

# Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja

---

Šimić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:073328>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Šimić

**ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA PESTICIDA IZ UZORKA  
ČAJA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

izv. prof. dr.sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2015.

*Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na odabranoj temi rada, stručnoj pomoći i trudu koji mi je pružila. Zahvaljujem se tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Slavici Kos i Tanji Ivančić na pruženoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dijela.*

*Velika hvala i Matei Dedić, mag.appl. chem.i Antoniji Periši, m. chem. eng. iz Shimadzu d.o.o. Hrvatska na uloženom vremenu i trudu oko snimanja uzoraka i obrade rezultata na plinskom kromatografu.*

## SAŽETAK

U ovom diplomskom radu prikazan je postupak optimizacije ultrazvučne ekstrakcije jedanaest pesticida (klorprofam, propizamid, vinklozolin, metolaklor, profenofos, *p*, *p'*-DDE, etion, tetradifon, permetrin,  $\delta$ -lindan te pirimifos etil) međusobno različitih fizikalno–kemijskih svojstava iz čaja pri čemu su dobiveni ekstrakti snimani na plinskom kromatografu vezanom na spektrometar masa. Optimirana metoda je validirana, a dobivene visoke vrijednosti  $R^2$  potvrda su linearnosti ove metode. Za ispitivane pesticide granice detekcije dobivene su u rasponu od 0,125  $\mu\text{g/g}$  do 0,500  $\mu\text{g/g}$ , a granice kvantifikacije između 0,25  $\mu\text{g/g}$  i 1,00  $\mu\text{g/g}$ .

Optimirana i validirana metoda se uspješno primijenila na realnim uzorcima što daje naslutiti da je ultrazvučna ekstrakcija prikladna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju pesticida iz različitih uzoraka čajeva.

**Ključne riječi:** *ultrazvučna ekstrakcija, pesticidi, čaj, plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa*

# SUMMARY

## ULTRASONIC EXTRACTION OF PESTICIDES FROM TEA SAMPLES

This thesis shows the process optimization of ultrasonic extraction eleven pesticides (chlorpropham, propyzamide, vinclozolin, metolachlor, profenofos, *p*, *p'*-DDE, ethion, tetradifon, permethrin,  $\delta$ -lindane and pirimiphos ethyl) mutually different physical and chemical properties of tea whereby the extracts are analyzed on a gas chromatography tandem mass spectrometry. The optimized method has been validated and the obtained high value  $R^2$  are the confirmation of the linearity of this method. For investigated pesticides limit of detection were obtained in the range of 0,125  $\mu\text{g/g}$  to 0,500  $\mu\text{g/g}$ , and the limit of quantification between 0,25  $\mu\text{g/g}$  and 1,00  $\mu\text{g/g}$ .

Optimized and validated method was successfully applied to real samples suggesting that the ultrasonic extraction method is suitable for the identification and quantification of pesticides from different tea samples.

**Key words:** *ultrasonic extraction, pesticides, tea, gas chromatography tandem mass spectrometry*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Pesticidi</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Pesticidi u okolišu</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Čaj</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Priprema čvrstog uzorka</b>	<b>7</b>
2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija	9
2.4.1.1. Utjecaji ultrazvuka	10
2.4.1.2. Komercijalni uređaji ultrazvuka	12
<b>2.5. Validacija analitičkih metoda</b>	<b>13</b>
2.5.1. Osnovni parametri validacije	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materijal</b>	<b>16</b>
3.1.1. Čaj	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Pesticidi	17
3.1.3.1. Klorprofam	17
3.1.3.2. Lindan	18
3.1.3.3. Propizamid	19
3.1.3.4. Vinklozolin	20
3.1.3.5. Metolaklor	21
3.1.3.6. Pirimifos etil	22
3.1.3.7. Profenofos	23
3.1.3.8. <i>p, p'</i> -DDE	24
3.1.3.9. Etion	25
3.1.3.10. Tetradifon	26
3.1.3.11. Permetrin	27
3.1.4. Priprema standardnih otopina pesticida	28
<b>3.2. Instrumenti</b>	<b>28</b>
3.2.1. Analitička vaga	28
3.2.2. Ultrazvučna kupelj	28
3.2.3. Rotirajući uparivač otapala	29
3.2.4. Plinski kromatograf	30
<b>3.3. Metode rada</b>	<b>31</b>
3.3.1. Postupak za ultrazvučnu ekstrakciju pesticida iz uzorka čaja	31
3.3.2. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa (GC-MS)	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Ekstrakcija pesticida iz uzoraka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Validacija metode</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Primjena metode na realnim uzorcima</b>	<b>49</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>54</b>

## 1. UVOD

Budući da pesticidima pripada velik broj spojeva koji se značajno razlikuju u svojim fizikalno-kemijskim svojstvima, za njihovo određivanje koriste se različite analitičke tehnike i metode kako bi se osigurala potrebna učinkovitost metoda i pouzdanost rezultata. Najveći broj metoda određivanja pesticida temelji se na kromatografskim tehnikama. Zahvaljujući najsuvremenijim analitičkim tehnikama koje se temelje na višestrukoj spektrometriji masa vezanoj na tekućinsku i plinsku kromatografiju (LC-MS/MS i GC-MS/MS), u laboratorijima se multirezidualnim metodama kvantitativno određuje i više stotina pesticida različitih kemijskih skupina (organofosforni, organoklorni, triazinski, strobilurinski, nikotinski, karbamati, avermektini i dr.) i različite namjene (insekticidi, fungicidi, akaricidi, herbicidi, limacidi, itd.).

Određivanje pesticida i njihova stalna kontrola je veoma važna jer se pesticidi razlikuju po kemijskoj strukturi, načinu djelovanja, biotransformaciji, načinu eliminacije iz organizma kao i po različitom stupnju toksičnosti. Prema podacima koji su objavljeni od strane epidemioloških studija, utjecaj dugotrajne izloženosti ostatcima pesticida dovodi do pojave malignih oboljenja, alergija i oštećenja brojnih vitalnih organa. Da mehanizam djelovanja pesticida na ljudsko zdravlje još uvijek nije sasvim razjašnjen najbolje potvrđuje činjenica da se dopuštena maksimalna razina ostataka pesticida razlikuje u propisima pojedinih zemalja. Iz navedenih razloga postoji stalna potreba za razvojem novih, osjetljivih analitičkih metoda za kvantitativno praćenje i određivanje pesticida u biološkom materijalu i hrani.

Cilj ovoga rada bio je optimirati ultrazvučnu ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja trputca promjenom izbora otapala i/ili smjese otapala, brojem ciklusa ponavljanja i temperature. Nakon što su određeni optimalni uvjeti koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije navedene smjese pesticida, procijenjena je validacija metode parametrima linearnosti, granicama detekcije (GD) i kvantifikacije (GK), preciznosti i obnovljivosti te utjecajem matice uzorka. Na kraju je optimirana i validirana metoda UAE-GC-MS primijenjena na trinaest različitih uzoraka čaja koji se međusobno razlikuju prema porijeklu i sastavu



## **2. OPĆI DIO**

### **2.1. Pesticidi [4]**

Sredstva za zaštitu bilja posebno su formulirani kemijski spojevi koji služe za zaštitu biljke od štetočina u koje se ubrajaju štetnici, uzročnici bolesti i korovi. U ova sredstva ubrajaju se i regulatori rasta, biološki pripravci i neki drugi slični proizvodi za tretiranje biljaka koji ne služe za ishranu biljke. Sredstva za zaštitu bilja sadrže određeni postotak aktivne (djelotvorne) tvari, te druge potrebne dodatke poput otapala, emulgatora, okvašivača i dr. Sredstva za zaštitu bilja često se nazivaju i pesticidima, iako je taj pojam širi. Dakle, pesticidima smatramo sredstva za zaštitu bilja, ali i veterinarske pripravke za suzbijanje nametnika na životinjama, te ona sredstva za sanitarnu higijenu i sredstva opće uporabe koje služe suzbijanju nametnika na ljudima kao i suzbijanje gamadi [1].

Organizacija za hranu i agronomiju pri Ujedinjenim narodima (FAO) definirala je pesticide kao tvar ili smjesu više tvari koje se upotrebljavaju u svrhu prevencije najezde, uništavanja ili suzbijanja bilo koje vrste štetočina (vektori u prijenosu bolesti ljudi i životinja, nepoželjne vrste biljaka i životinja koje stvaraju gubitke u procesu proizvodnje, obrade, skladištenja, prijevoza ili stavljanja hrane na tržište, poljoprivrednih proizvoda, drveta, drvnih prerađevina te hrane za životinje) te suzbijanja štetočina koje parazitiraju u tijelu životinja ili na njihovom tijelu [2]. Iako je uporaba jednostavnih kemijskih spojeva, dostupnih iz okoliša, u svrhu zaštite usjeva i uskladištenih ili prerađenih plodova i namirnica poznata još iz davnina, druga polovica 19. stoljeća smatra se početkom razdoblja, tzv. znanstveno potkrijepljene uporabe pesticida. Ono je kulminiralo 40-ih godina 20. stoljeća otkrićem Paula Müllera da novosintetizirani spoj DDT ima insekticidno djelovanje te početkom njegove masovne proizvodnje i primjene u II. Svjetskom ratu. Od 90-ih godina prošlog stoljeća, umjesto na traženje novih kemijskih skupina spojeva, razvoj pesticidnih pripravaka usmjerava se prema modificiranju postojećih aktivnih tvari u svrhu povećanja njihove selektivnosti i time smanjenja opterećenja okoliša i rizika za zdravlje čovjeka [3].

Prema porijeklu pesticidi mogu biti neorganske tvari kao i tvari iz biljaka, bakterija i gljiva. Mogu biti i organske sintetske tvari kao što su organoklorirani i organofosforni spojevi, triazini, derivati fenoksi-ugljične kiseline, sintetički piretroidi, itd. Najčešće sadrže toksične elemente kao što je živa, arsen, fosfor i drugi. Neki među njima su i kancerogeni nakon

dužeg konzumiranja s hranom. Značajniji pesticidi su *insekticidi* (sredstva za uništavanje insekata, parazita, muha, krpelja...), *rodenticidi* (sredstva za uništavanje glodavaca), *herbicidi* (sredstva za zaštitu od korova), *fungicidi* i drugi.

**Insekticidi.** To je velika skupina kemijskih sredstava namijenjena za zaštitu usjeva od insekata. Njihova upotreba je promovirana korištenjem DDT-a tokom II. Svjetskog rata. Poslije DDT-a dolazili su sve jači insekticidi (lindan, dieldrin, karbamati, piretroidi) tako da se postavlja pitanje tko se brže prilagođava otrovima – insekti ili ljudi. Insekticidi brzo prodiru u lanac prehrane (masti i ulja) i tamo se dugo zadržavaju. Kod izbora primjene insekticida u prehrambenoj industriji mora se voditi računa o toksičnosti, karenci i stručnoj primjeni, kako ne bi došlo do neželjenih trovanja ljudi kontaminiranim namirnicama koje su bile tretirane ili se nalaze u tretiranom objektu.

Organoklorni insekticidi su DDT, aldrin, klordan, lindan (gama izomer heksaklorcikloheksana), endosulfan i drugi. Zabranjena je upotreba mnogih spojeva ove skupine (DDT, dieldrin, klordan) nakon što je ustanovljeno da su izuzetno stabilni i lipofilni te se nakupljaju u životinjskom masnom tkivu. Uočeno je neurotoksično djelovanje organoklornih insekticida (remete funkciju natrijevih i kloridnih kanala) te remećenje endokrine ravnoteže (uglavnom estrogenskim djelovanjem). S druge strane, glavni metabolit DDT-a, DDE (diklordifenildikloreten) je snažan antagonist androgenskih receptora. Kod životinja izaziva feminizaciju mužjaka ako je prisutan za vrijeme sazrijevanja. DDT se veže i za receptore i transportne proteine tiroidnih hormona. Utvrđeno je i kancerogeno djelovanje nekih organoklornih insekticida (DDT, dieldrin, klordan). Od ove skupine još se često koriste oni koji su razgradljiviji u okolišu te znatno manje toksični (npr., lindan i endosulfan).

**Organofosfatni insekticidi.** To je trenutno najraširenija skupina insekticida. Brzo se metaboliziraju i izlučuju iz organizma, bez nakupljanja. Uslijed nakupljanja u organizmu dolazi do produžene stimulacije parasimpatičkog živčanog sustava, tj. usporavanja pulsa i ritma disanja, paralize mišića, probavne smetnje.

**Karbamatni insekticidi** su analozi biljnog toksičnog alkaloida fizostigmina (karbaril, aldikarb, karbofuran), neurotoksični su, a neki su i kancerogeni za pokusne životinje.

**Piretrum i sintetski piretroidi** su insekticidi vrlo niske toksičnosti za sisavce. Neurotoksični su u visokim dozama i remete funkciju natrijevih kanala.

**Rodenticidi.** To su kemijska sredstva koja se koriste za deratizaciju, tj. uništavanje glodavaca. Pored toga što djeluju kao otrovi na glodavce, to su i otrovi za sve toplokrvne životinje i čovjeka. Zbog toga primjena ovih sredstava mora biti kontrolirana, kako ne bi došlo do trovanja hranom koja je kontaminirana rodenticidima.

**Herbicidi.** To su kemijska sredstva koja se koriste u zaštiti usjeva od korovnih biljaka. Vrlo su toksična, a često i kancerogena. Herbicidi se koriste u primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji, ali njihovi ostaci ulaze u prehrambeni lanac i djeluju dugoročno – štetno. Na sreću, najveći njihov dio uništava se u toku pripreme hrane (kuhanjem, pečenjem i sl.). Toksikološki značajni herbicidi su: ariloksifenoksiopionati (neki su peroksisomni proliferatori, npr. haloksifop), triazini (neki su kancerogeni (atrazin, cijanazin) i teratogeni (cijanazin) za životinje), supstituirane uree (npr. kancerogeni diuron i linuron), difenil eteri (npr. kancerogeni laktofen), tiadiazoli (npr. kancerogeni flutiacet metil), triazoli (npr. kancerogeni amitrol), izoksazoli (npr. kancerogeni, neurotoksini i razvojno toksični izoksaflutol).

**Fungicidi.** To su kemijska sredstva koja se koriste protiv razvijanja plijesni i gljivica na sirovinama i gotovim proizvodima da bi se spriječilo kvarenje. Koriste se u velikim količinama i predstavljaju problem jer su vrlo toksični, a neki među njima i kancerogeni. Primjer je etilentiouree ili skraćeno ETU, koji je vrlo efikasan, ali i kancerogen. Zbog toga je skinut s liste dopuštenih pesticida. Naročito su opasni organo živini spojevi koji sadrže metil-živu, a koristili su se i u zaštiti sjemena.

Najznačajniji fungicidi, s obzirom na opseg korištenja i toksičnost, su dikarboksimid, ditiokarbamati (endokrini disruptori), etilenbisditiokarbamati, organometalni fungicidi (kancerogeni trifenilfosfit), ftalimidi (npr. kancerogeni kaptan) i supstituirani benzeni (npr. kancerogeni klortalonil).

## **2.2. Pesticidi u okolišu**

Pesticidi se šire u okolišu uglavnom vodenim putem. Ispiranjem s poljoprivrednih površina dospijevaju u površinske, ali i u podzemne vode. Najveći problem predstavljaju pesticidi koji se ne razgrađuju brzo u okolišu, hlapivi su ili topljivi u masti, a posljedica je njihova biološka koncentracija i translokacija koja podrazumijeva isparavanje i nošenje

zračnim putem daleko od mjesta izvora. Kod adsorpcije na tlu moguće je i premještanje u obliku prašine i slično. Zadržavanje pesticida u vodi ili tlu ovisi o vrsti tla, količini vlage, temperaturi, pH, prisutnoj mikroflori, razgradivosti pesticida i drugo [4].

