

Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje odabranih karboksilnih kiselina

Petrin, Damjan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:954399>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Damjan Petrin
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidat **Damjan Petrin**

Predao je izrađen diplomski rad dana: 5. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Sandra Babić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistent, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 8. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Damjan Petrin

RAZVOJ I VALIDACIJA KROMATOGRFSKE METODE ZA
ODREĐIVANJE ODABRANIH KARBOKSILNIH KISELINA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Irena Škorić

Dr. sc. Kristina Tolić Čop

Zagreb, rujan 2023.

Zahvala

Zahvalu upućujem prije svega svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić za svu pomoć i savjete tijekom izrade diplomskog rada.

Isto tako zahvalan sam i prof. dr. sc. Ireni Škorić, kolegici Martini Vuković te asistenticama Mileni Mlakić, mag. appl. chem. i Kristini Tolić Čop, dr. sc. za pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada i međusobnim razgovorima koji su doveli do boljeg razumijevanja ove teme.

Zahvaljujem se i tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći i uvijek dobroj atmosferi tijekom rada u labosu.

Zahvalan sam na svim dobrim ljudima koje sam u ovih 5 godina upoznao. Posebno hvala mom prijatelju dr. sc. Dariu Dabiću na svojoj pomoći i savjetima tijekom studija. Također hvala i mom velikom prijatelju Marku Ružiću, mag. ing. cheming., na svim našim druženjima zadnjih godina.

Hvala mojoj obitelji na svojoj podršci koju sam dobio za vrijeme studiranja, a posebno hvala mojoj djevojci Mirti što je uvijek tu za mene.

Veliku zahvalnost dao bih svom pokojnom djedu Tomislavu Cvitašu što me svojevremeno zainteresirao za kemijom i kasnije pomagao i davao savjete.

Na kraju bih se zahvalio i Bogu što mi je darovao život.

SAŽETAK

Halooctene kiseline su dezinfekcijski nusprodukti koji nastaju kada se sirova voda dezinficira klorom. Djelovanje i štetnost halooctenih kiselina za ljudsko zdravlje još uvijek nije sasvim istraženo i stoga se neprestano razvijaju i optimiraju analitičke metode kojima se nadzire njihova koncentracija u obrađenim vodama. Kroz ovaj rad analizirane su kloroctena, trikloroctena i bromoctena kiselina na način da su derivatizacijom prevedene u estere, nakon čega su snimljeni NMR i UV-Vis spektri derivata, te su potom analizirane kromatografskom HPLC-DAD metodom. Dodatno je provedena i GC-MS analiza trikloroctene i bromoctene kiseline.

NMR analizom potvrđena je uspješna derivatizacija trikloroctene i bromoctene kiseline te djelomična derivatizacija kloroctene kiseline. UV-Vis analizom ustanovljeni su apsorpcijski maksimumi dobivenih derivata. Uz kvalitativnu kromatografsku analizu, razvijena je i validirana HPLC-DAD metoda za kvantitativno određivanje trikloroctene i bromoctene kiseline. Sve ispitane izvedbene karakteristike validacije zadovoljene su obzirom na postavljene kriterije. GC-MS analizom uspješno su detektirane trikloroctena i bromoctena kiselina.

Ključne riječi: dezinfekcijski nusprodukti, halooctene kiseline, derivatizacija, kromatografija, validacija metode

ABSTRACT

Haloacetic acids form as disinfection byproducts when raw water is disinfected with chlorine. Since the harmful and adverse effects of haloacetic acids on human health have not yet been fully investigated, analytical methods are constantly being developed and optimized to monitor their concentration levels in water. In this paper, chloroacetic, trichloroacetic and bromoacetic acids were analyzed in such a way that they were converted into esters by derivatization, after which the NMR and UV-Vis spectra of the derivatives were obtained, and then they were analyzed using the chromatographic HPLC-DAD method. Additionally, GC-MS analysis of trichloroacetic and bromoacetic acids was carried out.

NMR analysis confirmed the successful derivatization of trichloroacetic and bromoacetic acids as well as the partial derivatization of chloroacetic acid. UV-Vis analysis was used to determine the absorption maxima of the derivatives. Along with the qualitative chromatographic analysis, a new method for quantitative analysis of trichloroacetic and bromoacetic acids was developed and validated. All validation characteristics that were examined have met the set criteria. Trichloroacetic and bromoacetic acid were successfully detected with GC-MS analysis.

Key words: disinfection byproducts, haloacetic acids, derivatization, chromatography, method validation

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	1
2.1. DEZINFEKCIJSKI NUSPRODUKTI.....	1
2.2. HALOOCENE KISELINE	2
2.2.1. Određivanje haloocenenih kiselina	3
2.3. NUKLEARNA MAGNETSKA SPEKTROSKOPIJA.....	6
2.4. UV-Vis SPEKTROFOTOMETRIJA.....	10
2.5. KROMATOGRAFIJA.....	11
2.6. VALIDACIJA METODE.....	12
2.7. SPEKTROMETRIJA MASA	13
2.7.1. Plinska kromatografija – spektrometrija masa	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.2. INSTRUMENTI	17
3.2.1. Rotacijski uparivač	17
3.2.2. NMR spektrometar	18
3.2.3. UV-Vis spektrofotometar	18
3.2.4. HPLC-DAD kromatograf	19
3.2.5. GC-MS sustav	20
3.3. METODE RADA	21
3.3.1. Derivatizacija.....	21
3.3.2. HPLC-DAD analiza.....	23
3.3.3. GC-MS analiza.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. NMR ANALIZA	26
4.2. UV-Vis ANALIZA	29
4.3. HPLC-DAD KVALITATIVNA ANALIZA	30
4.4. VALIDACIJA HPLC-DAD METODE.....	33
4.4.1. Linearnost.....	34
4.4.2. Osjetljivost.....	37
4.4.3. Granice detekcije i kvantifikacije	38
4.4.4. Preciznost	39

4.4.5. Istinitost.....	43
4.4.6. Sažetak rezultata.....	44
4.5. GC-MS ANALIZA.....	45
5. ZAKLJUČAK.....	47
6. LITERATURA.....	48
7. PRILOZI.....	51
8. ŽIVOTOPIS.....	57

1. UVOD

Dezinfekcija voda pokazala se neizostavnim korakom u očuvanju ljudskog zdravlja. Mnoge bolesti koje se prenose putem vode na ovaj su način znatno smanjene ili gotovo skroz iskorijenjene. Neke od takvih bolesti su kolera, trbušni tifus ili dizenterija [1,2]. Kao dezinficijensi koriste se jaka oksidacijska sredstva (klor, ozon, vodikov peroksid i dr.) koja učinkovito uklanjaju mikroorganizame iz vode i onemogućavaju njihov razvoj kroz dulji vremenski period [1]. Najčešće korišteni dezinficijens je klor, zbog svoje dostupnosti, niske cijene i vrlo učinkovitog djelovanja. Kloriranjem vode, osim što se znatno umanjuje mikrobiološki rizik, dolazi i do nastajanja dezinfekcijskih nusprodukata koji mogu djelovati štetno na ljudsko zdravlje. Mnoga istraživanja dovela su dezinfekcijske nusprodukte u vezu s toksičnim, mutagenim i kancerogenim djelovanjem na čovjeka. Obzirom na to da postoji veliki broj različitih dezinfekcijskih nusprodukata te da su njihove koncentracije u vodama vrlo niske, pred analitičarima se postavlja težak izazov u smislu razvijanja novih metoda kojima će biti omogućeno njihovo pouzdano određivanje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEZINFEKCIJSKI NUSPRODUKTI

Dezinfekcijski nusprodukti (eng. *disinfection byproducts*, DBPs) su spojevi koji se formiraju kada dezinficijensi na bazi klora (Cl_2 , HOCl , OCl^-) reagiraju s organskom tvari iz sirove vode. Organska tvar nalazi se u gotovo svim površinskim i podzemnim vodama koje se obrađuju i rezultat je trošenja i raspadanja živog materijala (biljaka, životinja itd.) te raznih drugih onečišćenja [3]. Iako je zaštita prirodnih vodenih izvora općenito glavna strategija za dobivanje mikrobiološki ispravne vode, veliki broj izvora zagađen je u toj mjeri da je nužna dodatna obrada vode [4]. Glavni prirodni čimbenici kojima je određena količina organske tvari u sirovoj vodi su topografija, vegetacija, vrsta tla i klimatski uvjeti u kojima se voda nalazi. Isto tako treba imati na umu i da su podzemne vode podložne prirodnoj filtraciji kroz zemlju što na kraju rezultira manjom koncentracijom organske tvari u odnosu na površinske vode [5].

Formiranje dezinfekcijskih nusprodukata ovisi o više različitih faktora kao što su pH, temperatura te količina dodanog klora kao i količina prisutne organske tvari [6]. Nusprodukti koji nastaju mogu biti anorganski, organski nehalogenirani i organski halogenirani [1]. Najveća pažnja posvećuje se organskim halogeniranim nusproduktima obzirom da je dokazano njihovo kancerogeno djelovanje [7-9]. Među dosad preko 600 identificiranih dezinfekcijskih nusprodukata halooctene kiseline su nakon trihalometana drugi najčešći nusprodukti [10].

2.2. HALOOCETENE KISELINE

Halooctene kiseline su etanske (octene) kiseline koje na α -ugljičkovom atomu imaju vezan jedan ili više halogenih elemenata. Kloriranjem vode mogu se formirati kloroctena, dikloroctena i trikloroctena kiselina, a uz prisutnost bromida u vodi može doći do zamjene broma s klorom te tako mogu nastati bromoctena, dibromoctena, tribromoctena, bromkloroctena, bromdikloroctena i dibromkloroctena kiselina (Tablica 1).

Tablica 1. Halooctene kiseline i njihova fizikalno-kemijska svojstva [11,12]

Naziv	Kemijska formula	Molarna masa (g/mol)	pK_a	Vrelište (°C)
Kloroctena kiselina	$CH_2ClCOOH$	94,50	2,65	189
Dikloroctena kiselina	$CHCl_2COOH$	128,94	1,37	194
Trikloroctena kiselina	CCl_3COOH	163,39	0,09	198
Bromoctena kiselina	$CH_2BrCOOH$	138,95	2,73	208
Dibromoctena kiselina	$CHBr_2COOH$	217,84	1,47	233
Tribromoctena kiselina	CBr_3COOH	296,74	0,22	245
Bromkloroctena kiselina	$CHBrClCOOH$	173,39	/	215
Bromdikloroctena kiselina	$CBrCl_2COOH$	207,84	0,05	/
Dibromkloroctena kiselina	$CBr_2ClCOOH$	252,29	0,13	/

Kako se može vidjeti iz Tablice 1, sve halooctene kiseline su jače, odnosno imaju niže pK_a vrijednosti od octene kiseline ($pK_a = 4,76$) [13]. Razlog tome je pojava induktivnog efekta. Drugim riječima halogeni elementi zbog svoje velike elektronegativnosti navlače na sebe

elektronski oblak i kao posljedica toga H⁺ ion smješten na drugom kraju molekule bude slabije vezan i lakše se dijeli. Isto tako sve halooctene kiseline imaju više vrelište u odnosu na octenu kiselinu ($t_v = 118,0 \text{ °C}$) [14] zbog veće polarnosti i jačih intermolekulskih sila.

Toksično i kancerogeno djelovanje halooctenih kiselina do sada je dokazano u *in vivo* studijama provedenim na miševima, dok u novijim istraživanjima autori ukazuju na moguću povezanost halooctenih kiselina s razvojem raka crijeva, raka jetre te štetnim utjecajem na reproduktivni sustav kod ljudi [12]. Zbog sve veće zabrinutosti za učinak na ljudsko zdravlje nadležne zdravstvene organizacije klasificirale su halooctene kiseline obzirom na njihovu kancerogenost i odredile maksimalne dozvoljene vrijednosti njihovih koncentracija u vodi. Tako je primjerice američka agencija za zaštitu okoliša (eng. *Environmental protection agency*, EPA) dikloroocetenu klasificirala kao „vjerojatno kancerogenu“, a trikloroocetenu kao „mogućće kancerogenu“ kiselinu. Maksimalna dozvoljena koncentracija (eng. *maximum contaminant level*, MCL) za zbroj pet halooctenih kiselina (HAA5; kloroocetena, dikloroocetena, trikloroocetena, bromoocetena i dibromoocetena) u vodi prema EPA-i iznosi 60 µg/L [15]. U Europskoj uniji MCL za HAA5 također iznosi 60 µg/L, dok je u Kanadi ta vrijednost nešto viša i iznosi 80 µg/L [1].

2.2.1. Određivanje halooctenih kiselina

Dosad razvijene metode određivanja halooctenih kiselina najčešće uključuju plinsku kromatografiju, dok neke koriste i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti te ionsku kromatografiju. Razlog za to je što plinskom kromatografijom relativno brzo dolazi do razdvajanja sastojaka, troškovi takve analize su niski i lako se može kombinirati s nekom od osjetljivih tehnika detekcije. Osjetljive tehnike detekcije nužne su obzirom da su koncentracije halooctenih kiselina u vodi vrlo niske (reda veličine µg/L). Tako se za bolju detekciju halooctenih kiselina često preporuča i spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) kao kombinacija s nekom od navedenih kromatografskih tehnika. Osim vrlo niskih koncentracija, jaka kiselost svojstva i hidrofilan karakter halooctenih kiselina isto tako predstavljaju problem i dodatno otežavaju njihovo određivanje [12].

Prvi korak kod određivanja halooctenih kiselina podrazumijeva njihovu ekstrakciju iz uzorka vode s manjim volumenom organskog otapala. Prednosti koje se dobivaju takvom ekstrakcijom su zasićenje uzorka analitom i uklanjanje određenog dijela interferencija [10]. Prilikom

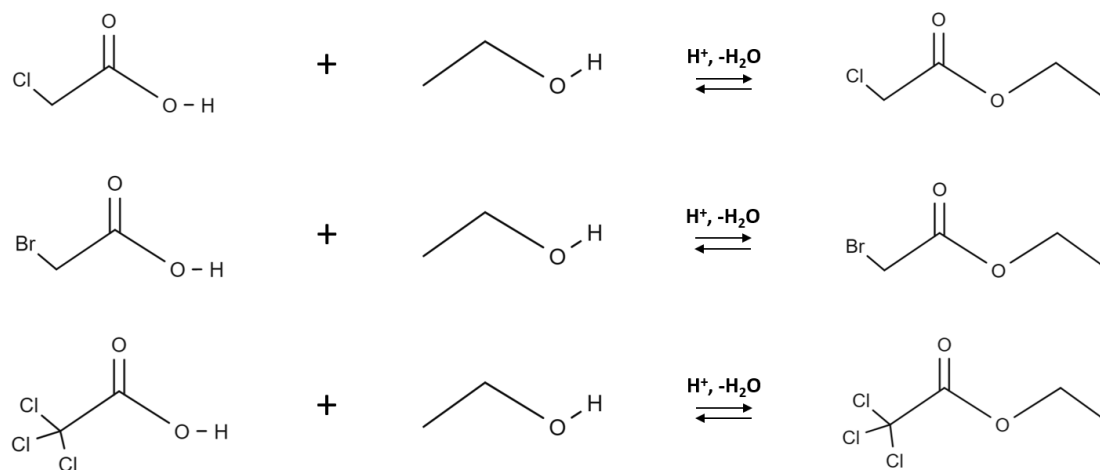
ekstrakcije treba imati na umu pK_a vrijednosti halooctenih kiselina jer različiti oblici kiselina (neutralni i disocirani) imaju drugačije pK_{ow} vrijednosti. Drugim riječima, kada je haloocena kiselina u disociranom obliku ($pH > pK_a$) ima negativnu vrijednost $\log pK_a$, odnosno primarno se otapa u vodenoj fazi, dok neutralni oblik ($pH < pK_a$) ima pozitivnu vrijednost $\log pK_a$, tj. primarno se otapa u oktanolu.

Drugi korak u određivanju halooctenih kiselina je derivatizacija u esterski oblik s odgovarajućim reagensom. Glavni razlog derivatizacije je otklanjanje jakih kiselih svojstava analita te dobivanje nepolarnih, stabilnih i hlapivih spojeva kakvi su poželjni za analizu plinskom kromatografijom. Metode iz EPA-ine 552 serije za određivanje halooctenih kiselina (Tablica 2) koriste diazometan i metanol kao derivatizacijski reagens čime se kiseline prevode u odgovarajuće metilne estere.

Tablica 2. Metode pripreme uzorka za određivanja halooctenih kiselina plinskom kromatografijom prema EPA-i [12]

Naziv metode	Ekstrakcijska tehnika	Derivatizacijski reagens
USEPA Method 552	LLE (s MTBE)	diazometan
USEPA Method 552.1	SPE s ionsko-izmjenjivačkom smolom	metanol
USEPA Method 552.2	LLE (s MTBE)	metanol u kis. mediju
USEPA Method 552.3	LLME (s MTBE ili TAME) uz dodatak kis.	metanol u kis. mediju

Sama derivatizacija odvija se sukladno reakciji Fischerove esterifikacije, odnosno iz kiseline i alkohola u kiselom mediju nastaju ester i voda. Na *Slici 1* shematski je prikazana derivatizacija triju halooctenih kiselina koje su korištene u ovom radu (kloroctena, bromoctena i trikloroctena). Kao derivatizacijski reagens u ovom radu korišten je etanol.



Slika 1. Shema derivatizacije kloroactene, bromoactene i trikloroactene kiseline etanolom

U pokušaju unaprjeđenja dosad razvijenih metoda određivanja haloactenih kiselina plinskom kromatografijom, isprobani su različiti derivatizacijski reagensi kao i različita organska otapala (Tablica 3). Obzirom da je neke haloactene kiseline teško derivatizirati ili su njihovi derivati nestabilni, istražene su i tehnike tekućinske i ionske kromatografije koje ne zahtijevaju prethodnu derivatizaciju. Ionska kromatografija je češće korištena tehnika, no relativno visoke granice detekcije i osjetljivost na interferirajuće anione glavna su prepreka njenoj široj primjeni [10].

