

# Analitičke metode određivanja N-nitrozamina u vodama

---

Lubina, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:311859>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Lubina

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Lubina

**ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA N-NITROZAMINA U VODAMA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Krešimir Košutić

Lidija Furač, v. pred. dr. sc.

Zagreb, rujan 2023.

## SAŽETAK

*N*-nitrozamini dezinfekcijski su nusprodukti koji nastaju reakcijom oksidacije sekundarnih ili tercijarnih amina pomoću nitrozacijskog reagensa. Njihova opća formula je  $R_1N(-R_2)-N=O$ . Široko su rasprostranjeni u sustavima za opskrbu pitkom vodom i u vodama u okolišu. Istraživanja su pokazala da nitrozamini imaju štetne učinke na ljudsko zdravlje te je potrebno ograničiti njihove koncentracije u vodi. Za analizu *N*-nitrozamina koriste se kromatografske metode, uobičajeno su to plinska ili tekućinska kromatografija vezane sa spektrometrijom masa nakon odgovarajuće pripreme uzorka. U ovom radu opisane su analitičke metode određivanja *N*-nitrozamina u vodi za piće i otpadnim vodama.

Ključne riječi: dezinfekcijski nusprodukti, *N*-nitrozamini, prekursori, analitičke metode

# ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF *N*-NITROSAMINE IN WATER

## ABSTRACT

*N*-nitrosamines are disinfection by-products that arise from the oxidation reaction of secondary or tertiary amines using a nitrosating agent. Their general formula is  $R_1N(-R_2)-N=O$ . They are widely distributed in drinking water supply systems and in environmental waters. Studies have shown that nitrosamines have carcinogenic effects on human health, and it is necessary to limit their concentrations in water. Chromatographic methods are used for the analysis of *N*-nitrosamine, usually gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Sample preparation is required before analysis. Analytical methods for the determination of *N*-nitrosamine in drinking water and wastewater are described in this paper.

Keywords: disinfection byproducts, *N*-nitrosamines, precursors, analytical methods

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. DEZINFEKCIJSKI NUSPRODUKTI.....	2
2.2. <i>N</i> -NITROZAMINI .....	4
2.2.1. PREKURSORI <i>N</i> -NITROZAMINA .....	8
2.2.2. NASTAJANJE <i>N</i> -NITROZAMINA.....	8
2.2.3. PRISUTNOST <i>N</i> -NITROZAMINA U VODI.....	11
3. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA .....	13
3.1. PRIPREMA UZORKA.....	15
3.2. TEORIJA KROMATOGRFIJE .....	18
3.3. ANALIZA NITROZAMINA PLINSKOM KROMATOGRFIJOM .....	20
3.4. ANALIZA NITROZAMINA TEKUĆINSKOM KROMATOGRFIJOM .....	22
3.4.1. ANALIZA VODE ZA PIĆE [9].....	23
3.4.2. ANALIZA OTPADNIH VODA.....	25
4. ZAKLJUČAK .....	26
5. LITERATURA .....	27

## 1.UVOD

Dezinfekcijski nusprodukti neželjene su posljedice reakcije sredstva za dezinfekciju s prirodnom organskom tvari u vodi. Kemijska sredstva za dezinfekciju koja se koriste za uništavanje patogena mogu reagirati s prirodnim ili antropogenim organskim tvarima prisutnim u izvorskoj vodi stvarajući nusprodukte dezinfekcije. Podaci o toksičnosti i mutagenosti za većinu nusprodukata nisu dostupni. Nitrozamini, koji su jako stabilni u vodi, jedni su od dezinfekcijskih nusprodukata detektiranih u vodi za piće i otpadnoj vodi. Najveća količina *N*-nitrozamina nastaje procesom dezinfekcije vode, a kao dezinficijensi koriste se kloramini, slobodan klor, ozon te klorov dioksid. Spojevi nitrozamina, osim u vodi, detektirani su u duhanskim i suhomesnatim proizvodima, sredstvima za čišćenje, alkoholnim pićima, pesticidima, ribi, industrijskim postrojenjima za proizvodnju gume, metala i kože, u kozmetici, poljoprivrednim kemikalijama te farmaceutskim proizvodima.

U novije vrijeme sve se više razvijaju metode za kvantifikaciju i detekciju dezinfekcijskih nusprodukata. Potrebne su vrlo osjetljive analitičke tehnike za njihovu analizu jer se nitrozamini obično detektiraju pri vrlo niskim koncentracijama ng/L. Za analizu su najčešće korištene plinska i tekućinska kromatografija u kombinaciji s maseno-spektrometrijskim detektorom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. DEZINFEKCIJSKI NUSPRODUKTI

Nusprodukti dezinfekcije (engl. *disinfection byproducts*, DBP) posebna su vrsta spojeva koji nastaju u tragovima u postrojenjima za pročišćavanje vode tijekom procesa kloriranja, odnosno tijekom procesa kemijske dezinfekcije. Njihova široka rasprostranjenost u sustavima za opskrbu pitkom vodom i vodama u okolišu izaziva zabrinutost za ljudsko zdravlje.

Dezinfekcijski nusprodukti nastaju kao posljedica reakcije između prirodne organske tvari (engl. *natural organic matter*, NOM) i klora. Klor je zbog svoje učinkovitosti, trajnosti, jednostavnosti upravljanja i niske cijene široko rasprostranjeno dezinfekcijsko sredstvo. Lomljenjem polifenolnog prstena pod utjecajem klora nastaju primarni nusprodukti dezinfekcije. Iz primarnih nusprodukata i reakcije s bromom ili jodom nastat će pojavnici ili sekundarni nusprodukti, kao što su bromohalometan, jodotrihalometan, haloacetonitril [1].

Postoje i alternativna dezinfekcijska sredstva s istim ili boljim svojstvima od klora kao što su: ozon, vodikov peroksid, kalijev permanganat, peroksiocetna kiselina [1], kloramini i klorov dioksid [2]. Dezinfekcijski su namijenjeni deaktivaciji patogenih mikroorganizama te sprječavanju izbijanja virusa.

Dezinfekcijski nusprodukti svrstavaju se u 4 glavne skupine [1]:

- Halometani (HM)
- Haloacetene kiseline (HAA)
- Haloketoni (HK)
- Haloacetonitrili (HAN)

Zahvaljujući dezinfekciji vode za piće ljudi svakodnevno dobivaju kvalitetnu pitku vodu iz vodovodnih sustava. Međutim, kemijska dezinfekcija proizvodi i nenamjernu opasnost po zdravlje, odnosno rizik od karcinoma zbog nastanka nusprodukata dezinfekcije. Kemijski



dezinficijensi učinkoviti su u ubijanju štetnih patogena u pitkoj vodi, ali su također snažni oksidansi koji oksidiraju prirodnu organsku tvar, antropogene onečišćujuće tvari i bromid/jodid prirodno prisutan u većini izvorskih voda (rijeke, jezera i mnoge podzemne vode). Potrebno je pronaći idealnu dozu klora za izbjegavanje i smanjenje problema s mikrobima te kontrolu stvaranja DBP u velikim količinama koje predstavljaju ozbiljan rizik.

Prvi dezinfekcijski nusprodukti identificirani u vodi za piće bili su kloroform i drugi trihalometani. Veliki dio istraživanja učinaka na zdravlje usmjeren je na rak ili mutagenost. Uočeno je da udisanje i dermalna apsorpcija, primjerice tuširanje, kupanje, plivanje u bazenima i ostale aktivnosti, mogu povećati izloženost određenim nusproduktima dezinfekcije te na taj način pridonijeti pojavi raka mokraćnog mjehura. Također, dezinfekcijski nusprodukti mogu se formirati iz reakcije antropogenih onečišćujućih tvari, kao što su pesticidi, lijekovi, površinski aktivne tvari i tekstilne boje. Ovisno o učestalosti i rasprostranjenosti postoje dvije kancerogene kategorije dezinfekcijskih nusprodukata: mogući i vjerojatni kancerogeni agensi. Različiti uvjeti voda, uključujući koncentracije bromida ili jodida, koncentracije prirodne organske tvari i pH, utječu na stvaranje različitih dezinfekcijskih nusprodukata koji sadrže klor, brom ili jod [2].

