

# Optimiranje razdvajanja pesticida u HPLC analizi

---

Nikolaš, Ljubica

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:758713>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ljubica Nikolaš

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ljubica Nikolaš

# OPTIMIRANJE RAZDVAJANJA PESTICIDA U HPLC ANALIZI

## DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Šime Ukić
2. prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
3. dr. sc. Ema Horak

Zagreb, rujan 2017.

*Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta „Modeliranje okolišnih aspekata napredne obrade voda za razgradnju prioriternih onečišćivala“ Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se svom mentoru docentu dr. sc. Šimi Ukiću na nesebičnoj pomoći, strpljenju i brojnim savjetima prilikom izrade ovoga rada.*

*Također bih se zahvalila asistentu Matiji Cvetniću na svojoj pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na neizmjerljivoj podršci i razumijevanju koju su mi pružili tijekom studija.*

## SAŽETAK

Razvitak novih metoda za određivanje pojedinih analita vrlo je često dugotrajan proces. Pronalazak optimalnih uvjeta analize zahtijeva puno vremena, te je često s ekonomske strane vrlo nepovoljan proces. Razvijanje novih postupaka analize uglavnom se temelji na metodi pokušaja i pogreške pri čemu se troši puno kemijskih reagensa. U svrhu smanjenja troškova i vremena potrebnog za razvitak nove metode koriste se različiti modeli vremena zadržavanja.

Ovaj rad fokusiran je na optimiranje separacije skupine pesticida analiziranih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) matematičkim putem. HPLC analizama dobivena su vremena zadržavanja ispitivanih pesticida pri izokratnim uvjetima elucije, te potom transferirana u gradijentno okruženje koristeći tzv. *iso-to-grad* pristup.

Iako gradijentni model nije pružio očekivanu kvalitetu predviđanja, detektirani su potencijalni uzroci njegovog nedostatka. Za očekivati je kako će se njihovom eliminacijom dobiti modeli znatno boljih prediktivnih karakteristika.

**Ključne riječi:** HPLC, izokratni model, *iso-to-grad* pristup, pesticidi

## ABSTRACT

Developing new methods for determining certain analytes is often a time-consuming process. Discovering the optimal conditions for analysis requires time and it is often non-economical. The development of new analytical procedures is often a result of the *trial and error* approach, where many chemical reagents are wasted. Retention time modelling is commonly used to reduce both: the costs and time spent for developing of a new method.

The aim of this work is mathematical optimization of separation for group of pesticides analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). A set of isocratic elutions was performed and the results were transferred into gradient environment by applying so called *iso-to-grad* approach.

The tested gradient model did not show great predictive capacity. Yet, such model approved itself in case with one-component eluent and therefore higher predictive abilities were expected. The major potential causes of this inadequate prediction were detected and discussed. It is expected that elimination of these causes will lead to significant increase of the model's predictive abilities.

**Key words:** HPLC, isocratic model, *iso-to-grad* approach, pesticides

# SADRŽAJ

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Uvod</b> .....                                        | 1  |
| <b>2. Kromatografija</b> .....                              | 2  |
| 2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotovornosti ..... | 2  |
| 2.2. Detektori .....                                        | 4  |
| 2.2.1. Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda.....          | 5  |
| 2.2.2. Flourescencijski detektor .....                      | 5  |
| 2.2.3. Maseni spektrometar .....                            | 5  |
| 2.3. Omjeri raspodjele u kromatografiji .....               | 6  |
| 2.4. Vrijeme zadržavanja.....                               | 7  |
| 2.5. Faktor zadržavanja .....                               | 7  |
| 2.6. Selektivnost .....                                     | 8  |
| 2.7. Djelotvornost kromatografske kolone .....              | 8  |
| <b>3. Pesticidi</b> .....                                   | 11 |
| 3.1. Izoproturon .....                                      | 11 |
| 3.2. Atrazin .....                                          | 11 |
| 3.3. Diuron.....                                            | 12 |
| 3.4. Irgarol .....                                          | 13 |
| 3.5. Simazin .....                                          | 14 |
| <b>4. Eksperimentalni dio</b> .....                         | 16 |
| 4.1. Kemikalije .....                                       | 16 |
| 4.2. Instrumenti.....                                       | 16 |
| 4.3. Kromatografska separacija .....                        | 16 |
| 4.4. Eksperimentalni dizajn .....                           | 17 |
| <b>5. Modeliranje</b> .....                                 | 19 |
| 5.1. Izokratni model vremena zadržavanja.....               | 19 |
| 5.1.1. Model linearne jakosti otapala.....                  | 19 |
| 5.1.2. Hooverov model .....                                 | 19 |
| 5.1.3. Model dvokompeticijskog eluensa .....                | 20 |
| 5.1.4. Model multikompeticijskog eluensa.....               | 20 |
| 5.1.5. Polinomni model.....                                 | 20 |
| 5.2. Gradijentno modeliranje.....                           | 21 |
| 5.3. Iso-to-grad .....                                      | 22 |
| <b>6. Rezultati i rasprava</b> .....                        | 25 |
| 6.1. Izokratna elucija .....                                | 25 |
| 6.1.1. Izokratni model I.....                               | 26 |
| 6.1.2. Izokratni model II .....                             | 28 |



|           |                           |           |
|-----------|---------------------------|-----------|
| 6.1.3.    | Izokratni model III.....  | 30        |
| 6.1.4.    | Izokratni model IV .....  | 32        |
| 6.2.      | Gradijentna elucija ..... | 34        |
| <b>7.</b> | <b>Zaključak</b> .....    | <b>37</b> |
| <b>8.</b> | <b>Literatura</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>9.</b> | <b>Životopis</b> .....    | <b>41</b> |