U hrani se pesticidi pojavljuju u obliku ostataka. Porijeklo ostataka pesticida u hrani može biti neposredno od tretiranja ili posredno iz okoliša. Tako posredno pesticidi mogu dospjeti putem vodotoka s tretiranih usjeva u rijeke, ali i hranom kojom se hrane domaće životinje. Ukoliko je upotreba pesticida u proizvodnji hrane nekontrolirana, posljedice mogu biti katastrofalne po zdravlje ljudi. Zbog toga se nastoji da upotreba pesticida bude pod kontrolom uz osiguranje integralne proizvodnje i monitoringa njihove pravilne primjene. Putem lanca ishrane pesticidi se prenose i na životinje koje čovjek koristi za dobivanje hrane. Zbog toga praćenje prisustva pesticida postaje obavezno kako u namirnicama biljnog tako i u namirnicama životinjskog porijekla [5, 6].

Utvrđeno je da se koncentracija mnogih pesticida smanjuje nakon toplinske i drugih načina obrade hrane. Kod voća i povrća većina pesticida zadržava se na površini pa su se ljuštenje i guljenje pokazali vrlo učinkovitim procesima, za razliku od pranja, dok kod mesa i ribe kuhanje i prženje uz istovremeno uklanjanje masnog tkiva može znatno smanjiti udio pesticida ovisno o vrsti, razini i temperaturi. U trgovačkim preparatima pesticidi se često miješaju s tzv. „inertnim“ sastojcima, koji su inertni samo po tome što nemaju pesticidnog djelovanja. Riječ je o otapalima, površinski aktivnim tvarima, nosačima, antioksidansima koji također mogu imati toksično djelovanje [4].

Zagađenje okoliša i onečišćenje vode i hrane uzrokovano ekstenzivnom uporabom pesticida još uvijek je prvenstveni problem, što je potaknulo donošenje strogih propisa i razvoja vrlo osjetljivih analitičkih metoda. Direktivom 98/83 Europske komisije propisuje se koncentracija pojedinih pesticida na 0,1 µg/L, a ukupna koncentracija svih pesticida u uzorcima vode na 0,5 µg/L. Budući da se pesticidi izabiru temeljem svoje sposobnosti ubijanja živih bića (biljaka, kukaca, životinja), ne čudi da mogu naštetiti i ljudima, živome svijetu i općenito okolišu. Njihovo djelovanje povezuje se s brojnim mogućim zdravstvenim problemima, od raka do neplodnosti, a neki od njih su identificirani kao vjerojatni uzročnici hormonskih poremećaja u čovjeku. Ove endokrino aktivne tvari mogu utjecati na ponašanje, razvoj mozga i spolnih organa. Njihov utjecaj povezuje se i sa smanjenjem broja spermija i ranijim ulaskom djevojčica u pubertet [7].

### 2.3. Čaj

Prije svega, treba razlikovati čaj od biljne infuzije. Čaj je napitak koji se dobiva namakanjem listova biljke čajevca (*Camellia sinensis*) u vrućoj vodi, dok je biljna infuzija napitak koji se sprema na isti način, ali se dobiva iz neke druge biljke. Čaj je podrijetlom iz Kine, koja je i danas glavni svjetski proizvođač. Tri su osnovna tipa čaja kojeg klasificiramo prema načinu proizvodnje, tj. razini fermentacije listova: nefermentirani (zeleni), polufermentirani (oolong, bijeli, žuti) i fermentirani (crni, crveni). Crni je u svijetu najrašireniji, a slijede ga zeleni i oolong čaj. Činjenica da je zeleni čaj jedini proizveden bez prethodne fermentacije čini ga vrijednijim od ostalih vrsta jer sadrži više biološki aktivnih komponenti čija se aktivnost smanjuje oksidacijom, odnosno fermentacijom.

Još od davnina poznata je uloga zelenog čaja u zdravlju ljudi. U tradicionalnoj kineskoj medicini koristio se kod raznih stanja i bolesti, od glavobolje, bolova u tijelu, problema s probavom, depresije, a smatralo se i da produžuje život. Danas je poznato da pozitivni učinci na zdravlje proizlaze iz sadržaja tri glavne komponente: kofeina (i teofilina), esencijalnih ulja te polifenolnih spojeva. Od ova tri, najjači je i najbolje istražen utjecaj polifenolnih spojeva, osobito katehina (epigalokatehin galat- EGCG) [8].

Uzgoj čaja osjetljiv je prema mnogim štetnicima, a korov i bolesti također zadaju probleme. Kako bi se smanjili, najčešća praksa u proizvodnji usjeva čaja je korištenje pesticida. Međutim, opasni ostatci pesticida u čaju su povezani s neurološkim disfunkcijama i bolestima. Sukladno tome, određivanje ostataka pesticida je na čelu preventivnih mjera zaštite javnog zdravlja [9]. Plinska kromatografija pokazala se dobrim izborom u analizi pesticida u prehrambenim proizvodima, ali mnogi pesticidi koji su termički nestabilni ili nehlapljivi poput karbamata i benzimidazola teško se analiziraju [10].

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je izjavila u godišnjem izvješću za 2008. godinu da su potrebne svestrane i pouzdane metode ekstrakcije za analizu čajeva i bilja, jer su obje spomenute vrste sadržavale više od 5 pesticida po uzorku. Osim toga, ove matice su imale najveće prekoračenje vrijednosti maksimalno dopuštenih ostataka pesticida od strane Europske Unije (16% za bilje i 9% za čaj). Analiza pesticida u čaju i drugim suhim tvarima predstavlja izazov zbog visokog sadržaja koekstrahiranih tvari. Ove tvari sadrže širok spektar spojeva koji mogu ometati analizu. Između ostalog, čaj lišća sadrži šećere, pigmente, polifenole i alkaloida [11, 12]. Razvoj selektivnih metoda ekstrakcije koje osiguravaju dobru

ponovljivost rezultata te uklanjaju što je moguće više komponenti matrice predstavljaju velik izazov. Minimiziranje koekstrahiranih tvari je važno jer neželjeni spojevi prisutni u ekstraktima dovode do ozbiljnih poteškoća u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, do utjecaja matrice te mogu uzrokovati probleme s iskorištenjem primjenom LC-MS i GC-MS instrumenata. Jedan od mogućih načina smanjenja navedenih problema je razrjeđenje uzorka [13].

Autori su razvili i validirali mnogo različitih metoda za pripremu uzorka. Neka od primjenjenih otapala za ekstrakciju su acetonitril, etil acetat, cikloheksan te smjesa etil acetata i cikloheksana [14].

## **2.4. Priprema čvrstog uzorka [7]**

Moderne metode pripreve uzorka uglavnom se zasnivaju na ekstrakciji. Mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit te na one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugoga otapala. Sve ekstrakcijske metode koriste se principom selektivnog koncentriranja analita u jednoj fazi, a njihova selektivnost postiže se promjenom radnih uvjeta. Analit se pritom raspodjeljuje između dviju faza u skladu s konstantom raspodjele, temperaturom i relativnim obujmom faza. Ekstrakcijske se metode pripreve uzorka mogu podijeliti i prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita pa govorimo o ekstrakciji tekuće-tekuće, ekstrakciji čvrsto-tekuće ili ekstrakciji plinovito-tekuće. Izbor metode pripreve uzorka ovisi o njegovu agregacijskom stanju.

Ekstrakcija organskih sastojaka iz čvrstih uzoraka je proces u kojemu se tvar desorbira iz matrice uzorka i otapa u prikladnom otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o tri međuovisna čimbenika: topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka. Matica uzorka ima velik utjecaj na ekstrakciju analita i može znatno utjecati na djelotvornost. Kad je riječ o analizi bioloških uzoraka, priprema uzorka je prilično složena jer je uzorak onečišćen masnoćom i proteinima. Klasičnim metodama, poput Soxhleta, ekstrahiraju se i spomenute nečistoće što dodatno pridonosi lošoj djelotvornosti. Stoga je nužno uzorak prethodno odmastiti ili primjeniti metodu raspršenja matrice uzorka kroz čvrstu fazu koja u jednom koraku provodi ekstrakciju, koncentriranje i pročišćavanje dobivenoga ekstrakta. U usporedbi s takvim uzorcima, ekstrakcija uzoraka tla i sedimenta prilično je jednostavna.

Topljivost analita ovisi o vrsti otapala te temperaturi i tlaku prilikom prijenosa analita iz uzorka u otapalo. To uključuje prodiranje otapala u maticu uzorka i uklanjanje analita s adsorbirane površine, što ovisi o koeficijentu difuzije, veličini čestica uzorka i strukturi matice. Prijenosu analita pogoduje visoka temperatura i tlak, niska viskoznost otapala i mala veličina čestica.

Izbor otapala ovisan je o prirodi analita i matice uzorka. Ni jedno čisto otapalo nije univerzalno za sve analite, pa je ponekad potrebno koristiti se smjesom vode i organskih otapala.

Ekstrakcijske metode se mogu razvrstati prema temperaturi i tlaku koji imaju važnu ulogu u kinetici ekstrakcije. Klasične metode uključuju Soxhlet ekstrakciju, automatiziranu Soxhlet ekstrakciju i ultrazvučnu ekstrakciju. Postupak se provodi pri atmosferskom tlaku, uz grijanje ili djelovanje ultrazvuka pri čemu se troše velike količine organskih otapala, a ekstrakcija je dugotrajna. Drugu skupinu čine ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima, ekstrakcija pregrijanom vodom, tlačna ekstrakcija otapalom te mikrovalna ekstrakcija otapalom koje se provode pri povišenom tlaku ili temperaturi. One su brže, djelotvornije, troše manje organskih otapala pa manje zagađuju okoliš.

Većina ekstrakcijskih metoda bolje se provodi na suhome uzorku manjih čestica pa se preporučuje sušenje uzorka i usitnjavanje do finoga praha. Iznimka su uzorci koji sadržavaju hlapljive analite i oni opasni po zdravlje, u takvima se slučajevima uzorak mora sušiti miješanjem s anhidridom natrijeva sulfata ili dijatomejskom zemljom. Neke metode stvaraju velik obujam ekstrakta koji se mora reducirati da bi se postigla dovoljno visoka koncentracija analita za mjerenje određenom metodom. Ekstrakti tla, mulja i otpada obično zahtijevaju prethodno pročišćavanje kako bi se uklonili sastojci koji mogu uzrokovati sustavnu pogrešku određivanja, onečišćenje i uništenje opreme te pogoršanje kromatografskoga razlučivanja. Kao metoda pročišćavanja obično se rabi ekstrakcija čvrstom fazom.

### **2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija**

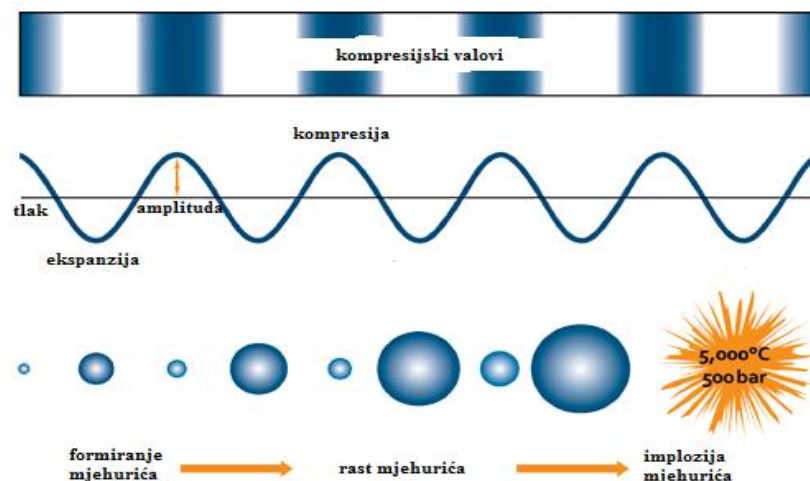
Već dugi niz godina, u prehrambenoj industriji široka je primjena ultrazvuka u tekućem i čvrstom mediju te raste sve veći interes za njegovu primjenu u postupcima obrade uzoraka. Ova tehnika učinkovit je alat za široke komercijalne primjene (npr., emulgiranje, homogenizacija, ekstrakcija, kristalizacija...). Mnogo je pozornosti posvećeno primjeni ultrazvuka u ekstrakciji prirodnih tvari za koju su uobičajeno konvencionalnim metodama potrebni sati ili dani. Klasične tehnike korištene u prehrambenoj industriji za ekstrakciju otapalom bioaktivnih spojeva temelje se na pravilnom odabiru otapala u kombinaciji s korištenjem topline i/ili miješanja. Ekstrakcija otapalom organskih spojeva iz biljaka i sjemenki znatno je poboljšana primjenom snage ultrazvuka [15]. Mehanički učinci ultrazvuka pružaju veću penetraciju otapala u stanične dijelove i poboljšavaju prijenos mase zbog efekta mikrostrujanja. Ovo daje dodatnu prednost primjeni ultrazvuka u ekstrakcijskim procesima - narušava se stijenka bioloških stanica čime se oslobađa sadržaj stanice. Sve u svemu, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE) prepoznata je kao učinkovita ekstrakcijska tehnika koja dramatično smanjuje vrijeme trajanja, povećava iskorištenje i često kvalitetu ekstrakta [16]. Nekoliko studija dalo je pregled različite industrijske primjene ultrazvuka u pojačavanju ekstrakcije bioaktivnih tvari iz bilja, ulja sjemenki i proteina iz soje. Tako su u posljednjih nekoliko godina ekstrahirani brojni spojevi UAE-om iz nekoliko matica, s posebnim naglaskom na komercijalnu proizvodnju bioaktivnih spojeva u prehrambenoj industriji.

UAE također postupno postaje stvar rutinske prakse u analitičkoj kemiji, koja koristi tu energiju za razne namjene vezane uz postupke pripreme uzorka, uglavnom za uzorkovanje. Trenutno svaki osvrt vezan za napretke u pripremi uzorka uključuje poglavlje posvećeno UAE. Više od 80% vremena analize i dalje se troši na uzorkovanje i pripremu uzorka te UAE može ubrzati mnoge postupke kojima su uzorkovanje i priprema uzorka neizostavni koraci u procesu [15].



### 2.4.1.1. Utjecaji ultrazvuka

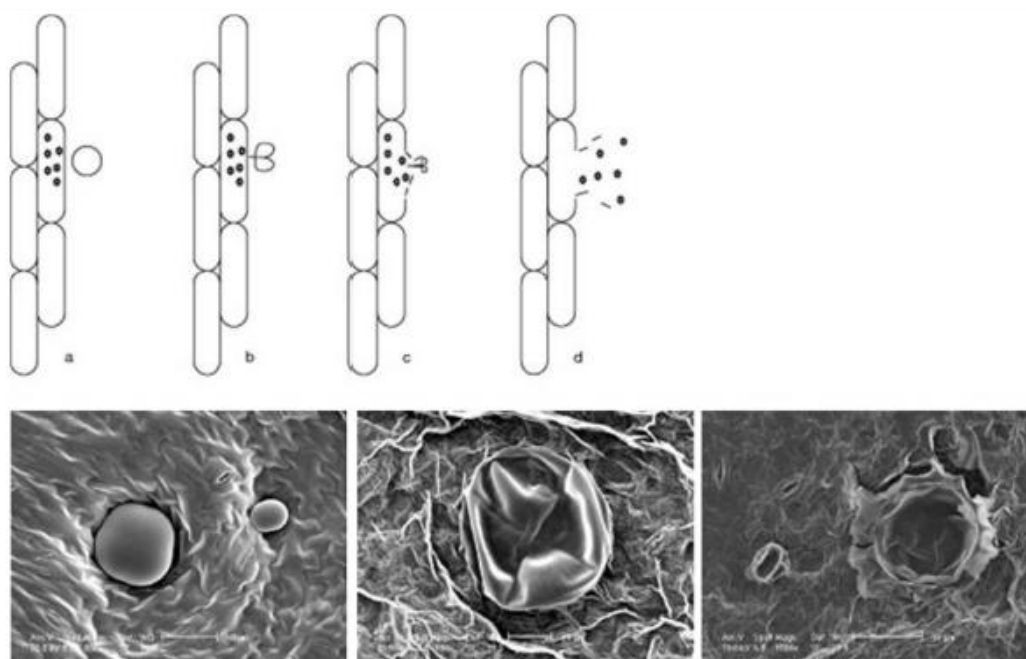
Tijekom procesa sonikacije, longitudinalni valovi nastaju kada se zvučni val susretne s molekulama tekućeg medija pri čemu se stvaraju područja izmjeničnih ciklusa kompresije i ekspanzije valova izazvanim molekulama medija (Slika 2.1).