Tablica 3. Karakteristike nekih od razvijenih metoda određivanja haloactenih kiselina plinskom kromatografijom

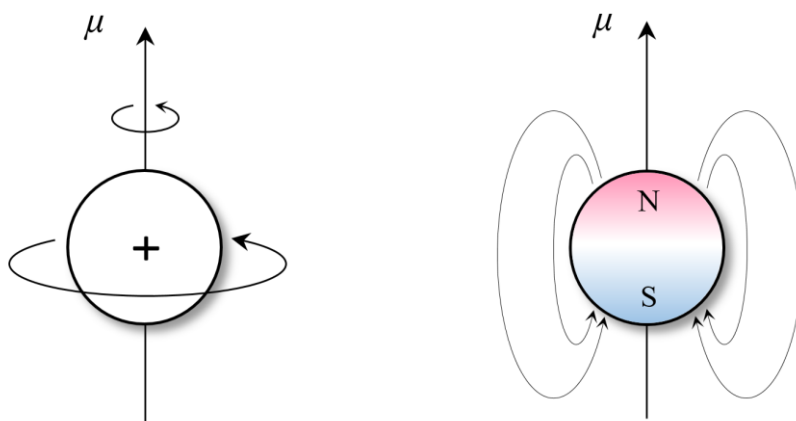
Određivane kiseline	Derivatizacijski reagens	Ekstrakcijska tehnika	Tehnika detekcije	Granica detekcije (µg/L)	Lit.
HAA9	DMS i TBA-HSO ₄	LLME-HS-SPME	MS	0,33 – 1,5	[16]
HAA5	metanol	HF-LPME	ECD	0,1 – 1,8	[17]
Kloroactena	TFE	LLE ili SPE	ECD	3	[18]
HAA9	metanol	SPE-LLME	MS	0,009 – 0,42	[19]
HAA5	metanol	LLE-HS-SPME	ECD	0,02 – 0,7	[20]
HAA9	DMS i TBA-HSO ₄	LLME-HS	MS	0,02-0,4	[21]

* HAA9 se odnosi na svih 9 haloactenih kiselina, dok HAA5 podrazumijeva kloroactenu, dikloroactenu, trikloroactenu, bromoactenu i dibromoactenu kiselinu

2.3. NUKLEARNA MAGNETSKA SPEKTROSKOPIJA

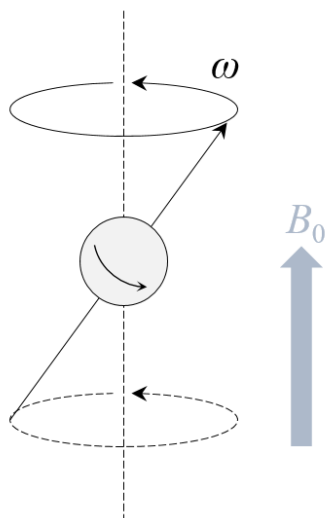
Nuklearna magnetska spektroskopija je spektroskopska tehnika koja se koristi za određivanje struktura spojeva, a temelji se na fenomenu nuklearne magnetske rezonancije.

Atomi koji u svojoj jezgri imaju neparan broj protona i neparan broj neutrona, kao i oni koji imaju neparan broj nukleona (protona i neutrona zajedno) posjeduju svojstvo koje se naziva spin jezgre (eng. *nuclear spin*). Jezgre takvih atoma najlakše je zamisliti kao da se rotiraju oko svoje osi stvarajući pritom magnetsko polje, jer općenito bilo kakvo kretanje naboja u prostoru rezultira stvaranjem magnetskog polja. Drugim riječima, jezgre takvih atoma imaju vlastiti dipolni magnetski moment i ponašaju se kao magneti, tj. dipoli (*Slika 2*).



Slika 2. Rotacija jezgre vodika (lijevo) te prikaz inducirano magnetskog dipola (desno)

Kada se takav magnetski dipol postavi u vanjsko magnetsko polje njegovi polovi počinju se orijentirati tako da se usklade s magnetskim poljem, po istom principu kako se i na kompasu igla pomiče pod djelovanjem Zemljinog magnetskog polja. Jezgre atoma ^1H i ^{13}C imaju neparan broj nukleona, odnosno posjeduju dipolni magnetski moment i pod djelovanjem vanjskog magnetskog polja orijentiraju se na dva moguća načina, u smjeru (stanje niže energije) i obrnuto na smjer djelovanja magnetskog polja (stanje više energije). Primjenom vanjskog magnetskog polja jezgra, osim što se orijentira sukladno magnetskom polju, počinje precesirati (rotirati se) oko vlastite osi određenom kutnom (kružnom) frekvencijom (*Slika 3*). Što je primijenjeno magnetsko polje jače to je veća kutna frekvencija kojom jezgra precesira (*jednadžba 1*) [22].



Slika 3. Precesija jezgre kao posljedica primjene vanjskog magnetskog polja

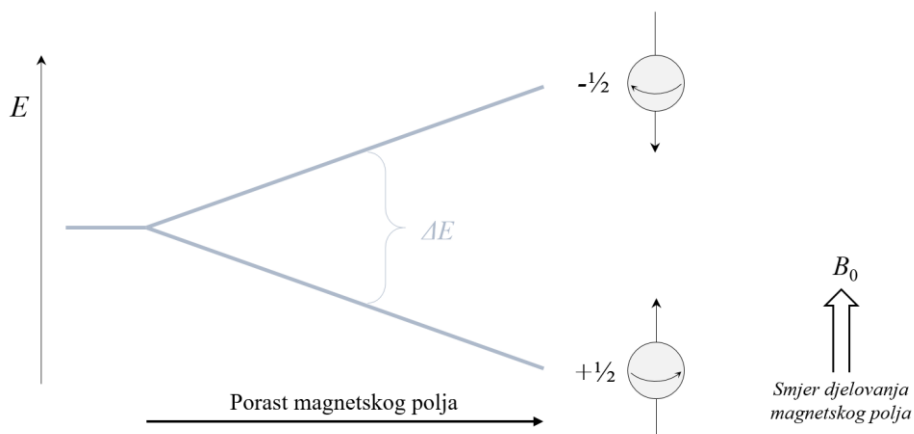
$$\omega = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1)$$

ω – kutna frekvencija jezgre

γ – odnos dipolnog magnetskog momenta jezgre i njene kutne frekvencije

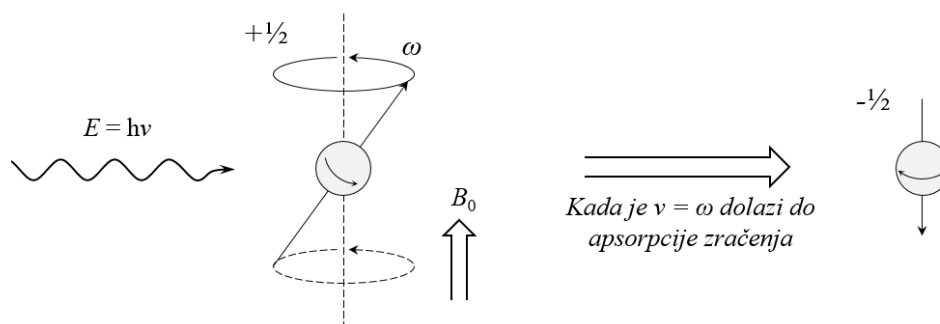
B_0 – vanjsko magnetsko polje

U odsutnosti vanjskog magnetskog polja, sve orijentacije jezgri (dipola) su na jednakom energijskom nivou, odnosno jezgre se mogu slobodno orijentirati u svim smjerovima. Primjenom vanjskog magnetskog polja dolazi do razdvajanja u energijskim nivoima za različite orijentacije jezgre. U slučaju ^1H i ^{13}C atoma, gdje su u prisustvu magnetskog polja moguće dvije orijentacije, jedna orijentacija bit će niže energije (ona u smjeru magnetskog polja) i ona se označava kvantnim brojem spina $+\frac{1}{2}$, dok se orijentacija više energije (ona obrnuto od smjera djelovanja magnetskog polja) označava kvantnim brojem spina $-\frac{1}{2}$ (Slika 4). Razlika u energiji ove dvije orijentacije to je veća što je jače vanjsko magnetsko polje.



Slika 4. Razdvajanje energijskih nivoa dviju različitih orijentacija jezgri ovisno o magnetskom polju

Kada nabijene jezgre u određenoj orijentaciji precesiraju one oko sebe generiraju oscilirajuće električno polje. To električno polje oscilira onom frekvencijom kojom jezgra (koja to polje stvara) precesira. Ukoliko se tako precesirajuće jezgre ozrače elektromagnetskim zračenjem čija električna komponenta oscilira jednakom frekvencijom kojom oscilira električno polje generirano precesijom jezgre, tada ta dva električna polja dolaze u spregu i može doći do prijenosa energije s ulaznog elektromagnetskog zračenja na jezgru. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja jezgra može promijeniti svoj spin i tako prijeći u orijentaciju više energije (Slika 5). U takvim uvjetima kaže se da je jezgra u rezonanciji s dolaznim elektromagnetskim valom.



Slika 5. Promjena orijentacije jezgre u uvjetima rezonancije

Valentni elektroni koji kruže oko jezgre također stvaraju magnetsko polje i smjer takvog magnetskog polja suprotan je smjeru primijenjenog (vanjskog) magnetskog polja. Na taj način jezgre su u određenoj mjeri zasjenjene (eng. *chemical shielding*) od vanjskog magnetskog polja. Koliko će neka jezgra biti zasjenjena ovisi o njenoj elektronskoj okolini. Obzirom da različite jezgre imaju drugačije elektronske gustoće oko sebe, svaka od njih bit će drugačije zasjenjena. Ta različita zasjenjenost jezgri omogućuje nam da određujemo njihovu okolinu i na taj način i strukturu molekula.

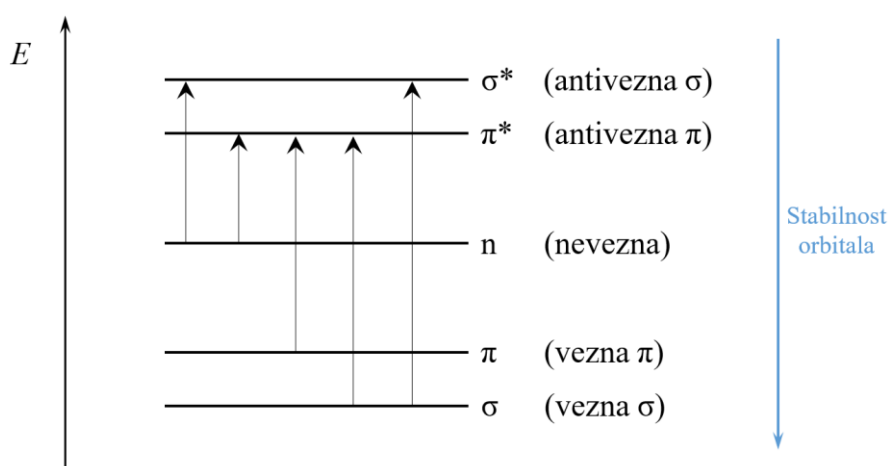
U konstantnom homogenom magnetskom polju različito zasjenjene jezgre precesiraju različitim kutnim frekvencijama (jer drugačije "osjećaju" vanjsko magnetsko polje koje uzrokuje precesiju). Zbog toga svaka od tih jezgri u rezonanciju s dolaznim elektromagnetskim valom dolazi pri nekoj drugoj frekvenciji tog vala. Isto tako, ako se primijeni konstantna frekvencija ulaznog zračenja, onda svaka jezgra u rezonanciju s tim zračenjem dolazi pri nekoj drugoj jakosti magnetskog polja.

Na taj način rade, odnosno radili su tzv. CW-NMR (eng. *continuous wave*, CW) instrumenti. Kod njih se najčešće primijeni konstantna radna frekvencija, magnetsko polje mijenja se linearno i detektorom se određuju jakosti magnetskog polja pri kojima dolazi do rezonancije (apsorpcije zračenja). Druga vrsta NMR instrumenta je tzv. FT-NMR (eng. *fourier transform*, FT). Oni rade na način da se uzorak ozrači kratkotrajnim pulsevima koji sadrže niz različitih frekvencija. Različite jezgre tada istodobno apsorbiraju različite frekvencije i prelaze u stanje više energije. U periodu između pulseva dolazi do relaksacijskog efekta, odnosno jezgre tada prelaze nazad u stanje niže energije emitirajući pritom elektromagnetsko zračenje s različitim frekvencijama. Takav signal, koji sadrži emitirano zračenje različitih frekvencija naziva se FID (eng. *free induction decay*) signal i on se bilježi detektorom. Matematičkom metodom Fourierove transformacije te različite frekvencije se separiraju i na taj se način dobiva spektar.

Obzirom da nemaju svi instrumenti jednaku radnu frekvenciju ili jednaku jakost magnetskog polja, za isti spoj bi do rezonancije dolazilo pri drugačijim vrijednostima frekvencije, tj. magnetskog polja. Kako bi rezultati analiza na različitim instrumentima bili usporedivi mjeri se veličina koja se naziva kemijski pomak (eng. *chemical shift*). Kemijski pomak nam govori koliko se rezonantna frekvencija jezgri u uzorku razlikuje od rezonantne frekvencije standarda, a kao standard se najčešće koristi tetrametilsilan (TMS) jer su vodikove jezgre (protoni) na njegovim metilnim skupinama jače zasjenjene od većine drugih spojeva [22].

2.4. UV-Vis SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija je dio analitičke kemije koji se bavi proučavanjem interakcija elektromagnetskog zračenja s tvari. UV-Vis spektrofotometrijske tehnike koriste područje ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja, odnosno područje od 190 – 800 nm. Energije tih valnih duljina imaju sposobnost pobuđivanja molekula iz osnovnog u pobuđeno stanje, odnosno uzrokuju elektronske prijelaze unutar molekula. Takvi prijelazi odnose se na prijelaz elektrona iz veznih u antivezne molekulske orbitale (*Slika 6*) i to najčešće iz najviše popunjene molekulske orbitale (eng. *highest occupied molecular orbital*, HOMO) u najnižu nepopunjenu (eng. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) [22].



Slika 6. Energijske razine elektrona i mogući elektronski prijelazi

Do apsorpcije UV-Vis zračenja dolazi onda kada se energija fotona izjednači s razlikom energija elektrona u nižem i višem (pobuđenom) stanju, a razlike u energijskim razinama elektrona određene su nabojem jezgri atoma koji te elektrone drže u vezi (u molekulskim orbitalama). Drugim riječima, apsorpcijska svojstva molekula nisu određena samim elektronima, već grupom atoma koji sudjeluju u stvaranju molekulskih orbitala [22]. Grupe koje mogu apsorbirati UV-Vis zračenje (energije valnih duljina 190 – 800 nm) nazivaju se kromofori. Neke uobičajene kromoforne grupe su -C=C- (nezasićene C-C veze), -NO_2 (nitro), -COOH (karboksilne), -C=O (karbonilne), -COOR- (esterske) itd. Obzirom da su orbitalne strukture molekula različite, svaka molekula apsorbira energiju (ili više njih) točno određene valne duljine i na taj način daje apsorpcijski spektar karakterističan samo za tu molekulu.

Na UV-Vis spektrima estera obično se pojavljuju dva maksimuma. Jedan apsorpcijski maksimum ukazuje na prijelaz π elektrona u C=O vezi, i to iz π vezne u π antiveznu orbitalu ($\lambda < 200$ nm). Drugi maksimum nešto niže energije posljedica je prijelaza elektrona iz slobodnog elektronskog para na kisikovom atomu, odnosno prijelaza iz nevezne u π antiveznu orbitalu ($\lambda > 200$ nm) [23].

Intenziteti apsorpcijskih maksimuma dobivenih na spektru izravno su proporcionalni koncentraciji grupa (molekula) koje na toj valnoj duljini apsorbiraju i takva ovisnost dana je Lambert-Beerovim zakonom (*jednadžba 2*). Na taj način nam UV-Vis analiza, osim kvalitativnog, omogućuje i kvantitativno određivanje analita.

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

A – apsorbancija

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

c – množinska koncentracija (mol L^{-1})

l – duljina puta zraka kroz uzorak (cm)

2.5. KROMATOLOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci uzorka raspodjeljuju između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Razdvajanje sastojaka temelji se na njihovim različitim dinamičkim ravnotežama između pokretne i nepokretne faze. Pokretna faza može biti plin, tekućina ili superkritični fluid i kreće se kroz ili uzduž nepokretne faze. Nepokretna faza može biti čvrsta, kapljevita ili u obliku gela i ima glavnu ulogu u odvajanju sastojaka. Ona se odabire ovisno o vrsti analita, odnosno na način da zadržavanje sastojaka u njoj bude selektivno. Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na više različitih načina kako je i navedeno u *Tablici 4* [24].

Tablica 4. Načini podjele kromatografskih tehnika

Prema vrsti podloge	Kolonska - nepokretna faza nalazi se unutar cijevi (kolone) Plošna - nepokretna faza je ploha ili sloj nanesen na plohu
Obzirom na fizikalno stanje stanje pokretne faze	Plinska kromatografija (eng. <i>gas chromatography</i> , GC) Tekućinska kromatografija (eng. <i>liquid chromatography</i> , LC) Fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima (eng. <i>supercritical fluid chromatography</i> , SFC)
Obzirom na fizikalno stanje obje faze	Plinsko-tekućinska kromatografija (eng. <i>gas-liquid chromatography</i> , GLC) Plinsko-čvrsta kromatografija (eng. <i>gas-solid chromatography</i> , GSC) Tekućinsko-tekućinska kromatografija (eng. <i>liquid-liquid chromatography</i> , LLC) Tekućinsko-čvrsta kromatografija (eng. <i>liquid-solid chromatography</i> , LSC)
Prema mehanizmu razdvajanja	Razdjelna – temelji se na razlici u topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi (kod plinske kromatografije) ili na razlici u topljivosti sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (kod tekućinske kromatografije) Adsorpcijska – razdvajanje se temelji na razlici u afinitetu sastojaka uzorka prema površini adsorbensa Afinitetna – razdvajanje na temelju jedinstvenih bioloških interakcija analita i liganda Ionsko-izmjenjivačka – do razdvajanja sastojaka uzorka dolazi zbog njihove razlike u afinitetu prema ionskoj izmjeni Kromatografija isključenjem – razdvajanje na temelju razlika u veličini i/ili naboju molekula

U tekućinskoj kromatografiji danas se koriste kolone s vrlo sitnim česticama (promjera do nekoliko mikrometara) i visoki ulazni tlakovi [24]. Na taj način povećana je specifična površina nepokretne faze, razdvajanje sastojaka je ubrzano i postignut je visok stupanj razdvajanja. Takva vrsta kromatografije naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) i korištena je u ovom radu.

2.6. VALIDACIJA METODE

Validacija analitičke metode je postupak kojim se provjerava ispravnost metode za određenu namjenu. Provodi se ispitivanjem niza izvedbenih karakteristika metode, nakon čega se rezultat ispitivanja uspoređuje s postavljenim kriterijima prihvatljivosti te se u konačnici izdaje izvještaj o zadovoljavanju kriterija. Validacija metoda nužna je kako bi se osigurala točnost i kvaliteta analitičkih rezultata. Osnovne izvedbene karakteristike validacije su selektivnost

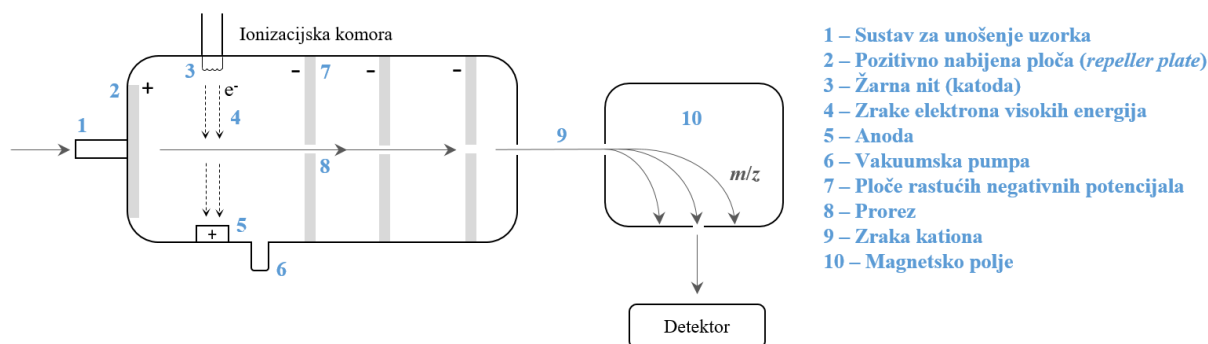
(specifičnost), linearnost, osjetljivost, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost (ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost), istinitost te robusnost.