## 1. Uvod

Tridesetih godina prošlog stoljeća kromatografija postaje rutinska laboratorijska metoda. Od svog početka do današnjih dana doživjela je pravi procvat. Danas se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) smatra standardom u analitici, s kojim se uspoređuju sve ostale tehnike. HPLC je separacijska tehnika koja uspješno i ponovljivo razdvaja sastojke smjese u svrhu dokazivanja, određivanja sadržaja ili pročišćavanja uzorka, odnosno preparativne svrhe.<sup>1</sup>

Danas se HPLC tehnika povezuje u složene sustave s različitim detektorima, poput vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS). Nedostatak HPLC tehnike je visoka cijena, velika potrošnja organskih otapala koja se koriste u analizi, zagađenje okoliša, nepostojanje univerzalnog detektora za sve analite odnosno različite vrste analiza. Također, za neke spojeve, bez obzira na tip detektora, osjetljivost je niska.

Bez obzira na spomenute nedostatke, HPLC ima i čitav niz prednosti poput brzine, visoke moći razdvajanja komponenti, osjetljivosti, ponovljivosti, točnosti i automatiziranosti, zbog čega je postala nezaobilaznom tehnikom u laboratorijima.<sup>2</sup>

Prilikom razvoja novih kromatografskih metoda analitičari se uvelike oslanjaju na vlastito iskustvo te vrlo često pribjegavaju tzv. metodama pokušaja i pogreške. S druge pak strane, velik je broj onih koji pokušavaju matematičkim modelima opisati ponašanje kromatografskih sustava. Ovisno o uspješnosti predviđanja, ovakvi matematički modeli mogu se u većoj ili manjoj mjeri koristiti upravo za razvoj novih kromatografskih metoda. Prednosti matematičkih modela obuhvaćaju mogućnost uključivanja više parametara u model, veliku točnost i brzinu proračuna.<sup>3</sup>

## 2. Kromatografija

Kromatografija je separacijska tehnika gdje se sastojci složene smjese razdjeljuju između dviju faza pri čemu je jedna faza pokretna (mobilna), a druga nepokretna (stacionarna). Plinovita ili tekuća mobilna faza nosi ispitivanu tvar kroz stacionarnu fazu, a razdvajanje komponenti se zasniva na različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu.<sup>4</sup>

Kromatografske metode možemo podijeliti obzirom na: ravnotežu između pokretne i nepokretne faze (razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem); sastav pokretne faze (plinska kromatografija, tekućinska kromatografija, fluidna kromatografija u superkričnim uvjetima); sastav nepokretne faze (plošna kromatografija, tankoslojna kromatografija, kromatografija na papiru, kromatografija na stupcu ili koloni).<sup>5</sup>

Glavne metode kromatografije su: frontalna kromatografija, kromatografija istisnućem i kromatografija ispiranjem. Frontalna kromatografija je postupak u kojemu se uzorak (tekućina ili plin) kontinuirano unosi u kromatografsku podlogu te se u njoj ne koristi dodatna pokretna faza. Kod kromatografija istisnućem i ispiranjem uzorak se mora unositi u sustav u ograničenoj količini. Ukoliko pokretna faza sadrži spoj koji se na nepokretnoj fazi zadržava jače nego sastojak uzorka koji se ispituje, dolazit će do istiskivanja spomenutog uzorka i tada govorimo o kromatografiji istisnućem. U kromatografiji ispiranjem pokretna faza, koja se u ovom slučaju naziva eluens, neprekidno prolazi kroz ili uzduž kromatografske podloge. Eluens sadržava tvari koje se ravnomjerno natječu s ispitivanim uzorkom za aktivna mjesta u kromatografskoj podlozi (kompeticijske tvari).<sup>6</sup>