**Slika 2.1.** Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića [17]

U tim područjima promjene tlaka, javlja se kavitacija i formiraju se mjehurići plina. Ovi mjehurići imaju veću površinu u ciklusu ekspanzije, što povećava difuziju plina uzrokujući eksploziju balona. Kritična točka dostiže se tijekom ciklusa kompresije u kojem ultrazvučna energija nije dovoljna da zadrži plinovitu fazu u balonu. Kao posljedica toga, javlja se brza kondenzacija i oslobađa se velika količina energije. Kondenzirane molekule sudaraju se burno, stvarajući „šok“ valove. Ti „šok“ valovi stvaraju područja vrlo visoke temperature i tlaka, te dosežu i do 5500°C i 50 MPa. Kavitacija dovodi do mikrostrujanja što povećava prijenos mase i topline. To stvara „vruće točke“ koje mogu dramatično ubrzati kemijsku reakciju u mediju. Kada se ovi mjehurići uruše na površini čvrstog materijala, visoka temperatura i tlak oslobađaju generirane mikromlaznice usmjerene prema površini. Ove mikromlaznice odgovorne su za odmašćivanje metalnih površina djelovanjem ultrazvuka što

se naširoko koristi za čišćenje materijala. Druga primjena mikrostrujnica u prehrambenoj industriji je ekstrakcija biljnih spojeva jer omogućuju poboljšano prodiranje otapala u tijelo biljke i također omogućuje razgradnju stanične stijenke. Kao što je prikazano na Slici 2.2, kavitacijski mjehurić može bit generiran u neposrednoj blizini površine materijala (a), zatim tijekom ciklusa kompresije mjehurić se urušava (b) te se stvaraju mikrostrujnice usmjerene prema površini čvrstog materijala (b i c). Visoki tlak i temperatura koje su uključene u ovom procesu uništavaju stanične stijenke stanica čvrstog materijala čiji se sadržaj oslobađa u medij (d).



**Slika 2.2.** Kavitacijski efekti na površini čvrsto-tekuće [18]

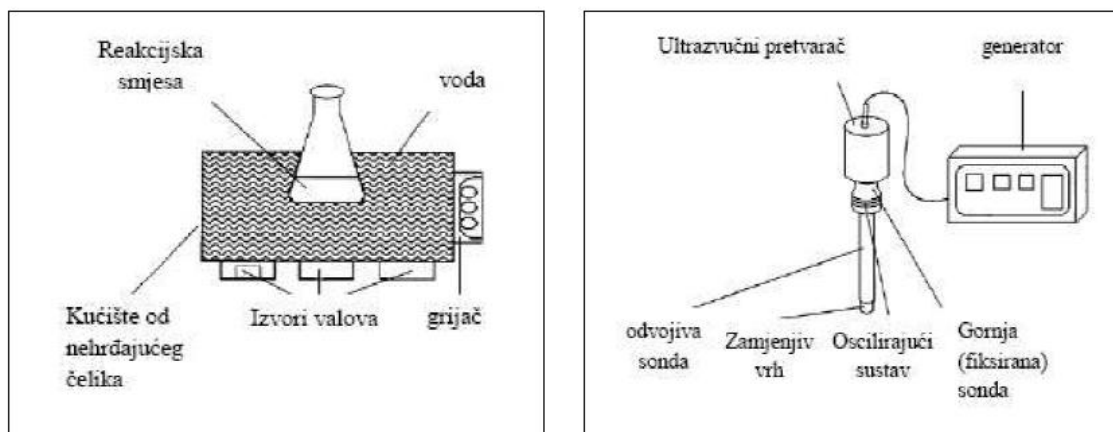
To je vrlo zanimljiv alat za ekstrakciju spojeva iz prirodnih tvari. Primjena UAE ima prednost u povećanju prijenosa tvari, boljem prodiru otapala, manjoj ovisnosti upotrebe otapala (izbora otapala), primjeni nižih temperatura, bržoj ekstrakciji i većem iskorištenju [15].

Sposobnost ultrazvuka da uzrokuje kavitaciju ovisi o karakteristikama ultrazvuka (npr., frekvencija i intenzitet), svojstvima uzorka (npr., viskoznost, napetost površine) te uvjetima okoline (npr., temperatura i tlak). Ova tehnika zahtijeva tekući medij, generator energije i pretvornik koji pretvara električnu, magnetsku ili kinetičku energiju u akustičnu [19].

### 2.4.1.2. Komercijalni uređaji ultrazvuka

U analitičkoj kemiji ultrazvuk se može primjeniti na dva načina: izravno na uzorku ili neizravno preko stijenke posude uzorka pomoću vodene kupelji, što je najviše dostupan i najjeftiniji izvor ultrazvučnog zračenja. Međutim, postoje i mnoga druga učinkovita rješenja, na primjer rogovi (neposredno ili posredno) ili ultrazvučne sonde (izravno na uzorku) koja omogućuju oslobađanje veće snage ultrazvuka.

Ultrazvučna kupka koja se obično nalazi u kemijskim laboratorijima, a koja emitira zvučne valove visoke energije i frekvencije u posudi ispunjenoj fluidom (najčešće vodom), nije moćan alat. Snaga zračenja je  $1-5 \text{ W/cm}^2$  [20]. Klasična kupka radi sa samo jednom frekvencijom, uglavnom 40 kHz i može biti opskrbljena temperaturnim regulatorom. Postoje i kupke opremljene s jedinicima različitih frekvencija koje rade istovremeno. Ultrazvučna sonda je uronjena izravno u otopinu i daje snagu ultrazvuka barem do 100 puta veću od one koju bi dobili kupkom pri trajanju od 5 minuta ili manje. Sonda je moćan alat za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka otapalom, ali može pokazati i suprotno svojstvo. Treba naglasiti da kontrola amplitude zračenja sonde omogućuje ultrazvučne vibracije na vrhu sonde i može se postaviti na bilo koju željenu razinu [15].



**Slika 2.3.** Shematski prikaz uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju: a) Ultrazvučna kupelj; b) Ultrazvučna sonda [21]

Izbor pristupa ovisi o zahtjevima pojedine analize. Ako je cilj ukupna ekstrakcija čvrsto-tekuće, bolji izbor je primjena snažne sonde jer zahtijeva manje vremena za ekstrakciju. Međutim, kada se treba analizirati velik broj uzoraka, kupka je bolji izbor jer omogućuje istovremenu ekstrakciju niza uzoraka, dok drugi uređaji u isto vrijeme mogu obraditi samo jedan uzorak [22].

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra se dobrim izborom za ekstrakciju organskih spojeva iz različitih matica jer pruža učinkovitiji kontakt između čvrstog uzorka i otapala zbog povećanog tlaka (potiče penetraciju otapala i transport) i temperature (poboljšava topljivost i difuziju).

Nekoliko se ekstrakcija može izvoditi istovremeno i nije potrebna specijalizirana laboratorijska oprema, a tehnika je relativno jeftina u odnosu na većinu modernih metoda ekstrakcije. Nekoliko komponenti hrane (arome, pigmenti, antioksidansi i drugi organski i mineralni spojevi), aditivi te zagađivači okoliša ekstrahirani su i učinkovito analizirani iz različitih matica (uglavnom životinjska tkiva, hrana, biljni materijal, voda, tlo i sediment). Širok raspon otapala i otopina može se koristiti, a prikupljanje otapala je lako. Međutim, ekstrakcija je još uvijek dugotrajna i potrebna je velika količina organskog otapala. Zbog svojih karakteristika, UAE se može koristiti za predobradu uzoraka za mnogo sofisticiranije ekstrakcijske metode [15].

## **2.5. Validacija analitičkih metoda [15]**

Svrha analize je dati pouzdanu informaciju o prirodi i sastavu materijala. U svako mjerenje uključena je mjerna nesigurnost, a namjena je programa osiguravanja kvalitete svesti te pogreške na prihvatljiv minimum što se, između ostalog, postiže validacijom uz prethodnu optimizaciju mjernog postupka. Validaciju analitičkih metoda možemo definirati kao postupak kojim se osiguravaju točni, precizni i ponovljivi rezultati tijekom dugoročnoga korištenja metode. Također, validacijom se mogu utvrditi uzroci mogućih problema tijekom izvođenja metode, čime se postiže veliki stupanj pouzdanosti i pogodnosti metode.

Ona uzima u obzir sve čimbenike koji utječu na rezultat koje laboratorij mora proučiti te ukloniti ili barem smanjiti učinak značajnih čimbenika i kasnije uspostaviti sustav nadzora. Osnovni validacijski parametri ili izvedbene značajke koje se provode tijekom validacije

analitičke metode su selektivnost, točnost, preciznost, stabilnost analita i standardnih otopina, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, radno područje i otpornost metode.

### **2.5.1. Osnovni parametri validacije**

#### *Selektivnost metode*

Selektivnost, odnosno specifičnost metode, pri čemu se pod specifičnošću misli na mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzorka, a pod selektivnošću sposobnost određivanja skupine sličnih sastojaka uzorka. Pri instrumentalnom određivanju specifična metoda daje signal koji odgovara samo odzivu analita, a selektivna je ona metoda kojom različiti sastojci smjese daju zasebne signale i međusobno ne utječu na rezultat.

#### *Točnost metode*

To je razlika odnosno stupanj podudaranja između mjerene i prave vrijednosti uzrokovana uglavnom sustavnom pogreškom. Određuje se na minimalno tri koncentracijske točke unutar radnog područja.

#### *Preciznost metode*

Preciznost metode definiramo kao izraz slaganja između niza mjerenja provedenih iz istog homogenog uzorka prema propisanom analitičkom propisu. Uključuje dva pojma: ponovljivost rezultata koji su dobiveni istom metodom, istim uzorkom i u istim uvjetima te obnovljivost kad je riječ o istoj metodi i uzorku, ali su promijenjeni uvjeti izvedbe (mjesto, vrijeme, analitičar). Ako se postupak ponovi nekoliko puta unutar istog dana, tada govorimo o dnevnoj preciznosti ili preciznosti unutar dana, odnosno ako se postupak ponavlja nekoliko dana uzastopno tada govorimo o međudnevnoj preciznosti. Granice prihvatljivosti se definiraju ovisno o vrsti analize, prirodi uzorka te koncentraciji analita u mjernoj otopini.

#### *Linearnost metode*

Linearnost metode je mogućnost metode da se unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita, što se određuje umjernim postupkom.

*Stabilnost analita i standardnih otopina*

To je vremenski period unutar kojeg su otopine stabilne, odnosno unutar kojeg se dobivaju isti mjerni rezultati.

*Granica detekcije*

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati.

*Granica kvantifikacije*

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost.

*Radno područje*

To je interval unutar kojeg analitički postupak ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost. Za definiranje radnog područja metode koriste se podaci dobiveni kod određivanja linearnosti, točnosti i preciznosti metode.

*Otpornost metode*

Ovaj parametar označava otpornost analitičkog postupka na male i namjerne promjene parametara metode. Mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Ako je utjecaj promjene parametra metode unutar specifikacije metode, kaže se da je parametar u području otpornosti metode.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Čaj

Uzorak čaja trputca korišten je za određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije, validaciju ukupne metode te utjecaj matice uzorka. Čuvan je u plastičnoj vrećici na suhom i zatamnjenom prostoru pri sobnoj temperaturi.

Razvijena i validirana metoda je primijenjena na trinaest različitih uzoraka čaja, a to su: preslica (PRES), list breze (LB), list maline (LM), maćuhica (M1, M2), djetelina (D1, D2, D3, D4), crvena djetelina (DC1, DC2), maslačak (MAS) te priljepača (PRI). Maćuhica, djetelina i crvena djetelina uzorkovane su iz različitih šarži. Svi uzorci čuvani su u plastičnim vrećicama pri uvjetima kojih se preporučuje pridržavati prilikom analize.

##### 3.1.2. Kemikalije

Sva otapala korištena u ovom radu navedena su u Tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Popis korištenih kemikalija

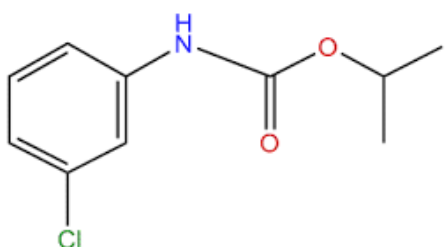
	<b>Naziv kemikalije</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
1.	Aceton (ACO)	<i>p.a.</i>	Gram–mol, Zagreb
2.	Acetonitril (ACN)	HPLC grade	Fisher Chemical, SAD
3.	Dietil eter (DEE)	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
4.	Diklormetan (DKM)	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
5.	Etanol (EtOH)	<i>p.a.</i>	Kefo, Ljubljana
6.	Etil–acetat (EA)	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
7.	Metanol (MeOH)	(Ultra)Gradient HPLC Grade	J. T. Baker, Nizozemska
8.	n-heksan (HEX)	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich
9.	Petroleter (PE)	<i>p.a.</i>	Gram–mol, Zagreb
10.	Toluen (T)	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
11.	2–propanol (2-PrOH)	HPLC grade	Kemika, Zagreb

### 3.1.3. Pesticidi

#### 3.1.3.1. Klorprofam [24]

Klorprofam je rezidualni herbicid i sredstvo za suzbijanje mladice krumpira koji ima odobrenje Europske Unije za uporabu. Umjereno je topljiv u vodi, slabo hlapljiv i umjereno mobilan. Nije otporan u tlu, ali može biti otporan u vodenim sustavima. Klorprofam ima nisku toksičnost kod sisavaca, ali se može bioakumulirati te je prepoznat kao nadražujuće sredstvo. Umjereno je toksičan za ptice, pčele i većinu vodenih organizama. Njegova fizikalno-kemijska svojstva navedena su u Tablici 3.2.

**Tablica 3.2.** Fizikalno-kemijska svojstva klorprofama

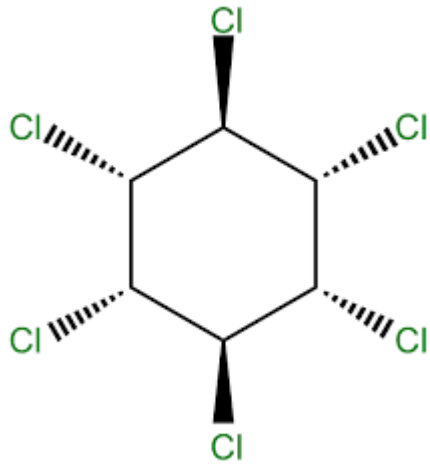
<b>Generičko ime</b>	klorprofam
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	izopropil 3-klorokarbanilat
<b>CAS broj</b>	101-21-3
<b>Kemijska formula</b>	$C_{10}H_{12}ClNO_2$
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	213,66
<b>Agregatno stanje</b>	bijelosmeđi kristal
<b>Temperatura tališta, °C</b>	42
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	150
<b><math>\log K_{ov}</math> (pH=7, 20°C) [25]</b>	3,30
<b><math>\log K_{oc}</math> [25]</b>	2,76
<b>Tip pesticida</b>	herbicid, regulator rasta biljke
<b>Podgrupa</b>	karbamat
<b>Podrijetlo</b>	sintetski



### 3.1.3.2. Lindan [24]

Lindan se uglavnom sastoji od  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -izomera. Ta smjesa ima izvanredna insekticidna svojstva, iako je biološki aktivan samo  $\gamma$ -izomer; rabi se u zaštiti bilja. U Tablici 3.3 navedena su fizikalno-kemijska svojstva lindana.

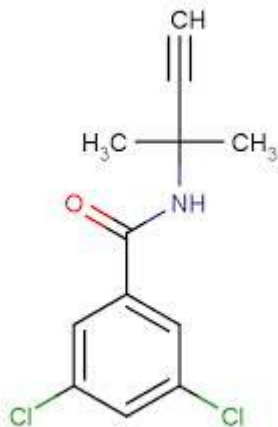
**Tablica 3.3.** Fizikalno-kemijska svojstva lindana

<b>Generičko ime</b>	$\delta$ -lindan
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -heksaklorcikloheksan
<b>CAS broj</b>	58-89-9
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	290,82
<b>Agregatno stanje</b>	bezbojni kristal
<b>Temperatura tališta, °C</b>	112,9
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	200
<b>logK<sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	4,26
<b>logK<sub>oc</sub> [25]</b>	3,59
<b>Tip pesticida</b>	insekticid, akaricid
<b>Podgrupa</b>	organoklorirani insekticid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.3. Propizamid [24]

Propizamid je rezidualni herbicid koji se koristi za kontrolu godišnjih i višegodišnjih trava i nekih korova čija se fizikalno-kemijska svojstva nalaze u Tablici 3.4.

