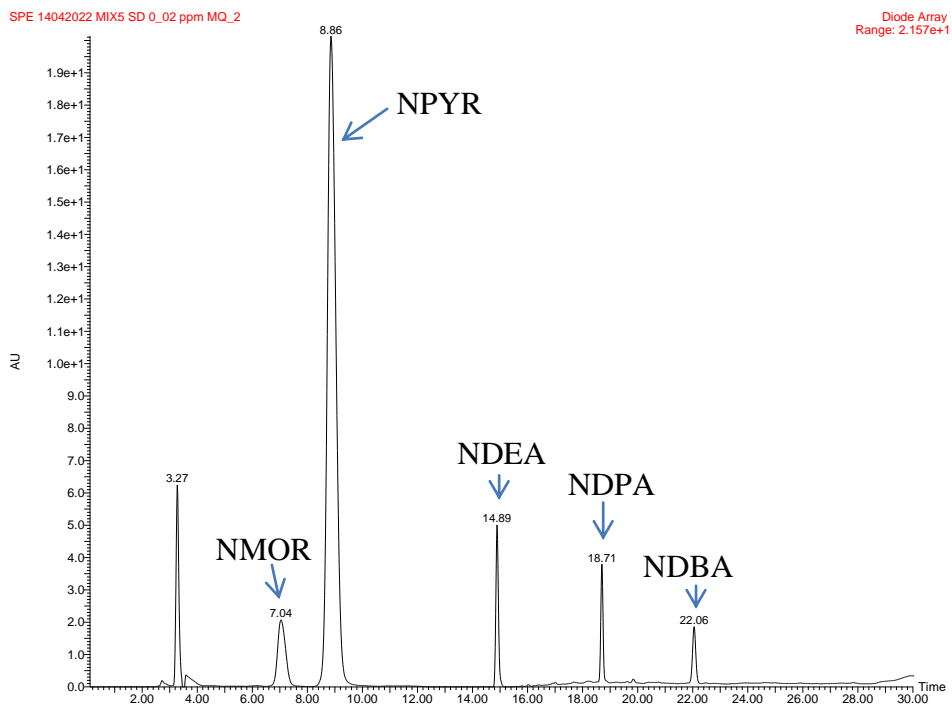
Slika P12. Kromatografski pik NDPA-a pri $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ uz $t_R = 18,73 \text{ min}$



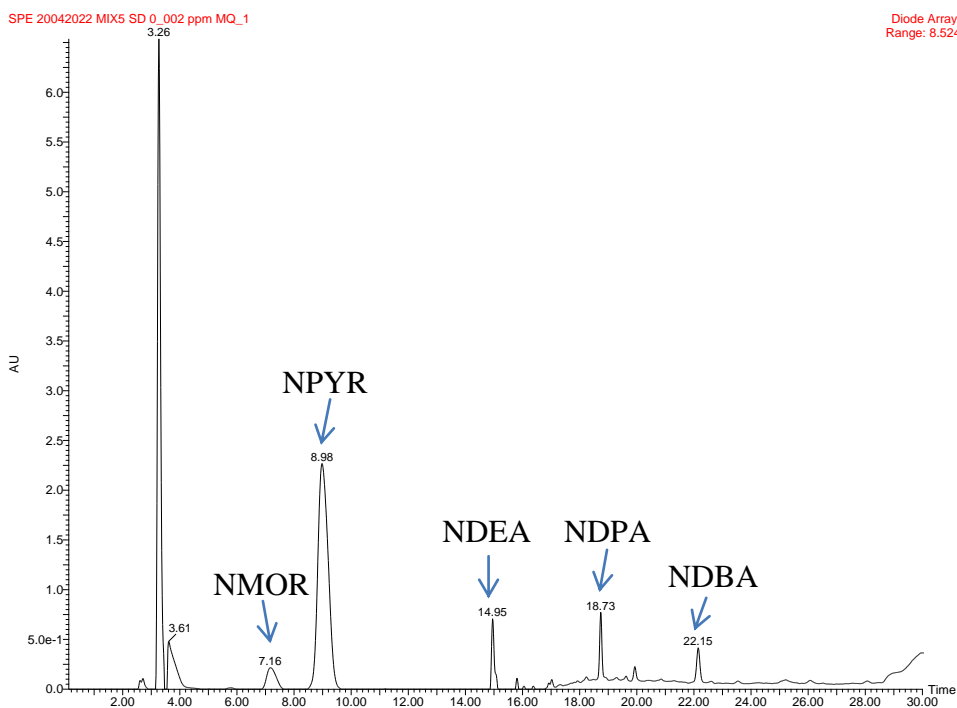
Slika P13. Kromatografski pik NDBA-a pri $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ uz $t_R = 22,05 \text{ min}$