2.7. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je tehnika kojom se s velikom točnošću određuju relativne atomske i molekulske mase, elementarni i izotopni sastav te strukture molekula. Zahvaljujući visokoj selektivnosti, osjetljivosti i točnosti, spektrometrija masa u novije vrijeme ima sve važniju ulogu u raznim znanstvenim područjima. Neka od područja u kojima se primjenjuje su biomedicina, farmacija, forenzičke znanosti, biotehnologija, u sportu za kontrolu dopinga, kod određivanja omjera izotopa i dr. [25-28].

Princip rada spektrometra masa temelji se na ionizaciji molekula analita tako što se molekule bombardiraju elektronima visoke energije, nakon čega se nastali ioni ubrzavaju u električnom polju te se u konačnici primjenom magnetskog ili električnog polja ti ioni razdvajaju obzirom na m/z omjer (omjer mase i naboja, eng. *mass-to-charge ratio*) i dolaze do detektora [29].

Kako bi se molekule analita ionizirale one se uvode u ionizacijsku komoru pomoću sustava za unošenje (*Slika 7*). Tlak u sustavu za unošenje namješten je tako da je veći od tlaka u ionizacijskoj komori te se stalan tok molekula osigurava propuštanjem kroz malu rupicu (eng. *pinhole*). U ionizacijskoj komori zrake elektrona visokih energija (≈ 70 eV), emitirane pomoću žarne niti zagrijane na nekoliko tisuća Celzijevih stupnjeva, bombardiraju molekule analita izbijajući im elektrone i tvoreći tako pozitivno nabijene molekulske ione. Nastali molekulski kationi se pomoću pozitivno nabijene ploče (eng. *repeller plate*) odbijaju i usmjeravaju prema seriji ploča s rastućim negativnim potencijalom pomoću kojih se ubrzavaju. Molekule koje se u ionizacijskoj komori ne ioniziraju odvođe se pomoću vakuumske pumpe spojene na ionizacijsku komoru. Isto tako, negativno nabijene molekule nastale apsorpcijom elektrona odstranjuju se pomoću pozitivno nabijene ploče.



Slika 7. Princip rada spektrometra masa

Ubrzani kationi propuštaju se kroz jedan ili više proreza i na taj način tvore jednoliku zraku iona. Tako ubrzana zraka iona uvodi se u analizator, odnosno u dio u kojem se kationi pomoću vanjskog magnetskog polja zakreću i odvajaju obzirom na m/z omjer. Što je m/z omjer molekuskog kationa veći to je veći i njegov radijus zakretanja.

Obzirom da je detektor fiksiran, do njega mogu doći samo kationi s točno određenim radijusom zakretanja (Slika 7). Kako bi se mogli detektirati svi nastali molekulski kationi (različitih m/z omjera), kontinuirano se mijenja jakost magnetskog ili električnog polja čime se onda indirektno mijenja i radijus zakretanja molekulskih kationa [29]. Detekcijom svih nastalih molekulskih kationa dobiva se spektar masa analita.

2.7.1. Plinska kromatografija – spektrometrija masa

Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) je tehnika kod koje se sastojci složenih uzoraka prije analize spektrometrom masa razdvajaju pomoću plinske kromatografije. Plinski kromatograf i spektrometar masa vezani su na način da se struja plinovitog uzorka po izlasku iz kromatografske kolone pomoću ventila usmjerava u cjevčicu iz koje određeni dio uzorka dolazi u ionizacijsku komoru spektrometra masa. Na ovaj način spektrometrom masa moguće je detektirati sve komponente koje su prisutne u složenom uzorku. Isto tako, nužno je da se različiti sastojci uzorka prije ulaska u spektrometar masa u potpunosti odvoje kako bi snimljeni spektri masa mogli odgovarati čistim sastojcima [29].

Osim za analize složenih smjesa, GC-MS tehnike se zbog visoke točnosti i osjetljivosti često koriste i za analize uzoraka vrlo niskih koncentracija. Postupno smanjenje cijene GC-MS instrumenata s godinama dovelo je do toga da su takve tehnike danas u vrlo širokoj primjeni. Neka od područja primjena GC-MS tehnika su medicina, farmacija, petrokemija, kemija okoliša, toksikologija itd. [30-33].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Sve kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada dane su u *Tablici 5*.

Tablica 5. Kemikalije korištene tijekom rada

Kemikalija	Kemijska formula	Proizvođač i zemlja	Čistoća
Klorooctena kiselina	CH ₂ ClCOOH	BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo	≥ 99,5 %
Triklorooctena kiselina	CCl ₃ COOH	FERAK, Njemačka	> 99,5 %
Bromooctena kiselina	CH ₂ BrCOOH	Alfa Aesar GmbH&Co KG, Njemačka	98,0 %
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	Lach-Ner, Češka Republika	99,8 %
Sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	Lach-Ner, Češka Republika	96,0 %
Natrijev karbonat	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, SAD	≥ 99,5 %
Kalcijev klorid anhidrid (granulirani)	CaCl ₂	Lach-Ner, Češka Republika	96,0 %
Acetonitril	CH ₃ CN	CARLO ERBA, Njemačka	≥ 99,9 %
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	KEFO d.o.o., Slovenija	96,0 %
Metanol	CH ₃ OH	J. T. Baker, SAD	(Ultra) Gradient HPLC Grade
Acetonitril	CH ₃ CN	Fischer Scientific, SAD	≥ 99,9 %

Etanol i sumporna kiselina korišteni su za derivatizaciju (esterifikaciju) halooctenih kiselina u kiselom mediju. Natrijev karbonat u obliku vodene otopine ($w = 5\%$) korišten je za ispiranje destilata (dobivenih estera), a granulirani kalcijev klorid anhidrid za njihovo sušenje.

Acetonitril (CARLO ERBA) je korišten kao otapalo za snimanje uzoraka na UV-Vis spektrofotometru.

Etanol (KEFO d.o.o.), metanol (J. T. Baker) i acetonitril (Fischer Scientific) korišteni su kao organska otapala u pokretnoj fazi kod analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s DAD detektorom (HPLC-DAD). Acetonitril (Fischer Scientific) je također korišten i kao otapalo za smjesu i pojedinačne uzorke kod pripreme otopina za analizu.

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Rotacijski uparivač

Za uparavanje uzoraka korišten je rotacijski uparivač Buchi Rotavapor R-124, švicarske tvrtke Buchi (*Slika 8*). Uparavanje je provedeno na temperaturi 45 °C u trajanju od 1 sat, s ciljem da se uklone zaostali etanol i voda iz uzoraka nakon što je provedena derivatizacija.



Slika 8. Rotacijski uparivač Buchi Rotavapor R-124 i vodena kupelj Buchi Waterbath B-480

3.2.2. NMR spektrometar

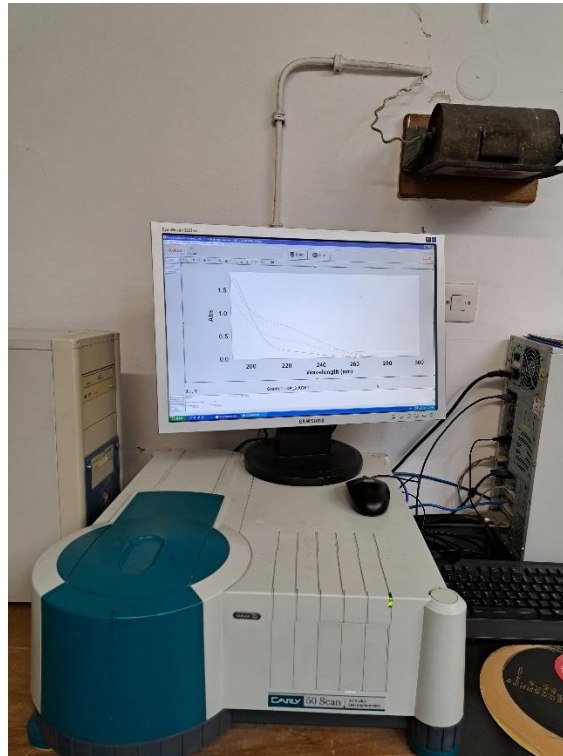
^1H NMR analiza provedena je na instrumentu Bruker Avance 600 MHz (*Slika 9*), američke tvrtke Bruker, na institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Cilj NMR analize uzoraka bio je potvrditi uspješnost derivatizacije kiselina u estere te ustanoviti da li zaostaje etanol i da li s vremenom dolazi do povratne reakcije (hidrolize estera). Za otapanje uzoraka korišten je deuterirani kloroform, a kao standard za snimanje NMR spektara korišten je tetrametilsilan.



Slika 9. NMR spektrometar Bruker Avance 600 MHz [34]

3.2.3. UV-Vis spektrofotometar

Snimanje apsorpcijskih spektara derivata (estera) provedeno je na UV-Vis spektrofotometru Varian Cary 50 (*Slika 10*). Automatskom pipetom otpipetirano je 50 μL uzorka u kvarcnu kivetu te je dodan acetonitril do vrha kivete. Uzorci su snimani u rasponu od 190 – 500 nm. Na početku i između pojedinih uzoraka, kvarcna kiveta ispirana je acetonitrilom po 9 puta. Pomoću snimljenih spektara ustanovljene su valne duljine pri kojima se pojavljuju apsorpcijski maksimumi uzoraka. Ovaj korak nužan je kako bi se ispravno odabrala valna duljina pri kojoj će se dalje provoditi kvantitativno određivanje uzoraka DAD detektorom.



Slika 10. Varian Cary 50 UV-Vis spektrofotometar

3.2.4. HPLC-DAD kromatograf

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti provedena je na HPLC-DAD Agilent 1100 Series kromatografu (Slika 11). Kao kolona korištena je Kinetex C18 kromatografska kolona, tvrtke Phenomenex. Dimenzije kolone su: duljina 150 mm, širina 4,6 mm, veličina čestica 5 μm i veličina pora 100 Å (150 x 4,6 mm, 5 μm). Sama kolona sadrži nosač od silike na koji su vezani nepolarni ugljikovodični lanci s 18 ugljikovih atoma. Obzirom da je pokretna faza bila polarna, a nepokretna nepolarna, u ovom radu provedena je kromatografija obrnutih faza. Kao detektor korišten je DAD detektor, odnosno detektor s nizom dioda, tvrtke Agilent. Takva vrsta detektora odabrana je zbog toga što uzorci u ovom radu posjeduju kromofornu (karbonilnu) skupinu u strukturi i stoga mogu apsorbirati UV zračenje.



Slika 11. HPLC-DAD kromatograf Agilent 1100 Series

3.2.5. GC-MS sustav

Za plinsku kromatografiju sa spektrometrijom masa korišten je plinski kromatograf Varian CP 3800 te spektrometar masa Varian Saturn 2200 (*Slika 12*). Kao kolona korištena je Varian factorFOUR kolona. Kolona je duljine 30 m te unutarnjeg promjera 0.32 mm (30 m x 0.32).

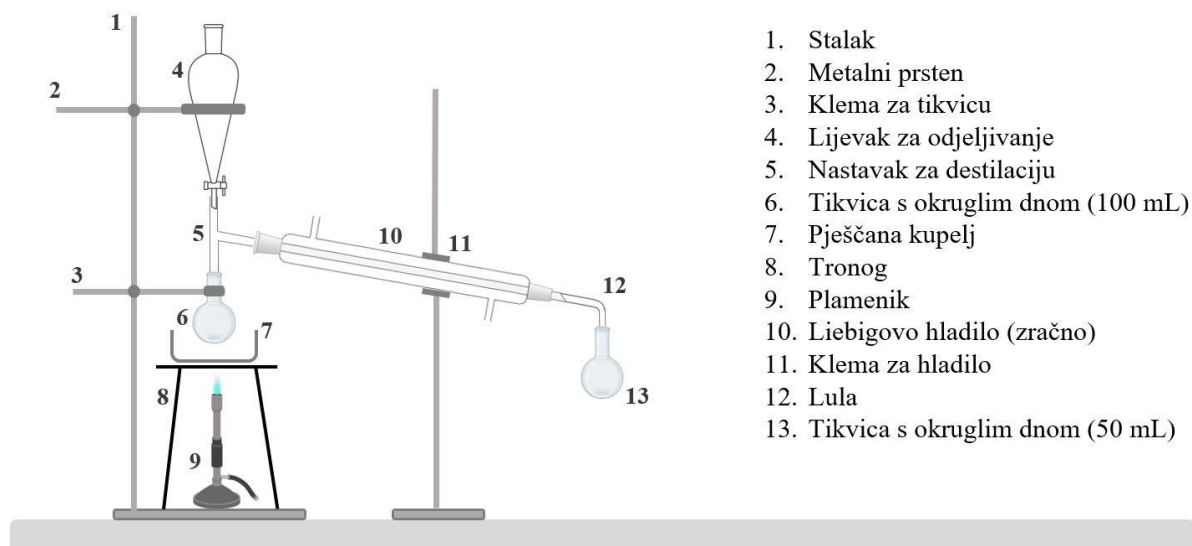


Slika 12. GC-MS sustav Varian CP 3800-Varian Saturn 2200

3.3. METODE RADA

3.3.1. Derivatizacija

Derivatizacija haloocetnih kiselina u estere provedena je pomoću aparature za destilaciju prikazane na *Slici 13*.



Slika 13. Shema aparature za derivatizaciju haloocetnih kiselina

Približno 13 g standarda haloocetne kiseline odvagano je i otopljeno u 13,5 mL etanola te je takva otopina unijeta u lijevak za odjeljivanje. U tikvicu od 100 mL dodana je smjesa od 2,5 mL etanola i 2 mL sumporne kiseline. Tikvica sa smjesom postavljena je u pješčanu kupelj i zagrijava se. Pješčana kupelj korištena je zbog toga što su vrelišta haloocetnih kiselina mnogo viša od vrelišta vode (Tablica 1) te je iz istog razloga korišteno i zračno Liebigovo hladilo za hlađenje.

Kada je temperatura kupelji narasla na oko 200 °C započeto je dokapavanje otopine iz lijevka za odijeljivanje, na način da se brzina dokapavanja uskladila s brzinom kapanja destilata. Nakon što je sva otopina iz lijevka za odijeljivanje ispuštena, destilacija je provedena još otprilike 30 minuta, odnosno dok se u tikvici uronjenoj u kupelj nije počela stvarati smola.

Dobiveni destilat potom je ispran s 10 mL vodene otopine natrijevog karbonata ($w = 5\%$) u novoj tikvici za odijeljivanje (*Slika 14*). Nakon ispiranja odvojena je organska faza u Erlenmeyerovu tikvicu i u nju su dodane 2 žličice bezvodnog kalcijevog klorida. Na *Slici 14* može se vidjeti stvaranje zamućene otopine oko granula kalcijevog klorida kao posljedica

povlačenja molekula vode iz organske faze, u kojima se onda kalcijev klorid otapa. Nakon sušenja kalcijevim kloridom organska faza je profiltrirana naboranim filter papirom i na taj je način dobiven derivatizirani uzorak (ester). Tako dobiven uzorak uparavan je na rotacijskom uparivaču oko 1 sat na temperaturi 45 °C kako bi se do kraja uklonili zaostali etanol i voda.



Slika 14. Ispiranje destilata vodenom otopinom natrijevog karbonata (lijevo) i sušenje organske faze bezvodnim kalcijevim kloridom (desno)

Ovim postupkom pripremljeni su derivatizirani uzorci svih triju haloctenih kiselina; trikloroctene, kloroctene i bromoctene kiseline (Tablica 6). Tijekom eksperimentalnog dijela, uzorci su svo vrijeme čuvani u hladnjaku na 4 °C, u bočicama obloženim parafilmom i aluminijskom folijom.

Tablica 6. Pripremljeni derivatizirani uzorci i njihovi nazivi

Oznaka estera	Ester
DP-1	Etil-trikloracetat
DP-2	Etil-kloracetat
DP-3	Etil-bromacetat

3.3.2. HPLC-DAD analiza

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s DAD detektorom provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza derivatiziranih uzoraka. Obzirom da je NMR analizom utvrđeno da kod estera DP-2 dolazi do povratne reakcije, za njega nije bilo moguće pripremiti radne standardne otopine potrebne za kvantitativno određivanje. Iz tog razloga validacija metode provedena je samo za estere DP-1 i DP-3, dok je kvalitativna analiza provedena sa sva tri estera.

Za kvalitativnu analizu pripremljene su otopine estera na način da je 10 μL derivatiziranih uzoraka DP-1 i DP-3 te 50 μL derivatiziranog uzorka DP-2 otopljeno u 100 mL acetonitrila. Otopina estera DP-2 pripremljena je s 50 μL derivatiziranog uzorka jer je za njega ustanovljeno da nije čisti ester. Uz pojedinačne otopine estera pripremljena je i otopina njihove smjese otapanjem 10 μL DP-1 i DP-3 te 50 μL DP-2 u istih 100 mL acetonitrila (*Slika 15*).



Slika 15. Otopine korištene za kvalitativnu HPLC-DAD analizu

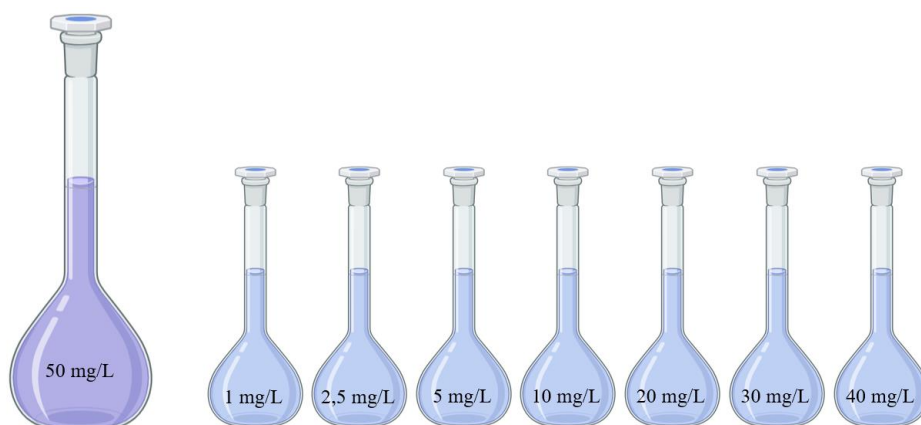
Smjesa estera analizirana je s 3 različita organska otapala (etanol, metanol, acetonitril) u pokretnoj fazi te su za svako otapalo korištena četiri različita omjera; vodeno/organsko = 80/20, 60/40, 40/60 i 20/80. Kao vodeno otapalo korištena je deionizirana (milliQ) voda. Svaka analiza provedena je izokratnom metodom u trajanju od 40 min, s protokom pokretne faze 0,5 mL/min te uz volumen injektiranja 20 μL . Kromatogrami su snimani na valnim duljinama koje odgovaraju apsorpcijskim maksimumima derivatiziranih uzoraka i koje su ustanovljene UV-

Vis analizom. Svi dobiveni kromatogrami na valnoj duljini 218 nm (za koju je dobiven najveći odziv svih triju estera) dani su na *Slikama P1-P12*.

Kao optimalna pokretna faza odabrana je smjesa otapala voda/acetonitril = 40/60 (*Slika P11*). Kvalitativno određivanje (analiza otopina pojedinačnih estera) provedeno je po istoj metodi s time da je vrijeme trajanja analize skraćeno s 40 na 15 minuta.