### 2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

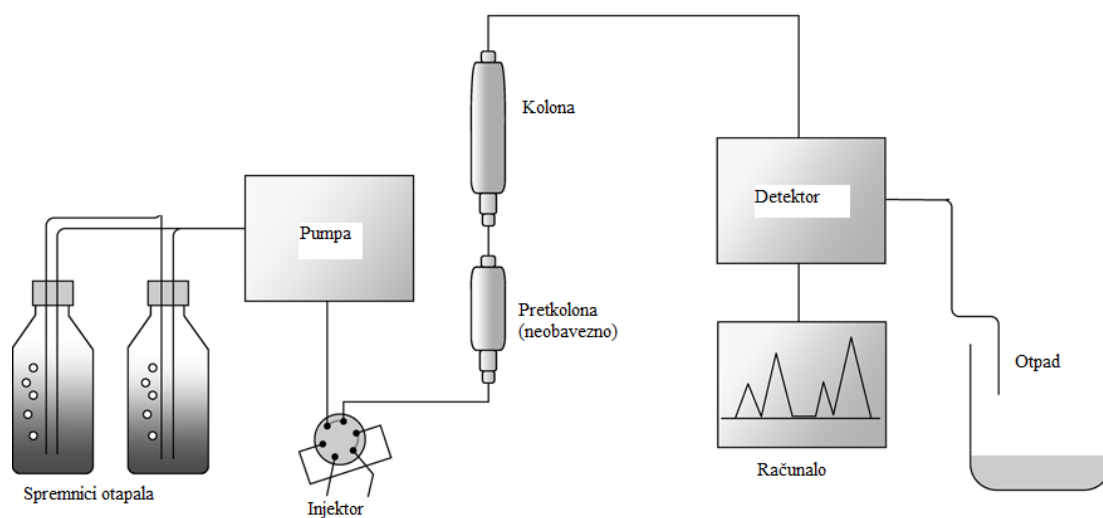
Na početku razvitka tekućinske kromatografije primijećeno je da se najveća djelotvornost kromatografske kolone postiže smanjenjem dimenzija zrna punila. Tehnologija proizvodnje i primjena punila promjera 10  $\mu\text{m}$  razvila se tek krajem 60-ih godina. Za primjenu te tehnologije bili su nužni mnogo složeniji uređaji od jednostavnih staklenih kolona, kakve su se primjenjivale u klasičnoj tekućinskoj kromatografiji.<sup>7</sup>

Kako bi se postigle dovoljne brzine protoka u kolonama s punilima u rasponu od 3 do 10 mm, nužni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa. Zbog tih visokih tlakova, oprema za

tekućinsku kromatografiju visokih performansi obično je znatno složenija i skuplja nego što se susreće u drugim vrstama kromatografije.

Moderni HPLC instrument opremljen je s jednim ili više, staklenih ili čeličnih spremnika, zapremnine 500 mL u kojima se nalazi otapalo. Često je u sklopu tog sustava uključena oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica, iz tekućina. Plinovi stvaranjem mjehurića mogu dovesti do širenja zone eluiranih sastojaka. Osim toga, mjehurići i čestice ometaju performanse većine detektora. Odstranjivači plina mogu se sastojati od vakuumskeg sustava za pumpanje, sustava destilacije, grijača i miješalice, ili sustava za otplinjavanje u kojemu se otopljeni plinovi odstranjuju iz otopine nošeni mjehurićima inertnog plina netopljivog u pokretnoj fazi.

Najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom jest izokratična elucija, pri kojoj analit kroz kolonu nosi jedno otapalo. Međutim, često se bolji kromatogram dobije gradijentnom elucijom uz upotrebu dvaju sustava otapala polarности kojih se međusobno znatno razlikuju. Odnos zapremnine dvaju otapala mijenja se na unaprijed utvrđen način.<sup>8</sup>

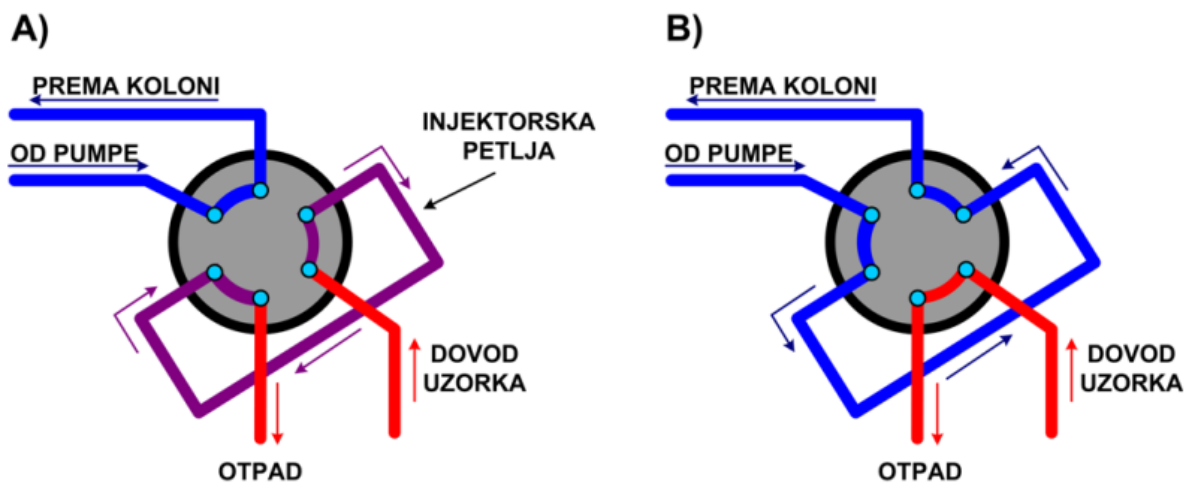


Slika 1. Shematski prikaz HPLC sustava

Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji pogodne su dvije vrste mehaničkih crpki. Protok tekućine koji stvara crpka s vijčanim pogonom ravnomjeran je i može se jednostavno nadzirati. Nedostatak im je mali kapacitet i nepogodnost za promjenu otapala. Recipročne crpke, koje su češće u uporabi, sastoje se od male komore u obliku cilindra koja se puni i prazni micanjem klipa. Micanje klipa stvara pulsirajući protok koji je potrebno prigušiti. Prednosti

ovakvih crpki su mali unutarnji volumen, visok vanjski tlak, mogućnost primjene za gradijentnu eluciju, stalni protoci koji ne ovise ni o povratnom tlaku u koloni ni o viskoznosti otapala.<sup>9</sup>