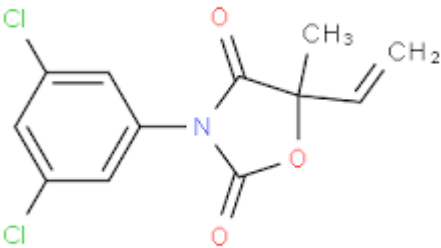
**Tablica 3.4.** Fizikalno-kemijska svojstva propizamida

<b>Generičko ime</b>	Propizamid
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	3,5-diklor- <i>N</i> -(1,1-dimetilprop-2- inil)benzamid
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO
<b>CAS broj</b>	23950-58-5
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	256,13
<b>Agregatno stanje</b>	bezbojni prah
<b>Temperatura tališta, °C</b>	156
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>logK<sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	3,57
<b>logK<sub>oc</sub> [25]</b>	2,57
<b>Tip pesticida</b>	herbicid
<b>Podgrupa</b>	benzamid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.4. Vinklozolin [24]

Vinklozolin je fungicid koji se uglavnom koristi za kontrolu gljivica *Botrytis*, *Monolinia* i *Sclerotinia spp* na uljanoj repici, vinovoj lozi, voću i povrću. U Tablici 3.5 prikazana su fizikalno-kemijska svojstva vinklozolina.

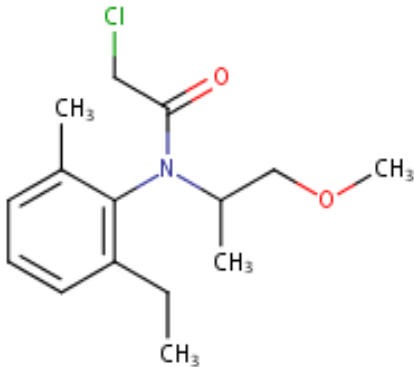
**Tablica 3.5.** Fizikalno-kemijska svojstva vinklozolina

<b>Generičko ime</b>	vinklozolin
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	( <i>RS</i> )-3-(3,5-diklorfenil)-5-metil-5-vinil-1,3-oksazolidin-2,4-dion
<b>CAS broj</b>	50471-44-8
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	286,11
<b>Agregatno stanje</b>	bezbojni kristal
<b>Temperatura tališta, °C</b>	108
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>logK<sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	3,03
<b>logK<sub>oc</sub> [25]</b>	2,53
<b>Tip pesticida</b>	fungicid
<b>Podgrupa</b>	oksazol
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.5. Metolaklor [24]

Metolaklor je djelatna tvar koja izaziva zaustavljanje rasta klijanaca uskolisnih i manjeg broja jednogodišnjih širokolisnih korova. Najčešće se rabi kao zemljišni graminicid poslije sjetve, a prije nicanja i u kombinacijama s drugim djelatnim tvarima. Razgradnja se odvija uz pomoć svjetlosti kada je primijenjen na površinu tla ili mikroorganizmima kada je inkorporiran u tlo. Nije sklon ispiranju u dublje slojeve tla ili prekomjernom hlapljenju. Fizikalno-kemijska svojstva navedena su u Tablici 3.6.

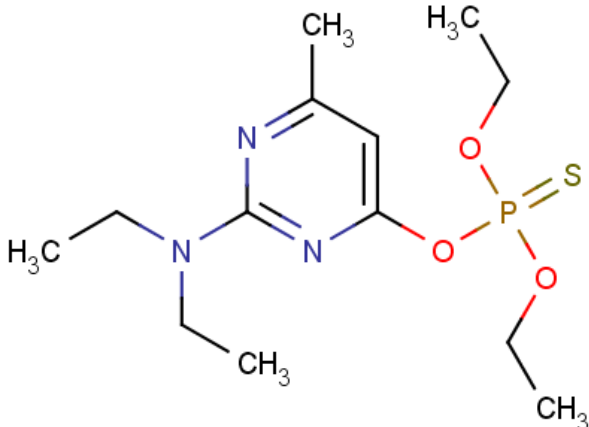
**Tablica 3.6.** Fizikalno-kemijska svojstva metolaklora

<b>Generičko ime</b>	metolaklor
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	2-klor- <i>N</i> -(6-etil- <i>o</i> -tolil)- <i>N</i> -[(1 <i>RS</i> )-2-metoksi-1-metiletil]acetamid
<b>CAS broj</b>	51218-45-2
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	283,8
<b>Agregatno stanje</b>	sivobijela do bezbojna tekućina
<b>Temperatura tališta, °C</b>	-62,1
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>log<math>K_{ov}</math> (pH=7, 20°C) [25]</b>	3,24
<b>log<math>K_{oc}</math> [25]</b>	2,39
<b>Tip pesticida</b>	herbicid
<b>Podgrupa</b>	kloracetamid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.6. Pirimifos etil [24]

Pirimifos etil pripada skupini pirimidinskih organofosfatnih insekticida koji se nekoć koristio u zaštiti voća, a njegova fizikalno-kemijska svojstva nalaze se u Tablici 3.7.

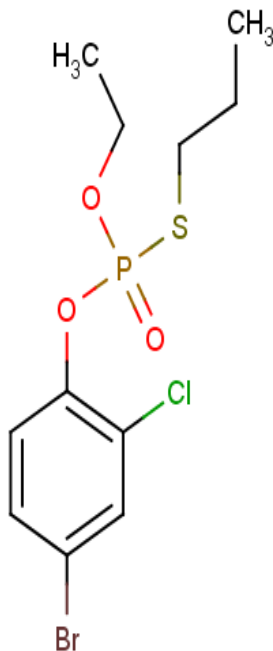
**Tablica 3.7.** Fizikalno-kemijska svojstva pirimifos etila

<b>Generičko ime</b>	pirimifos etil
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	<i>O</i> -2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il <i>O</i> , <i>O</i> -dietyl fosfortioat
<b>CAS broj</b>	23505-41-1
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	305,34
<b>Agregatno stanje</b>	obojena tekućina
<b>Temperatura tališta, °C</b>	15
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	194
<b>log<i>K</i><sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	4,98
<b>log<i>K</i><sub>oc</sub> [25]</b>	3,85
<b>Tip pesticida</b>	insekticid, akaracid
<b>Podgrupa</b>	organofosfatni insekticid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.7. Profenofos [24]

Profenofos je insekticid koji se koristi na raznim kulturama za kontrolu mnogih štetnika, ali uglavnom leptira i grinja. U Tablici 3.8 navedena su fizikalno-kemijska svojstva profenofosa.

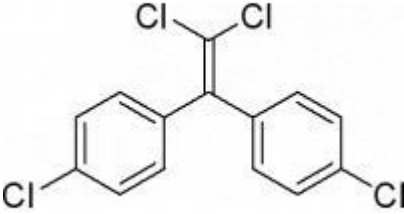
**Tablica 3.8.** Fizikalno-kemijska svojstva profenofosa

<b>Generičko ime</b>	profenofos
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	( <i>RS</i> )-(O-4-brom-2-klorfenilO-etilS-propil fosfortioat)
<b>CAS broj</b>	41198-08-7
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	373,63
<b>Agregatno stanje</b>	blijedožuta tekućina
<b>Temperatura tališta, °C</b>	-
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>logK<sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	4,82
<b>logK<sub>oc</sub> [25]</b>	3,29
<b>Tip pesticida</b>	insekticid, akaracid
<b>Podgrupa</b>	organofosfatni insekticid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.8. *p,p'*-DDE [26]

*p,p'*-DDE je insekticid koji se koristio za sprječavanje malarije, tifusa i drugih bolesti koje prenose insekti čija je prodaja i upotreba danas u potpunosti zabranjena. Fizikalno-kemijska svojstva nalaze se u Tablici 3.9.

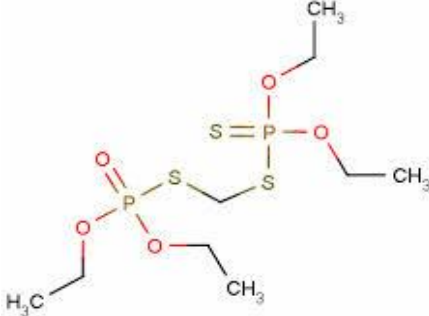
**Tablica 3.9.** Fizikalno-kemijska svojstva *p, p'*-DDE

<b>Generičko ime</b>	<i>p, p'</i> -DDE
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	1-klor-4-[2,2-diklor-1-(4-klorfenil)etenil]benzen
<b>CAS broj</b>	72-55-9
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	318,02
<b>Agregatno stanje</b>	bijeli prah
<b>Temperatura tališta, °C</b>	89
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>log<math>K_{ov}</math> (pH=7, 20°C) [25]</b>	6,00
<b>log<math>K_{oc}</math> [25]</b>	5,65
<b>Tip pesticida</b>	insekticid
<b>Podgrupa</b>	organoklorni insekticid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.9. Etion [24]

Etion je pripadnik organofosfatnih insekticida registriran za uporabu u SAD-u 1965. Ovaj se pesticid u početku razvio kao nesistemički insekticid i akaricid za uporabu na voćkama, uključujući i agrume, orašaste plodove, vlakna te sjemenja i krmno bilje. Fizikalno-kemijska svojstva etiona prikazana su u Tablici 3.10.

**Tablica 3.10.** Fizikalno-kemijska svojstva etiona

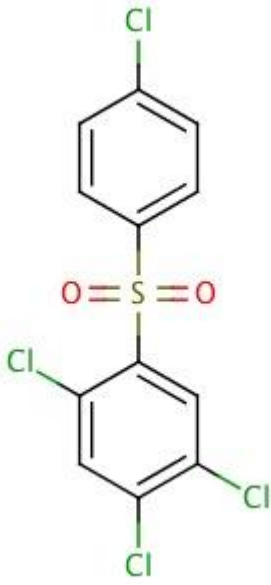
<b>Generičko ime</b>	etion
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	O,O,O',O'-tetraetilS,S'-metilen bis(fosforditioat)
<b>CAS broj</b>	563-12-2
<b>Kemijska formula</b>	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	384,48
<b>Agregatno stanje</b>	tekućina
<b>Temperatura tališta, °C</b>	-12
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>log<math>K_{ov}</math> (pH=7, 20°C) [25]</b>	5,00
<b>log<math>K_{oc}</math> [25]</b>	3,55
<b>Tip pesticida</b>	insekticid, akaricid
<b>Podgrupa</b>	organofosforni insekticid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski



### 3.1.3.10. Tetradifon [24]

Tetradifon je akaricid koji se koristi u vrtnim nasadima za kontrolu širokog raspona biljožderskih grinja čija su fizikalno-kemijska svojstva navedena u Tablici 3.11.

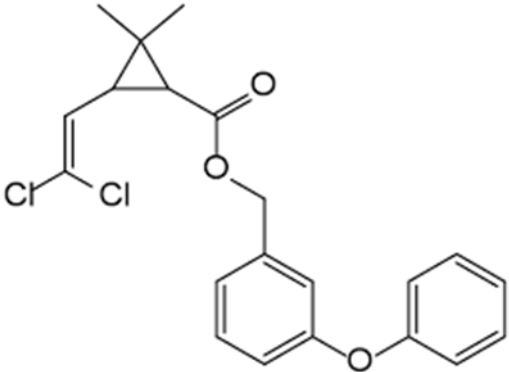
**Tablica 3.11.** Fizikalno-kemijska svojstva tetradifona

<b>Generičko ime</b>	tetradifon
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	4-klorfenil 2,4,5-triklorfenil sulfon
<b>CAS broj</b>	116-29-0
<b>Kemijska formula</b>	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	356,06
<b>Agregatno stanje</b>	bezbojni kristal
<b>Temperatura tališta, °C</b>	146
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>log<math>K_{ov}</math> (pH=7, 20°C) [25]</b>	5,18
<b>log<math>K_{oc}</math> [25]</b>	3,64
<b>Tip pesticida</b>	akaricid
<b>Podgrupa</b>	premošteni difenil
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### 3.1.3.11. Permetrin [24]

Permetrin je uobičajena sintetska kemikalija, široko se koristi kao insekticid i akaricid. Pripada obitelji sintetskih kemikalija zvanih piretroidi i funkcionira kao neurotoksin. Nije poznato da škodi većini sisavaca ili ptica, ali je opasno otrovan za ribe i mačke. Općenito, ima nisku toksičnost prema sisavcima i slabo se apsorbira kožom. U Tablici 3.12 navedena su fizikalno-kemijska svojstva permetrina.

**Tablica 3.12.** Fizikalno-kemijska svojstva permetrin

<b>Generičko ime</b>	permetrin
<b>Naziv prema IUPAC nomenklaturi</b>	3-fenoksibenzil (1 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i> ;1 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i> )-3-(2,2-diklorvinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilat
<b>CAS broj</b>	52645-53-1
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>Kemijska struktura</b>	
<b>Molekulska masa, g/mol</b>	391,3
<b>Agregatno stanje</b>	bezbojna kristalna krutina do smeđe viskozna tekućina, ovisno o čistoći
<b>Temperatura tališta, °C</b>	34,5
<b>Temperatura razgradnje, °C</b>	-
<b>log<i>K</i><sub>ov</sub> (pH=7, 20°C) [25]</b>	7,43
<b>log<i>K</i><sub>oc</sub> [25]</b>	4,51
<b>Tip pesticida</b>	insekticid
<b>Podgrupa</b>	piretroid
<b>Podrijetlo</b>	sintetski

### **3.1.4. Priprema standardnih otopina pesticida**

Temeljna standardna otopina pesticida pripremljena je u acetonitrilu te čuvana u hladnjaku pri temperaturi 4°C u mraku. Radne otopine pesticida potrebne za optimizaciju postupka ekstrakcije i validaciju metode te utjecaj matice pripremaju se razrijeđenjem temeljne standardne otopine. Korištene koncentracije standardnih otopina pesticida su 0,5, 1, 1,25, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 i 50 µg/L.

## **3.2. Instrumenti**

### **3.2.1. Analitička vaga**

Za precizno određivanje mase tvari korištena je analitička vaga Mettler Toledo, Švicarska, model AB104.

### **3.2.2. Ultrazvučna kupelj**

Ekstrakcija pesticida iz uzoraka čaja provedena je ultrazvučnom kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka prikazanom na Slici 3.1.



**Slika 3.1.** Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Njemačka

Kupelj se ispunjava destiliranom vodom (temperature ne veće od 50°C) do 2/3 volumena kupelji. Uzorci koji se nalaze u plastičnim bočicama postavljaju se u odgovarajuću košaru. Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje regulaciju temperature kupelji, vremena trajanja ekstrakcije i snage ultrazvuka. Maksimalna temperatura koja se može podesiti iznosi 80°C, vrijeme od 1–99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W. Moguće je pohraniti uvjete provođenja ekstrakcije u 10 različitih programa. Standardni program pohranjen je pod tipkom „0“, a označava: vrijeme pet minuta, temperatura 50°C, snaga 100%. Taj program je neizbrisiv.

Karakteristike ultrazvučne kupelji:

- napon 230 V
- volumen 26 L
- frekvencija 35 kHz
- dimenzije posude 500 x 300 x 200 mm.

### **3.2.3. Rotirajući uparivač otapala**

Za uparivanje ekstrakata nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije korišten je rotacijski uparivač otapala, tipa R-114/A, Büchi, Švicarska, prikazan na Slici 3.2. Uređaj se sastoji od jedinice za rotiranje tikvice, vodene kupelji za održavanje povišene temperature, povratnog hladila i tikvice za prikupljanje kondenzata. Filtrirani ekstrakti preneseni su u tikvicu okruglog dna koja se uranja u vodenu kupelj, temperature 50°C. Tikvica je spojena na sustav s vodenom vakuum sisaljkom.