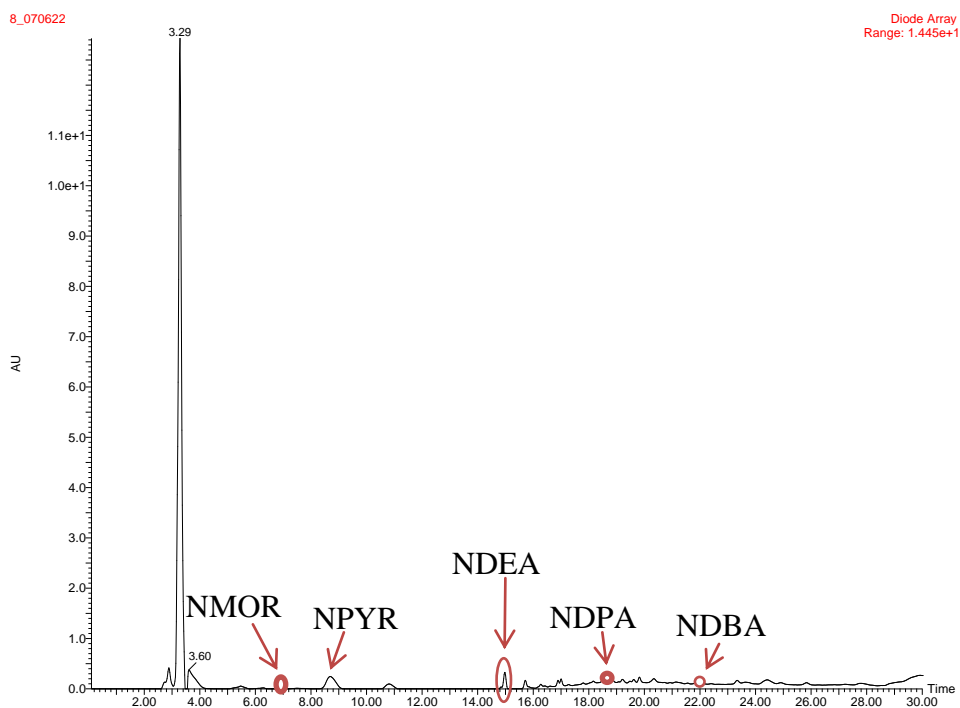
Slika P14. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina početne koncentracije $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ nakon SPE-om



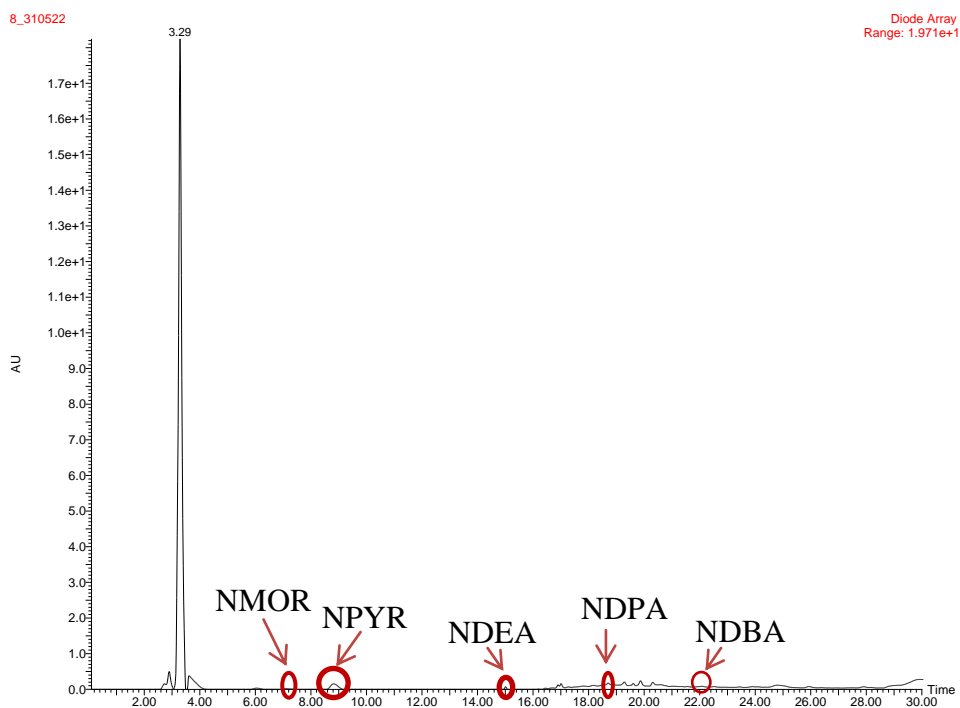
Slika P15. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina početne koncentracije 0,02 mg L⁻¹ nakon SPE-om