Za kvantitativnu analizu i validaciju pripremljena je temeljna standardna otopina (TSO) smjese estera DP-1 i DP-3 u odmjernoj tikvici od 100 mL, tako da je masena koncentracija oba estera u otopini iznosila 50 mg/L. Obzirom da su esteri DP-1 i DP-3 u tekućem stanju, za izračun masene koncentracije uzete su literaturne gustoće etil-trikloracetata i etil-bromacetata [35]. Razrjeđenjem temeljne standardne otopine pripremljene su radne standardne otopine (RSO) koncentracija 1, 2,5, 5, 10, 20, 30 i 40 mg/L u tikvicama od 10 mL (*Slika 16*).

Sve analize provedene su izokratnom metodom u trajanju od 15 min, s omjerom otapala voda/acetonitril = 40/60, protokom pokretne faze 0,5 mL/min, uz volumen injektiranja 40 µL te su snimani na valnoj duljini 210 nm.



Slika 16. TSO i RSO korištene za validaciju HPLC-DAD metode

Za određivanje linearnosti, otopina svake koncentracije (1 – 50 mg/L) injektirana je po tri puta. Dobivenim podacima određene su linearnost, osjetljivost, ponovljivost, granica detekcije te granica kvantifikacije.

Nakon toga su za svaki ester odabrane tri koncentracije pomoću kojih je ispitana međupreciznost kroz 3 različita dana te istinitost. Istinitost je iskazana kao iskorištenje i

računata je kao omjer koncentracije dobivene iz jednadžbe pravca za dani odziv te stvarne koncentracije.

Karakteristike linearnosti, osjetljivosti te granica detekcije i kvantifikacije su za oba estera određene pri dvije različite valne duljine, od kojih je jedna 210 nm, a druga ona koja odgovara apsorpcijskom maksimumu za taj ester. Za ester DP-1 navedene karakteristike ispitane su pri 210 i 228 nm, dok su za ester DP-3 ispitane pri 210 i 218 nm.

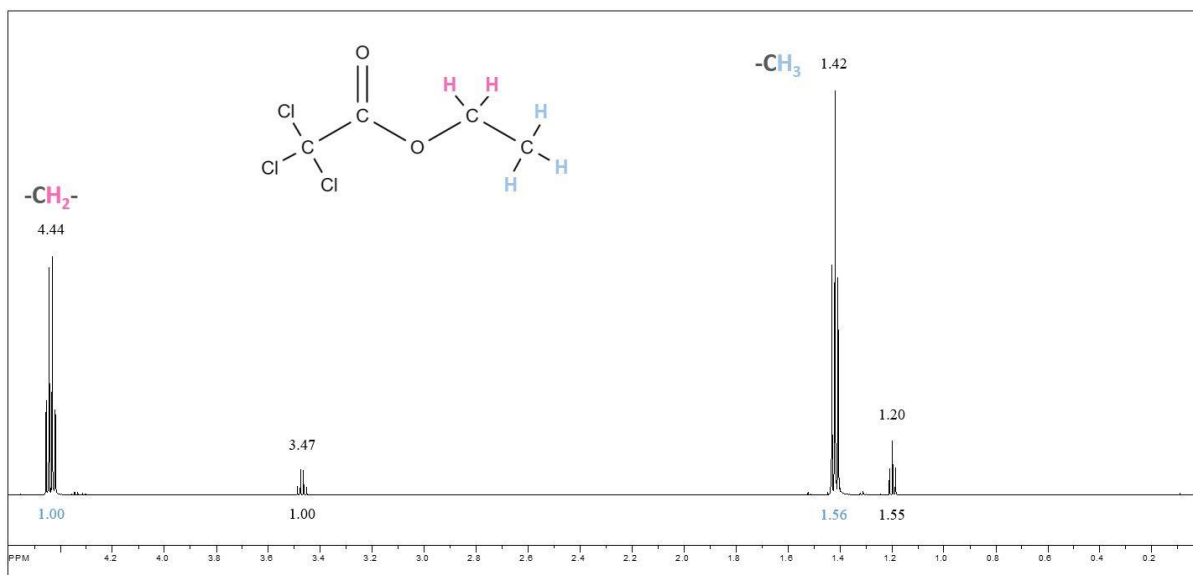
3.3.3. GC-MS analiza

Plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa provedena je kvalitativna analiza estera DP-1 i DP-3. Otopine za analizu pripremljene su otapanjem estera u kloroformu tako da je njihova koncentracija iznosila približno 2 mg/mL. Kao pokretna faza (plin nosioc) korišten je helij čistoće 5.6. ($\geq 99,9996$ %). Protok pokretne faze iznosio je 1 mL/min, volumen injektiranja 10 μ L i vrijeme analize 6 min. Temperaturni režim kolone iznosio je od 110 – 300 °C uz brzinu zagrijavanja 47 °C/min.

4. REZULTATI I RASPRAVA

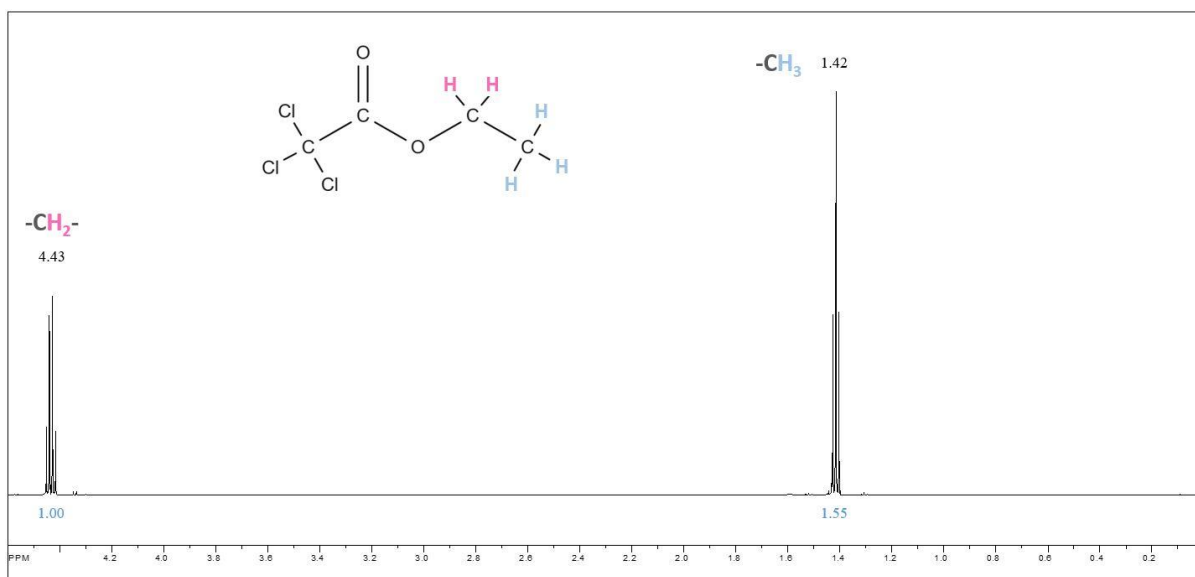
4.1. NMR ANALIZA

^1H NMR spektar derivatiziranog uzorka DP-1 prikazan je na *Slici 17*.



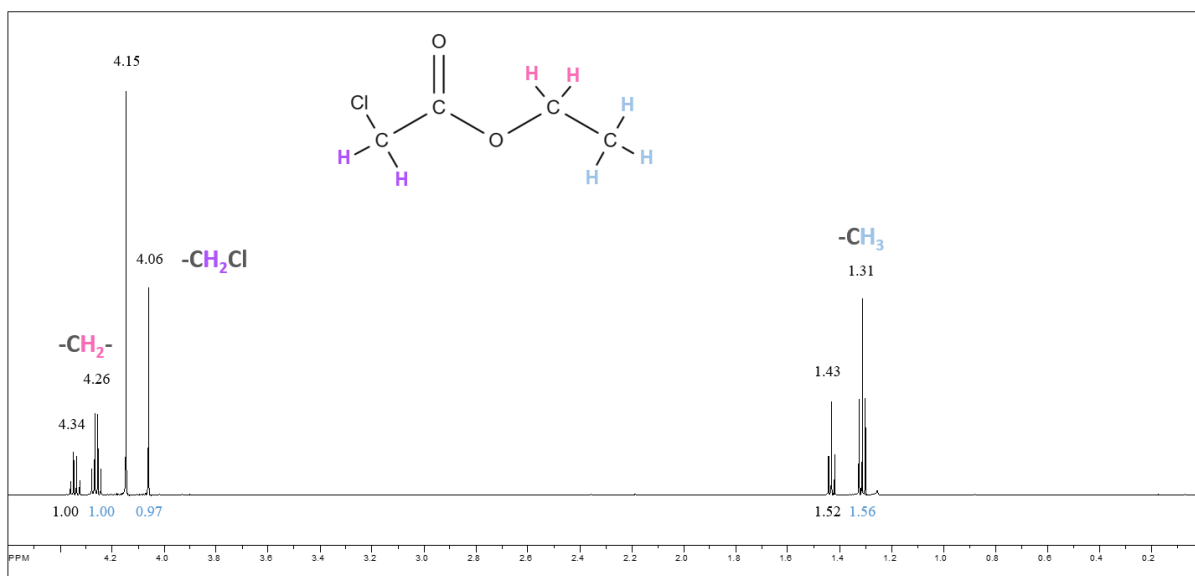
Slika 17. ^1H NMR spektar derivatiziranog uzorka DP-1

Na dobivenom spektru mogu se uočiti četiri različita pika. Triplet na 1,42 ppm ($-\text{CH}_3$) i kvartet na 4,44 ppm ($-\text{CH}_2-$) ukazuju na strukturu etil-trikloracetata, dok triplet na 1,20 ppm ($-\text{CH}_3$) i kvartet na 3,47 ppm ($-\text{CH}_2-$) ukazuju na prisutnost etanola [36]. Nakon što je uočeno zaostajanje etanola, derivatizirani uzorak DP-1 je još jednom uparavan te mu je ponovno snimljen ^1H NMR spektar (*Slika 18*). Na novom spektru može se vidjeti da je dodatnim uparavanjem uspješno uklonjen sav etanol te da je zaostao čisti ester (etil-trikloracetat).



Slika 18. ^1H NMR spektar derivatiziranog uzorka DP-1 nakon dodatnog uparavanja

Spektar derivatiziranog uzorka DP-2 prikazan je na Slici 19.



Slika 19. ^1H NMR spektar derivatiziranog uzorka DP-2

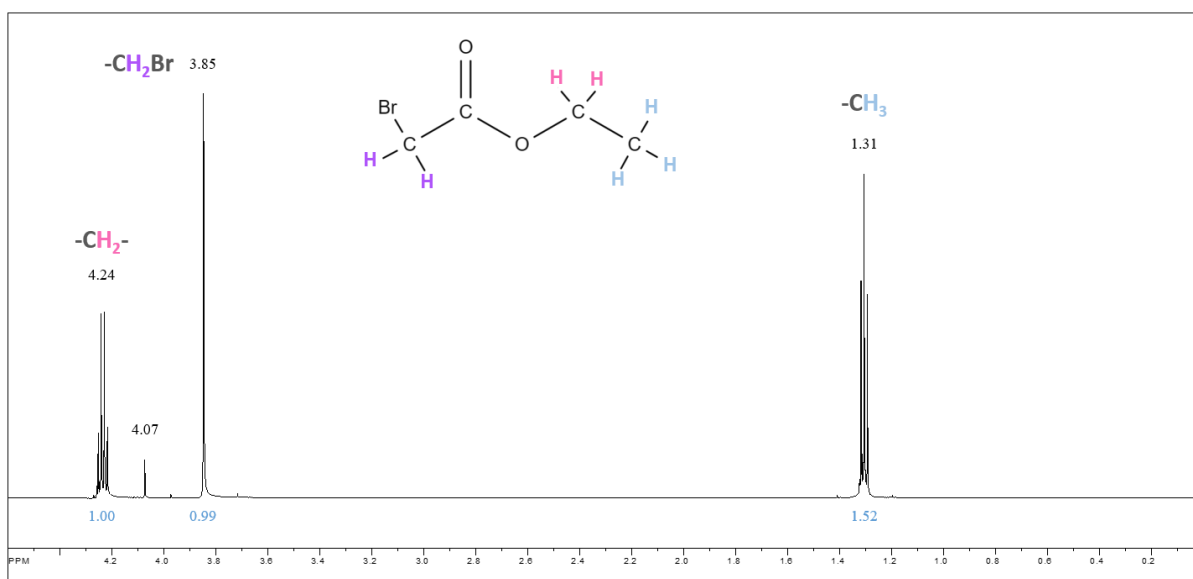
Na dobivenom spektru uočava se 6 različitih pikova. Triplet na 1,31 ppm ($-\text{CH}_3$), singlet na 4,06 ppm ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) i kvartet na 4,26 ppm ($-\text{CH}_2-$) zajedno ukazuju na strukturu etil-kloroacetata. Singlet na 4,15 ppm ukazuje na prisutnost kloroctene kiseline, dok triplet na 1,43 ppm i kvartet

na 4,34 ppm ukazuju na prisutnost etanola [36]. Iz ovakvih rezultata može se zaključiti da je kod uzorka DP-2 nakon derivatizacije došlo do povratne reakcije.

Isto tako dugotrajnim uparavanjem uzorak je uparen do suha, odnosno dok nije zaostala određena količina krutine. Tako dobivena krutina nije se mogla otopiti acetonitrilom, dok je dodatkom vode odmah došlo do otapanja. Ovo opažanje ukazuje nam na to da bi navedena krutina bila kloroctena kiselina te da se otklanjanjem etanola ravnoteža pomicala u smjeru povratne reakcije (nastajanja kiseline).

Također su procijenjeni udjeli kiseline i estera u uzorku, na način da su površine singleta na 4,15 i 4,06 ppm stavljene u omjer. Dobiveni omjer iznosio je 1,62 što nam govori da je u uzorku prisutno približno 62 % kiseline (kloroctene) i 38 % estera (etil-kloracetata).

Spektar derivatiziranog uzorka DP-3 dan je *Slikom 20*.



Slika 20. ^1H NMR spektar derivatiziranog uzorka DP-3

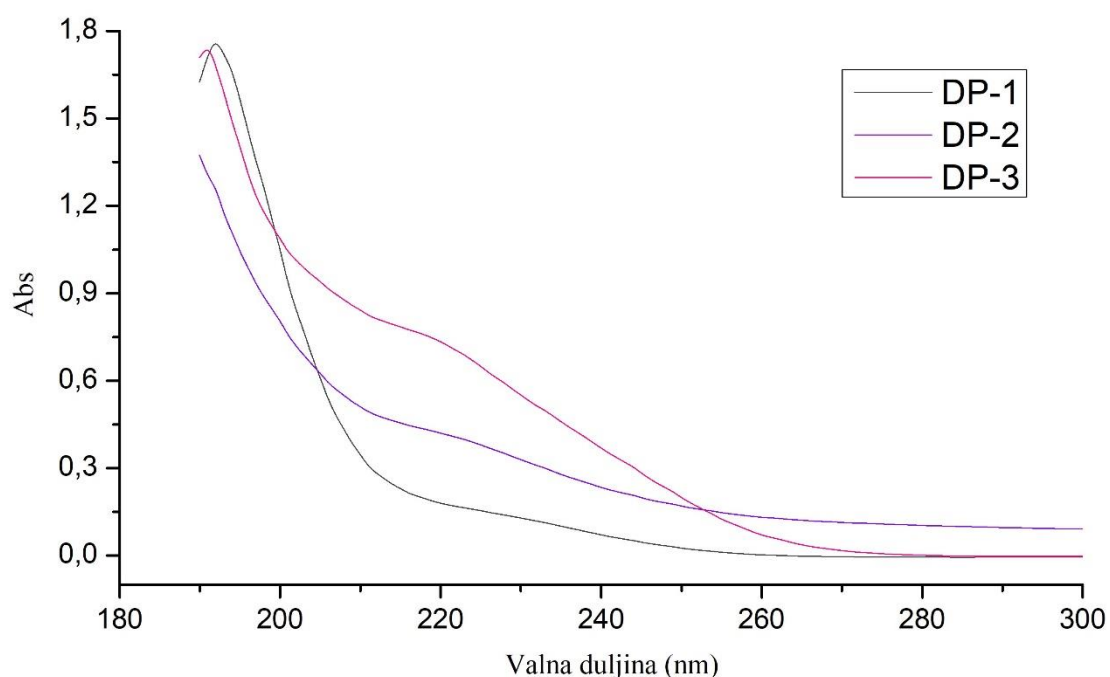
Na spektru se mogu vidjeti triplet na 1,31 ppm ($-\text{CH}_3$), singlet na 3,85 ppm ($-\text{CH}_2\text{Br}$) te kvartet na 4,24 ppm ($-\text{CH}_2-$) koji zajedno ukazuju na strukturu etil-bromacetata. Isto tako uočava se i singlet slabijeg intenziteta na 4,07 ppm koji je svojstven za bromoctenu kiselinu [36].

Iznos omjera površina singleta na 3,85 i 4,07 ppm iznosi 19,98. Iz toga možemo reći da je u uzorku DP-3 prisutno približno 5 % kiseline (bromoctene) i 95 % estera (etil-bromacetata).

Isto tako, na snimljenim spektrima derivatiziranih uzoraka DP-2 i DP-3 nije uočen singlet s kemijskim pomakom > 10 ppm, koji je karakterističan za proton karboksilne skupine.

4.2. UV-Vis ANALIZA

Rezultati UV-Vis spektrofotometrijske analize dani su na *Slici 21* i u *Tablici 7*.



Slika 21. Apsorpcijski spektri derivatiziranih uzoraka

Maksimumi derivatiziranih uzoraka pojavljuju se na oko 190 nm, pri čemu se maksimum estera DP-2 ne može vidjeti obzirom da je 190 nm granična valna duljina s kojom instrument radi. Isto tako, kod svih triju estera se odmah uz maksimum pojavljuje i manji pik (tzv. „shoulder peak“) na valnim duljinama između 217 i 228 nm. Iznad 300 nm nije došlo do odziva za nijedan ester.

Tablica 7. Apsorpcijski maksimumi pojedinih estera

Ester	1. maksimum (nm)	2. maksimum (nm)
DP-1	227,98	192,03
DP-2	224,06	/
DP-3	217,93	191,08

4.3. HPLC-DAD KVALITATIVNA ANALIZA

Eksperimentalni uvjeti korišteni za kvalitativnu analizu dani su *Tablicom 8*, a rezultati same analize dani su na *Slikama 22-26*.