**Slika 3.2.** Rotirajući uparivač otapala R-114/A, Büchi, Švicarska

### **3.2.4. Plinski kromatograf**

Ekstrakti su analizirani plinskim kromatografom sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS–QP2010 Ultra s uređajem za automatsko dodavanje uzoraka AOC 5000 (Slika 3.3.). U konfiguraciji sustava nalazi se SPL injektor, a za analizu primjenjen je *splitless* način injektiranja pri temperaturi od 280°C. Korištena je kolona InertCap 5MS/NP duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$ . Kao plin nosioc korišten je helij.



**Slika 3.3.** Plinski kromatograf sa spektrometrom masa GCMS – QP2010 Ultra, Shimadzu

### **3.3. Metode rada**

#### **3.3.1. Postupak za ultrazvučnu ekstrakciju pesticida iz uzorka čaja**

Izvaže se 2 g uzorka čaja u posudicu za vaganje te se na njega doda 2 mL standardne otopine pesticida i 4 mL acetonitrila. Takva smjesa lagano se promućka kružnim pokretima te se ostavi u sušioniku na temperaturi od 40°C dok sav acetonitril ne ishlapi. Nakon što je sve otapalo ishlapilo, izvaže se 50 mg uzorka čaja u malene laboratorijske čaše. Izvaganom čaju doda se 5 mL otapala i ostavi da stoji u kontaktu s uzorkom čaja 15 minuta. Nakon toga stavi se na ultrazvučnu kupelj. Ultrazvučna ekstrakcija provodi se uz snagu od 600 W, vrijeme trajanja ekstrakcije je 15 minuta. Svaki se eksperiment radi u tri paralelne serije (tri uzorka čaja koja sadrže pesticide) uz prisutnost slijepa probe, tj. uzorka koji sadrži čaj bez dodatka pesticida. Nakon ekstrakcije, dobiveni ekstrakti prebacuju se u okrugle tikvice i uparavaju do suha na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi vodene kupelji od 40°C. Nakon uparavanja, suhi ostatak se otopi dodatkom 5 mL acetonitrila, sadržaj tikvice se pažljivo promućka te se prenese u vialice za snimanje na GC–MS-u.

U nizu eksperimenata ispitana je učinkovitost ekstrakcije smjese jedanaest pesticida primjenom različitih otapala (metanol, etanol, acetonitril, aceton, etilacetat, diklormetan, heksan, toluen, dietileter, petroleter, 2-propanol), različitih smjesa organskih otapala (heksan:aceton=1:1, petroleter:aceton=1:1, heksan:petroleter=1:1, aceton:heksan=2:1, heksan:aceton=1:2), različitih temperatura ekstrakcije kroz jedan i/ili dva ekstrakcijska ciklusa.

Nakon pronalaska optimalnih ekstrakcijskih uvjeta, metoda je validirana te primjenjena na realne uzorke čaja. Zbog toga što su realni uzorci čaja sadržavali neke pesticide obuhvaćene metodom, kao i spojeve koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje, masena koncentracija pesticida u realnom uzorku je određena metodom standardnog dodatka u tri koncentracijske točke (jedna bez dodatka standarda i dvije s dodatkom standarda pesticida u realni uzorak čaja), što je i jedan od načina za isključenje utjecaja matice na analitički rezultat. Masene koncentracije ispitivanih pesticida u realnom uzorku čaja izračunate su kao razlika između masene koncentracije pesticida u uzorku sa i bez dodatka standardne otopine pesticida. Umjerni pravci s tri točke napravljeni su za svaki realni uzorak čaja.

### 3.3.2. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa (GC–MS)

Standardne otopine pesticida i dobiveni ekstrakti analizirani su na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa koji ima mogućnost injektiranja tekuće i parne faze (tzv., „head space“), proizvođača Shimadzu. Kao nepokretna faza korištena je kolona 5 % difenil – 95 % dimetilpolisiloksan koja je slabo polarna. U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize koji su postavljeni nakon preliminarnih ispitivanja po kojima su odabrani optimalni uvjeti (Tablica 3.13).

**Tablica 3.13.** Uvjeti rada plinskog kromatografa sa spektrometrom masa

<b>Temperatura kolone</b>	80°C	
<b>Temperatura injektiranja</b>	260°C	
<b>Način injektiranja</b>	<i>Splitless</i>	
<b>Vrijeme uzorkovanja</b>	1 min	
<b>Tlak</b>	128,3 kPa	
<b>Ukupni protok</b>	23,9 mL/min	
<b>Protok kolone</b>	1,90 mL/min	
<b>Linearna brzina</b>	50,8 cm/s	
<b>Protok plina nosioca</b>	3,0 mL/min	
<b>Split</b>	10,0	
Temperaturni profil		
<b>Stopa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (min)</b>
-	80,0	1,00
5,00	300,0	0,00

U svrhu optimiziranja metode, za početak se snima SCAN mode svih komponenata standarda kako bi se dobila vremena zadržavanja komponenata, njihov ciljani kao i potvrdni ion. Zatim se snima SIM mode gdje se odabire  $m/z$  vrijednost ciljnog i potvrdnog iona svake pojedine komponente kako bi se postigla što bolja osjetljivost. Tablica 3.14 prikazuje parametre odabranih komponenata pesticida analiziranih na GC–MS-u.

**Tablica 3.14.** Kromatografski paramateri odabranih komponenata pesticida analiziranih na GC–MS-u

<b>Pesticid</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (min)</b>	<b>Ciljni ion (<math>m/z</math>)</b>	<b>Potvrdni ion (<math>m/z</math>)</b>
Klorprofam	18,000	43,00	127,00-213,00
$\delta$ -lindan	20,210	181,00	219,00-183,00
Propizamid	20,865	173,00	175,00-255,00
Vinklozolin	23,035	285,00	212,00-178,00
Metolaklor	24,715	162,00	238,00-240,00
Pirimifos etil	25,940	280,00	333,00-318,00
Profenofos	28,265	79,00	139,00-97,00
$p, p'$ -DDE	28,370	246,00	248,00-318,00
Etion	30,170	231,00	97,00-153,00
Tetradifon	33,960	159,00	111,00-229,00
Permetrin	36,870	183,00	163,00-165,00



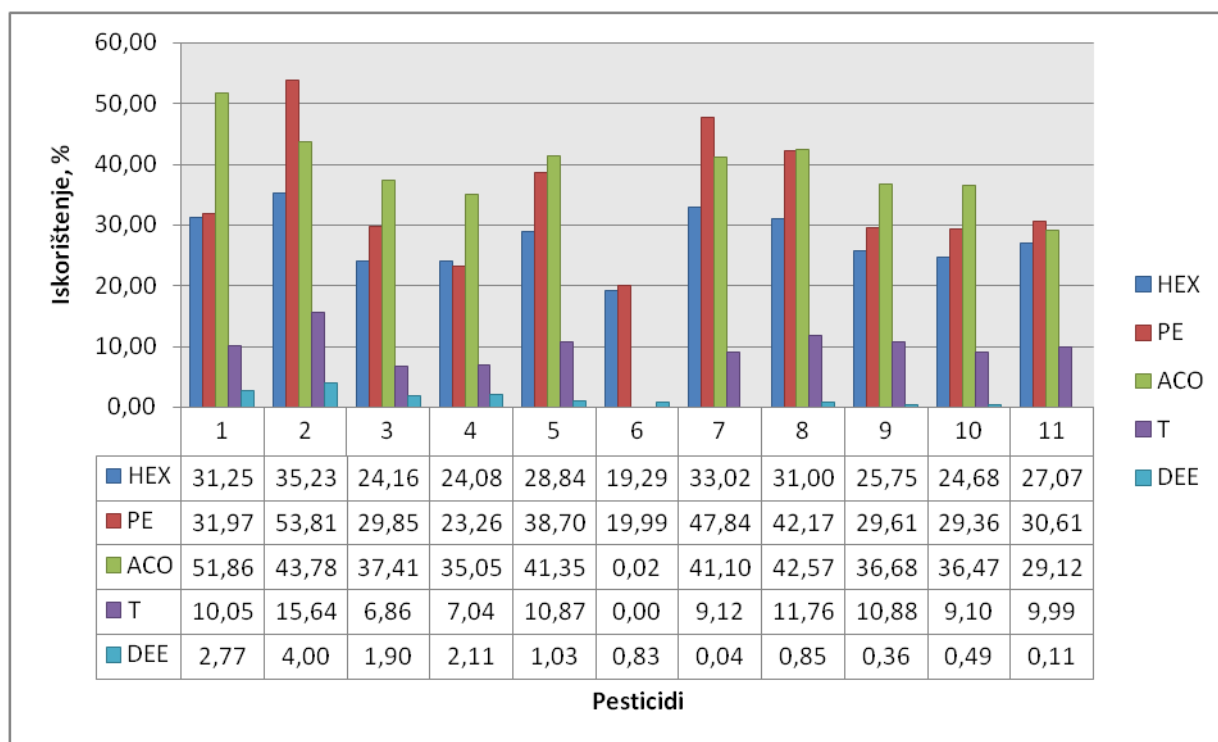
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Ekstrakcija pesticida iz uzoraka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom**

Kritični korak analize svakog realnog uzorka je postupak pripreme uzorka. Kod ultrazvučne ekstrakcije važno je odabrati odgovarajuće otapalo kao i njegov volumen, vrijeme i temperaturu ekstrakcije te snagu ultrazvuka i broj ciklusa. Budući da matica u realnim uzorcima zna biti prilično kompleksna poput matice čaja korištene u ovom radu, za očekivati je i njezin veliki utjecaj na samu ekstrakciju.

Iz poglavlja 3.1.3. vidljivo je da svi ispitivani pesticidi imaju prilično različite strukturne formule te samim time imaju i dosta različita fizikalno-kemijska svojstva. Iz tog razloga pravi je izazov provesti optimizaciju metode njihovog određivanja te pronaći optimalne uvjete za ekstrakciju svih pesticida u jednom koraku. Svi eksperimenti su osmišljeni na temelju znanja stečenog u prijašnjim ispitivanjima te podataka iz literature. Za razvoj metode ultrazvučne ekstrakcije korišten je čaj od trputca koji je dobiven iz organskog uzgoja i za kojeg se pouzdano zna da ne sadrži niti jedan od ispitivanih pesticida.

U prvom nizu eksperimenata ekstrakcija je provedena s čistim otapalima (metanol, etanol, 2-propanol, aceton, etil-acetat, acetonitril, diklormetan, dietileter, petroleter, toluen i heksan) pri 25°C. Volumen otapala bio je 5 mL. Na Slici 4.1 prikazano je grafički iskorištenje jedanaest ispitivanih pesticida za otapala heksan, petroleter, aceton, toluen i dietileter.



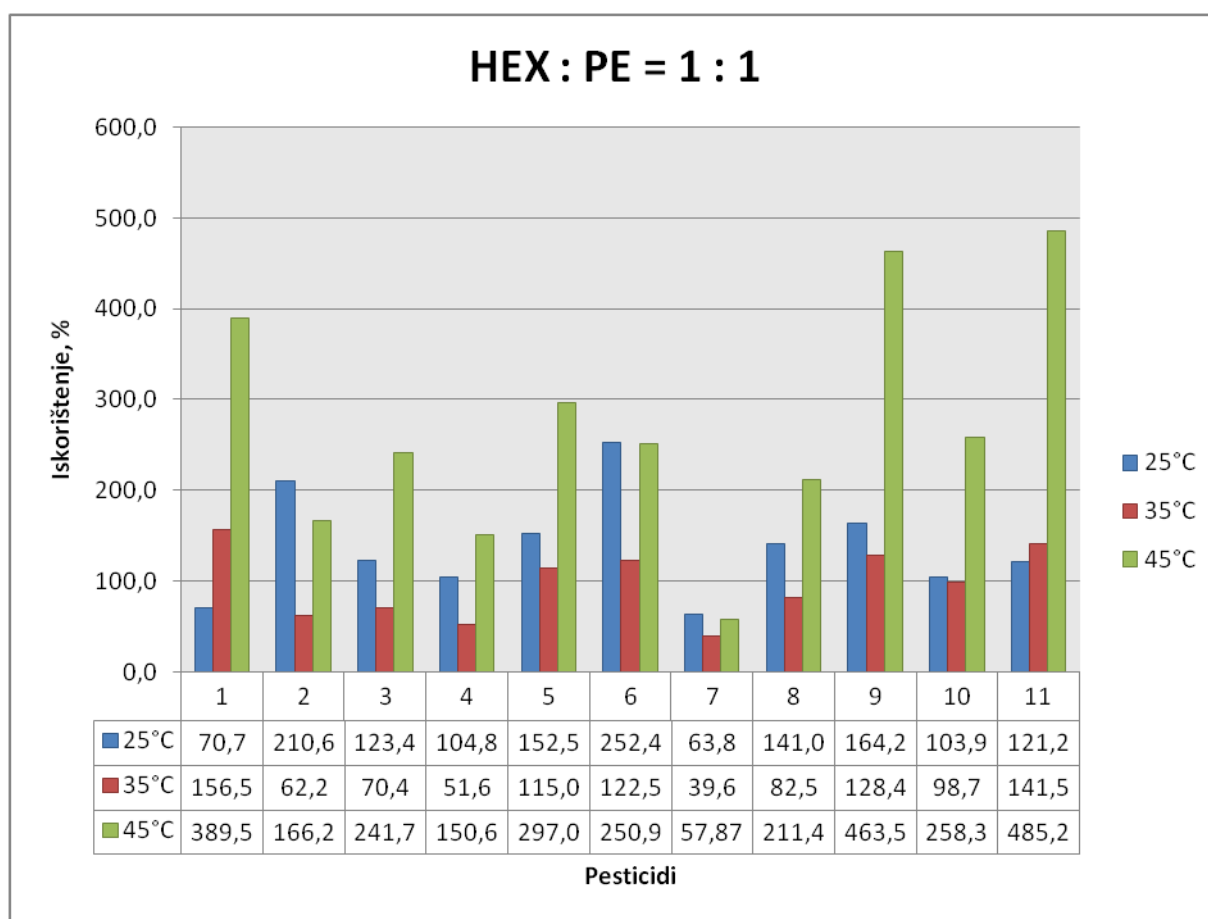
**Slika 4.1.** Utjecaj izbora otapala na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p*, *p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)

Najlošija iskorištenja za sve pesticide dobivena su u slučaju odabira otapala toluena i dietiletera, s time da je za toluen postignuto iskorištenje veće od 10% za 45% ispitivanih pesticida, dok su za toluen iskorištenja svih pesticida manja od 4%. U odnosu na ostale pesticide, za  $\delta$ -lindan dobivena su najbolja iskorištenja za sva prikazana otapala, dok su najlošija iskorištenja postignuta za pirimifos etil. Odabirom heksana kao otapala, za sve pesticide dobivena su iskorištenja u rasponu između 20 i 30%. Aceton se pokazao najboljim izborom među korištenim čistim otapalima jer su pomoću njega dobivena najveća iskorištenja (od 30 do 60%), a za 80% pesticida iskorištenja su veća od 30%. Ništa lošiji rezultati nisu dobiveni uz petroleter kao otapalo, jer su za 50% ispitivanih pesticida iskorištenja bila veća od 30%.