Slika P16. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina početne koncentracije 0,002 mg L⁻¹ u MilliQ vodi nakon SPE-om



Slika P17. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina početne koncentracije 0,00016 mg L⁻¹ u vodovodnoj vodi nakon SPE-om



Slika P18. Kromatogram otopine pet *N*-nitrozamina početne koncentracije 0,0001 mg L⁻¹ u vodovodnoj vodi nakon SPE-om

Tablica P7. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR		NPYR	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (0,02 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)	A (0,02 mg L ⁻¹)
1.	28263,22	18557,9	304017,06	202707,45
2.	28393,47	18583,55	305600,06	203219,11
3.		18796,13		205231,58
	NDEA		NDPA	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (0,02 mg L ⁻¹)	A (10 mg L ⁻¹)	A (0,02 mg L ⁻¹)
1.	26558,72	15796,65	15081,53	9636,98
2.	26717,23	15842,84	15055,31	9668,48
3.		15976,97		9728,17
	NDBA			
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)		
Broj mjerenja	A (10 mg L ⁻¹)	A (0,02 mg L ⁻¹)		
1.	7685,52	6706,58		
2.	7594,27	6715,52		
3.		6776,71		

Tablica P8. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR		NPYR	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)
1.	2954,66	2508,18	32766,57	28109,83
2.	2955,61	2543,79	33161,55	28477,47
3.		2578,41		28898,02
	NDEA		NDPA	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)
1.	2999,56	2485,05	2058,91	1719,72
2.	3065,5	2474,94	2095,56	1726,13
3.		2385,48		1702,05
	NDBA			
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)		
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)		
1.	1603,02	1318,52		
2.	1616,13	1300,55		
3.		1319,98		

Tablica P9. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

		NMOR		NPYR	
		Standardna otopina	SPE (vodovodna voda)	Standardna otopina	SPE (vodovodna voda)
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)		A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)
1.	2992,33	2265,83		33345,68	26632,18
2.	2965,2	2261,3		33280,04	25661,42
3.		2249,96			25686,43
		NDEA		NDPA	
		Standardna otopina	SPE (vodovodna voda)	Standardna otopina	SPE (vodovodna voda)
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)		A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)
1.	3035,23	1474,82		2095,61	253,71
2.	3033,25	1434,86		2095,7	246
3.		1397,44			242,66
		NDBA			
		Standardna otopina	SPE (vodovodna voda)		
Broj mjerenja	A (1 mg L ⁻¹)	A (0,002 mg L ⁻¹)			
1.	1467,3	90,02			
2.	1451,95	95,06			
3.		91,76			

Tablica P10. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR		NPYR	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (0,08 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,08 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)
1.	-	14,09	2975,29	2704,17
2.	187,39	13,58	2987,56	2703,75
3.	186,86	14,93	2987,12	2694,4
4.	191,83		2986,68	
	NDPA		NDBA	
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (0,08 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,08 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)
1.	134,69	85,03	118,33	79,14
2.	133,97	80,17	108,02	76,2
3.	128,4	86	113,13	77,34
4.	123,48		104,88	

Tablica P11. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR	NPYR		
	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)	
Broj mjerenja	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	
1.	123,21	2964,57	591,32	
2.	124,5	2949,23	583,43	
3.	127,77	2910,83	580,7	
	NDPA		NDBA	
	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)
Broj mjerenja	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)	A (0,00016 mg L ⁻¹)
1.	106,95	91,86	78,65	76,1
2.	102,39	90,17	80,72	77,8
3.	105,23	92,53	80,99	77,04

Tablica P12. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR	NPYR	
	Standardna otopina	Standardna otopina	SPE (MilliQ)
Broj mjerenja	A (0,05 mg L ⁻¹)	A (0,05 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)
1.	-	1761,7	1588,82
2.	-	1732,42	1571,84
3.	-	1738,9	1578,88
4.	116,74	1758,41	
	NDPA		NDBA
	Standardna otopina	SPE (MilliQ)	Standardna otopina
Broj mjerenja	A (0,05 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,05 mg L ⁻¹)
1.	89,37	83,83	-
2.	89,85	77,62	86,72
3.	91,54	77,67	94,02
4.	86,43		90,95