Tablica 8. Eksperimentalni uvjeti za kvalitativnu HPLC-DAD analizu

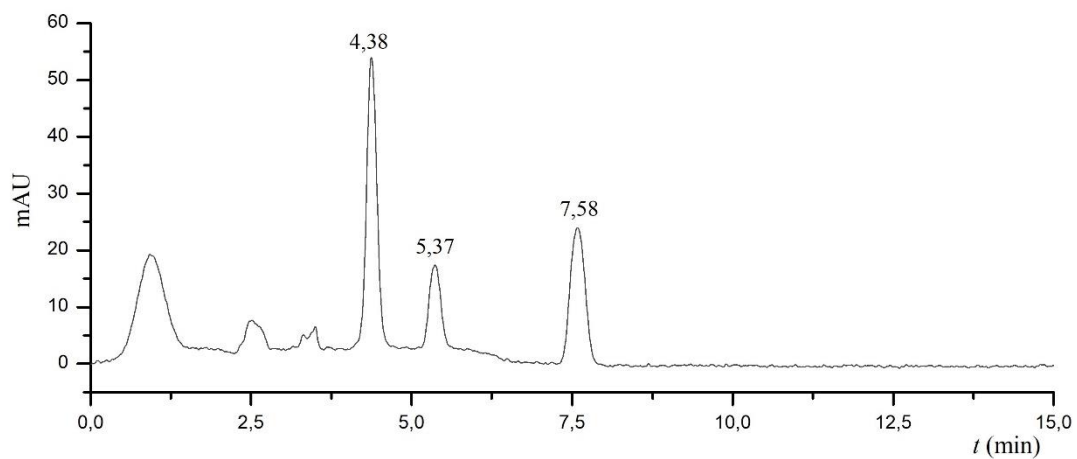
Eluiranje	izokratno
Pokretna faza	voda/acetonitril = 40/60
Protok	0,5 mL/min
V (injektiranja)	20 μ L
t (analize)	15 min
λ (snimanja)	218 nm

Koncentracije pojedinačnih otopina estera (kao i koncentracije pojedinih estera u otopini smjese) pripremljenih za kvalitativnu analizu iznosile su:

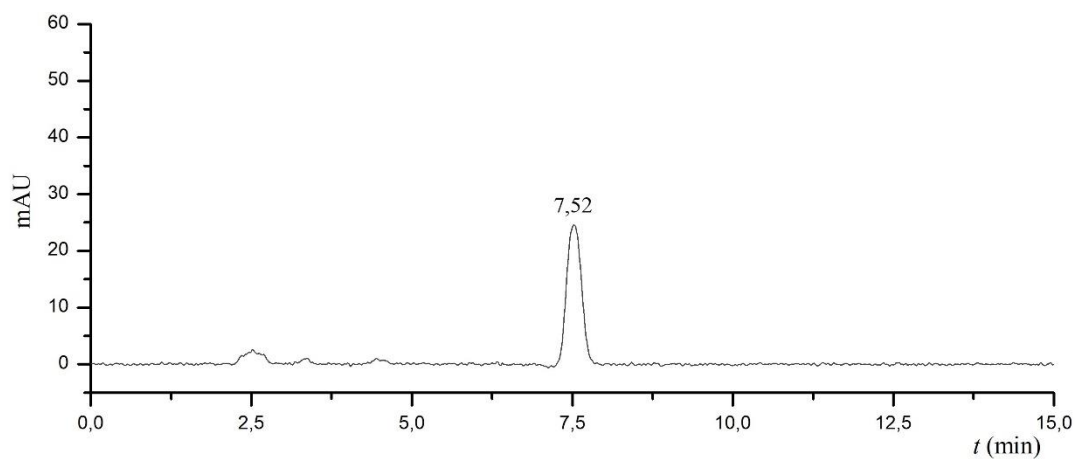
$$\gamma (\text{DP-1}) = 138,0 \text{ mg/L}$$

$$\gamma (\text{DP-2}) > 100 \text{ mg/L (nije bilo moguće točno odrediti)}$$

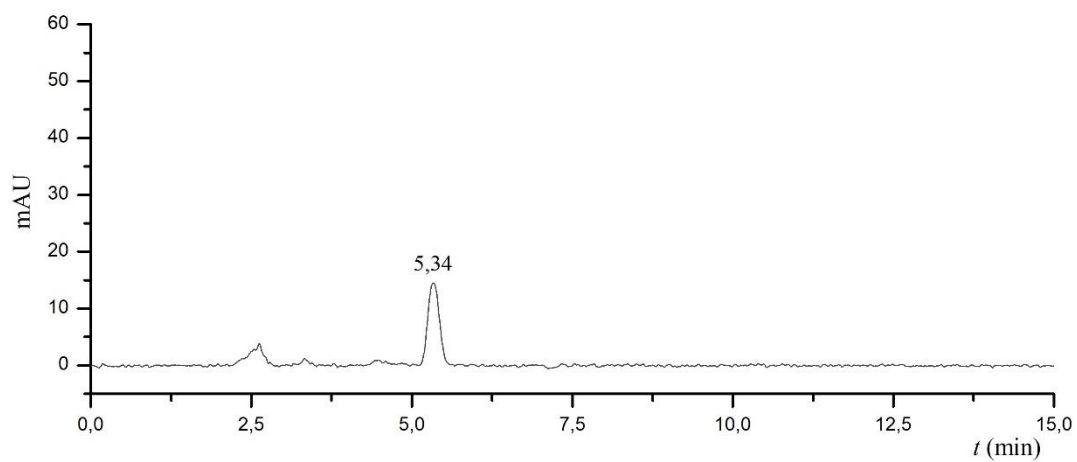
$$\gamma (\text{DP-3}) = 151,0 \text{ mg/L}$$



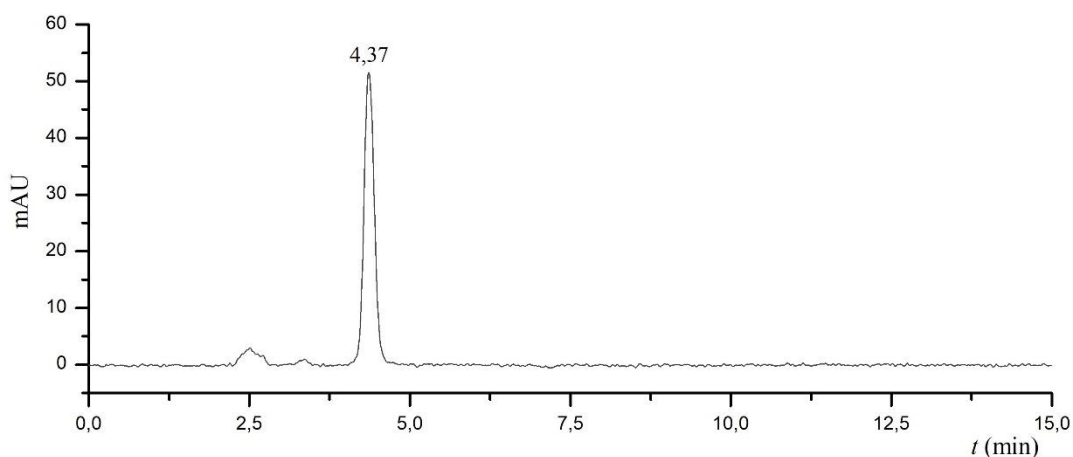
Slika 22. Kromatogram smjese (DP-1, DP-2 i DP-3)



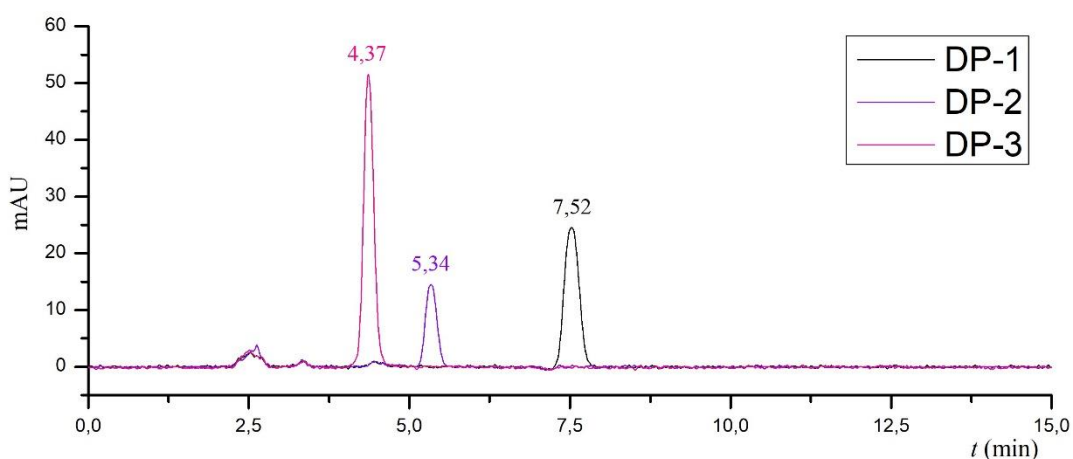
Slika 23. Kromatogram estera DP-1



Slika 24. Kromatogram estera DP-2



Slika 25. Kromatogram estera DP-3



Slika 26. Preklapljeni kromatogrami estera DP-1, DP-2 i DP-3

Iz rezultata možemo vidjeti da s ovom metodom ester DP-3 (etil-bromacetat) najbrže eluira kroz kolonu s vremenom zadržavanja 4,37 min, ester DP-2 (etil-kloracetat) eluira uz vrijeme zadržavanja 5,34 min, dok ester DP-1 (etil-trikloracetat) eluira najduže i ima vrijeme zadržavanja 7,52 min.

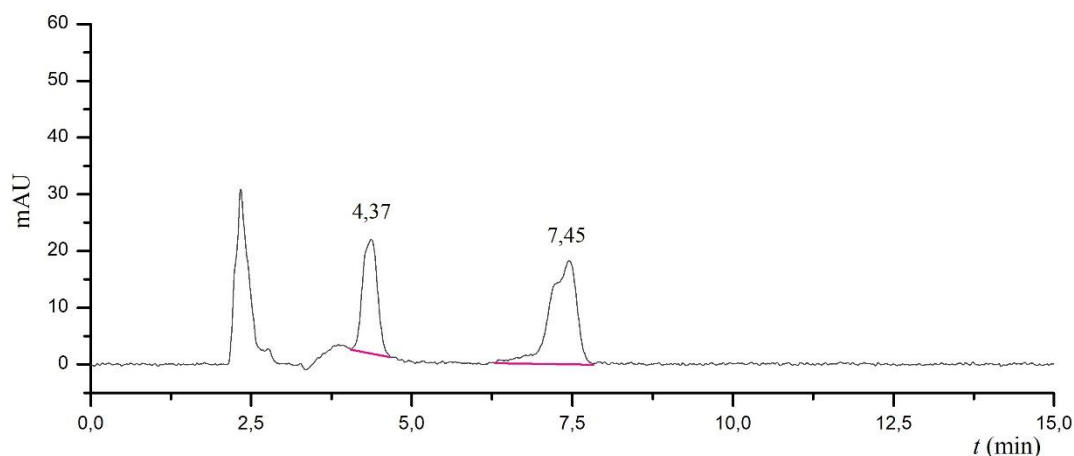
4.4. VALIDACIJA HPLC-DAD METODE

Eksperimentalni uvjeti pri kojima je provedeno kvantitativno kromatografsko određivanje derivatiziranih uzoraka i validacija metode dani su u *Tablici 9*. Obzirom da su odzivi estera relativno slabi, volumen injektiranja povećan je s 20 na 40 μL te je za snimanje kromatograma korištena valna duljina 210 nm.

Tablica 9. Eksperimentalni uvjeti za kvantitativnu HPLC-DAD analizu

Eluiranje	izokratno
Pokretna faza	voda/acetonitril = 40/60
Protok	0,5 mL/min
V (injektiranja)	40 μL
t (analize)	15 min
λ (snimanja)	210 nm

Analizom otopina estera nižih koncentracija (1-50 mg/L) dobiveni pikovi nisu imali pravilne oblike kao kod kvalitativne analize gdje je koncentracija estera bila veća. Zbog tih nepravilnosti automatsko integriranje pikova nije bilo provedeno po istom principu za sve kromatograme. Iz tog razloga integraciju pikova bilo je nužno provesti ručno namještanjem bazne linije pika, kako bi princip integracije pikova bio ujednačen za sve kromatograme. Bazne linije pikova namještane su na način kako je prikazano na *Slici 27* te su tako određene površine pikova korištene za kvantitativno određivanje i validaciju metode.



Slika 27. Kromatogram smjese estera DP-1 i DP-3, $\gamma = 50 \text{ mg/L}$

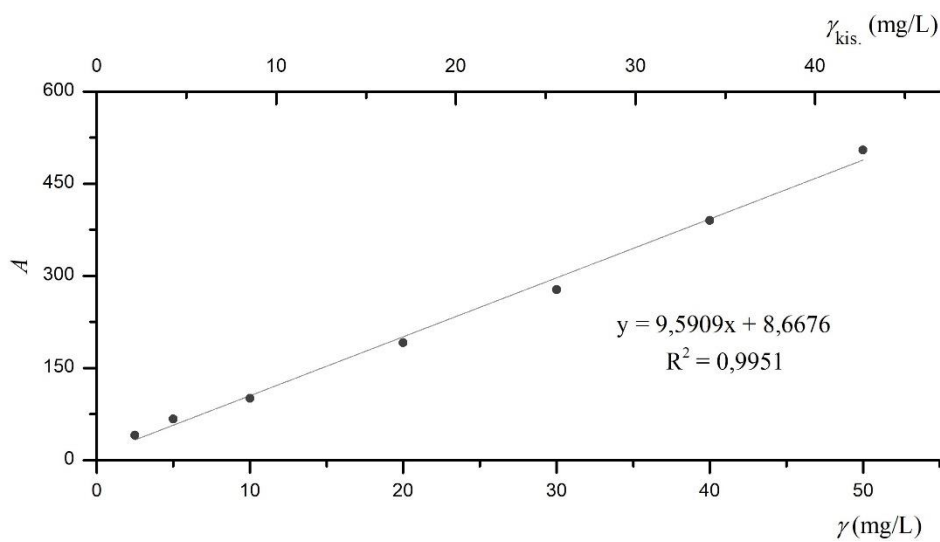
4.4.1. Linearnost

Umjerni (kalibracijski) pravci predstavljaju funkcijsku ovisnost površine ispod pika o koncentraciji analita. Pravci su izrađeni u području koncentracija 1 – 50 mg/L te su im određeni nagib i koeficijent determinacije. Rezultati određivanja linearosti estera DP-1 i DP-3 pri dvije različite valne duljine dani su *Tablicama 10 i 11* te na *Slikama 28-31*. Na grafovima linearnosti su na donjoj x-osi iskazane koncentracije estera, a na gornjoj x-osi koncentracije odgovarajućih kiselina (za DP-1 se radi o trikloroctenoj, a za DP-3 o bromoctenoj kiselini).

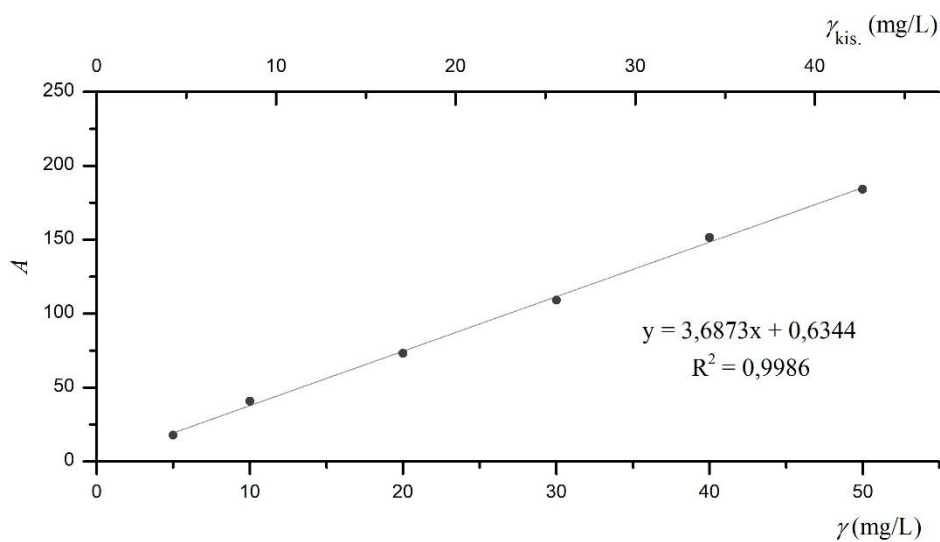
Uvjet linearnosti je da koeficijenti determinacije (R^2) budu veći ili jednaki 0,995.

Tablica 10. Podaci analize za određivanje linearnosti DP-1

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$
$\lambda = 210 \text{ nm}$					
1,00	0,85				
2,50	2,13	39,00	41,30	41,80	40,70
5,00	4,27	67,60	64,50	68,80	66,97
10,00	8,53	102,40	99,80	98,70	100,30
20,00	17,07	192,60	186,60	194,30	191,17
30,00	25,60	277,00	277,10	278,90	277,67
40,00	34,14	392,90	386,40	390,70	390,00
50,00	42,67	508,00	503,40	501,90	504,43
$\lambda = 228 \text{ nm}$					
1,00	0,85				
2,50	2,13				
5,00	4,27	18,20	20,10	14,40	17,57
10,00	8,53	44,30	36,90	40,30	40,50
20,00	17,07	77,20	73,90	68,20	73,10
30,00	25,60	111,70	107,20	108,00	108,97
40,00	34,14	144,10	152,80	157,10	151,33
50,00	42,67	178,90	187,20	185,50	183,87



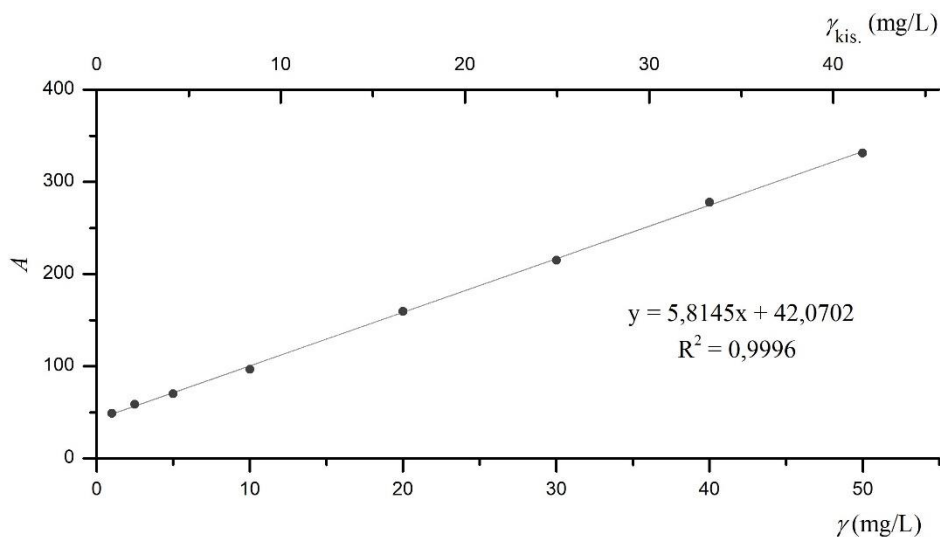
Slika 28. Graf linearnosti estera DP-1 pri 210 nm



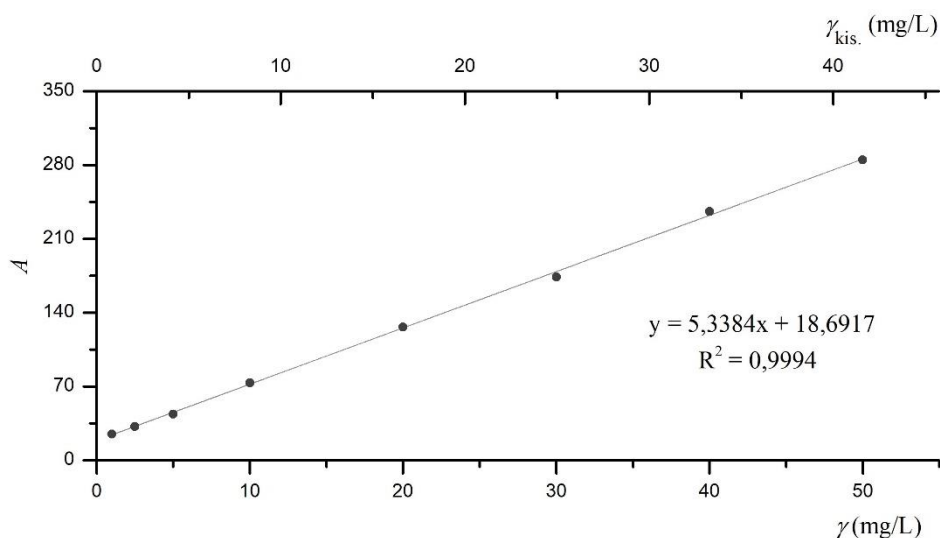
Slika 29. Graf linearnosti estera DP-1 pri 228 nm

Tablica 11. Podaci analize za određivanje linearnosti DP-3

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$
$\lambda = 210 \text{ nm}$					
1,00	0,83	48,50	48,20	49,70	48,80
2,50	2,08	58,50	56,60	60,90	58,67
5,00	4,16	73,70	70,80	66,20	70,23
10,00	8,32	92,70	97,30	100,10	96,70
20,00	16,64	157,70	158,40	162,40	159,50
30,00	24,96	221,90	208,10	215,60	215,20
40,00	33,28	278,30	279,10	275,80	277,73
50,00	41,60	327,10	338,90	328,00	331,33
$\lambda = 218 \text{ nm}$					
1,00	0,83	20,30	31,60	22,50	24,80
2,50	2,08	31,90	26,60	37,80	32,10
5,00	4,16	45,80	48,10	38,00	43,97
10,00	8,32	74,50	75,10	70,50	73,37
20,00	16,64	121,60	127,20	130,70	126,50
30,00	24,96	178,70	171,80	171,40	173,97
40,00	33,28	234,00	241,20	232,80	236,00
50,00	41,60	277,50	292,80	284,60	284,97



Slika 30. Graf linearnosti estera DP-3 pri 210 nm



Slika 31. Graf linearnosti estera DP-3 pri 218 nm

Kod estera DP-1 za koncentracije niže od 2,5 mg/L pri 210 nm i za koncentracije niže od 5 mg/L pri 228 nm nije dobiven odziv instrumenta. Isto tako, uočava se i znatno bolji koeficijent determinacije pri valnoj duljini 228 nm. Kod estera DP-3 koeficijenti determinacije približno su jednaki za obje valne duljine (malo je niži pri 218 nm).