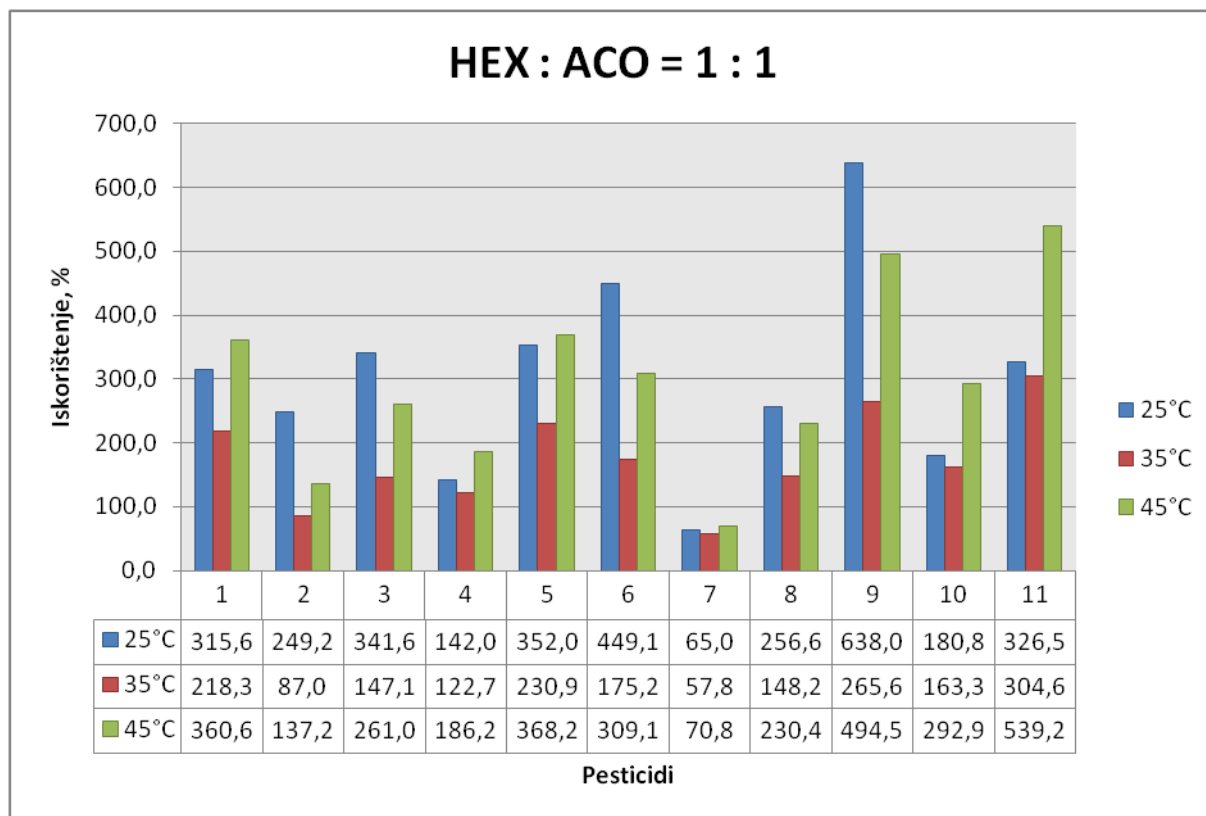
Općenito, ako se pogledaju svi dobiveni rezultati u ovom eksperimentu, za sve pesticide su postignuta niska iskorištenja pa su za drugi eksperiment odabrane sljedeće smjese otapala:

heksan:aceton=1:1, petroleter:aceton=1:1 i heksan:petroleter=1:1. Za njih je ispitan i utjecaj temperature (25°C, 35°C i 45°C) na ekstrakciju pesticida iz uzorka čaja trputca ultrazvučnom ekstrakcijom u jednom i dva ciklusa, a rezultati su prikazani grafički na Slikama 4.3, 4.4 i 4.5 samo u slučaju provedbe eksperimenta u jednom ciklusu. Naime, ultrazvučna ekstrakcija pesticida u dva ciklusa pri temperaturi od 35°C nije pokazala najbolje rezultate pa iz tog razloga ti rezultati nisu ni prikazani u ovom radu.



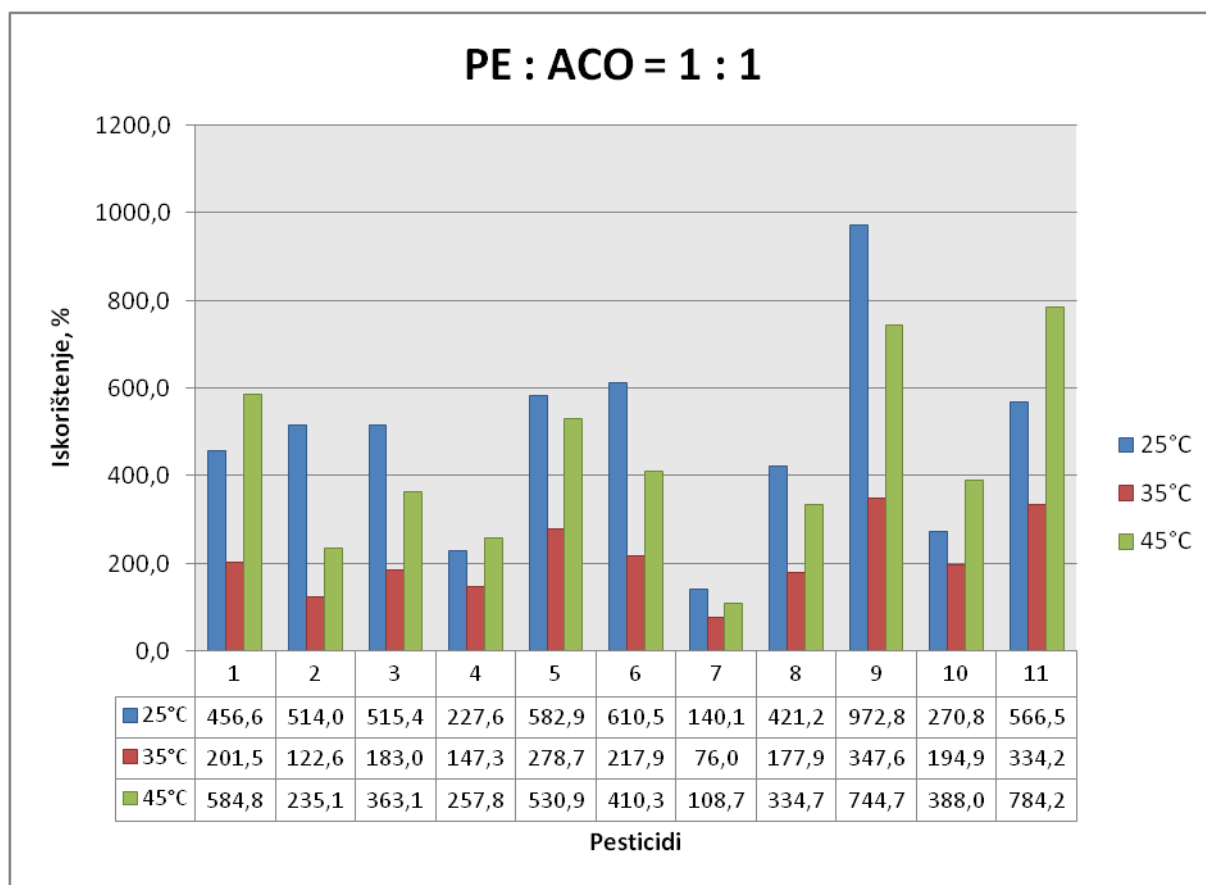
**Slika 4.2.** Utjecaj temperature na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala HEX:PE=1:1

(1- Klorprofam, 2- δ-lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)



**Slika 4.3.** Utjecaj temperature na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala HEX:ACO=1:1

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)

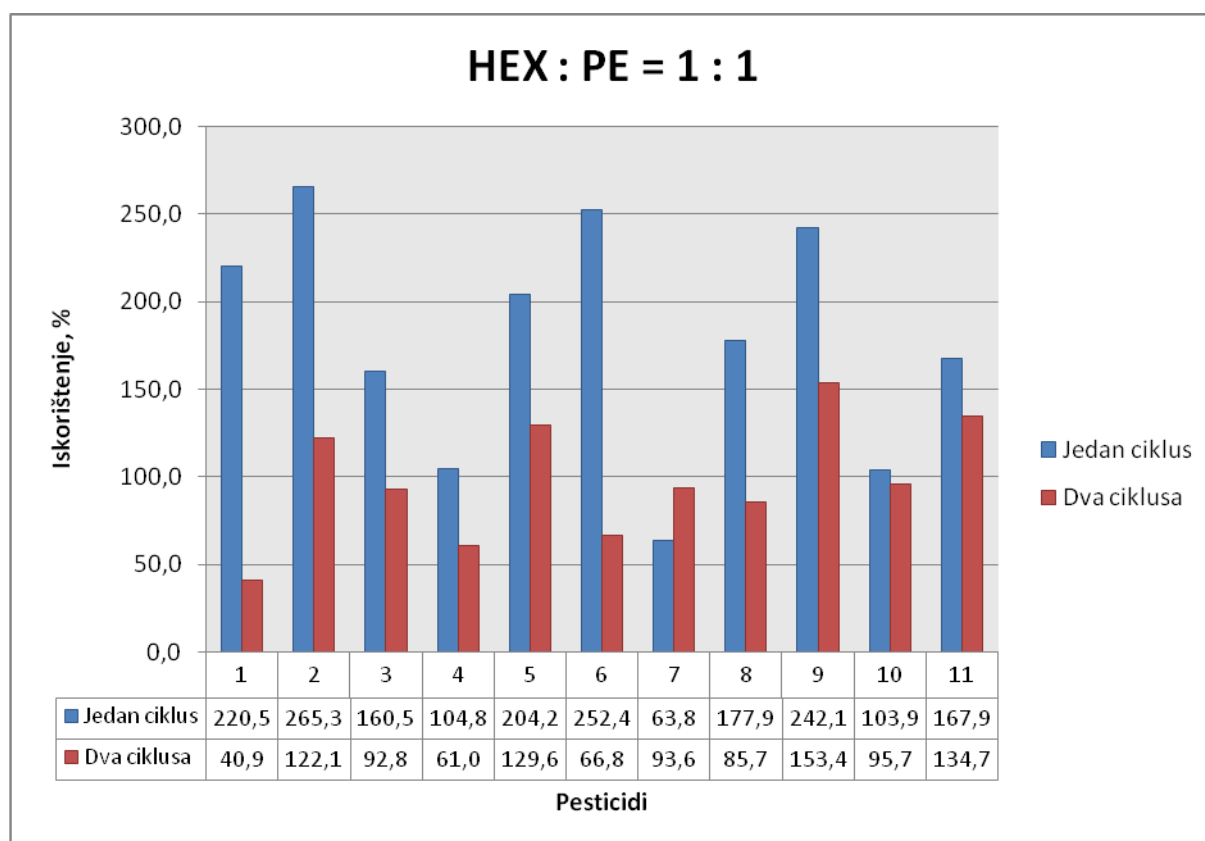


**Slika 4.4.** Utjecaj temperature na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala PE:ACO=1:1

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)

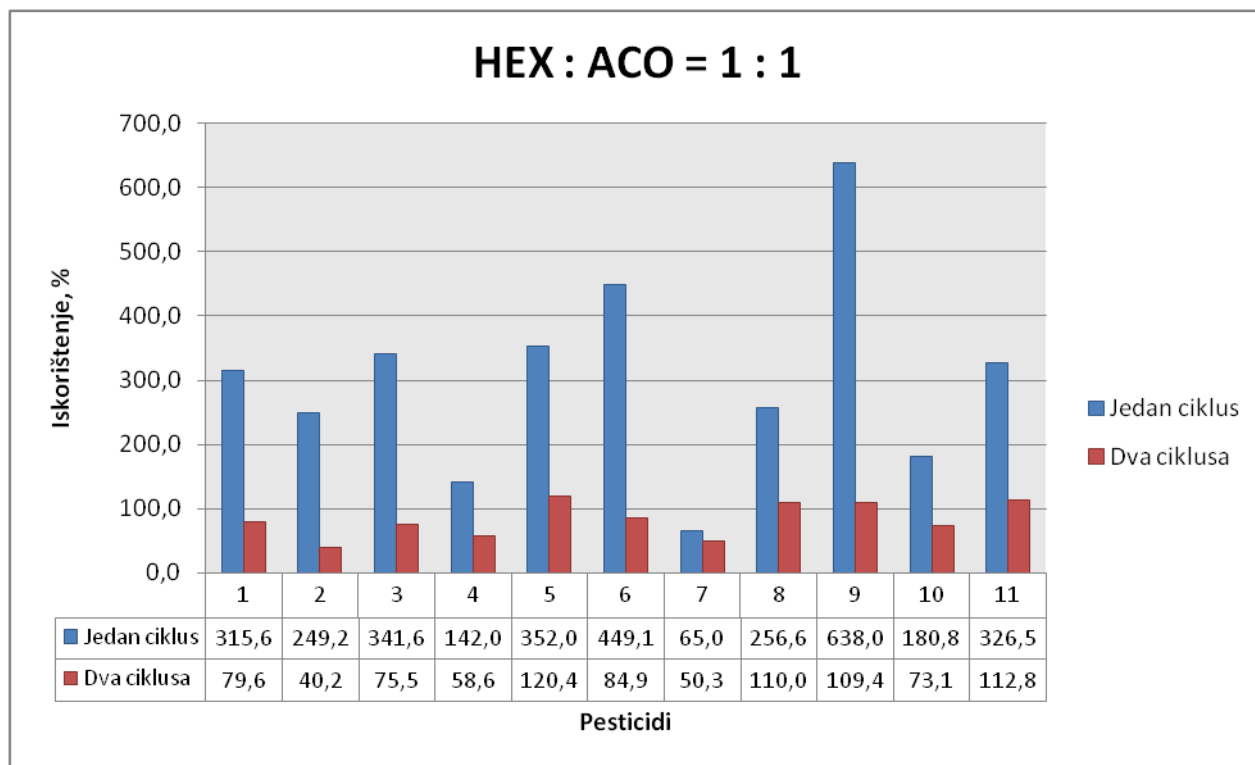
Za sve tri odabrane smjese otapala postignuta su izrazito velika iskorištenja svih pesticida za sve tri ispitane temperature, iz čega slijedi da je utjecaj matice prevelik i nerealan. Postoji mogućnost da neke grupe spojeva matice uzorka instrument prepozna kao pesticid što rezultira povećanjem signala odziva. Najveći utjecaj matice na ekstrakciju pesticida iz čaja trputca ultrazvučnom ekstrakcijom vidljiv je pri temperaturi od 45°C. Jedino na ekstrakciju profenofosa nema utjecaja matice jer su dobivena iskorištenja za sve ispitane temperature manja od 100% za sve tri odabrane smjese otapala. Najbolja iskorištenja pesticida za smjese otapala heksan:acetone=1:1, petroleter:acetone=1:1 i heksan:petroleter=1:1 postignuta su pri temperaturi od 35°C i provedbi ultrazvučne ekstrakcije u jednom stupnju. Ipak ti rezultati nisu bili toliko dobri da bi se temperatura od 35°C uzela kao optimalna temperatura za sve naše

sljedeće eksperimente. Naime, iskorištenja možda i jesu bolja u nekim slučajevima, ali su relativna standardna odstupanja veća kao i utjecaj matice koji se najbolje može vidjeti na samim snimljenim kromatogramima. Iz tog razloga je u sljedećem eksperimentu ispitan utjecaj broja ciklusa ultrazvučne ekstrakcije na ekstrakciju pesticida iz čaja trputca pri temperaturi od 25°C za prethodno navedene smjese otapala koja su pokazala dobre rezultate usprkos zamjetno velikom utjecaju matice (iskorištenja značajno viša od 100%). Dobiveni rezultati prikazani su grafički na Slikama 4.5, 4.6 i 4.7.