Primjena kemijske dezinfekcije ključna je i u postrojenjima za desalinizaciju morske vode. Zabilježeno je da materijali koji potječu iz ljudskog tijela (npr. kosa, koža, slina i urin) i proizvodi za osobnu njegu (npr. losioni) mogu reagirati kao prekursori dezinfekcijskih nusprodukata s dezinficijensima u rekreacijskim vodama [3].

## 2.2. N-NITROZAMINI

Nitrozaminima nazivamo spojeve iz skupine *N*-nitrozo spojeva (engl. *N-nitroso compounds*, NOC) koji imaju zajedničku funkcionalnu skupinu  $>N-N=O$ . NOC se mogu podijeliti u dvije grupe: *N*-nitrozamini te *N*-nitrozamidi i srodni spojevi [4].

*N*-nitrozamini su spojevi koji nastaju reakcijom nitrita amina, to jest reakcijom oksidacije sekundarnih ili tercijarnih amina pomoću nitrozacijskog reagensa. Njihova opća formula je  $R_1N(-R_2)-N=O$ . U strukturi sadrže nitrozo-skupinu koja je vezana na deprotonirani amin te bočne ogranke (supstituente) koji mogu biti razgranati ili ravni lanci i prsteni. Podložni su razgradnji kada se izlože svjetlosti. Najčešće su žute boje i nalaze se uglavnom u tekućem agregatnom stanju [5].

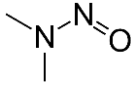
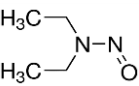
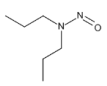
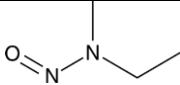
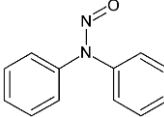
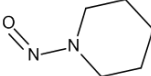
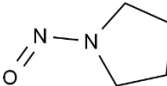
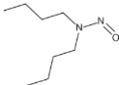
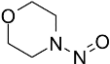
Nitrozamini mogu nastati kao nenamjerni nusprodukti procesa proizvodnje koji uključuju upotrebu nitrata ili nitrita i amina. Spojevi nitrozamina pronađeni su u duhanskim i suhomesnatim proizvodima, sredstvima za čišćenje, alkoholnim pićima, pesticidima, ribi [6], industrijskim postrojenjima za proizvodnju gume, metala i kože, u kozmetici, kemikalijama koje se koriste u poljoprivredi te farmaceutskim proizvodima [7]. Konzumacija i odlaganje prehrambenih proizvoda, cigareta i drugih proizvoda onečišćenih s *N*-nitrozo-dimetilaminom (NDMA) i drugim nitrozaminima može dovesti do ispuštanja u okoliš. [6]

*N*-nitrozamini smatraju se kancerogenim tvarima za ljude. *N*-nitrozo-dimetilamin (NDMA), *N*-nitrozodietilamin (NDEA), *N*-nitrozo-di-*n*-butilamin (NDBA), *N*-nitrozodi-*n*-propilamin (NDPA), *N*-nitrozodifenilamin (NDPhA), *N*-nitrozopirolidin (NPYR), *N*-nitrozo-*N*-metiletilamin (NMEA) prema procjeni karcinogenog rizika definiraju se kao “vjerojatni karcinogeni za ljude” i pripadaju B2 kategoriji. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje karcinoma (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) NDMA i NDEA pripadaju kategoriji 2A („vjerojatni karcinogeni za ljude”), a NDBA, NDPA, NPYR, NMEA, NPIP, NMOR kategoriji 2B („mogući karcinogeni za ljude”), međutim NDPhA pripada grupi 3 („nije klasificirano po kancerogenosti za ljude”) [5]. Britanski znanstvenici pronašli su kancerogeni NDMA kod životinja, nakon čega je u Norveškoj potvrđeno kako je glavni uzrok

za smrt stoke hranjene ribom bio upravo NDMA. Ribljim obrocima dodavani su nitriti koji reagiraju s aminima te na taj način proizvode određenu smrtonosnu dozu NDMA [8].

U Tablici 1 prikazane su strukture i svojstva devet nitrozamina koji su najčešće proučavani nitrozo-dezinfekcijskih nusprodukti.

Tablica 1. Strukture i svojstva devet nitrozamina [9]

Skraćeno	Nitrozamin	Molekulska formula	Struktura	Topivost u vodi (g/100 mL)	10 <sup>-6</sup> gornja granica rizika od raka zbog konzumacije vode za piće
NDMA	<i>N</i> -nitrozodimetilamin	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O		∞	0,7 ng/L
NDEA	<i>N</i> -nitrozodietilamin	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O		10,6	0,2 ng/L
NDPA	<i>N</i> -nitrozodipropilamin	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O		0,98	5 ng/L
NMEA	<i>N</i> -nitrozometiletilamin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O		0,12	2 ng/L
NDPhA	<i>N</i> -nitrozodifenilamin	N <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O		0,003	7000 ng/L
NPip	<i>N</i> -nitrozopiperidin	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O		7,7	NA
NPyr	<i>N</i> -nitrozopirrolidin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O		∞	20 ng/L
NDBA	<i>N</i> -nitrozodibutilamin	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O		0,12	6 ng/L
NMor	<i>N</i> -nitrozomorfolin	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O		∞	NA

NA= nije dostupno

NDMA i NDPA su simetrični dialkilnitrozamini, NMEA je asimetrični dialkilnitrozamin, a NPYR je ciklički nitrozamin.

Prema fizikalnim svojstvima, *N*-nitrozamini mogu se podijeliti u 2 glavne skupine:

1. Hlapljivi *N*-nitrozamini (najčešće ciklički spojevi sa manjom molekulom masom i dialkil amini)
2. Nehlapljivi *N*-nitrozamini [6, 8]

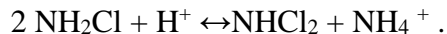
### 2.2.1. PREKURSORI *N*-NITROZAMINA

*N*-nitrozamini potječu od antropogenih prekursora, no mogu bit i prirodnog podrijetla. Od iznimnog značaja je dimetilamin (DMA) kao neizostavni dio biološkog otpada. U prirodne prekursore *N*-nitrozamina ubrajaju se i otopljeni organski dušik koji se nalazi u hidrofilnim frakcijama prirodne organske tvari. Dietilamin, predstavnik sekundarnih amina, smatra se antropogenim prekursorom *N*-nitrozamina. Dietilamin se koristi u proizvodnji tekstila, boja, gume i insekticida. Takvi spojevi ispuštanjem otpadnih voda, odnosno efluenta dolaze u vodoprijemnike te su značajniji za nastajanje *N*-nitrozamina od prirodnih prekursora. Efluenti su bogati sekundarnim i tercijarnim aminima te prilikom procesa dezinfekcije nastaju znatne količine kancerogenih *N*-nitrozamina. Kvaterni amini također spadaju u antropogene prekursore. Oni su glavni sastojci raznih proizvoda, poput omekšivača, deterdženata i šampona. U otpadnim efluentima, osim sekundarnih i tercijarnih amina, prisutni su razni nanomatrijali, pesticidi, boje i farmaceutici koji mogu imati ulogu prekursora [5].