Tablica P13. Površine ispod kromatografskih pikova tijekom određivanja istinitosti i preciznosti mjerenja SPE-HPLC-DAD metode

	NMOR	NPYR		
	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)	
Broj mjerenja	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)	
1.	106,83	1660,69	1243,17	
2.	106,69	1699,4	1237,73	
3.	137,65	1671,53	1272,97	
	NDEA		NDPA	
	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)
Broj mjerenja	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)	A (0,0001 mg L ⁻¹)
1.	222,24	138,95	97,32	60,95
2.	255,37	144,41	93	58,76
3.	239,97	146,54	91,98	57,52
	NDBA			
Broj mjerenja	SPE (vodovodna voda)	SPE (vodovodna voda s Na ₂ S ₂ O ₃)		
1.	48,26	59,19		
2.	47,21	57,63		
3.	46,86	59,66		

Tablica P14. Površine ispod kromatografskih pikova u ulaznim otopinama

	Ulazne otopine			
Broj mjerenja	A (1 NDEA mACM)	A (2 NDEA mACM)	A (1 NDEA ACM)	A (2 NDEA ACM)
1.	9057,73	8734,71	8439,33	8383,88
2.	9010,01	8890,58	8496,88	8422,79
Broj mjerenja	A (1 NDPA mACM)	A (2 NDPA mACM)	A (1 NDPA ACM)	A (2 NDPA ACM)
1.	-	68,59	5325,17	5770,24
2.	8,3	92,37	5661,5	6144,08
Broj mjerenja	A (1 NDBA mACM)	A (2 NDBA mACM)	A (1 NDBA ACM)	A (2 NDBA ACM)
1.	4431,56	4314,73	4181,87	3556,06
2.	4379,67	4285,44	4182,34	3580,52

Tablica P15. Površine ispod kromatografskih pikova u retentatima

	Retentati			
Broj mjerenja	A (1 NDEA mACM)	A (2 NDEA mACM)	A (1 NDEA ACM)	A (2 NDEA ACM)
1.	11466,32	11214,2	10028,49	9475,4
2.	11449,98	11043,97	9849,09	9355,98
Broj mjerenja	A (1 NDPA mACM)	A (2 NDPA mACM)	A (1 NDPA ACM)	A (2 NDPA ACM)
1.	7650,49	7752,26	6826,1	6795,2
2.	7209,54	7287,79	6485,51	6884,28
Broj mjerenja	A (1 NDBA mACM)	A (2 NDBA mACM)	A (1 NDBA ACM)	A (2 NDBA ACM)
1.	5214,46	5331,3	4797,98	5070,69
2.	5141,47	5327,15	4685,67	4844,2

Tablica P16. Površine ispod kromatografskih pikova u permeatima

Permeati				
Broj mjerjenja	A (1 NDEA mACM)	A (2 NDEA mACM)	A (1 NDEA ACM)	A (2 NDEA ACM)
1.	950,08	789,53	542,14	567,13
2.	955,81	781,08	543,27	580,52
Broj mjerjenja	A (1 NDPA mACM)	A (2 NDPA mACM)	A (1 NDPA ACM)	A (2 NDPA ACM)
1.	205,16	153,54	151,38	124,26
2.	200,72	156,82	157,26	123,66
Broj mjerjenja	A (1 NDBA mACM)	A (2 NDBA mACM)	A (1 NDBA ACM)	A (2 NDBA ACM)
1.	45,52	47,79	78,16	49,64
2.	47,9	46,96	84,36	53,04

Tablica P17. Površine ispod kromatografskih pikova za izračun faktora *R*

	A (1 NDEA mACM)	A (2 NDEA mACM)	A (1 NDEA ACM)	A (2 NDEA ACM)
A_p	952,94	785,3	542,7	573,82
A_f	9033,87	8812,64	8468,1	8403,34
	A (1 NDPA mACM)	A (2 NDPA mACM)	A (1 NDPA ACM)	A (2 NDPA ACM)
A_p	202,94	155,18	154,32	123,96
A_f	6091,9	6091,9	5493,34	5957,16
	A (1 NDBA mACM)	A (2 NDBA mACM)	A (1 NDBA ACM)	A (2 NDBA ACM)
A_p	109,64	109,64	109,64	109,64
A_f	4405,62	4300,08	4182,1	3568,29