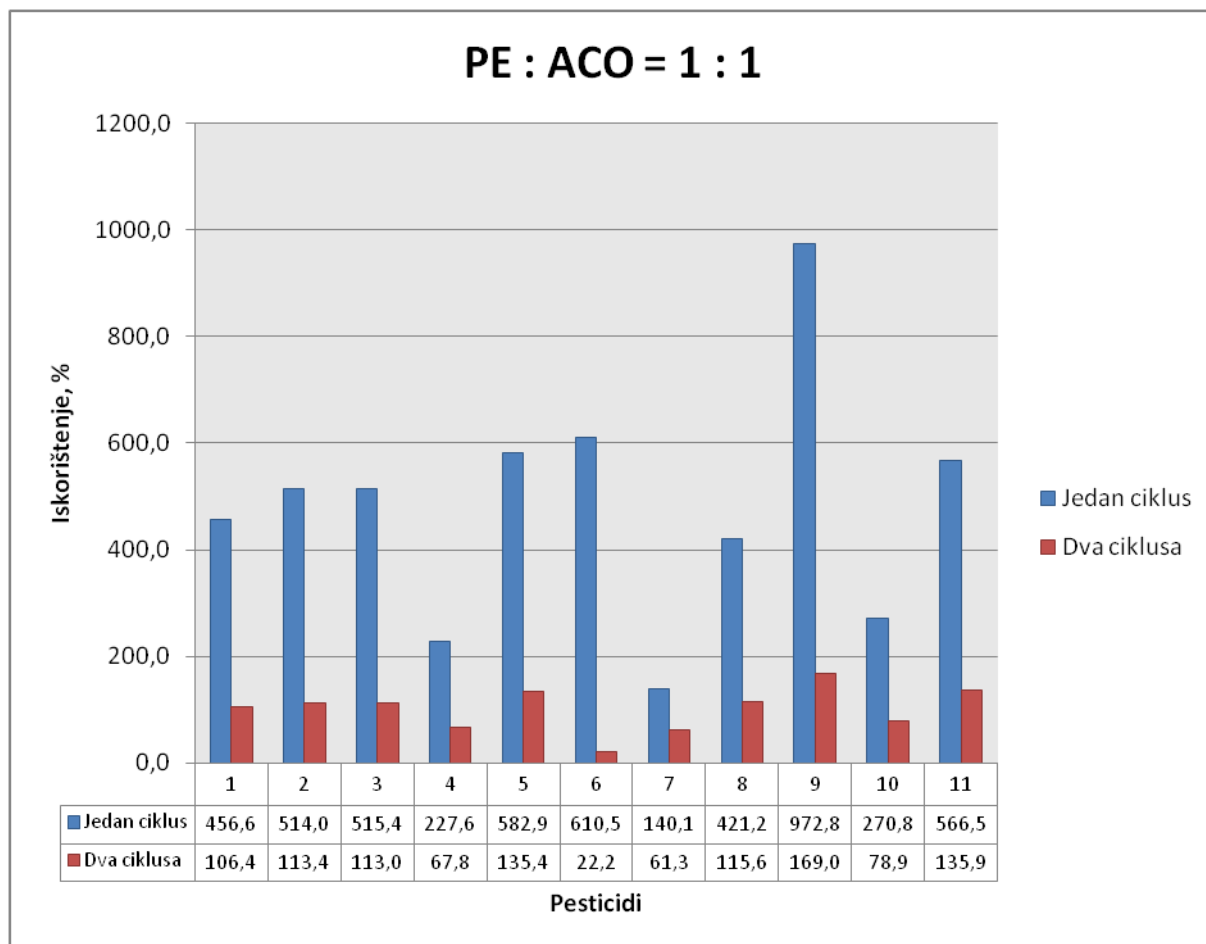
**Slika 4.5.** Utjecaj broja ciklusa na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala HEX:PE=1:1 pri 25°C

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)



**Slika 4.6.** Utjecaj broja ciklusa na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala HEX:ACO=1:1 pri 25°C

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)



**Slika 4.7.** Utjecaj broja ciklusa na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom za smjesu otapala PE:ACO=1:1 pri 25°C

(1- Klorprofam, 2-  $\delta$ -lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)

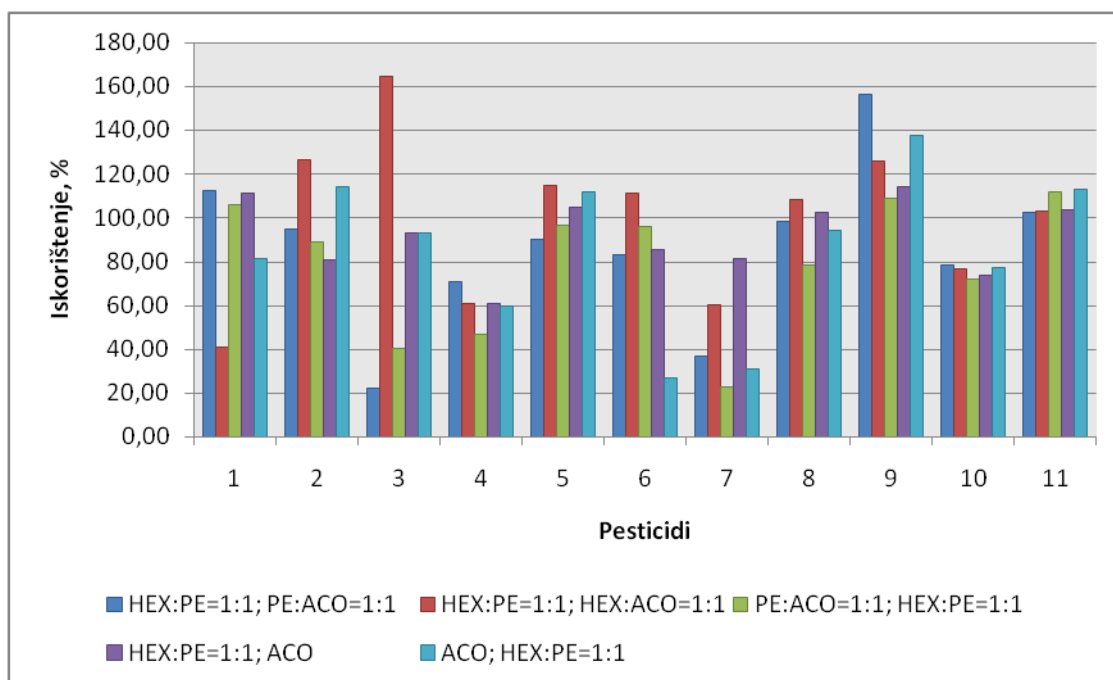
Odabirom provedbe ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja uvelike je smanjen utjecaj matice za sve tri korištene smjese otapala. Najbolja iskorištenja dobivena su za smjesu otapala heksan:aceton=1:1 gdje je za 73% ispitivanih pesticida postignuto iskorištenje veće od 70%. Iz tih razloga, za daljnje eksperimente ultrazvučna ekstrakcija provodila se u dva stupnja pri temperaturi od 25°C.



U zadnjem eksperimentu korištene su kombinacije smjesa otapala kao i kombinacije smjese otapala i acetona kao čistog otapala pri 25°C s ciljem postizanja većih iskorištenja pesticida. Odabrane kombinacije su sljedeće:

- heksan:petroleter=1:1; petroleter:aceton=1:1
- heksan:petroleter=1:1; heksan:aceton=1:1
- petroleter:aceton=1:1; heksan:petroleter=1:1
- heksan:petroleter=1:1; aceton
- aceton; heksan:petroleter=1:1.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički na Slici 4.8.



**Slika 4.8.** Utjecaj kombinacije različitih smjesa otapala i acetona kao čistog otapala na ekstrakciju jedanaest pesticida iz uzorka čaja ultrazvučnom ekstrakcijom pri 25°C u dva ciklusa

(1- Klorprofam, 2- δ-lindan, 3- Propizamid, 4- Vinklozolin, 5- Metolaklor, 6- Pirimifos etil, 7- Profenofos, 8- *p, p'*-DDE, 9- Etion, 10- Tetradifon, 11- Permetrin)

Iz grafičkog prikaza na Slici 4.8 vidljivo je da su najveća iskorištenja pesticida postignuta za kombinaciju heksan:petroleter=1:1; aceton (82% ispitivanih pesticida ostvaruje iskorištenje veće od 80%) pa su za optimalne uvjete ekstrakcije pesticida iz uzorka čaja trputca ultrazvučnom ekstrakcijom odabrani sljedeći uvjeti:

- otapalo: heksan:petroleter=1:1; aceton
- broj stupnjeva: dva
- temperatura: 25°C.

## **4.2. Validacija metode**

Nakon što su određeni optimizirani čimbenici koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije navedene smjese pesticida, validacija metode procijenjena je parametrima linearnosti, granicama detekcije (GD) i kvantifikacije (GK), preciznosti i obnovljivosti te utjecajem matice uzorka.

U tu svrhu napravljena su razrijeđenja standardne otopine smjese od jedanaest pesticida s acetonitrilom.

Nakon ekstrahiranja pri optimalnim uvjetima ekstrakti su zajedno sa standardima snimani plinskom kromatografijom.

Za svaki pesticid u uzorku čaja trputca procijenjena je linearnost u rasponu koncentracija od 0,05 µg/g do 5,00 µg/g, ovisno o pestocidu koristeći deset otopina standarada (poglavlje 3.1.4.). Umjerna krivulja za pojedini pesticid dobivena je crtanjem grafa na čijim su osima odzivi površine ispod kromatografske krivulje te koncentracija analita. Rezultati su analizirani primjenom linearne regresijske analize. Korelacijski koeficijenti ( $R^2$ ) veći su od 0,991, osim u slučaju δ-lindana, vinklozolina, profenofosa, *p*, *p'*-DDE te tetradifona čije se vrijednosti nalaze između 0,984 i 0,989. Visoke vrijednosti  $R^2$  su potvrda linearnosti metode (Tablica 4.1).

**Tablica 4.1.** Linearno područje, korelacijski koeficijent, granica detekcije i kvantifikacije metode

Pesticidi	Linearno područje (µg/g)	Linearna jednadžba	$R^2$	GD (µg/g)	GK (µg/g)
1- Klorprofam	1,00 – 5,00	$A = 1620\gamma + 1381$	0,995	0,500	1,00
2- Propizamid	0,25 – 5,00	$A = 718,6\gamma - 46,14$	0,993	0,125	0,25
3- Vinklozolin	0,50 – 5,00	$A = 228,3\gamma + 116,1$	0,984	0,250	0,50
4- Metolaklor	0,25 – 5,00	$A = 2822\gamma + 349,1$	0,992	0,125	0,25
5- Profenofos	0,50 – 5,00	$A = 1244\gamma + 237,3$	0,987	0,250	0,50
6- <i>p, p'</i> DDE	0,25 – 5,00	$A = 1272\gamma + 463,2$	0,984	0,125	0,25
7- Etion	0,50 – 5,00	$A = 893,2\gamma - 51,41$	0,995	0,250	0,50
8- Tetradifon	0,50 – 5,00	$A = 554,9\gamma + 294,9$	0,989	0,250	0,50
9- Permetrin	0,25 – 5,00	$A = 1810\gamma + 179,3$	0,996	0,125	0,25
10- $\delta$ -lindan	0,50 – 5,00	$A = 280,5\gamma + 160,5$	0,988	0,250	0,50
11- Pirimifos etil	0,50 – 5,00	$A = 1025\gamma - 360,6$	0,991	0,250	0,50

Za ispitivane pesticide granice detekcije dobivene su u rasponu od 0,125 µg/g do 0,500 µg/g, a granice kvantifikacije između 0,25 µg/g i 1,00 µg/g.

Tablica 4.2 predstavlja iskorištenja 11 pesticida ultrazvučnom ekstrakcijom iz uzorka čaja trputca na tri koncentracijska nivoa unutar linearnog područja. Svaka ultrazvučna ekstrakcija ponavljana je tri puta, a iskorištenje je izraženo kao srednja vrijednost. U optimalnim uvjetima iskorištenja pesticida ne bi trebala ovisiti o koncentraciji uzorka, tj. korisna metoda ne smije podrazumijevati nikakvu značajnu razliku u iskorištenjima tijekom očekivanog koncentracijskog područja analiziranih pesticida. Ipak, za neke pesticide na nižem koncentracijskom nivou dobivena su iskorištenja iznad 100% (permetrin) ili RSO (relativno standardno odstupanje) vrijednosti veće od 10%, a objašnjenje takvih rezultata može se pripisati utjecaju matice. Nadalje, iz Tablice 4.2 može se zaključiti da u slučaju ultrazvučne ekstrakcije profenofosa i *p, p'*-DDE iz uzorka čaja trputca promjena koncentracije uzorka ima

najmanji utjecaj na vrijednosti iskorištenja. Za pesticide metolaklor i pirimifos etil vidljivo je da porastom koncentracije uzorka rastu vrijednosti iskorištenja, dok za pesticide propizamid, tetradifon i permetrin vrijedi obratno.

**Tablica 4.2.** Iskorištenje pesticida primjenom optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije unutar linearnog područja

<b>Pesticid</b>	<b>Koncentracijski nivo, (µg/g)</b>	<b>Iskorištenje ± RSO(n=3), %</b>	<b>Pesticid</b>	<b>Koncentracijski nivo, (µg/g)</b>	<b>Iskorištenje ± RSO(n=3), %</b>
Propizamid	1	92,5 ± 4,1	Vinklozolin	0,5	59,0 ± 12,7
	2	62,7 ± 7,5		1,5	36,2 ± 6,7
	5	68,9 ± 13,8		2,5	61,7 ± 0,2
Metolaklor	1	80,3 ± 4,0	Profenofos	0,5	69,8 ± 4,3
	2	84,5 ± 4,4		1,5	63,5 ± 4,5
	5	99,5 ± 7,3		2,5	69,2 ± 8,4
<i>p, p'</i> -DDE	0,5	87,1 ± 10,7	Etion	0,5	86,1 ± 14,6
	1,5	89,3 ± 4,7		1,5	98,9 ± 1,2
	2,5	81,9 ± 10,7		2,5	90,7 ± 8,0
Tetradifon	1	74,1 ± 8,3	Permetrin	1	123,1 ± 5,3
	2	69,1 ± 10,9		2	106,4 ± 19,5
	5	57,9 ± 6,4		5	90,7 ± 10,1
Pirimifos etil	1	80,3 ± 4,0	Klorprofam	1	91,4 ± 8,8
	2	84,5 ± 4,4		2	91,8 ± 12,8
	5	99,5 ± 7,3		5	69,9 ± 3,0
δ-lindan	1	85,3 ± 0,4			
	2	65,8 ± 9,5			
	5	54,3 ± 2,1			

U sljedećem koraku validacije određena je preciznost ove metode, koja je iskazana kao ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost i obnovljivost su izražene kao relativno standardno odstupanje (RSO). Ponovljivost razvijene metode je izračunata iz rezultata analize uzorka čaja trputca s dodanim pesticidima u koncentraciji 1 µg/g u seriji pet ponavljanja u istom danu. Obnovljivost je izračunata iz analiza spomenutog uzorka čaja s dodanim pesticidima u pet ponavljanja provedbom opisane analitičke procedure tijekom tri različita dana. Rezultati tog ispitivanja navedeni su u Tablici 4.3.

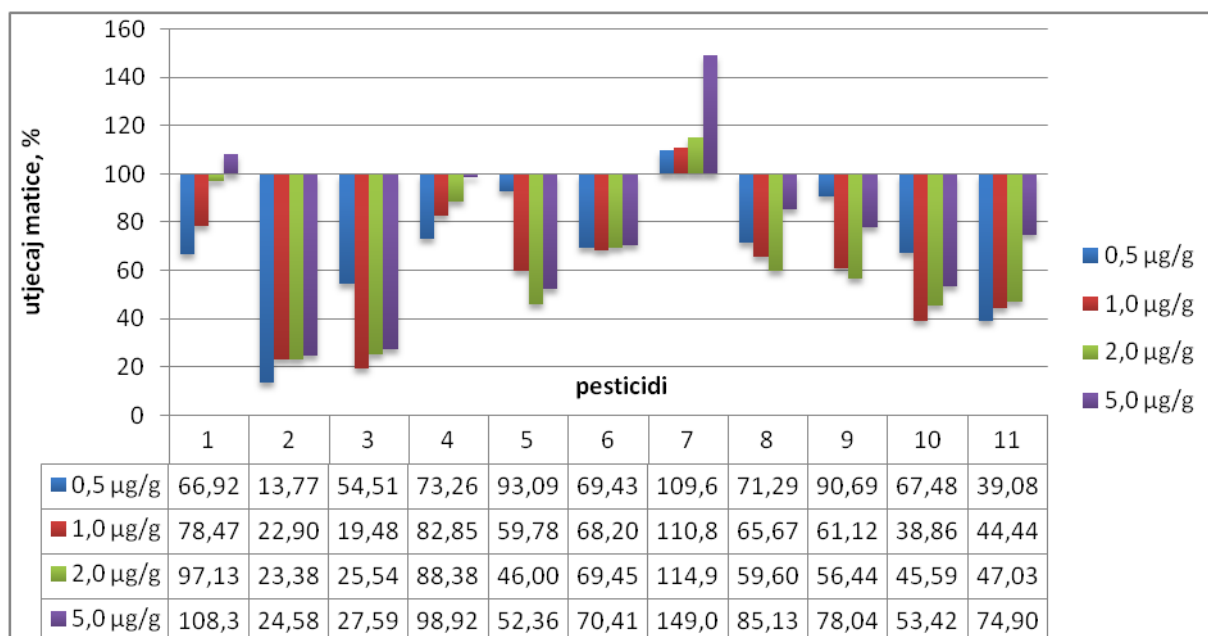
**Tablica 4.3.** Ponovljivost i obnovljivost pesticida za koncentraciju 1 µg/g

<b>Pesticid</b>	<b>Ponovljivost</b>	<b>Obnovljivost</b>
	<b>RSO, %</b>	<b>RSO, %</b>
Propizamid	2,6	9,1
Vinklozolin	1,6	7,5
Metolaklor	4,1	35,3
Profenofos	2,6	15,3
<i>p, p'</i> -DDE	7,4	28,7
Etion	14,6	60,9
Tetradifon	8,1	22,8
Permetrin	12,3	25,1
Pirimifos etil	7,1	412,8
Klorprofam	4,7	41,6
δ-lindan	19,7	25,9

Pojava fenomena utjecaja matice dobro je poznata i igra važnu ulogu u kvantitativnim analizama pesticida u uzorcima hrane jer utječe na kvalitetu podataka analize pesticida te predstavlja danas jedan od najvećih izazova u analitici. Utjecaj matice može smanjiti ili povećati signal odziva u odnosu na signal odziva standarda, a ta promjena signala jako ovisi o načinu ionizacije, o pojedinom analitu i matici koja se analizira (količina matice po mililitru ekstrakta) te o postupku obrade uzorka.