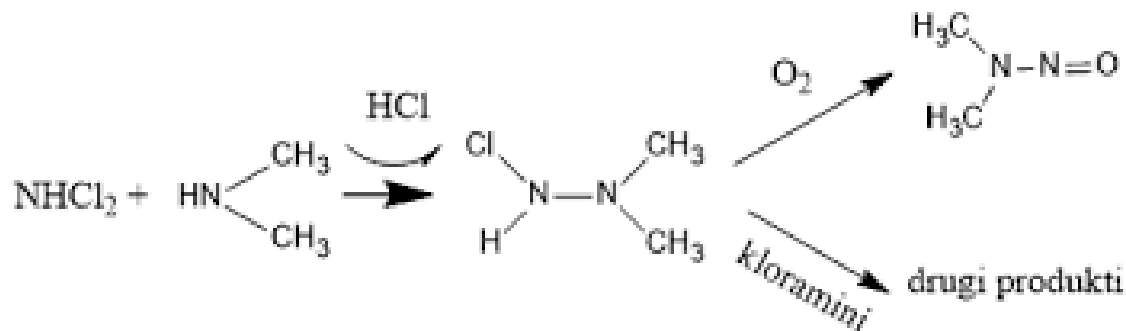
### 2.2.2. NASTAJANJE *N*-NITROZAMINA

Kemijskom reakcijom sekundarnih ili tercijarnih amina i nitrozacijskog reagensa nastaju *N*-nitrozamini. Kao nitrozacijski reagensi koriste se oksidi dušika, pri čemu je oksidacijsko stanje dušika +3 ili +4. Najčešći nitrozacijski reagens u hrani (mesnim proizvodima) je nitratni anhidrid kemijske formule  $N_2O_3$ . Nakon nastanka u kiseloj vodenoj otopini, nitratni anhidrid veže se nukleofilnom supstitucijom na slobodni elektronski par neprotoniranog sekundarnog amina [8].

Kada se kao dezinficijensi koriste se kloramini, slobodan klor, ozon te klorov dioksid postupkom dezinfekcije vode mogu nastati *N*-nitrozamini. Kloraminacija važan je proces dezinfekcije s kloraminskim dezinficijensom. Postupak se provodi dodavanjem klora i manje količine amonijaka u vodu, pri čemu dolazi do njihove reakcije i stvaranja kloramina. Ukoliko se obrada pitke vode u postrojenjima za pročišćavanje vode za piće i u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda odvija u karakterističnim uvjetima, dominantna vrsta bit će monokloramin, dok je dikloramin prisutan prema ravnoteži:



Koja će vrsta kloramina prevladavati u procesu ovisi o molarnom omjeru klora i amonijaka ( $\text{Cl}_2:\text{NH}_3$ ) kao i o pH-vrijednosti. Što je veća pH-vrijednost, odnosno što je otopina bazičnija, to će u sustavu biti više neprotoniranog sekundarnog amina. Kada je u otopini prisutan dikloramin nastaju veće količine NDMA u odnosu na situaciju kada je prisutan monokloramin. Kloraminacija je jako spora reakcija s iznimno niskim molarnim iskorištenjem od svega 2% [5]. Na stvaranje nitrozamina značajno utječe otopljeni kisik. Padom koncentracije otopljenog kisika opada prinos NDMA, što pokazuje da je otopljeni kisik glavni oksidans u procesu kloraminacije. Na Slici 1. prikazana je reakcija nukleofilne supstitucije sekundarnog amina i dikloramina, pri čemu dolazi do nastanka međuprodukta te njegove daljnje oksidacije.



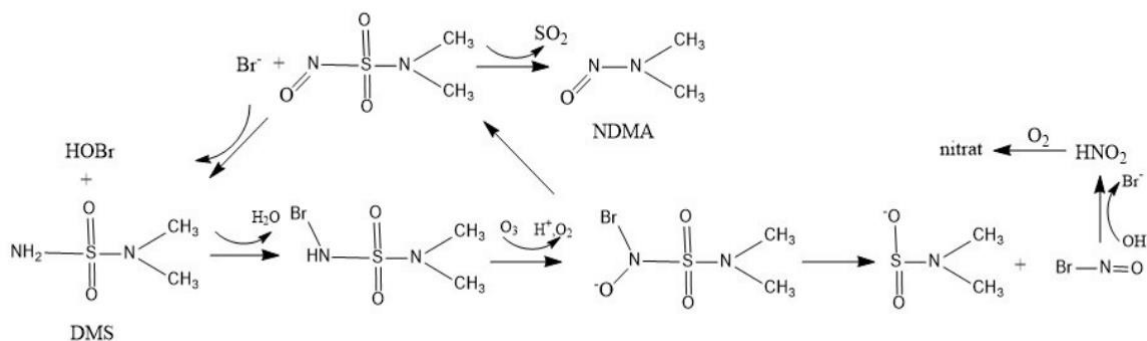
Slika 1. Shematski prikaz nukleofilne supstitucije sekundarnog amina i dikloramina [5]

Reakcijom kloramina s DMA nastaje nesimetrični dimetilhidrazin (UDMH) koji se zbog prisustva otopljenog kisika jednostavno oksidira u različite spojeve, među kojima je NDMA [10]. NDMA je uočen kao nusproizvod oksidacije UDMH bakrovim ionom, kalijevim permanganatom, jodatom, vodikovim peroksidom i kisikom. Stvaranje NDMA tijekom oksidacije UDMH najznačajnije je pri neutralnom i visokom pH. Do nedavno se smatralo da se nastajanje NDMA tijekom kloriranja događa nitrozacijskim putem, no istraživanja su pokazala mogućnost stvaranja NDMA kroz UDMH kao intermedijera. Brzina stvaranja UDMH putem ovog procesa raste s pH.

Zbog sporog preliminarnog koraka, ukupna brzina formiranja je izuzetno spora, što rezultira stvaranjem NDMA tijekom razdoblja od nekoliko dana [11].

Dodavanjem klora u vodu najprije nastaju kloramini i klor-organski spojevi, to jest vezani rezidualni klor. Potrebno je svesti količinu kloramina i klorovih organskih spojeva na minimum, što je moguće postizanjem kritične točke kloriranja koja je od iznimne važnosti u procesu kloriranja. Ukoliko ne dođe do postizanja kritične točke, pospješuje se nastajanje *N*-nitrozamina za vrijeme razgradnje kloramina. U kritičnoj točki slobodni rezidualni klor će biti prisutan u obliku hipokloritnog iona te hipokloritne kiseline [5].

Bromidni ion česta je komponenta u tragovima u vodi za piće i otpadnim vodama. Lako se oksidira slobodnim klorom i monokloraminom, iako je brzina reakcije s monokloraminom nekoliko redova veličine niža. Kada se u vodu u kojoj su prisutni bromidi doda hipoklorit u prisutnosti viška amonijaka, lako dolazi do nastajanja bromamina. S obzirom na sličnost kemije bromamina i kloramina i općenito povećanu reaktivnost bromamina u usporedbi s kloraminima, može se uočiti katalitički učinak bromida na stvaranje NDMA. Nusprodukt *N,N*-dimetilsulfamid (DMS) pronađen je u uzorcima podzemnih voda. Ozoniranje HOBr dovodi do nastanka bromida pomoću kojeg se bromira DMS, odnosno njegova primarna aminska skupina, što je prikazano na Slici 2. Daljnjom ozonizacijom nastaje ozonid, koji je intermedijer u reakciji. Naposljetku se uklanja kisik. Katalitički ciklus DMS-a završava eliminacijom bromida uz eliminaciju SO<sub>2</sub> pri čemu nastaje NDMA i bromid [5,11].



Slika 2. Shematski prikaz nastajanja NDMA tijekom ozonizacije [5]



Nitrozacija uključuje stvaranje nitrozil kationa ili sličnih vrsta koje sadrže dušik, tijekom zakiseljavanja nitrita. Nitrozilni kation reagira s aminom, najčešće je to dimetilamin, kako bi nastao NDMA te se reakcija najbrže odvija pri pH 3,4 [11]. . Dodavanje visokih koncentracija nitrita u jezersku vodu koja sadrži dimetilamin rezultira stvaranjem NDMA. U otpadnoj vodi tvornice guma otkriven je NDMA u koncentracijama do 2 mg/L [11].

NDMA otkriven je u pročišćenoj pitkoj vodi iz izvora na koje otpadne vode nisu utjecale ili iz industrijskih izvora, posebno kada je korišten monokloramin za održavanje rezidualnog klora [11].