Koeficijenti determinacije veći su od 0,995 za oba estera (i na obje valne duljine), što znači da u rasponu koncentracija 1- 50 mg/L oba estera imaju zadovoljavajuću linearnost.

4.4.2. Osjetljivost

Osjetljivost metode određena je nagibima umjernih pravaca. Iz rezultata je vidljivo da je osjetljivost metode pri 210 nm veća za ester DP-1. Isto tako, može se vidjeti i da je osjetljivost metode za oba estera veća na nižoj valnoj duljini (210 nm), što se bolje uočava kod estera DP-1. To se može objasniti činjenicom da oba estera bolje apsorbiraju UV zračenje na nižim valnim duljinama, kako je i prethodno ustanovljeno snimanjem apsorpcijskih spektara.

$$S (\text{DP-1})_{210 \text{ nm}} = 9,5909 \text{ L/mg}$$

$$S (\text{DP-3})_{210 \text{ nm}} = 5,8145 \text{ L/mg}$$

$$S (\text{DP-1})_{228 \text{ nm}} = 3,6873 \text{ L/mg}$$

$$S (\text{DP-3})_{218 \text{ nm}} = 5,3384 \text{ L/mg}$$

4.4.3. Granice detekcije i kvantifikacije

Granice detekcije i kvantifikacije određene su prema *jednadžbama 3 i 4*, pri čemu je kao odziv slijepe probe (x_0) uzeta vrijednost odsječka umjernog pravca na y-osi. Određene granice detekcije i kvantifikacije za oba estera (kiseline) i na obje valne duljine dane su u *Tablici 12*.

$$GD = x_0 + 3,3 \cdot s_0 \quad (3)$$

GD – granica detekcije

x_0 – odziv slijepe probe

s_0 – standardno odstupanje najniže koncentracije umjernog pravca

$$GK = x_0 + 10 \cdot s_0 \quad (4)$$

GK – granica kvantifikacije

x_0 – odziv slijepe probe

s_0 – standardno odstupanje najniže koncentracije umjernog pravca

Tablica 12. Određene granice detekcije i kvantifikacije obzirom na estere i obzirom na odgovarajuće kiseline

DP-1 ester (mg/L)	DP-1 kis. (mg/L)	DP-3 ester (mg/L)	DP-3 kis. (mg/L)
210 nm		210 nm	
GD = 0,51	GD = 0,44	GD = 0,45	GD = 0,37
GK = 1,55	GK = 1,33	GK = 1,37	GK = 1,14
228 nm		218 nm	
GD = 2,60	GD = 2,22	GD = 3,70	GD = 3,08
GK = 7,87	GK = 6,72	GK = 11,22	GK = 9,34

Iz rezultata se može vidjeti da su granice detekcije i kvantifikacije za oba estera niže pri 210 nm zbog toga što je i osjetljivost metode (nagib umjernog pravca) pri toj valnoj duljini veća. Iako je pri 210 nm osjetljivost metode veća za ester DP-1, zbog znatno bolje linearnosti granice detekcije i kvantifikacije nešto su nižih vrijednosti za ester DP-3.

Isto tako treba reći da se izračunata granica kvantifikacije estera DP-3 (1,37 mg/L) ne podudara s dobivenim rezultatima iz kojih se vidi da je za koncentraciju 1,00 mg/L omjer signala i šuma (S/N omjer) veći od 10 (*Slika P13*). Iz tog razloga kao granica kvantifikacije za ester DP-3 uzeta je koncentracija 1,00 mg/L, odnosno 0,83 mg/L obzirom na kiselinu.

4.4.4. Preciznost

U sklopu preciznosti ispitana je ponovljivost injektiranja za tri različite koncentracije svakog estera (Tablice 13 i 14). Također je provedeno i ispitivanje međupreciznosti kroz 3 različita dana. Međupreciznost je određena analizom varijancija (ANOVA analizom), odnosno testiranjem na sustavne razlike između rezultata mjerenja dobivenih kroz tri različita dana.

Mjerenje za određivanje ponovljivosti provedeno je 26.5.2023., a druga dva mjerenja za određivanje međupreciznosti provedena su 2.6.20203. i 5.6.2023.

Za ester DP-1 ispitivanje preciznosti provedeno je pri koncentracijama 2,5, 20 i 50 mg/L, dok su za ester DP-3 ispitane koncentracije iznosile 1, 20 i 50 mg/L.

Ponovljivost

Uvjet ponovljivosti je da su vrijednosti relativnih standardnih odstupanja (RSD vrijednosti) niže od 10 %.

Tablica 13. Podaci analize za određivanje ponovljivosti za ester DP-1

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$	s	RSD%
2,50	2,13	39,00	41,30	41,80	40,70	1,49	3,67
20,00	17,07	192,60	186,60	194,30	191,17	4,05	2,12
50,00	42,67	508,00	503,40	501,90	504,43	3,18	0,63

Tablica 14. Podaci analize za određivanje ponovljivosti za ester DP-3

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$	s	RSD%
1,00	0,83	48,50	48,20	49,70	48,80	0,79	1,63
20,00	16,64	157,70	158,40	162,40	159,50	2,54	1,59
50,00	41,60	327,10	338,90	328,00	331,33	6,57	1,98

Kod estera DP-1 relativno standardno odstupanje opada porastom koncentracije, dok su kod estera DP-3 relativna standardna odstupanja za sve tri koncentracije približno jednaka te iznose između 1,5 – 2,0 %. Sva relativna standardna odstupanja iznose manje od 10% čime je ponovljivost injektiranja za oba estera zadovoljena.

Međupreciznost

Kriterij prihvatljivosti za međupreciznost je da su računске F -vrijednosti određene ANOVA analizom manje od kritične F -vrijednosti (5,14), uz uvjet da relativna standardna odstupanja kroz drugi i treći dan iznose manje od 15 %. Rezultati mjerenja provedenih kroz tri različita dana dana su u *Tablicama 15 i 16*.

Tablica 15. Podaci mjerenja za određivanje međupreciznosti za ester DP-1

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$	s	RSD%
1. DAN (26.5.2023.)							
2,50	2,13	39,00	41,30	41,80	40,70	1,49	3,67
20,00	17,07	192,60	186,60	194,30	191,17	4,05	2,12
50,00	42,67	508,00	503,40	501,90	504,43	3,18	0,63
2. DAN (2.6.2023.)							
2,50	2,13	31,8	29,1	34,1	31,67	2,50	7,90
20,00	17,07	191,4	199,1	192,4	194,30	4,19	2,15
50,00	42,67	511,4	515,3	495,4	507,37	10,55	2,08
3. DAN (5.6.2023.)							
2,50	2,13	29,3	24,7	29,9	27,97	2,84	10,17
20,00	17,07	181,8	188	188,4	186,07	3,70	1,99
50,00	42,67	528,2	506,1	520,6	518,30	11,23	2,17

Tablica 16. Podaci mjerenja za određivanje međupreciznosti za ester DP-3

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$	s	RSD%
1. DAN (26.5.2023.)							
1,00	0,83	48,50	48,20	49,70	48,80	0,79	1,63
20,00	16,64	157,70	158,40	162,40	159,50	2,54	1,59
50,00	41,60	327,10	338,90	328,00	331,33	6,57	1,98
2. DAN (2.6.2023.)							
1,00	0,83	48,9	50,6	51,9	50,47	1,50	2,98
20,00	16,64	151,5	154,9	150,6	152,33	2,27	1,49
50,00	41,60	329,4	338,3	319,1	328,93	9,61	2,92
3. DAN (5.6.2023.)							
1,00	0,83	46,20	49,10	46,10	47,13	1,70	3,62
20,00	16,64	167,4	158,3	157,4	161,03	5,53	3,44
50,00	41,60	343	341,4	340,5	341,63	1,27	0,37

Analiza varijancija (ANOVA) provedena je pomoću računalnog alata Excel, a rezultati analize dani su u *Tablicama 17 i 18*.

SS_b vrijednost je zbroj kvadrata odstupanja između pojedinih dana mjerenja i ukazuje na varijacije između različitih dana, dok se SS_w vrijednost odnosi na zbroj kvadrata odstupanja unutar dana od svoje srednje vrijednosti i mjera je za varijacije unutar dana. MS_b i MS_w vrijednosti odnose se na srednja kvadratna odstupanja između i unutar dana. F -vrijednosti računaju se kao omjer MS_b i MS_w .

Tablica 17. Rezultati ANOVA analize za ester DP-1

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	SS_b	SS_w	MS_b	MS_w	F	$F_{\text{krit.}}$
2,50	2,13	257,43	33,17	128,71	5,53	23,28	5,14
20,00	17,07	103,62	95,17	51,81	15,86	3,27	5,14
50,00	42,67	320,43	494,75	160,21	82,46	1,94	5,14

Tablica 18. Rezultati ANOVA analize za ester DP-3

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	SS_b	SS_w	MS_b	MS_w	F	$F_{\text{krit.}}$
1,00	0,83	16,67	11,59	8,33	1,93	4,31	5,14
20,00	16,64	129,40	84,35	64,70	14,06	4,60	5,14
50,00	41,60	273,14	274,14	136,57	45,69	2,99	5,14

Iz rezultata analize može se vidjeti da kod estera DP-1 za koncentraciju 2,5 mg/L postoji sustavna razlika u rezultatima mjerenja provedenih u različitim danima ($F > F_{\text{krit.}}$). Obzirom da su za tu koncentraciju vrijednosti relativnih standardnih odstupanja kroz sva 3 dana zadovoljavajuće (RSD < 10 % u prvom danu te RSD < 15 % u drugom i trećem danu), možemo zaključiti da sustavna razlika u mjerenjima nije posljedica loše međupreciznosti (svojstva metode), već stabilnosti otopine estera DP-1 (svojstva same otopine).

Za ostale ispitivane koncentracije DP-1 i za sve ispitivane koncentracije DP-3 međupreciznost je zadovoljena ($F < F_{\text{krit.}}$), odnosno razlike u srednjim vrijednostima mogu se okarakterizirati kao slučajne varijacije. Isto tako, porastom koncentracije računске F -vrijednosti očekivano su niže (uz iznimku DP-3, $\gamma = 20$ mg/L).

Za sve koncentracije kod kojih je međupreciznost zadovoljena, na kraju su prema *jednadžbama* 5, 6 i 7 određena i standardna odstupanja u uvjetima ponovljivosti, između grupa te u uvjetima međupreciznosti (Tablica 19).

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad (5)$$

s_r – standardno odstupanje u uvjetima ponovljivosti

MS_w – srednje kvadratno odstupanje unutar grupe

$$s_b = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad (6)$$

s_b – standardno odstupanje između grupa

MS_b – srednje kvadratno odstupanje između grupa

MS_w – srednje kvadratno odstupanje unutar grupe

n – broj mjerenja unutar grupe

$$s_{mp} = \sqrt{s_r^2 + s_b^2} \quad (7)$$

s_{mp} – standardno odstupanje u uvjetima međupreciznosti

Tablica 19. Određena standardna odstupanja za oba estera

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	s_r	s_b	s_{mp}
DP-1				
2,50	2,13	/	/	/
20,00	17,07	3,98	3,46	5,28
50,00	42,67	9,08	5,09	10,41
DP-3				
1,00	0,83	1,39	1,46	2,02
20,00	16,64	3,75	4,11	5,56
50,00	41,60	6,76	5,50	8,72

4.4.5. Istinitost

Istinitost je određena računanjem iskorištenja, odnosno omjerom stvarne koncentracije i koncentracije izračunate po jednadžbi pravca za dani odziv. Za određivanje istinitosti uzeta su mjerenja od 1. dana (26.5.2023.) kojima je određivana i ponovljivost. Dobiveni rezultati dani su u *Tablici 20*. Granice prihvatljivosti iskorištenja iznose od 80 – 150 %.

Tablica 20. Dobivena iskorištenja za oba estera

γ (mg/L)	$\gamma_{\text{kis.}}$ (mg/L)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{sr.}}$	$\gamma_{\text{jed.}}$ (mg/L)	I (%)
DP-1							
2,50	2,13	39,00	41,30	41,80	40,70	3,34	133,59
20,00	17,07	192,60	186,60	194,30	191,17	19,03	95,14
50,00	42,67	508,00	503,40	501,90	504,43	51,69	103,38
DP-3							
1,00	0,83	48,50	48,20	49,70	48,80	1,16	115,75
20,00	16,64	157,70	158,40	162,40	159,50	20,20	100,98
50,00	41,60	327,10	338,90	328,00	331,33	49,75	99,50

Iz rezultata se može vidjeti veliko iskorištenje za koncentraciju 2,5 mg/L kod uzorka DP-1 te relativno veliko iskorištenje za koncentraciju 1 mg/L kod uzorka DP-3. Iskorištenja očekivano jače odstupaju od 100 % pri nižim koncentracijama. Sva dobivena iskorištenja nalaze se unutar granica prihvatljivosti čime je kriterij za istinitost zadovoljen za sve ispitane koncentracije kod oba estera.

4.4.6. Sažetak rezultata

Rezultati validacije HPLC-DAD metode sažeti su u *Tablici 21*.

Tablica 21. Sažetak rezultata validacije HPLC-DAD metode

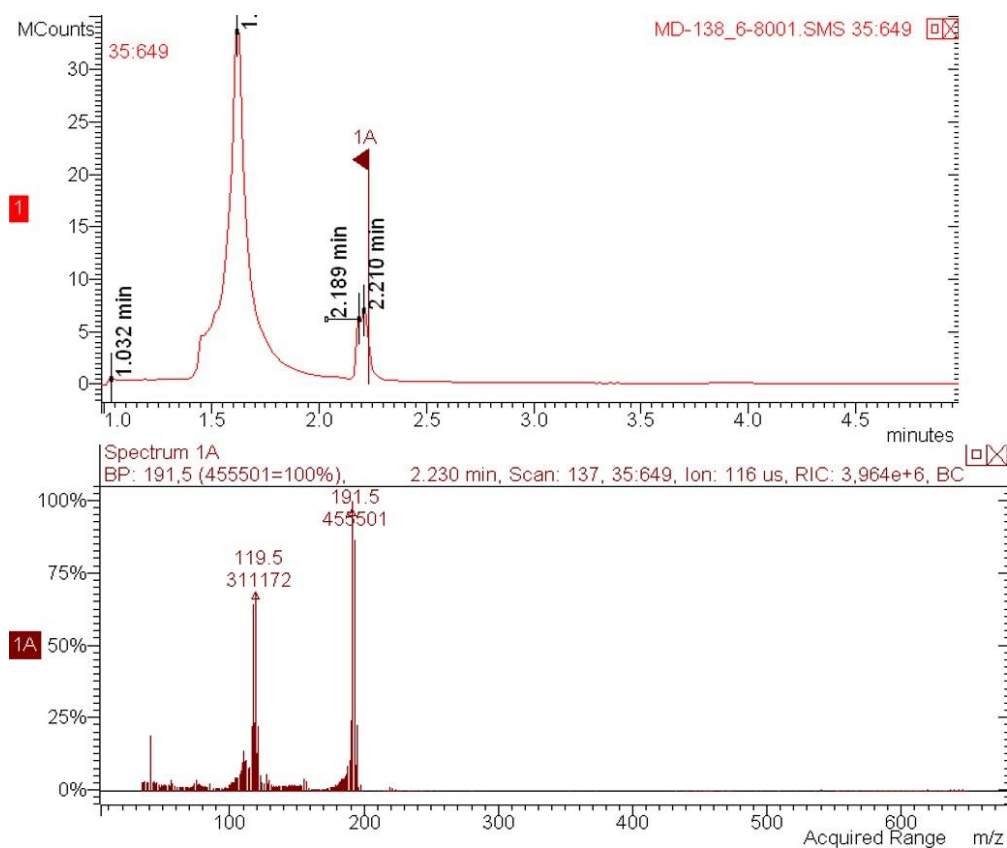
Izvedbena karakteristika	Kriterij	DP-1	DP-3	Kriterij zadovoljen za DP-1	Kriterij zadovoljen za DP-3
Linearnost	λ_1	0,9951	0,9996	DA	DA
	λ_2	0,9986	0,9994	DA	DA
Osjetljivost (L/mg)	λ_1	9,5909	5,8145	/	/
	λ_2	3,6873	5,3384	/	/
GD _{kis.} (mg/L)	λ_1	0,44	0,37	/	/
	λ_2	2,22	3,08	/	/
GK _{kis.} (mg/L)	λ_1	1,33	0,83	/	/
	λ_2	6,72	9,34	/	/
Ponovljivost (RSD – %)	Kriterij: RSD < 10 %				
	$\gamma = 1$ mg/L	/	1,63	/	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	3,67	/	DA	/
	$\gamma = 20$ mg/L	2,12	1,59	DA	DA
	$\gamma = 50$ mg/L	0,63	1,98	DA	DA
Međupreciznost (F-vrijednosti)	Kriterij: $F < F_{krit.} (5,14)$				
	$\gamma = 1$ mg/L	/	4,31	/	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	23,28	/	/	/
	$\gamma = 20$ mg/L	3,27	4,60	DA	DA
	$\gamma = 50$ mg/L	1,94	2,99	DA	DA
Istinitost (%)	Kriterij: 80 – 150 %				
	$\gamma = 1$ mg/L	/	115,75	/	DA
	$\gamma = 2,5$ mg/L	133,59	/	DA	/
	$\gamma = 20$ mg/L	95,14	100,98	DA	DA
	$\gamma = 50$ mg/L	103,38	99,50	DA	DA

4.5. GC-MS ANALIZA

Eksperimentalni uvjeti pri kojima je provedena kvalitativna GC-MS analiza dani su u *Tablici 22*, dok su rezultati analize dani na *Slikama 32* i *33*.