Unošenje uzorka u kromatografski sustav radi se pomoću injektora. Injektor nije ništa drugo negoli ventil koji se u svojem osnovnom sastavu sastoji od 6 mjesta za priključak. U prvoj fazi (slika 2A) uzorak se unosi kontinuiranim protokom u petlju točno definiranog volumena (injektorska petlja). Za to vrijeme eluens kontinuirano prolazi kroz kolonu, bez kontakta s injekcijskom petljom (plava linija). Zakretanjem ventila (slika 2B) tok eluensa usmjerava se na injektorsku petlju tjerajući na taj način sadržaj injektorske petlje (uzorak) dalje kroz sustav prema kromatografskoj koloni (plava linija).<sup>6</sup>



Slika 2. Unošenje uzorka u kromatografski sustav

a) punjenje injektorske petlje i b) injektiranje

## 2.2. Detektori

Određivanje i dokazivanje analita u uzorku provodi se primjenom različitih detektora, poput ultraljubičastog spektrofotometra, detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), elektrokemijskog detektora (engl. *Electrochemical Detector*, ED), detektora indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID).

### 2.2.1. Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda

DAD detektor je najčešće korišten detektor u tekućinskoj kromatografiji. To je detektor koji može snimati cijelo ultraljubičasto i vidljivo područje (190 – 800 nm), uz razlučivanje od 1 nm. Za razliku od običnog UV-Vis detektora, DAD za vrijeme jedne analize može istovremeno provoditi spektroskopsko skeniranje i precizno očitavanje vrijednosti apsorbancija. DAD detektor omogućuje snimanje cijelog UV-Vis spektra svakoga razdvojenoga kromatografskog pika, što pruža dodatnu dimenziju tijekom kromatografske analize. Tako dobiveni UV-Vis spektri daju dodatnu kvalitativnu informaciju, odnosno sigurnost u identifikaciji, pored vremena zadržavanja analita. Analiziranjem UV-Vis spektara dobivenih DAD detektorom moguće je procijeniti čistoću kromatografskog pika, to jest utvrditi je li postignuto potpuno razdvajanje, utvrditi selektivnost analitičke metode, jer sam oblik pika ne otkriva odgovara li on jednoj ili više sastavnica smjese. Također moguće je istovremeno dobiti kromatograme na nekoliko različitih valnih duljina.<sup>10,11</sup>

### 2.2.2. Fluorescencijski detektor

Fluorescencijski detektor je iznimno osjetljiv i specifičan te je zbog toga korišten kod analiza sastavnica koje se očekuju u vrlo malim količinama i kod složenih uzoraka. Glavna pretpostavka za oba slučaja je da molekule analita fluoresciraju, što je i glavno ograničenje primjene ovog detektora, budući da mali broj molekula pokazuje fluorescenciju. Prednost fluorescencijskog detektora je velika osjetljivost, otprilike 10 – 1000 puta veća nego za DAD detektor, pa se njime redovito analiziraju sastavnice u koncentracijama ng/mL, čak i pg/mL.<sup>11</sup>

### 2.2.3. Maseni spektrometar

Masena spektrometrija je analitička tehnika kojom se razdvajaju ionizirane molekule na temelju razlike u omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Instrument se sastoji od tri glavna dijela, ionizatora, analizatora i detektora. Nakon unošenja uzorka u maseni spektrometar, analit se ionizira, zatim se u analizatoru razdvaja s obzirom na omjer mase i naboja djelovanjem magnetskog ili električnog polja te se primjenom detektora (elektronskog pojačala ili scintilacijskog brojača) ioni detektiraju, signal se obrađuje, a moguće je provesti i kvantifikaciju analita.<sup>10,11</sup>

Ionizacija analita se može provoditi na nekoliko načina, pa tako razlikujemo ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI), kemijsku ionizaciju (engl. *Chemical Ionization*, CI), kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*, APCI), ionizaciju fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), matricom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI), ionizaciju bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB) i ionizaciju termoraspršenjem (engl. *Thermospray*). Tijekom ionizacije može doći do fragmentacije molekule analita, a upravo o količini energije koju ionizator predaje, odnosno u tipu ionizatora, ovisi stupanj, način i vrsta pucanja veza u molekuli analita te stvaranja različitih fragmenata. Analizator razdvaja dobivene ione analita prema omjeru mase i naboja. Neki od analizatora koji se najčešće koriste su: stupica za ione (engl. *Ion Trap*), kvadrupolni analizator (engl. *Quadrupole*) i analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF). Danas se sve više koristi tandemska masena spektrometrija (MS/MS), koja omogućuje dodatnu fragmentaciju iona.<sup>12,13</sup>

### 2.3. Omjeri raspodjele u kromatografiji

Kromatografska odjeljivanja se temelje na različitoj raspodjeli ispitivanog sastojka između pokretne i nepokretne faze.