### 2.2.3. PRISUTNOST *N*-NITROZAMINA U VODI

U Kanadi je 90-ih godina u kloriranoj vodi za piće otkriven NDMA. Naknadnim eksperimentima utvrđeno je da NDMA nije rezultat antropogenih izvora, već dezinfekcije vode, čime je postao prvi nitrozamin identificiran kao dezinfekcijski nusprodukt [9].

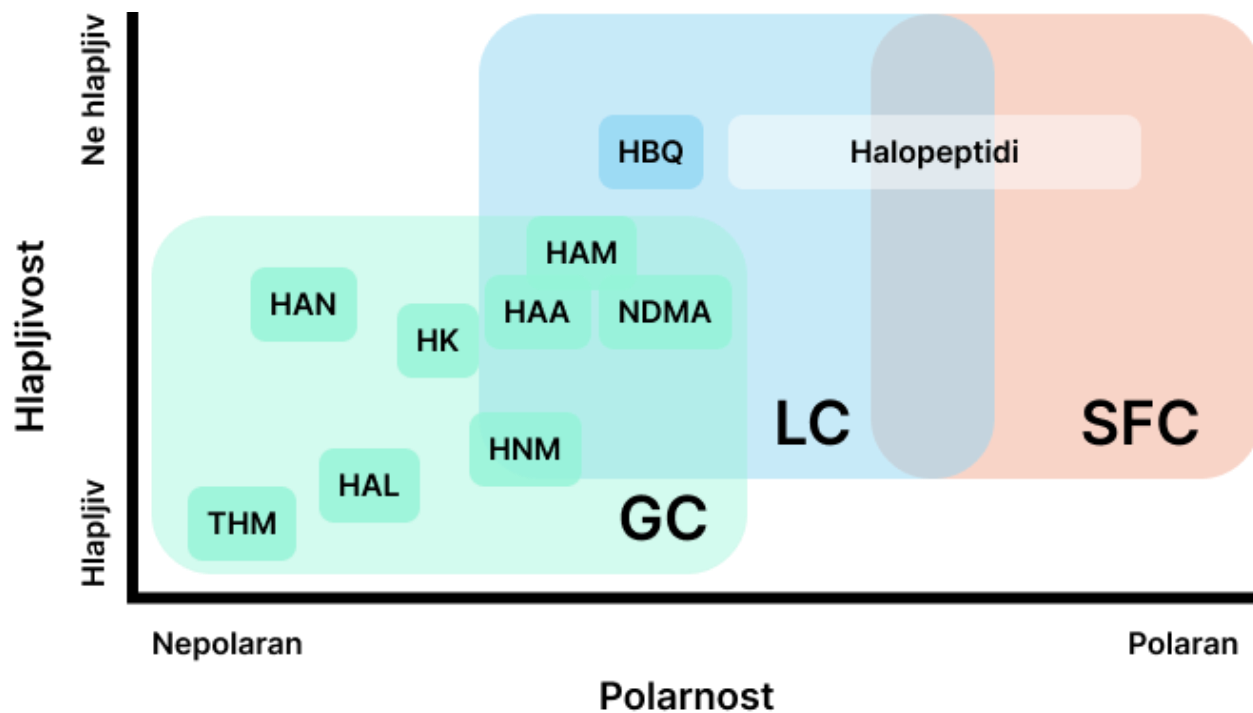
Provedeno je istraživanje postrojenja za proizvodnju pitke vode u Ontariju te se pokazalo da je koncentracija NDMA u tretiranoj vodi iz većine biljaka manja od 5 ng/L [11]. Slične rezultate dobio je i Kalifornijski odjel za zdravstvene usluge za vrijeme istraživanja koncentracije NDMA u sustavima pitke vode provedenog 2001. godine. Rezultati su pokazali da 3 od 20 ispitanih zaliha kloramina sadrže koncentracije NDMA veće od 10 ng/L, dok niti jedna od osam zaliha vode koja je koristila dezinfekciju klorom nije pokazala razine NDMA iznad 5 ng/L [11]. Drugi programi uzorkovanja potvrdili su da većina uzoraka pročišćene vode za piće sadrži manje od 10 ng/L NDMA [11]. Za razliku od rezultata iz postrojenja za pročišćavanje vode za piće, otpadne vode iz konvencionalnih i naprednih postrojenja sadrže relativno visoke koncentracije NDMA. NDMA često je prisutan u otpadnim vodama prije kloriranja. Kao rezultat procesa uklanjanja koji se odvijaju tijekom sekundarne obrade, koncentracije NDMA u nekloriranom sekundarnom efluentu često su manje od 20 ng/L, iako industrijski dodaci mogu dovesti do velikih skokova u koncentracijama NDMA u influentu i efluentu. Kloriranje sekundarnog efluenta otpadnih voda obično rezultira stvaranjem između 20 i 100 ng/L NDMA. U skladu s mehanizmom međuprodukta UDMH, nitrifikacija otpadne vode radi potpunog uklanjanja amonijaka prije dodavanja hipoklorita smanjuje stvaranje NDMA za otprilike jedan red veličine

[11]. U vodi, nitrozamini izloženi sunčevoj svjetlosti brzo fotoliziraju u amino radikale i dušikov oksid [6].

Ljudi su sve više izloženi kancerogenim učincima *N*-nitrozamina koji se nalaze svugdje u okolišu. Središnje njemačko tijelo za zaštitu okoliša (engl. *German Federal Environmental Agency*, UBA) preporuča da u vodi za piće koncentracija NDMA ne prelazi 10 ng/L [5]. Dopuštena koncentracija *N*-nitrozamina u vodi u Hrvatskoj nije propisana zakonom. USEPA je 2016. godine sastavila popis maksimalno dopuštenih koncentracija *N*-nitrozamina, prema procjeni rizika, u vodi za piće. Koncentracije bi trebale iznositi 0,6 ng/L za NDMA, 30 ng/L za NDBA, 0,4 ng/L za NDEA, 3 ng/L za NMEA, 7 ng/L za NDPA te 2 ng/L za NPYR. Fokus je na šest nitrozamina za koje je napravljena procjena rizika te je vidljivo da dopuštene koncentracije ne prelaze 10 ng/L, osim u slučaju NDBA [5].

### 3. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA

Prilikom analize *N*-nitrozamina nije moguće pronaći metodu kojom bi se moglo cjelovito detektirati i kvantificirati sve nitrozamine. Za analizu pojedinih *N*-nitrozamina odabire se selektivna metoda, specifična za svaku vrstu. Na Slici 3. prikazane su separacijske tehnike prikladne za analizu različitih dezinfekcijskih nusprodukata. Postoje razne tehnike detekcije i kvantifikacije, kao što su spektrometrija, polarografija, tekućinska kromatografija (LC), plinska kromatografija (GC) i tankoslojna kromatografija (TLC). Tehnike koje se najčešće koriste prilikom mjerenja koncentracija *N*-nitrozamina su plinska (GC) i tekućinska (LC) kromatografija povezane sa spektrometrom masa (MS) koji služi kao detektor. Takva kombinacija kromatografskih metoda i spektrometrije masa omogućuje detekciju analita koja se temelji na vremenu zadržavanja i specifičnoj fragmentaciji [5].