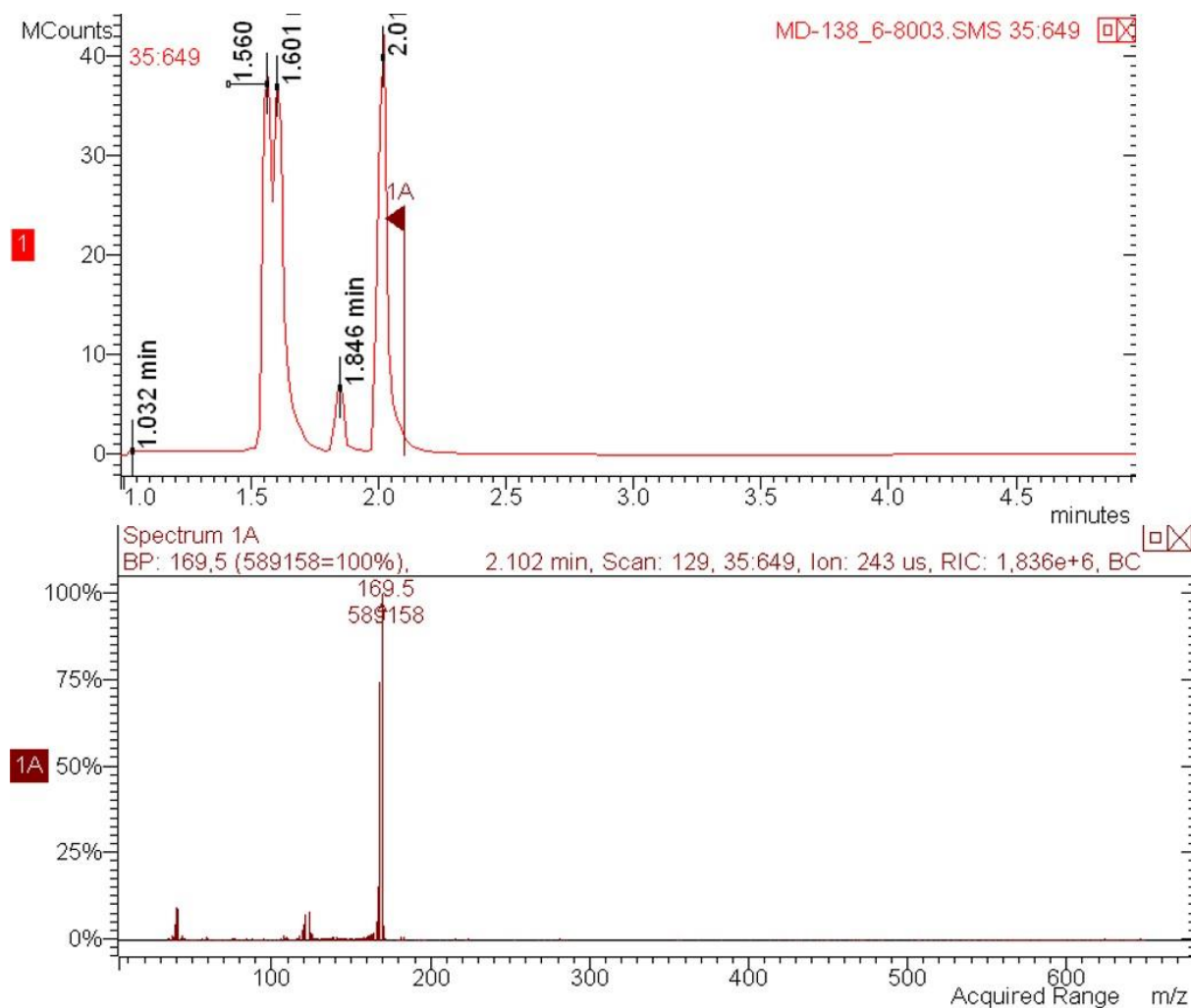
Tablica 22. Eksperimentalni uvjeti za kvalitativnu GC-MS analizu

Pokretna faza	He (čistoće 5.6.)
Protok	1,0 mL/min
V (inj.)	10 μ L
Vrijeme analize	6 min
Temp. režim	110 – 300 $^{\circ}$ C
Brzina zagrijavanja	47 $^{\circ}$ C /min



Slika 32. Kromatogram i pripadajući spektar masa estera DP-1

Iz rezultata možemo vidjeti da prema ovoj metodi vrijeme zadržavanja estera DP-1 iznosi 2,21 min. Signali pri $m/z = 191,5$ i $193,5$ upućuju na molekularni kation etil-trikloracetata, $[\text{CCl}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3]^+$, dok signali dobiveni pri $m/z = 117,5$ i $119,5$ ukazuju na fragment $[\text{CCl}_3]^+$. Razlike u signalima posljedica su prisutnosti ^{35}Cl i ^{37}Cl izotopa.



Slika 33. Kromatogram i pripadajući spektar masa estera DP-3

Vrijeme zadržavanja estera DP-3 iznosi 2,01 min. Na spektru masa uočavaju se signali pri $m/z = 167,5$ i $169,5$ koji ukazuju na molekularni kation etil-bromacetata, formule $[\text{CH}_2\text{BrCOOCH}_2\text{CH}_3]^+$. Do razlike u signalima dolazi zbog prisutnosti ^{79}Br i ^{81}Br izotopa.

GC-MS analizom estera DP-1 i DP-3 ustanovljena su njihova vremena zadržavanja te je snimanjem spektara masa još jednom potvrđena uspješna derivatizacija trikloroctene i bromoctene kiseline u odgovarajuće etilne estere.

5. ZAKLJUČAK

Derivatizacijom halooctenih kiselina dobiveni su etilni esteri; etil-trikloracetat, etil-kloracetat i etil-bromacetat. NMR analizom ustanovljeno je da su etil-trikloracetat i etil-bromacetat dobiveni kao čisti esteri te da uzorak etil-kloracetata nije bio čisti ester zbog toga što je dolazilo do povratne reakcije. UV-Vis analizom utvrđeni su apsorpcijski maksimumi estera.

U okviru rada razvijena je kromatografska metoda s pokretnom fazom voda/acetoneitril = 40/60 (v/v) s kojom se esteri uspješno razdvajaju u manje od 10 minuta. Kvalitativnom analizom ustanovljeno je da etil-bromacetat ima vrijeme zadržavanja 4,37 min, etil-kloracetat 5,34 min i etil-trikloracetat 7,52 min.

Uz dodatne izmjene razvijena je nova metoda za kvantitativno određivanje etil-trikloracetata i etil-bromacetata te je provedena validacija metode u rasponu koncentracija 1 – 50 mg/L. Linearost metode zadovoljena je za oba estera pri svim ispitanim valnim duljinama. Osjetljivost metode pri 210 nm za etil-trikloracetat iznosi 9,5909 L/mg, a za etil-bromacetat 5,8145 L/mg. Snimanjem pri većim valnim duljinama osjetljivost metode je manja te iznosi 3,6873 L/mg za etil-trikloracetat (pri 228 nm) i 5,3384 L/mg za etil-bromacetat (pri 218 nm). Granice detekcije i kvantifikacije za trikloroetenu kiselinu iznose 0,44 mg/L i 1,33 mg/L pri 210 nm te 2,22 mg/L i 6,72 mg/L pri 228 nm. Granice detekcije i kvantifikacije bromoetene kiseline iznose 0,37 mg/L i 1,14 mg/L pri 210 nm te 3,08 mg/L i 9,34 mg/L pri 218 nm. Obzirom da je za najnižu ispitanu koncentraciju bromoetene kiseline (0,83 mg/L) pri 210 nm omjer signala i šuma bio veći od 10 te da su za nju zadovoljene karakteristike preciznosti i istinitosti, ona je uzeta kao konačna granica kvantifikacije.

Ponovljivost injektiranja zadovoljena je za sve ispitane koncentracije oba estera (RSD < 10 %). Međupreciznost injektiranja kroz tri različita dana zadovoljena je za sve ispitane koncentracije oba estera, s time da za najnižu koncentraciju etil-trikloracetata (2,50 mg/L) nije bilo moguće odrediti međupreciznost zbog loše stabilnosti otopine. Istinitost metode zadovoljena je za sve ispitane koncentracije oba estera.

Kvalitativnom GC-MS analizom uz dane uvjete određena su vremena zadržavanja estera te ona iznose 2,21 min za etil-kloracetat i 2,01 min za etil-bromacetat. Signali dobiveni na spektrima masa karakteristični su za ispitane estere, čime je još jednom potvrđena uspješna derivatizacija trikloroetene i bromoetene kiseline.

6. LITERATURA

- [1] M. A. Mazhar, N. A. Khan, S. Ahmed, A. H. Khan, A. Hussain, Rahisuddin, F. Changani, M. Yousefi, S. Ahmadi, V. Vambol, Chlorination disinfection by-products in municipal drinking water – A review, *J. Clean. Prod.* 273 (2020) 1-13.
- [2] M. D. Sobsey, T. Handzel, L. Venczel, Chlorination and safe storage of household drinking water in developing countries to reduce waterborne disease, *Wat. Sci. Technol.* 47 (2003) 221-228.
- [3] J. Adusei-Gyamfi, B. Ouddane, L. Rietveld, J. P. Cornard, J. Criquet, Natural organic matter-cations complexation and its impact on water treatment: A critical review, *Water Res.* 160 (2019) 130-147.
- [4] A. H. Havelaar, A. E. M. De Hollander, P. F. M. Teunis, E. G. Evers, H. J. Van Kranen, J. F. M. Versteegh, J. E. M. Van Koten, W. Slob, Balancing the risks and benefits of drinking water disinfection: Disability adjusted life-years on the scale, *Environ. Health Perspect.* 108(4) (2000) 315-321.
- [5] <https://www.gov.nl.ca/ecc/waterres/quality/drinkingwater/haa/> (15.4.2023.)
- [6] K. Gopal, S. S. Tripathy, J. K. Bersillon, S. P. Dubey, Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water, *J. Hazard. Mater.* 140 (2007) 1-6.
- [7] M. Yang, H. K. Liberatore, X. Zhang, Current methods for analyzing drinking water disinfection byproducts, *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 7 (2019) 98-107.
- [8] X. F. Li, W. A. Mitch, Drinking water disinfection byproducts (DBPs) and human health effects: Multidisciplinary Challenges and opportunities, *Environ. Sci. Technol.* 52(4) (2018) 1681-1689.
- [9] L. E. B. Freeman, K. P. Cantor, D. Baris, J. R. Nuckols, A. Johnson, J. S. Colt, M. Schwenn, M. H. Ward, J. H. Lubin, R. Wadell, G. M. Hosain, C. Paulu, R. McCoy, L. E. Moore, A. T. Huang, N. Rothman, M. R. Karagas, D. T. Silverman, Bladder cancer and water disinfection by-product exposures through multiple routes: A population-based case-control study (New England, USA), *Environ. Health Perspect.* 125(6) (2017) 1-9.
- [10] W. Ma, W. Li, Y. Yang, J. Yang, B. Chen, Y. Xie, Derivatization-free multi-step extraction for trace haloacetic acids analysis with ion chromatography: Performance and mechanisms, *J. Hazard. Mater.* 436 (2022).

- [11] M. Rosero-Moreano, New trends in chemical analysis of disinfection by-products, u S. Kirmusaoglu, Disinfection, InTech, Istanbul, 2018, 55-77.
- [12] B. Delgado, P. Rocio-Bautista, V. Pino, J. H. Ayala, Analytical methods to monitor haloacetic acids in waters intended for human consumption, u M. Giannino (ur.), Drinking water and water management: New research, Nova Sci. Publ., New York, 2014, 105-132.
- [13] D. Dabić, D. Petrin, Puferi u nastavi. II. Priprema i upotreba, Kem. Ind. 69 (2020) 311-319.
- [14] Y. T. Tang, Y. W. Chen, H. P. Huang, C. C. Yu, S. B. Hung, M. J. Lee, Design of reactive distillations for acetic acid esterification, AIChE J. 51(6) (2005) 1683-1699.
- [15] https://archive.epa.gov/enviro/html/icr/web/html/gloss_dbp.html (24.4. 2023.)
- [16] M. J. Cardador, M. Gallego, Optimisation and comparison of several microextraction/methylation methods for determining haloacetic acids in water using gas chromatography, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 1331-1343.
- [17] P. Varanusupakul, N. Vora-adisak, B. Pulpoka, In situ derivatization and hollow fiber membrane microextraction for gas chromatographic determination of haloacetic acids in water, Anal. Chim. Acta. 598 (2007) 82-86.
- [18] M. G. Pervova, V. E. Kirichenko, K. I. Pashkevich, Determination of chloroacetic acids in drinking water by reaction gas chromatography, J. Anal. Chem. 57 (2002) 326-330.
- [19] W. Sadia, A. Pauzi, SPE-GC-MS for the determination of halogenated acetic acids in drinking water, Chromatographia 69 (2009) 1447-1451.
- [20] B. Hammami, M. R. Driss, Development of dry derivatization and headspace solid-phase microextraction technique for the GC-ECD determination of haloacetic acids in tap water, J. Anal. Chem. 68 (2013) 671-679.
- [21] M. J. Cardador, A. Serrano, M. Gallego, Simultaneous liquid-liquid microextraction/methylation for the determination of haloacetic acids in drinking waters by headspace gas chromatography, J. Chromatogr. 1209 (2008) 61-69.
- [22] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, Introduction to spectroscopy, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, 2001.
- [23] <https://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch20/ch20-4-3.html> (10.5.2023.)

- [24] Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko nazivlje, HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
- [25] I. Ojanpera, M. Kolmonen, A. Pelander, Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1203-1220.
- [26] L. Vaclavik, A. Schreiber, O. Lacina, T. Cajka, J. Hajslova, Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices, *Metabolomics* 8 (2012) 793-803.
- [27] R. J. B. Peters, A. A. M. Stolker, J. G. J. Mol, A. Lommen, E. Lyris, Y. Angelis, A. Vonaparti, M. Stamou, C. Georgakopoulos, M. W. F. Nielen, Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry, *Trends Analyt. Chem.* 29(11) (2010) 1250-1268.
- [28] G. Hopfgartner, D. Tonoli, E. Varesio, High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 402(8) (2012) 2587-2596.
- [29] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, Mass spectrometry, u D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, Introduction to spectroscopy, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, 2001, 396-466.
- [30] J. L. Valentine, R. Middleton, GC-MS Identification of sympathomimetic amine drugs in urine: Rapid methodology applicable for emergency clinical toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 24(3) (2000) 211-222.
- [31] L. Luo, L. Dong, Q. Huang, S. Ma, P. Fantke, J. Li, J. Jiang, M. Fitzgerald, J. Yang, Z. Jia, J. Zhang, H. Wang, Y. Dai, G. Zhu, Z. Xing, Y. Liang, M. Li, G. Wei, J. Song, J. Wei, C. Peng, H. Zhang, W. Zhang, S. Wang, K. Mizuno, A. A. G. Marco, L. Wu, J. Xu, C. Xiong, S. Chen, Detection and risk assessments of multi-pesticides in 1771 cultivated herbal medicines by LC/MS-MS and GC/MS-MS, *Chemosphere* 262 (2021) 1-16.
- [32] B. A. Eckenrode, Environmental and forensic applications of field-portable GC-MS: An overview, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12(6) (2001) 683-693.

[33] O. Botalova, J. Schwarzbauer, T. Frauenrath, L. Dsikowitzky, Identification and chemical characterization of specific organic constituents of petrochemical effluents, *Wat. Res.* 43(15) (2009) 3797-3812.

[34] <https://www.flickr.com/photos/ntnumedicine/14227616356/> (9.5.2023.)

[35] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en> (16.6.2023.)

[36] https://www.chemicalbook.com/CASDetailList_19200_EN.htm (9.6.2023.)

7. PRILOZI

POPIS KRATICA

DMS – dimetil sulfat

TBA-HSO₄ – tetrabutilamonijev hidrogensulfat

TFE – trifluoroetanol

MTBE – metil tert-butil eter

TAME – tert-amil metil eter

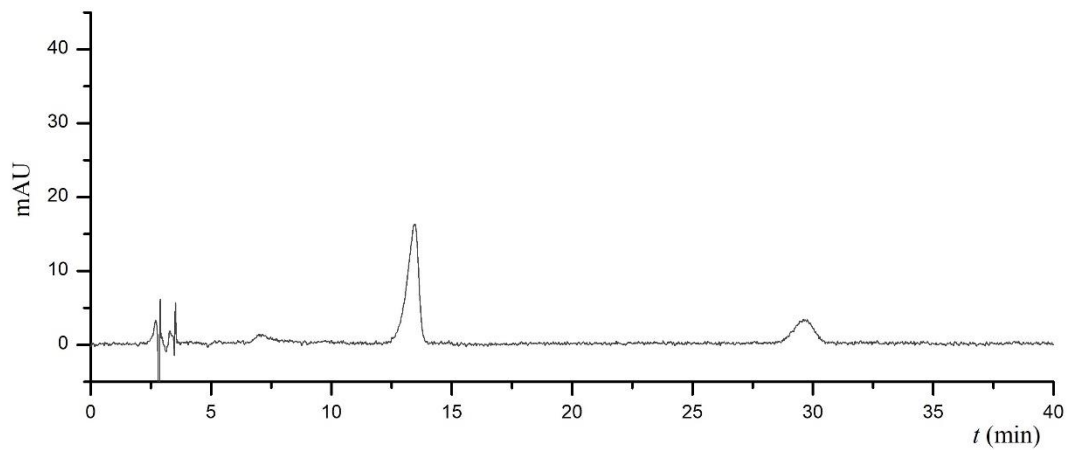
LLME – mikroekstrakcija tekuće-tekuće

HS-SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom s vlaknima smještenim iznad uzorka

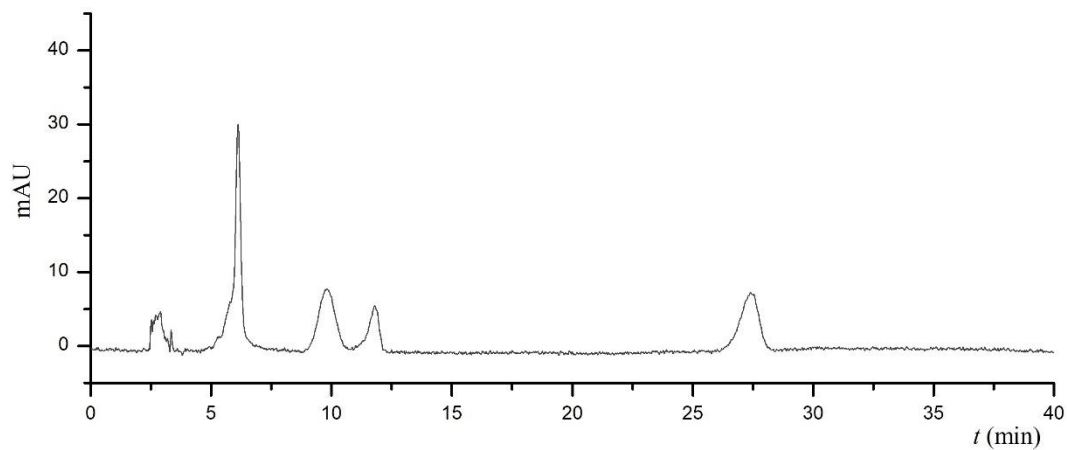
HF-LPME – mikroekstrakcija tekućom fazom sa šupljim vlaknima