Konstanta  $K$  gornje reakcije naziva se omjerom raspodjele ili koeficijentom raspodjele, te se definira kao:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (2)$$

pri čemu je  $c_S$  molarna analitička koncentracija sastojka u nepokretnoj fazi, a  $c_M$  u pokretnoj fazi. Idealno gledajući, omjer raspodjele stalan je u širokom području koncentracije analiziranog sastojka, što znači da je  $c_S$  razmjernan  $c_M$ . Kod visokih koncentracija analiziranog sastojka primjećuje se odstupanje od linearnosti. Velike vrijednosti  $K$  predstavljaju komponente s izraženim afinitetom prema nepokretnoj fazi, dok su suprotno tome  $K$  vrijednosti bliske nuli karakteristika komponenti koje preferiraju pokretnu fazu. Upravo razlike u vrijednostima

konstante razdjeljenja pojedinih komponenti preduvjet su koji omogućava njihovu kromatografsku separaciju.<sup>6,8</sup>

## 2.4. Vrijeme zadržavanja

Vrijeme zadržavanja definira se kao vrijeme potrebno da analit nakon injektiranja stigne do detektora i označava se simbolom  $t_R$ . Uzorak ili mobilna faza često sadrže tvari koje kolona ne zadržava. Vrijeme  $t_M$  koje je potrebno da tvar koju kolona ne zadržava stigne u detektor zove se mrtvo vrijeme.

Komponente prolaze kroz kromatografsku kolonu čiji se ukupni volumen sastoji od volumena pokretne ( $V_M$ ) i volumena nepokretne faze ( $V_S$ ). Sve komponente koje se razdvajaju u jednoj koloni prolaze kroz isti volumen koji je jednak:

$$V_M = t_{R,i} \cdot v_i = t_0 \cdot v_0 \quad (3)$$

Indeksom 0 označeno je vrijeme i brzina protoka nezadržanog sastojka (pokretne faze). Brzina protoka komponente  $i$  kroz kolonu manja je od brzine protoka nezadržanog sastojka, ovisno o vremenu provedenom u nepokretnoj fazi:

$$v_i = v_0 \frac{t_0}{t_{R,i}} = v_0 \frac{t_0}{t_0 + t_{R,i}'} = v_0 \frac{V_M}{V_{R,i}} = v_0 \frac{V_M}{V_M + V_R} \quad (4)$$

gdje  $t_{R,i}'$  predstavlja prilagođeno vrijeme zadržavanja, odnosno vrijeme koje je komponenta  $i$  provela u nepokretnoj fazi,  $V_{R,i}$  volumen zadržavanja komponente, a  $V_R'$  dodatni volumen pokretne faze potreban za eluciju komponente  $i$  uslijed njenog zadržavanja u nepokretnoj fazi (prilagođeni volumen zadržavanja).<sup>6</sup>

## 2.5. Faktor zadržavanja

Brzina protoka komponente  $i$  manja je od brzine protoka nezadržane komponente  $i$  ovisi o vremenu koje komponenta  $i$  provede u nepokretnoj fazi. Važan parametar kojim se opisuje brzina gibanja komponenta u koloni je faktor zadržavanja,  $k_i$ :

$$k_i = K_C \frac{V_S}{V_M} = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (5)$$



gdje  $K_c$  predstavlja konstantu razdjeljenja (1),  $V_s$  i  $V_M$  volumene nepokretne i pokretne faze ( $\text{dm}^3$ ),  $c_s$  i  $c_M$  koncentracije komponente  $i$  u nepokretnoj i pokretnoj fazi ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ),  $t_{R,i}$  vrijeme zadržavanja komponente  $i$  (s), a  $t_0$  vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka (s). Budući da faktor zadržavanja predstavlja omjer vremena koje uzorak provede u nepokretnoj i pokretnoj fazi te ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, prikladniji je izraz za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Poznavanje faktora zadržavanja dobar je pokazatelj kvalitete razdjeljivanja tvari određenom kromatografskom metodom. Ako faktor zadržavanja ima vrijednost puno manju od 1 znači da dolazi do prebrze elucije, a ako mu je vrijednost veća od 20 znači da je elucija prespora. Idealna vrijednost faktora zadržavanja je između 1 i 5.<sup>6</sup>

## 2.6. Selektivnost

Selektivnost,  $\alpha$ , mjera je sposobnosti razdjeljivanja i definiramo ju kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi komponenta koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena.

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

Selektivnost ovisi o faktoru zadržavanja zbog čega ovisi o sastavu pokretne i nepokretne faze, ali i o temperaturi sustava. Ako selektivnost ima vrijednost 1, to znači da nema razlike između dvije analizirane komponente i njihovo razdvajanje nije moguće.<sup>6</sup>

## 2.7. Djelotvornost kromatografske kolone

Djelotvornost kolone može se izraziti brojem teorijskih odsječaka,  $N$  (eng. *number of theoretical plates*), ili visinom ekvivalentnom teorijskom odsječku,  $HETP$  (eng. *height equivalent to a theoretical plate*), a kolona je djelotvorna kada su vrijednosti visine ekvivalentne teorijskom odsječku niske, a vrijednosti broja teorijskih odsječaka visoke.<sup>14</sup> Visina ekvivalentna teorijskom odsječku se može računati prema izrazu:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (7)$$

pri čemu je  $N$  broj teorijskih odsječaka, a  $L$  duljina kromatografske kolone.