Slika 3. Hlapljivost i polarnost različitih dezinfekcijskih nusprodukata i njihova kompatibilnost sa separacijskim tehnikama u kombinaciji sa spektrometrijom masa [12]

HAN: haloacetonitril

HBQ: halobenzokinon

HK: haloketone

HAM: haloacetamidi

THM: trihalometani

HAA: halooctene kiseline

HAL: haloacetaldehidi

NDMA: nitrozodimetilamin

HNM: halonitrometani

halopeptidi

### 3.1. PRIPREMA UZORKA

Priprema uzorka korak je u kemijskoj analizi na koji se troši najviše vremena. Glavni zadaci svih tehnika pripreme uzoraka su: ekstrakcija, čišćenje i obogaćivanje. Poželjno je koristiti tehnike mikroekstrakcije koje se temelje na principima zelene kemije. Zelena kemija razmatra način provođenja kemijskih procesa i reakcija uz minimalan utjecaj na okoliš, dovodeći do ekološki učinkovitijih i produktivnijih analitičkih postupaka. Temelji se na integraciji i automatizaciji uzorkovanja, eliminaciji ili redukciji organskih otapala, pri čemu se nastoji smanjiti broj koraka u postupku, odnosno svesti analizu na samo jedan korak. Mikroekstrakcija u jednom koraku omogućava izolaciju i koncentriranje ciljnih analita te uklanjanje interferencija prisutnih u matrici uzorka uz korištenje manjih količina toksičnih organskih otapala [1].

Za istraživanje pojave dezinfekcijskih nusprodukata u vodama, neizostavni je korak prikupljanje uzoraka. Prikupljeni uzorci obično se pohranjuju u tamne staklene boce prethodno očišćene organskim otapalima, kao što su aceton, etanol ili metanol te vodom. Za prikupljanje većih količina uzoraka otpadnih voda koriste se teflonske posude. Uzorci se u što kraćem vremenu dostavljaju u laboratorij u hladnjacima, budući da bi bakterijske aktivnosti mogle promijeniti karakteristike uzorka.. Budući da suspendirane čestice mogu ometati analizu, provodi se filtracija uzorka koristeći membranske filtere veličine pora u rasponu 0,22 -11  $\mu\text{m}$  [3].

Dezinficijensi prisutni u prikupljenim uzorcima, koji s vremenom mijenjaju vrstu i koncentraciju analita, često se neutraliziraju odmah nakon prikupljanja. Sredstva za neutralizaciju aktivnosti dezinficijensa uključujući mravlju kiselinu, askorbinsku kiselinu, amonijev klorid, natrijev tiosulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{NaAsO}_2$  korištena su za uklanjanje zaostalog klora u uzorcima. Amonijev klorid može reagirati s hipokloritnom kiselinom te formirati kloramin, koji inhibira stvaranje trihalometana i halooctenih kiselina. Istraživani su učinci sredstava za neutralizaciju aktivnosti dezinficijensa na stabilnost DBP-a, pokazujući da niti jedno sredstvo nije univerzalno prikladno za sve DBP-e. Tako se, na primjer, preporučuje korištenje askorbinske kiseline i natrijevog sulfita kada je potrebno analizirati organske

(trihalometan, haloctena kiselina i haloacetonitril) i anorganske nusprodukata (bromat, klorat i klorit) [3].

Novi trendovi u kemijskoj analizi DBP-a savjetuju automatizaciju i minijaturizaciju postupka pripreme uzorka te upotrebu manjih količina otapala. Do ispunjenja kriterija došlo je pomoću razvoja mikroekstrakcije čvrstom fazom (engl. *solid phase microextraction*, SPME), mikroekstrakcije tekućom fazom (engl. *liquid phase microextraction*, LPME), ekstrakcije mješalom (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE) i ekstrakcije rotirajućim diskom (engl. *rotating disk sorptive extraction*, RDSE) [1].

Ovisno o agregacijskom stanju izabire se metoda pripreme uzorka. Čvrsti uzorci moraju se homogenizirati i usitniti prije otapanja. Prilikom pripreme uzorka postoje postupci koji su temeljeni na fizikalnim postupcima kao što su destilacija, filtracija, ekstrakcija te postupci koji traže kemijsku pretvorbu [13]. Koncentracije dezinfekcijskih nusprodukata u uzorcima vode obično se nalaze na niskim razinama (mg/L ili čak ng/L), koje su ispod granica detekcije analitičkih instrumenata, stoga je za analizu i detekciju potrebno provesti ekstrakciju, s ciljem izolacije analita iz matice uzorka.

Ključnu ulogu u postizanju pouzdanog određivanja koncentracije nitrozamina igra ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase extraction*, SPE). Prije ekstrakcije, uzorci se obično zakiseljavaju korištenjem klorovodične kiseline, mravlje kiseline ili sumporne kiseline. U svrhu koncentriranja, tj. izolacije nitrozamina iz uzoraka vode primjenjuju se tehnike ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE), SPME te SPE. Postupci pripreme uzorka, kao što su ekstrakcija i koncentriranje, ključni su da bi se osigurala točnost mjerenja [3, 9].

LLE tradicionalna je metoda ekstrakcije koja zahtjeva velike količine otapala. LLE nije prikladna za pripremu uzoraka za praćenje dezinfekcijskih nusprodukata u tragovima te zahtjeva puno vremena, potrebne su velike količine organskog otapala i može doći do stvaranja emulzije tijekom ekstrakcije. Također su za neke analite zabilježena niska iskorištenja. U istraživanjima koja se bave određivanjem nitrozamina, LLE je zamijenjena učinkovitijom SPE metodom [3]. Za pripremu uzoraka nitrozamina za kromatografsku analizu najčešće se poseže za SPE tehnikom. Cijeli postupak SPE sastoji se od četiri koraka: kondicioniranje, zadržavanje,

ispiranje i eluiranje. Za ekstrakciju se koriste različiti SPE sorbensi od kojih je aktivni ugljen, zbog sposobnosti zadržavanja NDMA, najpogodniji za analizu nitrozamina [1, 9]. Važno je pravilno izabrati sorbens kako bi se mogli izolirati različiti analiti iz složenih uzoraka. Moguće je da se, tijekom ekstrakcije, određivani sastojak slabije veže ili izgubi za vrijeme propuštanja uzorka, a može se desiti i jako čvrsto vezanje analita za sorbens [13]. SPME je tehnika koja koristi silikatno vlakno obloženo materijalima za simultanu adsorpciju i koncentraciju analita iz uzorka [3]. SPME koristi manje otapala od LLE te manju količinu sorbensa u odnosu na SPE [9].

### 3.2. TEORIJA KROMATOGRAFIJE

Kromatografija je separacijska tehnika u kojoj se dijelovi smjese (sastojci) raspodjeljuju između nepokretne i pokretne faze. Pokretna faza ili eluens giba se u određenom smjeru. Kromatografski sustav čine pokretna i nepokretna faza te ispitivana tvar (analit) koja je u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze tijekom kromatografskog procesa. Narušavanje ravnotežnog sustava uzrokuje putovanje skupine molekula, odnosno ispitivane tvari u smjeru gibanja pokretne faze. Da bi došlo do razlučivanja sastojaka nepokretna faza mora biti odabrana tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, odnosno da su različiti sastojci ispitivane smjese različito dugo vezani uz nju [13].

S obzirom na prirodu ravnože kromatografske tehnike dijele se na [13]:

1. adsorpcijsku kromatografiju (pokretna faza je kapljevina ili plin, a nepokretna faza je čvrsta)
2. ionsku kromatografiju (ioni nepokretne faze izmjenjuju se s ionima analiziranog spoja)
3. razdjelnu kromatografiju (obje faze su kapljevite)
4. afinitetnu kromatografiju (na površini nepokretne faze dolazi do interakcija molekula s ligandom),
5. kromatografiju isključenjem (nepokretna faza je materijal s porama, a tvari se odjeljuju zbog razlike u obujmu i molekulskoj masi)

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti i na temelju sastava pokretne faze:

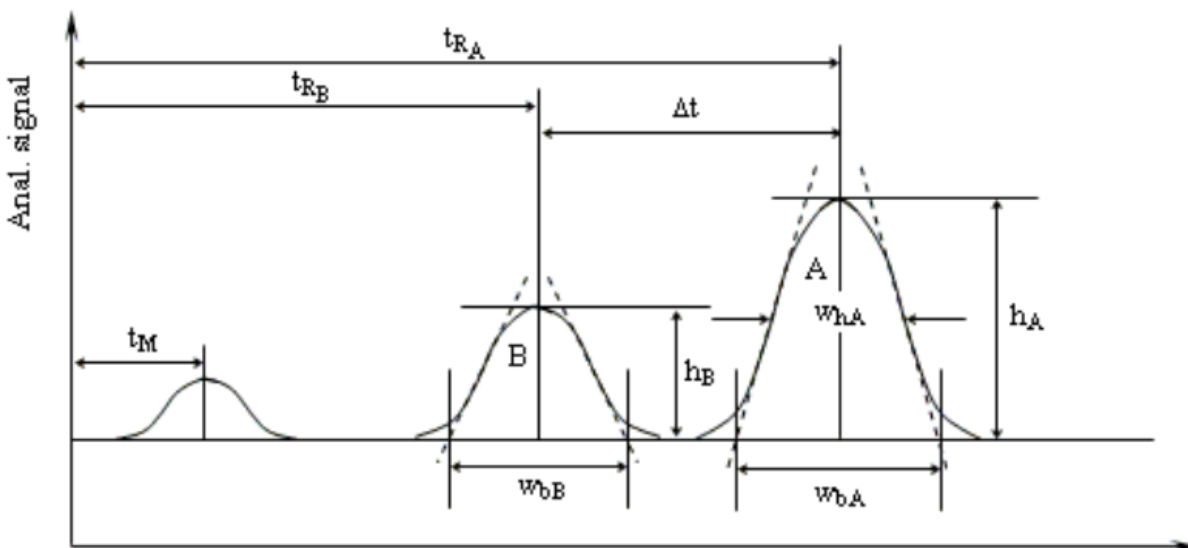
1. tekućinska kromatografija (pokretna faza je kapljevina male viskoznosti)
2. plinska kromatografija (inertni plin je pokretna faza)
3. fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (kapljevina iznad svojeg kritičnog tlaka i temperature je pokretna faza)

Nepokretna faza može biti čvrsta ili tekuća. S obzirom na oblik nepokretne faze razlikuju se: kromatografija u stupcu (nepokretna faza gusto je pakirana u kromatografskome stupcu) te plošna kromatografija (nepokretna faza je tanki homogeni sloj na inertnoj podlozi ili se kao podloga koristi posebno pripremljeni papir). Plošnoj kromatografiji pripada kromatografija na papiru (engl. *paper chromatography*, PC) i tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC). Prilikom analize uzoraka iz okoliša zastupljenija je kromatografija u stupcu.

Kromatogram je grafički prikaz koncentracije analita u eluensu prema volumenu eluensa ili vremenu trajanja analize, odnosno zapis analitičkog signala nakon procesa razdvajanja. Prema načinu razvijanja razlikuju se diferencijalni i plošni kromatogrami. Diferencijalni



kromatogrami dobit će se kromatografijom u stupcu. Sastojci se, zbog interakcija s nepokretnom fazom, detektiraju u različitim vremenima, iako prelaze isti put. Općeniti prikaz kromatograma prikazan je na Slici 4. Određivanje faktora zadržavanja u plošnoj kromatografiji temelj je za identifikaciju razlučenih sastojaka.  $R_F$  vrijednost omjer je puta koje prijeđe ispitivana tvar i puta koje prijeđe otapalo. Vrijeme zadržavanja,  $t_R$ , vrijeme je između trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva, određuje se u kromatografiji u stupcu. Zadržano vrijeme,  $t_M$ , je vrijeme koje tvar provede u pokretnoj fazi, odnosno vrijeme koje je potrebno da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu [13].



Slika 4. Kromatogram smjese sastojaka A i B [13]

$t_{RA}$ -vrijeme zadržavanja sastojka A,  $t_{RB}$ -vrijeme zadržavanja sastojka B,  $\Delta t$ - razlika u vremenu zadržavanja sastojaka A i B,  $t_M$ -vrijeme zadržavanja mobilne faze,  $h_A$ - visina krivulje sastojka A,  $h_B$ - visina krivulje sastojka B,  $w_{bA}$ - širina krivulje pri baznoj liniji sastojka A,  $w_{bB}$ - širina krivulje pri baznoj liniji sastojka B,  $w_{hA}$ - širina krivulje na polovici visine

Svaki dobar detektor karakteriziran je visokom osjetljivošću, širokim dinamičkim rasponom linearnosti, niskom razinom šuma, malim mrtvim volumenom protočne ćelije, bez obzira na vrstu detekcije koja se koristi. Na osjetljivost detektora izravno utječe šum. Detektori mogu mjeriti male mase i volumene uzorka [14]. U plinskoj kromatografiji detektori se prema vremenu odgovora mogu podijeliti na integralni i diferencijalni detektor. Uobičajeno se u kromatografskoj analizi koriste diferencijalni detektori kao što su fotometrijski detektor plamena, detektor toplinske vodljivosti, detektor zahvata elektrona, detektor toplinskih iona te detektor plamena vodika. Detektor zahvata elektrona (engl. *electron capture detector*, ECD) kao radioaktivni izvor plina nosača koristi radioizotop. Slobodni elektroni, utjecajem električnog polja,

putuju prema pozitivnom polu. ECD se koristi za analizu tragova elektronegativnih komponenata, odnosno organskih spojeva (npr. spojevi koji sadrže cijanid, fosfor, sumpor, halogene). Elektrofilne komponente hvataju elektrone te time smanjuju struju. ECD detektori učestalo se koriste zbog visoke osjetljivosti [15].

Spektrometar masa (engl. *mass spectrometry*, MS) temelji se na mjerenju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Osim kromatograma, povezivanjem kromatografije s MS detektorom daje i spektar masa i na taj način pruža informacije o strukturi spoja [15]. To osobito vrijedi kada se koristi tandemski spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) jer pruža mogućnost praćenja fragmentacije molekule ispitivanog spoja. Upotrebom MS/MS detekcije moguće je analizirati sastojke smjese bez njihovog potpunog kromatografskog odjeljivanja [13].

### 3.3. ANALIZA NITROZAMINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) koristi se za detekciju i kvantifikaciju nastalih nusprodukata koji su hlapljivi ili poluhlapljivi. Za neke klase spojeve, prije GC analize, provodi se derivatizacija kako bi se omogućilo njihovo određivanje. Kemijska derivatizacija potrebna je za polarne, termički nestabilne ili izrazito hidrofilne analite [16]. Na taj način moguće je smanjiti njihovu granicu detekcije te poboljšati učinkovitost ekstrakcije. Kloroformijat koristi se kao sredstvo za derivatizaciju pomoću kojeg je moguće izravno odrediti visoko polarne dezinfekcijske nusprodukte. Prednost ovog sredstva je mogućnost istovremenog reagiranja s hidroksilnim, karboksilnim i amino skupinama, pri čemu nastaju višestruko supstituirani derivati [3].

Detektori koji se najčešće koriste za GC analizu su ECD i spektrometar masa (MS). ECD je detektor visoke osjetljivosti i niske cijene te se koristi za kvantifikaciju dezinfekcijskih nusprodukata. Nepoznati dezinfekcijski nusprodukti mogu interferirati s ciljanim analitima jer ECD nije selektivan. Zbog toga se preferira spajanje MS detektora na GC [16]. Metode analize nitrozamina razvijene su korištenjem GC-a u sprezi s MS. Popularnost GC-MS uglavnom je posljedica visoke osjetljivosti i selektivnosti. Ova metoda je izvrsna za detekciju poluhlapljivih (npr. NDMA) i termički stabilnih nitrozamina u pitkoj vodi [9].

Najpopularnija ionizacijska tehnika za GC-MS analizu je ionizacija elektronima (engl. *electron ionization*, EI), koja koristi standardnu energiju ionizacije (70 eV) te daje karakteristične

uzorke fragmentacije koji se dalje uspoređuju s podacima iz komercijalno dostupnih baza i mogu se koristiti za strukturnu identifikaciju spoja. GC-(EI)-MS metode obično se koriste za određivanje reguliranih i novih dezinfekcijskih nusprodukata. Metoda je korištena za identifikaciju klorofenil acetonitrila, a njegova identifikacija potvrđena je na temelju vremena zadržavanja te fragmentnih iona analita uspoređenih sa standardima [16]. Molekularni ion je, zbog snažne fragmentacije, često odsutan u spektrima masa. Kako bi se dobio molekularni ion, koristi se kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI) koja pruža veću osjetljivost za kvantifikaciju ciljanu analita, kao što su derivatizirane halooctene kiseline [12].