ECD – detektor koji radi na principu detekcije elektrona

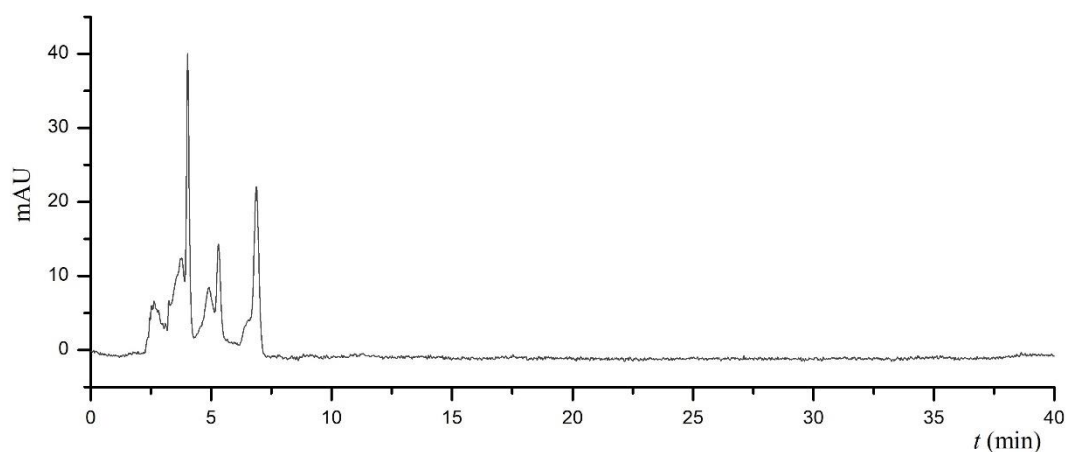
SPE – ekstrakcija čvrstom fazom



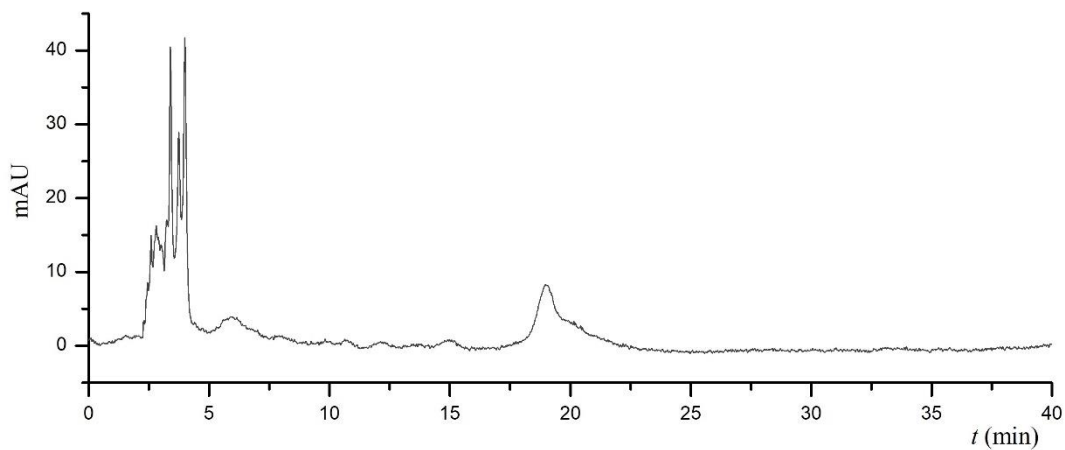
Slika P1. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/etanol = 80/20; $\lambda = 218$ nm



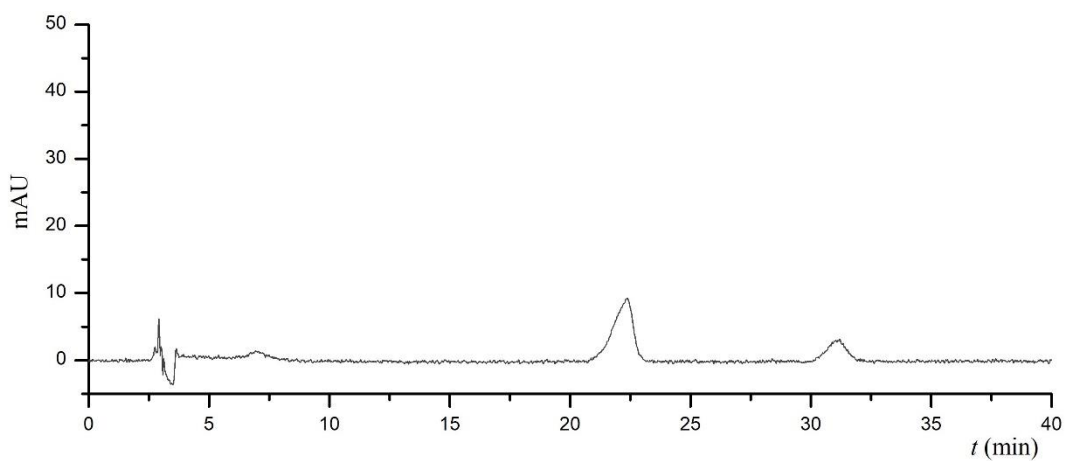
Slika P2. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/etanol = 60/40; $\lambda = 218$ nm



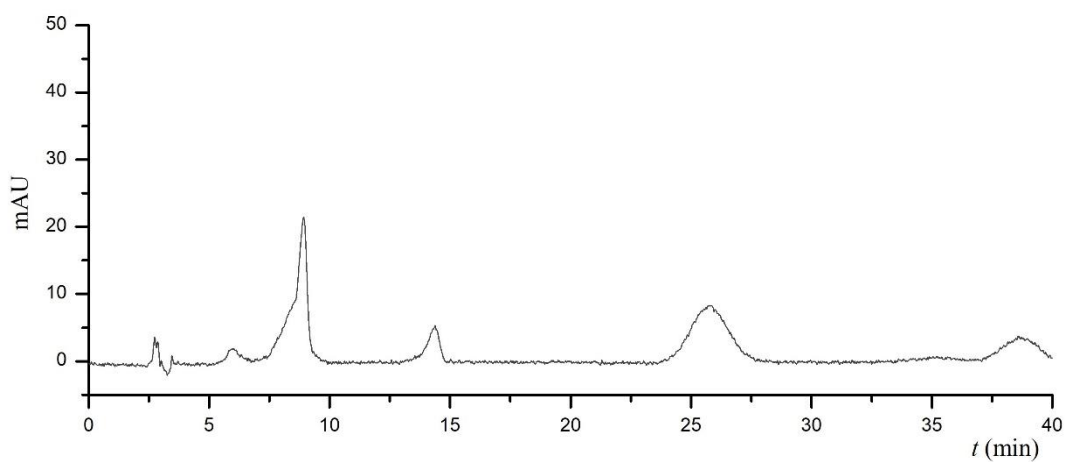
Slika P3. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/etanol = 40/60; $\lambda = 218$ nm



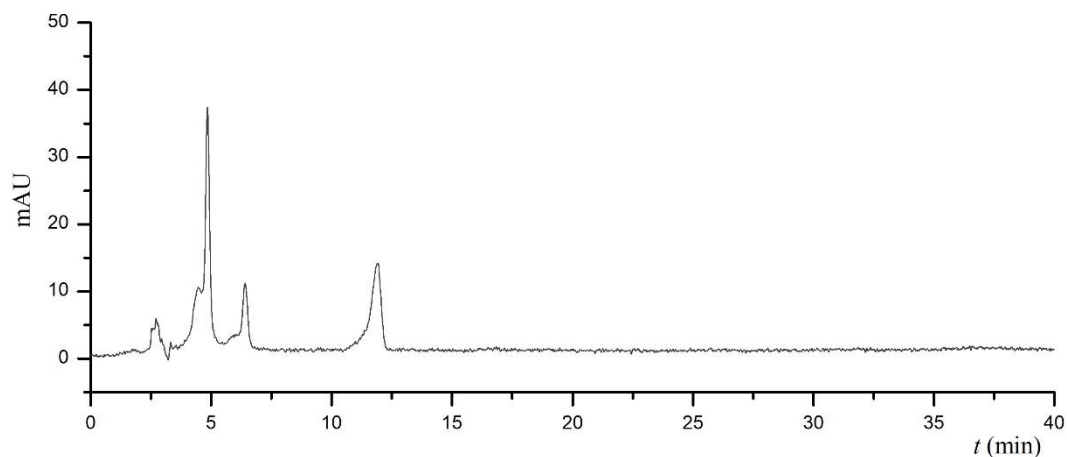
Slika P4. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/etanol = 20/80; $\lambda = 218$ nm



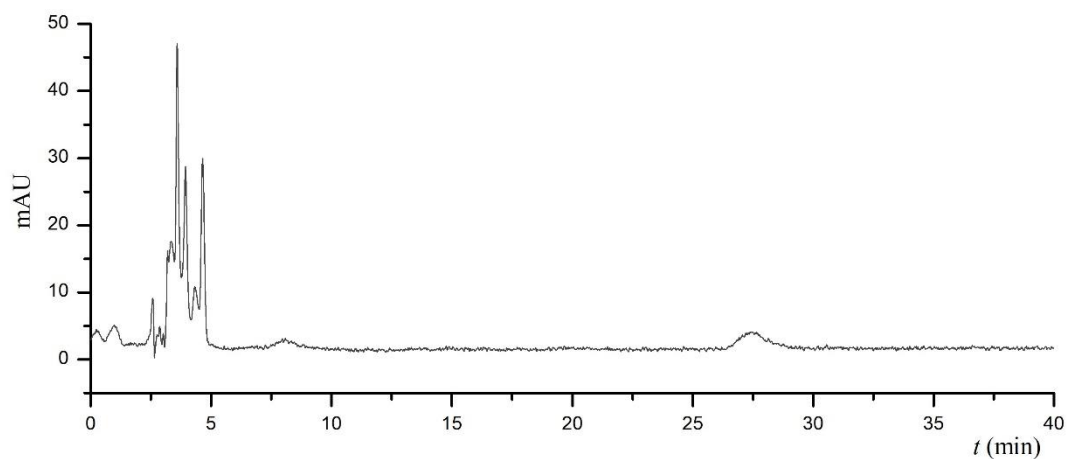
Slika P5. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/metanol = 80/20; $\lambda = 218$ nm



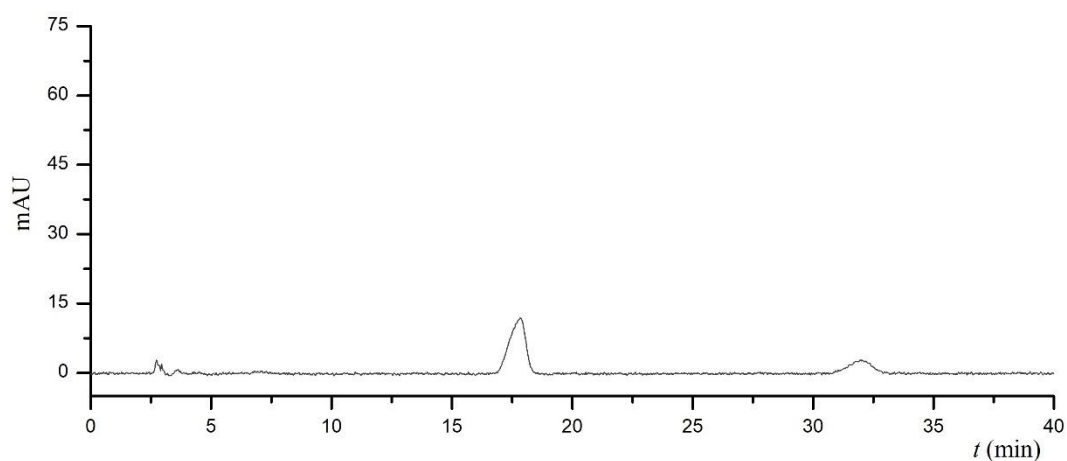
Slika P6. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/metanol = 60/40; $\lambda = 218$ nm



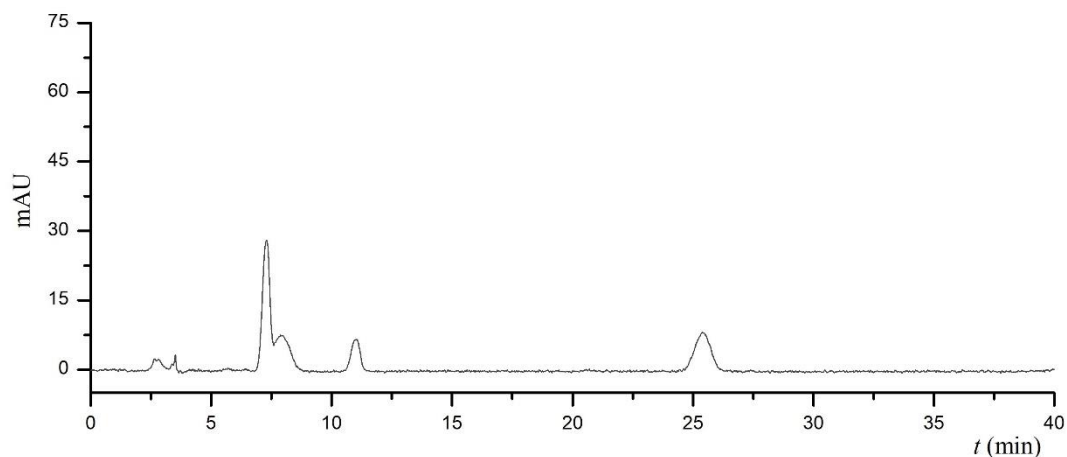
Slika P7. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/metanol = 40/60; $\lambda = 218$ nm



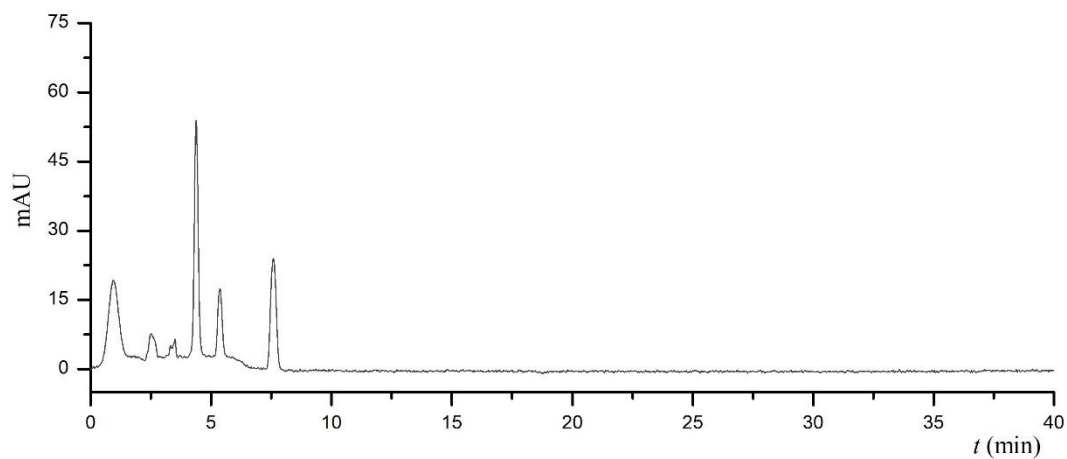
Slika P8. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/metanol = 20/80; $\lambda = 218$ nm



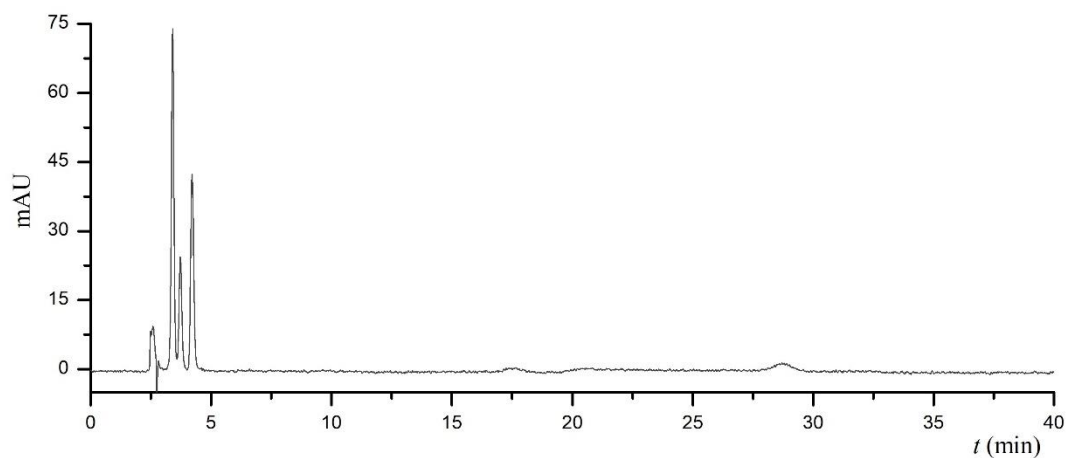
Slika P9. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/acetonitril = 80/20; $\lambda = 218$ nm



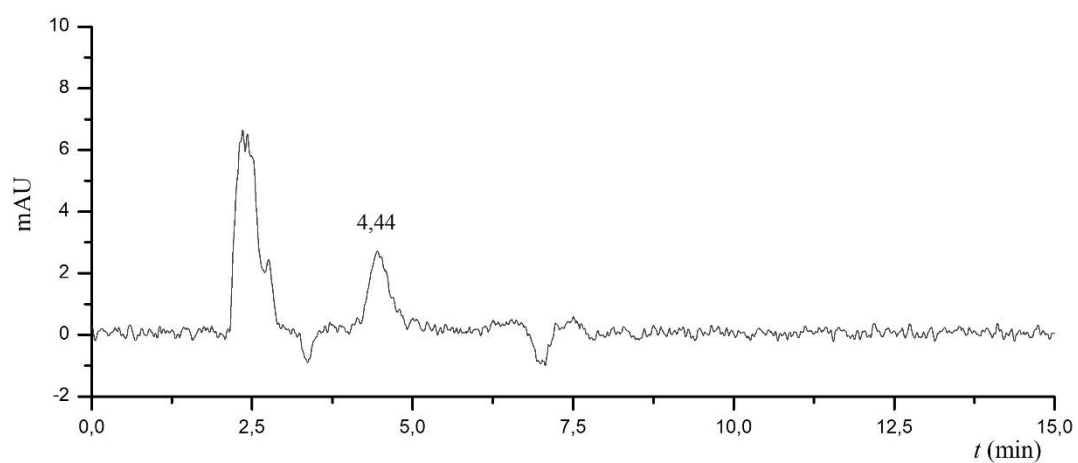
Slika P10. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/acetonitril = 60/40; $\lambda = 218$ nm



Slika P11. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/acetonitril = 40/60; $\lambda = 218$ nm



Slika P12. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka; voda/acetonitril = 20/80; $\lambda = 218$ nm



Slika P13. Kromatogram smjese derivatiziranih uzoraka DP-1 i DP-3; $\gamma = 1,00 \text{ mg/L}$; $\lambda = 210 \text{ nm}$