Utjecaj matice može biti uzrokovan interakcijama (van der Waalsove, dipol-dipol ili elektrostatske sile) između pesticida i koekstrahiranih tvari u pripremljenom uzorku koje bi mogle suzbiti ili poboljšati ionizaciju pesticida. To može rezultirati nižim ili višim odzivima signala, što utječe na točnost kvantitativnih rezultata [27, 28].

Utjecaj matice kvantificiran je usporedbom površine kromatografskih krivulja pesticida u špikanom uzorku matice čaja trputca nakon ultrazvučne ekstrakcije s površinom kromatografske krivulje pesticida u čistom otapalu. Na Slici 4.9 prikazan je utjecaj matice za svaki analizirani pesticid na četiri koncentracijska nivoa (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 µg/g) unutar linearnog područja.



**Slika 4.9.** Utjecaj matice na četiri koncentracijska nivoa

(1- Klorprofam, 2- Propizamid, 3- Vinklozolin, 4- Metolaklor, 5- Profenofos, 6- *p*, *p'*-DDE, 7- Etion, 8- Tetradifon, 9- Permetrin, 10- δ-lindan, 11- Pirimifos etil)

S obzirom da priroda učinka matice prilično varira, postotak je samo relativni pokazatelj stupnja prigušenja ili povećanja instrumentalnog odziva pojedinih pesticida. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da na utjecaj matice jako utječe koncentracija ispitivanih pesticida pri čemu je kod nekih pesticida veći utjecaj matice kod nižih koncentracija, a kod nekih obratno. Neki pesticidi poput klorprofama, metolaklora i etiona ne pokazuju značajan utjecaj matice osim pri najnižoj ili u slučaju etiona pri najvišoj koncentraciji jer je promjena signala manja od 20%. Iako većina ispitivanih pesticida ima isti trend (prigušenje ili povećanje) utjecaja matice, kod klorprofama i etiona primijećen je promjenjiv utjecaj matice, tj. kod najviše koncentracije prisutno je povećanje signala dok kod ostalih koncentracija dolazi do smanjenja signala. Najveći utjecaj matice (smanjenje signala) ima na propizamid i vinklozolin (oko 70%) te na  $\delta$ -lindan i pirimifos etil (oko 60 %).

### **4.3. Primjena metode na realnim uzorcima**

Nakon validacije, optimirana ultrazvučna ekstrakcija primjenjena je na jedanaest različitih realnih uzoraka čaja koji se međusobno razlikuju prema porijeklu i sastavu, a to su preslica (PRES), list breze (LB), list maline (LM), maćuhica (M1, M2), djetelina (D1, D2, D3, D4), crvena djetelina (DC1, DC2), maslačak (MAS) te priljepača (PRI). Realni uzorci čaja analizirani su bez dodatka standardnih otopina pesticida u jednom slučaju te uz dodatak standardne otopine smjese pesticida koncentracija 10 odnosno 20  $\mu\text{g/L}$ , a u Tablici 4.4 prikazane su dobivene koncentracije analiziranih pesticida u realnim uzorcima u odnosu na vrijednosti GD i GK dobivene validacijom ultrazvučne ekstrakcije.



Tablica 4.3. Koncentracija analiziranih pesticida u realnim uzorcima čajeva

		Koncentracija pesticida u realnim uzorcima čaja, µg/g										
		Klorprofam	δ-lindan	Propizamid	Vinklozolin	Metolaklor	Pirimifos etil	Profenofos	<i>p, p'</i> -DDE	Etion	Tetradifon	Permetrin
	GD (µg/g)	0,5	0,25	0,125	0,25	0,125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,125
	GK (µg/g)	1,0	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25
REALNI UZORCI ČAJA	MAS	n.d.	< GD	< GK	n.d.	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	n.d.	0,745
	PRES	< GD	n.d.	< GD	< GK	< GD	< GD	0,554	< GD	< GD	n.d.	n.d.
	LB	< GD	< GD	< GK	< GD	0,253	< GD	< GD	GD	n.d.	GD	1,245
	LM	n.d.	n.d.	< GD	< GD	< GD	< GD	0,466	< GD	n.d.	< GD	< GD
	PRI	< GD	n.d.	0,237	0,558	< GD	< GD	1,475	< GD	< GD	< GD	< GK
	DC1	n.d.	n.d.	n.d.	< GD	n.d.	n.d.	1,63	< GD	< GD	n.d.	n.d.
	DC2	< GD	< GD	< GD	GD	< GD	< GD	< GD	GD	< GD	< GD	0,501
	M1	< GD	1,055	< GD	< GD	< GK	n.d.	< GD	2,438	n.d.	n.d.	< GD
	M2	n.d.	< GD	n.d.	GD	< GK	< GD	0,585	< GK	< GD	< GD	< GK
	D1	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	n.d.	< GD	n.d.	< GD	n.d.
	D2	< GD	< GD	< GD	n.d.	< GD	n.d.	< GD	n.d.	< GD	< GD	< GD
	D3	< GD	< GD	< GD	< GK	GD	< GD	0,728	< GK	< GD	< GD	< GD
	D4	< GD	< GD	< GD	n.d.	< GK	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	n.d.

*n.d.* = nije detektirano

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su koncentracije pesticida u realnim uzorcima čaja izrazito niske, tj. koncentracije pesticida klorprofama, pirimifos etila, etiona i tetradifona ili nisu detektirane ili se nalaze ispod GD u svih trinaest realnih uzoraka čaja. Niti jedan pesticid nije kvantificiran u svim realnim uzorcima čaja, a profenofos je pronađen u šest realnih uzoraka čaja u rasponu koncentracija od 0,466 do 1,475 µg/g i to redom LM, PRES, M2, D3, PRI te DC1. Najveća koncentracija pesticida kvantificirana je u uzorku čaja M1 za pesticid *p*, *p'* DDE i iznosi 2,438 µg/g. U realnim uzorcima čajeva D1, D2 i D4 nije kvantificiran niti jedan pesticid, dok je najzagađeniji čaj priljepača u kojem su kvantificirani pesticidi propizamid, vinklozolin te profenofos u rasponu koncentracija između 0,237 i 1,475 µg/g. Najveća ukupna koncentracija pesticida po jedinici mase kvantificirana je u uzorku čaja M1. U uzorcima čajeva MAS, PRES, LM, DC1, DC2, M2 i D3 kvantificiran je po jedan pesticid, dok su u čajevima LB i M1 kvantificirani po dva pesticida u rasponu koncentracija 0,253 – 2,438 µg/g.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu optimirana je ultrazvučna ekstrakcija jedanaest pesticida međusobno različitih fizikalno–kemijskih svojstava i iz različitih grupa pesticida. Kod ultrazvučne ekstrakcije važno je odabrati odgovarajuće otapalo kao i njegov volumen, vrijeme i temperaturu ekstrakcije te snagu ultrazvuka i broj ciklusa. Najveća iskorištenja pesticida postignuta su za kombinaciju otapala heksan:petroleter=1:1; aceton (82% ispitivanih pesticida ostvaruje iskorištenje veće od 80%) pa su za optimalne uvjete ekstrakcije pesticida iz uzorka čaja trputca ultrazvučnom ekstrakcijom odabrani sljedeći uvjeti:

- otapala: heksan:petroleter=1:1; aceton
- broj ciklusa: dva
- temperatura: 25°C.

Dobivene visoke vrijednosti  $R^2$  su potvrda linearnosti ove metode. Za ispitivane pesticide granice detekcije dobivene su u rasponu od 0,125  $\mu\text{g/g}$  do 0,500  $\mu\text{g/g}$ , a granice kvantifikacije između 0,25  $\mu\text{g/g}$  i 1,00  $\mu\text{g/g}$ . Za neke pesticide na nižem koncentracijskom nivou dobivena su iskorištenja iznad 100% (permetrin) ili RSO vrijednosti veće od 10%, a objašnjenje takvih rezultata može se pripisati utjecaju matice. Iako većina ispitivanih pesticida ima isti trend (prigušenje ili povećanje) utjecaja matice, kod klorprofama i etiona primijećen je promjenjiv utjecaj matice, tj. kod najviše koncentracije prisutno je povećanje signala dok kod ostalih koncentracija dolazi do smanjenja signala. Najveći utjecaj matice (smanjenje signala) ima na propizamid i vinklozolin (oko 70%) te na  $\delta$ -lindan i pirimifos etil (oko 60%).

Razvijenom i validiranom UAE-GC-MS metodom analizirani su realni uzorci čajeva. Niti jedan pesticid nije kvantificiran u svim realnim uzorcima čaja. Najveća koncentracija pesticida kvantificirana je u uzorku čaja M1 za pesticid *p*, *p'* DDE i iznosi 2,438  $\mu\text{g/g}$ . U realnim uzorcima čajeva D1, D2 i D4 nije kvantificiran niti jedan pesticid, dok je najzagađeniji čaj priljepača u kojem su kvantificirani pesticidi propizamid, vinklozolin te profenofos u rasponu koncentracija između 0,237 i 1,475  $\mu\text{g/g}$ . Najveća ukupna koncentracija pesticida po jedinici mase kvantificirana je u uzorku čaja M1.

Ovaj rad pokazao je kako ultrazvučna ekstrakcija može biti atraktivna, pristupačna i efektivna metoda za uklanjanje pesticida iz realnih uzoraka čaja jer uvelike smanjuje vrijeme trajanja i

potrošnju otapala, a i optimizacija parametara UAE je jednostavna s obzirom na mali broj parametara u odnosu na druge tehnike (matica, priroda otapala i vrijeme). Primjena UAE u analitičkim laboratorijima trebala bi se povećati u sljedećih nekoliko godina, posebice zbog niske i razumne cijeme opreme. Međutim, još uvijek ima puno prostora za istraživanja neželjenog utjecaja matice koji otežava kvantifikaciju rezultata.

## 6. LITERATURA

- [1] Maceljski M., Priručnik iz zaštite bilja za zaposlenike u poljoprivrednim ljekarnama, Zagreb, Zavod za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu Republike Hrvatske, 1997.
- [2] FAO - Food and Agriculture organization of the United Nation, International code of conduct on the distribution and use of pesticides, FAO, Rim, 2002.
- [3] Željezić D., Perković P., Uporaba pesticida i postojeće pravne odredbe za njezinu regulaciju, *Sigurnost* **53(2)** (2011) 141-150.
- [4] Stanley O., Food and nutritional toxicology, CRC Press, Washington, 2004.
- [5] Insel P., Turner R.E., Ros D., Discovering nutrition, American dietetic association i Jones and Bartlett Publishers International, Sudbury, 2007.
- [6] Potter N., Hotchkiss J. H., Food science, Chapman&Hall, New York, 1997.
- [7] skupina autora, Analitika okoliša (ur. Kaštelan – Macan M., Petrović M.), Hinus i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
- [8] Cabrera C., Artacho R., Giménez R., Beneficial effects of green tea—a review, *The journal of the American college of nutrition* **25(2)** (2006) 79-99.
- [9] Guoqiang C., Pengying C., Renjiang L., A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure, *Food Chemistry* **125(4)** (2011) 1406-1411.
- [10] Gervais G., Brosillon S., Laplanche A., Helen C., Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water, *Journal of Chromatography A* **1202(2)** (2008) 163-172.
- [11] Lu C., Liua X., Dong F., Xu J., Song W., Zhang C., Li Y., Zheng Y., Simultaneous determination of pyrethrins residues in teas by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **678(1)** (2010) 56-62.
- [12] Xu X.-M., Yu C. et al, Multi-residue analysis of pesticides in tea by online SEC-GC/MS, *Journal of Separation Science* **34 (2)** (2011) 210-216.

- [13] Lozano A., Rajski L. et al., Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples, *Journal of Chromatography A* **1268** (2012) 109-122.
- [14] Kanrar B., Mandal S., Bhattacharyya A., Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 67 pesticides in made tea, tea infusion, and spent leaves using ethyl acetate extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of AOAC International* **93**(2) (2010) 411-424.
- [15] Pico Y., Ultrasound–assisted extraction for food and environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry* **43** (2013) 84-89.
- [16] Awad T.S., Moharram H.A., Shaltout O.E., Asker D., Youssef M.M., Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review, *Food Research International* **48**(2) (2012) 410-427.
- [17] Technology: Our high-power ultrasound technology-breaking down biomass through cavitation (<http://www.ultrawaves.de/en/technology.htm>) (srpanj, 2015.)
- [18] Chemat F., Zill-e-Huma, Khan M.K., Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonics sonochemistry* **18**(4) (2011) 813-835.
- [19] Pico Y., *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Elsevier, Oxford, Velika Britanija, 2012., str. 117-219.
- [20] Santos H.M., Capelo J.L., Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment, *Talanta* **73**(5) (2007) 795-802.
- [21] Lopez-Avila V., *Microwave-assisted extraction*, Midwest Research Institute, Cupertino, CA, USA, *Academic Press* (2000), str. 1389.
- [22] Klejdus B., Lojkova L., Plaza M., Snoblova M., Sterbova D., Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1217**(51) (2010) 7956-7965.
- [23] Kaštelan – Macan M., *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.

- [24] Pesticide properties database (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/>) (srpanj, 2015.)
- [25] EPI SUITE software (EPIWEB 4.1)  
(<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>) (srpanj, 2015.)
- [26] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3035#section=Top> (srpanj, 2015.)
- [27] Matrix effect in multi – residue pesticide analysis when using liquid chromatography – tandem mass spectrometry ([http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Editorial/mis\\_0026](http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Editorial/mis_0026)) (rujan, 2015.)
- [28] Ferrer I. et al., Multi–residue pesticide analysis fruits and vegetables by liquid chromatography–time–of–flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1082**(1) (2005) 81-90.

## ŽIVOTOPIS

Iva Šimić je rođena 28. kolovoza 1988. godine u Doboju, Bosna i Hercegovina. Završila je Osnovnu školu „Sesvete“ u Zagrebu, nakon koje je upisala Srednju školu Sesvete, smjer opća gimnazija. Srednju školu završila je 2007. godine te se upisala na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Kemijsko inženjerstvo. Nakon 4 godine promijenila je smjer i prešla na studij Ekoinženjerstva. 2013. godine je upisala diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi. Sudjeluje s posterskim i usmenim izlaganjima na Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu 2014. godine, Znanstveno-stručnom skupu o industrijskoj kristalizaciji u Plivi 2015. godine, Međunarodnom susretu studenata tehnologije u Novom Sadu 2014. godine, Tehnologijadi u Makarskoj 2015. godine te s radionicom na Festivalu znanosti u Zagrebu 2014. godine. Zajedno s kolegicom dobitnica je Dekanove nagrade u 2014. godine. Stručnu praksu odradila je u Službi laboratorijskih ispitivanja, istraživanja i proizvodnje nafte i plina (IPNP), Sektora za upravljanje i inženjering polja u INI- Industrija nafte d.d. Od stranih jezika koristi engleski i njemački jezik te je računalno pismena.