U otpadnim i površinskim vodama detektirani su fenolni kontaminanti, triklosan (antimikrobno sredstvo u proizvodima za higijenu) i bisfenol A (koji se koristi u PVC cijevima). U laboratorijski pripremljenim vodama koje sadrže slobodni klor i jodid ispitivana je kinetika halogeniranja triklosana, bisfenola A i fenola. GC-MS metodom provedena je analiza nastalih nusprodukata i početnih spojeva te su spojevi potvrđeni na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) molekulskih i fragmentiranih iona. Uočeno je kako je kinetika reakcije u prisutnosti jodida tijekom procesa kloriranja značajno brža, nego u njegovoj odsutnosti [3].

Na 37 uzoraka izvorske vode prikupljenih u gradovima u Kini istražena je pojava 17 alifatskih amina. Analiti su derivatizirani s benzensulfonil kloridom i prethodno obrađeni s LLE. GC-MS analizom detektirano je 14 amina i za neke od njih utvrđene su visoke koncentracije. Najučestaliji spoj bio je dimetilamin sa 100% učestalosti detekcije, zatim metilamin i *N*-metiletilamin sa 78% i 70% učestalosti. Provedena su istraživanja kojima je cilj otkrivanje *N*-nitrozamina uz prisutnost izotopa u ciljanim spojevima. Omjer stabilnog izotopa  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  tijekom stvaranja NDMA varira, a omjeri  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i  $^2\text{H}/^1\text{H}$  mogu se smatrati otiscima organskog prekursora. Uspostavljena metoda za analizu koristi spektrometriju masa omjera izotopa spojevu s GC. Korištenjem SPE kao metodom pripreme uzorka moguće je precizno kvantificiranje NDMA u uzorcima [3].

Neki nitrozamini, koji su termički nestabilni ili nehlapljivi, ne mogu se detektirati primjenom GC. Primjerice, u GC injektoru dolazi do raspada *N*-nitrozodifenilamin (NDPhA), zbog njegove termičke nestabilnosti. Za bolje razumijevanje nitrozamina, potrebno je pronaći nove metode pomoću kojih se mogu identificirati ostali nusprodukti dezinfekcije vode za piće [9].

### 3.4. ANALIZA NITROZAMINA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Metode tekućinske kromatografije (engl. *liquid chromatography*, LC) prikladne su za mjerenje termički nestabilnih nusprodukata, budući da se smatra da se tijekom dezinfekcije vode stvaraju nehlapljivi, termički nestabilni spojevi te nitrozamini velike molekulske težine, koji se ne mogu detektirati GC metodama. LC metode moraju biti robusne i osjetljive kako bi se mogli odrediti nitrozamini pri niskim koncentracijama ng/L. U ovu svrhu najčešće se koriste LC uređaji spojeni s MS ili MS/MS detektorom. Tekućinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa (LC-MS) koristi se za analizu nitrozamina. LC-MS tehnike, za razliku od GC-MS, imaju superiornost u određivanju polarnih ili visoko polarnih dezinfekcijskih nusprodukata i nusprodukata visoke molekulske mase. S obzirom da je kod LC-MS tehnike pokretna faza tekućina, njome se može odrediti širi raspon analita u usporedbi s GC-MS tehnikom. Razvoj novih LC-MS tehnika omogućio je izravnu analizu NDPhA i drugih nusprodukata koji sadrže dušik te njihovu identifikaciju i potvrdu kao DBP-a u pitkoj vodi [3, 9]. GC-MS i LC-MS tehnike korištene su za kvantifikaciju NDMA i metadona, koji se koristi za liječenje ovisnosti o heroinu i, kao prekursor, ima visok potencijal za stvaranje NDMA. Veće koncentracije metadona pokazuju veći potencijal za nastajanje NDMA. Tijekom kloraminacije koriste se različite doze kloramina, a metadon koji sadrži tercijarnu aminske skupine formira NDMA s molarnim prinosom koji varira od 23% do 70%. Rezultati analiza su pokazali da upotreba metadona od strane pacijenata može povećati rizik od raka za korisnike javnih sustava opskrbe pitkom vodom [3].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) s UV detektorom (HPLC-UV) korištena je za praćenje visoko kancerogenog *N*-nitrozodimetilamina te je u njegovom stvaranju iz prekursora otkrivena uloga dikloramina. Kromatografske kolone punjene nepolarnom nepokretnom fazom (kromatografija obrnute faze, engl. *reverse phase liquid chromatography*, RPLC) i ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) najčešće su korištene tehnike kromatografije odnosno ionizacije [16]. RP nepokretna faza učinkovite su u odvajanju nepolarnih i niskopolarnih dezinfekcijskih nusprodukata. Na taj se način dobro odvajaju haloacetene kiseline (HAA), haloacetamini (HAM) te nitrozodimetilamini (NDMA). Ove skupine spojeva dobro kompatibilne su s ESI, budući da je

ESI tehnika koja je korisna za male polarne molekule, ali je manje učinkovita u ionizaciji velikih ili nepolarnih spojeva. [12].

Praćenje višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM) koristi se za analite poznatog kemijskog identiteta za koje su dostupni standardi. Koristeći MRM, razvijena je nova HPLC-MS/MS metoda, koja se koristi za istovremeno mjerenje jodiranih aromatskih nusprodukata i jodiranih haloocetnih kiselina. MRM je korišten u analizi različitih skupina novih dezinfekcijskih nusprodukata, uključujući i nitrozamine, halobenzokinone (HBQ), polarne jodirane nusprodukte te nusprodukte izvedene iz antimikrobnih konzervansa. LC-MS/MS metode koriste se za identifikaciju novih dezinfekcijskih nusprodukata. U pitkoj vodi dezinficiranoj klorovim dioksidom identificirana je nova skupina dezinfekcijskih nusprodukata, trihalometanol, korištenjem tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC), odnosno UPLC-MS/MS metodom prekursorskog ionskog skeniranja (engl. *precursor ion scan*, PIS). Metoda selektivno detektira spojeve koji stvaraju bromidne i kloridne fragmente iona putem disocijacije izazvane sudarom [16].

Trostruki kvadrupolni spektrometar masa (engl. *triple-quadrupole*, TQMS ili QqQ MS) primijenje je za analizu nitrozamina u vodi i otpadnim vodama [9]. U Kini je provedeno istraživanje o prisutnosti nitrozamina u dezinficiranoj vodi za piće. Kvadrupolni MS spojen s UPLC korišten je za mjerenje koncentracija devet nitrozamina u različitim izvorskim vodama i s različitim postupcima dezinfekcije. Proveden je MRM način s pozitivnom ESI. Najpoznatiji nitrozamin, NDMA, najčešće se pojavio među devet nitrozamina analiziranih u uzorcima dezinficirane vode [3].

#### 3.4.1. ANALIZA VODE ZA PIĆE [9]

Neophodan korak u kontroli kvalitete vode je analiza nitrozamina prisutnih u vodi za piće. U usporedbi s analizom otpadne vode, analiza pročišćene vode za piće ima prednost u tome što je matrica relativno čista. Korištenje QqQ MS niske razlučivosti s korakom pripreme uzorka dovoljno je za određivanje niskih koncentracija nitrozamina. Prva LC-MS metoda korištena za

analizu nitrozamina u vodi za piće, temeljila se na separaciji primjenom kapilarne kromatografske kolone i detekciji s QqQ MS čime je omogućeno određivanje osam poluhlapljivih nitrozamina, uključujući i NDMA. Ovom metodom prvi put je kao dezinfekcijski nusprodukt u vodi za piće otkriven NDPhA, čime je potvrđeno da termički nestabilni i nehlapljivi nitrozamini također tvore dezinfekcijske nusprodukte.