Teorija odsječaka koju su ustanovili Martin i Synge pretpostavlja veliki broj odijeljenih slojeva duž kromatografske kolone gdje se u svakom od njih uspostavlja ravnoteža između pokretne i nepokretne faze. U slučaju idealne elucije, to znači da se unutar kromatografskih zona komponente raspodjeljuju u skladu s Gaussovom razdiobom pa izraz za broj teorijskih odsječaka poprima oblik:

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (8)$$

Ovdje  $N$  predstavlja broj teorijskih odsječaka,  $t_R$  vrijeme zadržavanja, a  $\sigma$  standardnu devijaciju njene raspodjele oko centra zone. Korištenjem vrijednosti širine pika,  $w_b$ , umjesto standardne devijacije dobijemo:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (9)$$

$w_b$  je duljina osnovice trokuta kojeg čine tangente u točkama infleksije s obje strane pika produljene do osnovice kromatograma. Parametar  $w_{0,5}$  je širina polovice maksimalne visine pika.

Broj teorijskih odsječaka može se izračunati i prema izrazu:

$$N = 2\pi \left( t_R \frac{h}{A} \right)^2 \quad (10)$$

gdje je  $h$  visina kromatografske krivulje, a  $A$  površina ispod nje.<sup>15,16</sup>

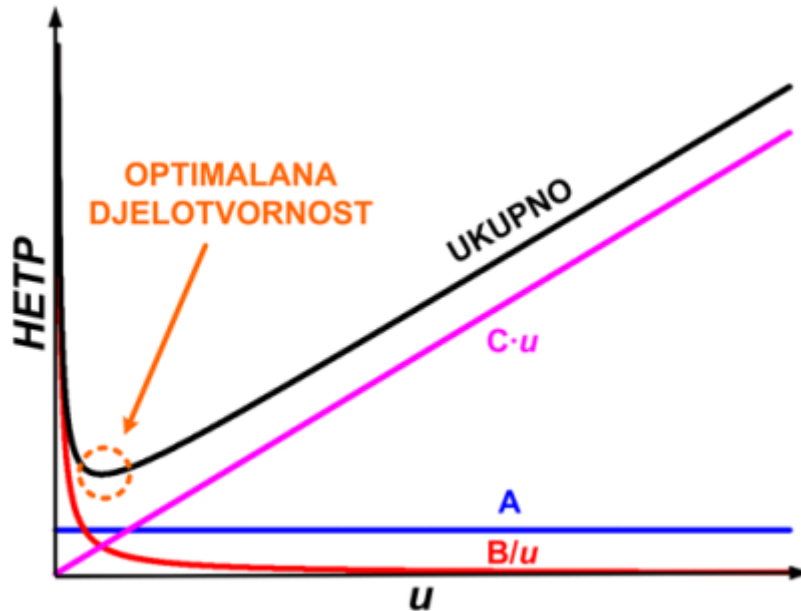
Za razliku od teorije odsječaka, teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu razmatra varijable poput protoka, veličine čestica punila, neidealnog punjenja kolona i brzine prijenosa tvari između faza. Prema Van Deemterovoj jednadžbi razlog nastajanja i širenja zone ili visine teoretskog odsječaka leži u kombiniranom djelovanju triju efekata pri linearnoj brzini protoka,  $u$ .<sup>9,15</sup>

$$HETP = A + B \cdot \frac{1}{u} + C \cdot u \quad (11)$$

$A$  – vrtložna difuzija (eng. *eddy diffusion*);  $B$  – uzdužna difuzija (eng. *longitudinal diffusion*);  
 $C$  – otpor međufaznom prijenosu tvari (eng. *mass transfer resistance*)

Vrijednost  $A$  predstavlja vrtložno miješanje i nije ovisna o brzini protoka. Vrijednost  $B$  opisuje prirodno svojstvo molekula za difuziju međutim pri visokim brzinama protoka je taj

efekt umanjen te se dijeli s  $u$ . Otpor međufaznom prijenosu tvari opisan je vrijednošću  $C$  koja je pak proporcionalna brzini protoka što znači da kod gušćeg pakiranja čestica u koloni će se više čestica iz mobilne faze zadržati. Imajući to u vidu možemo povećati izlaz, te samim time i brzinu analize ne utječući na kromatografsku djelotvornost.



Slika 3. Povećanje kromatografske učinkovitosti odabirom optimalnog protoka

Na slici (Slika 3.) dan je grafički prikaz Van Deemterove jednadžbe gdje opažamo da se najmanje širenje zone (najmanja visina teoretskog odsječka  $HETP$ ), a time i najveća kromatografska učinkovitost postiže u točki kada su ukupni uzroci širenju zone ( $A$ ,  $B$  i  $C$ ) minimalni, te navedena točka određuje optimalni protok mobilne faze,  $v$ .

## 3. Pesticidi

### 3.1. Izoproturon

Izoproturon ( $C_{12}H_{18}N_2O$ ) ili prema IUPAC-u 3-(4-izopropilfenil)-1,1-dimetilurea je pesticid koji pripada u skupinu supstituiranih fenilurea herbicida. Kemijska struktura izoproturona prikazana je na slici 7, a njegova topivost u vodenom mediju iznosi 72 mg/L pri 20 °C. Izoproturon je bijela kristalinična tvar bez mirisa s točkom tališta 155-156 °C i molekulskom masom 206,28 g/mol. Log  $K_{OW}$  za izoproturon iznosi 2,87.



Slika 4. Izoproturon

Izoproturon je herbicid koji se koristi za kontrolu jednogodišnjih trava i širokolisnih korova u žitaricama. Ima relativno niski log  $K_{ow}$  što znači da se ne adsorbira na čestice tla nego odlazi u površinske i podzemne vode. U vodi je postojan, uz odvijanje slabe hidrolize i fotokemijske razgradnje (oko 10 %) i nastajanje 3-(4-izopropilfenil)-1-metiluree, 3-(4-izopropilfenil)uree i 4,4'-diizopropilazobenzena. Izoproturon nije biorazgradiv.<sup>16</sup>

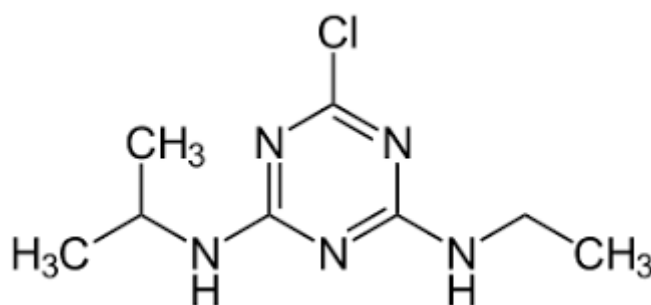
Postoje razni dostupni postupci i tehnologije obrade vode onečišćene izoproturonom, a mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke. Primjenom fizikalnih i bioloških procesa se ne mogu zadovoljiti standardi kvalitete pitke vode, pa se najčešće primjenjuju kemijski procesi kao što su napredni oksidacijski procesi upotrebom  $O_3$ ,  $O_2$  ili  $H_2O_2$  kao oksidansa.<sup>17</sup>

### 3.2. Atrazin

Atrazin ( $C_8H_{14}ClN_5$ ) ili prema IUPAC-u 2-kloro-4-etilamino-6-izopropilamino-striazin je pesticid koji pripada u skupinu triazinskih herbicida. Kemijska struktura atrazina prikazana je na slici 4, a njegova topivost u vodenom mediju iznosi 33 mg/L pri 25 °C. Atrazin je bijela kristalinična tvar bez mirisa s točkom tališta 172-175 °C i molekulskom masom 215,70 g/mol. Log  $K_{OW}$  za atrazin iznosi 2,76.<sup>18</sup>

Atrazin je herbicid registriran 1958., a koristi se za suzbijanje širokolisnih i travnatih korova na poljima kukuruza i žitarica, a primjenjuje se i u šumarstvu. Atrazin ulazi u biljku kroz korijenje i lišće te inhibira fotosintezu tako da blokira procese prijenosa elektrona. Nakon primjene, atrazin se teško razgrađuje zbog čega ostaje u zemlji i vodi do 12 mjeseci nakon primjene. Prema tome, atrazin je relativno postojano zagađivalo vode, iako mu je topljivost u vodi mala. Zbog velike učinkovitosti i niske cijene, atrazin je često upotrebljavani pesticid diljem svijeta.<sup>19</sup>

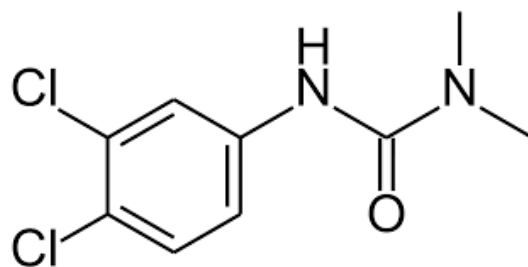
Atrazin je, kao i alaklor, prema EPA-i klasificiran kao kancerogen i endokrini disregulator. Osim toga, izaziva srčani udar, kolaps pluća, otkazivanje bubrega, niski krvni tlak, gubitak težine i oštećenja nadbubrežne žlijezde. Postoje različite metode uklanjanja atrazina i njegovih kloriranih metabolita (deizopropil atrazin i diaminoklorotriazin) iz vode, poput naprednih oksidacijskih procesa, katalitičke oksidacije, fotolize te adsorpcije. Oksidacijom atrazina ili bilo kojih drugih pesticida nastaju njihovi manji razgradni produkti ili se potpuno razgrađuju do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O.<sup>18,20</sup>



Slika 5. Atrazin

### 3.3. Diuron

Diuron (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O) ili prema IUPAC-u 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea je pesticid koji pripada u skupinu supstituiranih fenilurea herbicida. Kemijska struktura diurona prikazana je na slici 5, a njegova topivost u vodenom mediju iznosi 36,4 mg/L pri 25 °C. Diuron je bijela kristalinična tvar bez mirisa s točkom tališta oko 158 °C i molekulskom masom 233,10 g/mol. Log K<sub>OW</sub> za diuron iznosi 2,68.<sup>21</sup>