Različitim procesima dezinfekcije istraživano je stvaranje svih devet nitrozamina, primjenom LC-MS/MS metode. Istraživanje je provedeno prikupljanjem izvorske vode na sedam različitih lokacija u Americi. Voda je dezinficirana s 11 različitih postupaka, odnosno dezinficijensa. Ovisno o korištenom dezinfekcijskom sredstvu variralo je nastajanje nitrozamina, a NDMA je bio najčešće detektiran. Kao odličan primjer može se uzeti NDPhA, koji je na jednoj lokaciji određen u vodi tretiranoj s klorovim dioksidom ili kloraminom, a na drugoj lokaciji određen je u vodi tretiranoj ozonom ili UV zračenjem u kombinaciji s kloriranjem. NDPhA drugi je najčešće detektirani nitrozamin. Pokazalo se da izaziva rak mokraćnog mjehura kod štakora te da je citotoksičan.

*N*-nitrozomorfolin (NMOR) otkriven je na postrojenju za pročišćavanje vode sustava za kloriranje.

UPLC-MS/MS brza je metoda određivanja nitrozamina, konkretno NDMA u vodi za piće. Prije analize, u svrhu izolacije NDMA iz vode, provedena je ekstrakcija čvrstom fazom s aktivnim ugljenom kao sorbensom. Uzorci su zatim analizirani na UPLC-MS/MS uređaju te je utvrđena granica detekcije NDMA od 1,0 ng/L, a analiza je trajala kraće od 6,5 minuta. U uzorcima tretirane vode za piće otkriveno je do 2,8 ng/L NDMA, dok je u uzorcima sirove vode otkriveno i do 4,3 ng/L. NDMA je češće detektiran iznad granica detekcije u sirovoj vodi, nego u vodi za piće.

### 3.4.2. ANALIZA OTPADNIH VODA

Budući da su koncentracije potencijalnih prekursora dezinfekcijskih nusprodukata prisutnih u otpadnoj vodi veće u usporedbi s izvorom pitke vode, veće su i koncentracije nitrozamina u pročišćenoj otpadnoj vodi. Analiza nitrozamina u otpadnim vodama, kao i analiza vode za piće, koristi ciljanu analizu za neke nitrozamine ili čak svih devet nitrozamina. Za detekciju šest poluhlapljivih nitrozamina (NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NPYR, NPIP) u otpadnoj vodi razvijena je HPLC-QqQ-MS/MS metoda. Priprema uzoraka provedena je upotrebom različitih SPE sorbensa nakon čega se uzorak frakcionira HPLC-om prije UPLC-QqQ-MS/MS analize. Granice detekcije kretale su se od 2 ng/L za NDMA do 82 ng/L za *N*-nitrozopiperidin (NPIP) u otpadnoj vodi te od 2 ng/L za NDMA do 24 ng/L za NPIP u vodi laboratorijske kvalitete. Metoda je uspješno korištena kako bi se procijenile različite strategije za uklanjanje NDMA za vrijeme analize otpadnih voda. LC-MS/MS metoda također je korištena za procjenu učinkovitosti različitih tehnika uklanjanje nitrozamina iz vode, uključujući reverznu osmozu i fotolizu [9].

#### 4. ZAKLJUČAK

*N*-nitrozamini se formiraju kao nusprodukti dezinfekcije vode. Većina nitrozamina smatra se kancerogenima i mutagenima što stvara veliku zabrinutost te ih je potrebno ukloniti. Cilj njihovog uklanjanja je osigurati stanovništvu pitku vodu visoke kvalitete. Konačno, najvažnije je utvrditi koji su DBP-i odgovorni za učinke na ljudsko zdravlje te ih ukloniti iz vode za piće. Za procjenu učinkovitosti uklanjanja neophodne su analitičke metode koje će omogućiti detekciju i kvantitativno određivanje DBP-a u vodama pri niskim koncentracijama.

Analitičke metode prikladne za analizu *N*-nitrozamina su plinska i tekućinska kromatografija. Tako je GC-MS metoda izvrsna za detekciju NDMA koji je poluhlapljiv i termički stabilan nitrozamin. Nitrozamine, koji su termički nestabilni ili nehlapljivi, nije moguće odrediti primjenom GC. Za njihovu se analizu koristi LC-MS. Metode temeljene na LC-MS/MS najbolje su za otkrivanje i identificiranje novih nitrozaminskih DBP-a, osobito ako imaju veću molekulsku masu ili su nehlapljivi i termički nestabilni.



## 5. LITERATURA

- [1] M. Rosero-Moreano, New Trends in Chemical Analysis of Disinfection By-Products, u S. Kırmusaoglu (ur.), Disinfection, InTech, 2018.
- [2] S. D. Richardson, Disinfection By-Products: Formation and Occurrence in Drinking Water, u J.O. Nriagu (ur.), Encyclopedia of Environmental Health, Elsevier, Amsterdam, 2011, 110-136.
- [3] M. Yang, X. Zhang, Current trends in the analysis and identification of emerging disinfection byproducts, Trends in Environmental Analytical Chemistry, 10 (2016) 24–34.
- [4] A. R. Fernandez-Alba, A. Aguera, Nitrosamines u P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (ur.), Encyclopedia of Analytical Science, 2. izdanje, Amsterdam, Elsevier 10 (2005) 197-202.
- [5] S. Morović, K. Košutić, B. Babić, D. Ašperger, Sudbina N-nitrozamina u okolišu i primjenljivi postupci njihovog uklanjanja iz voda, Hrvatske vode 29 (2021) 175-186.
- [6] USEPA, EPA 810-R-16-009 Šestero godišnji pregled, Dokument za nitrozamine. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/810r16009.pdf> (pristup 8.07.2023.)
- [7] S. S. Hecht, Approaches to Cancer Prevention Based on an Understanding of *N*-nitrosamine Carcinogenesis, Society for Experimental Biology and Medicine, 216 (1997) 181-191.
- [8] I. Pavlinić Prokurica, M. Bevardi, N. Marušić, S. Vidaček, S. Kolarić Kravar, H. Medić, Nitriti i nitrati kao prekursori *N*-nitrozamina u paštetama u konzervi, Znanstveni rad Vol XII (2010) 322-332.
- [9] J. M. Boyd, S. E. Hrudey, S. D. Richardson, X.-F. Li, Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography mass spectrometry analysis of nitrosamines in treated drinking water and wastewater, Trends in Analytical Chemistry, **30** (2011) 1410-1421.

- [10] P. A. Alaba, Y. M. Sani, S. F. Olupinla, W. W. Daud, I. Y. Mohammed, C. C. Enweremadu, O. O. Ayodele, Toward N-nitrosamines free water: Formation, prevention, and removal, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47 (24), 2018, 2448-2489.
- [11] W. A. Mitch, J. O. Sharp, R. Rhodes Trussell, R. L. Valentine, L. Alvarez-Cohen, D. L. Sedlak, N-Nitrosodimethylamine (NDMA) as a Drinking Water Contaminant: A Review, *Environmental Engineering Science*, **20** (2003) 389-404.
- [12] N. J.P. Wawryk, C. B. Craven, L. K. Jmaiff Blackstock, X.-F. Li, New methods for identification of disinfection byproducts of toxicological relevance: Progress and future directions, *Journal of Environmental Sciences* 99 (2021) 151-159.
- [13] M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, *Analitika okoliša, Školska knjiga, Zagreb, 2013, 96-289.*
- [14] T. Bolanča, Š. Ukić, *Ionska kromatografija, sveučilišni udžbenik, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015.*
- [15] URL: <https://antiteck.com/hr/detektor-plinske-kromatografije-2/> (pristup 27.7.2023.)
- [16] M. Yang, H. K. Liberatore, X. Zhang, Current methods for analyzing drinking water disinfection byproducts, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 7 (2019) 98–107.