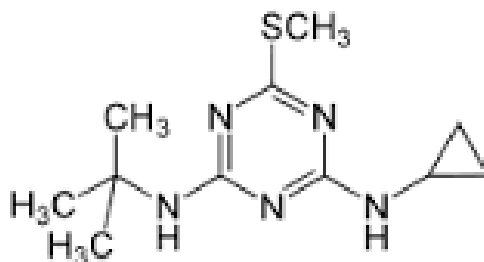
Slika 6. Diuron

Diuron je 1967. registriran kao herbicid, algicid i fungicid. Koristi se za kontrolu jednogodišnjih i višegodišnjih širokolisnih i travnatih korova na poljoprivrednim prehrambenim i neprehrambenim usjevima. Komercijalno je dostupan u obliku pudera, emulzije, granula, peleta i otopine. Lako se prenosi iz tla u korijen biljaka iz kojeg se brzo premješta u listove. Herbicidno djelovanje diurona se temelji na inhibiciji fotosinteze; ograničava proizvodnju visokoenergetskih molekula poput ATP-a koje su neophodne za provođenje različitih metaboličkih procesa, pa tako i za rast biljaka.

Prema EPA-i, diuron je karakteriziran kao potencijalno opasan za ljude, a posebno za dojenčad i djecu. Kancerogen je, kao i njegovi razgradni produkti, ali njihova mutagenost i teratogenost nije dokazana. Nalazi se na listi Europske Unije kao prioritetno opasni endokrini disregulator.<sup>21,22</sup>

### 3.4. Irgarol

2-metiltio-4-(terc-butilamino)-6-ciklopropilamino-s-triazin, popularno zvani irgarol ( $C_{11}H_{19}N_5S$ ), je pesticid koji pripada u skupinu triazinskih herbicida. Kemijska struktura irgarola prikazana je na slici 6, a njegova topivost u vodenom mediju iznosi 7,5 mg/L pri 25 °C. Irgarol je bijela kristalinična tvar bez mirisa s točkom tališta 128-130 °C i molekulskom masom 253,37 g/mol. Log  $K_{OW}$  za irgarol iznosi 3,95.<sup>23</sup>

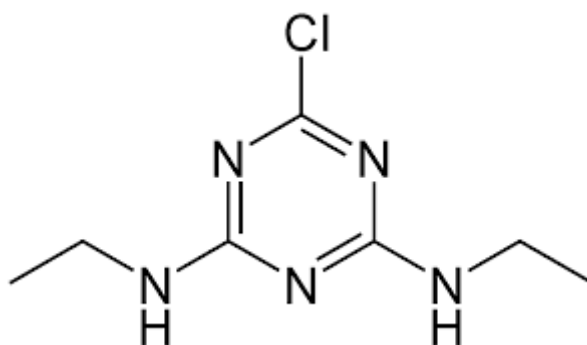


Slika 7. Irgarol

Irgarol je herbicid koji se koristi kao biocidna tvar u antivegetativnim premazima za brodove i ostala plovila. Ove boje se primjenjuju za sprječavanje rasta bakterija, makroalga, dagnja i drugih beskralježnjaka na trupovima brodova i brodica. Irgarol se tijekom vremena oslobađa u vodeni sustav te su pronađene visoke koncentracije irgarola u području jedrenja i u lukama. Irgarol je toksičan za 49 vrsta iz porodica algi, koralja, mekušaca, cijanobakterija, rakova, bodljikaša i riba, a njegov metabolit 2-metiltio-4-(terc-butilamino)-6-amino-s-triazin je toksičan za vodene biljke i alge. Djeluje tako da sprječava fotosintezu inhibirajući fotosustav II. Irgarol je slabo podložan biorazgradnji, dok su hidroliza i fotoliza bolje učinkovite. Najčešći razgradni produkt irgarola je 2-metiltio-4-(terc-butilamino)-6-amino-s-triazin, dok nove studije potvrđuju i nastajanje drugih s-triazinskih vrsta.<sup>24,25</sup>

### 3.5. Simazin

Simazin ( $C_7H_{12}ClN_5$ ) ili prema IUPAC-u 2-kloro-4,6-dietilamino-s-triazin je pesticid koji pripada u skupinu triazinskih herbicida. Kemijska struktura simazina prikazana je na slici 9, a njegova topivost u vodenom mediju iznosi 6,2 mg/L pri 20 °C. Simazin je bijela kristalinična tvar bez mirisa s točkom tališta 225-227 °C i molekulskom masom 201,66 g/mol. Log  $K_{ow}$  za simazin iznosi 2,18.<sup>26</sup>



Slika 8. Simazin

Simazin je 1984. registriran kao klorirani triazinski herbicid, a koristi se za kontrolu jednogodišnjih trava i širokolisnih korova prije nego oni niknu ili nakon njihova uklanjanja na poljima žitarica i voćnjacima. Također ima primjenu kao algicid. Nanosi se na tlo, adsorbira se u biljke kroz korijen pa se transportira do lišća gdje inhibira fotosintezu tako da sprječava tok

elektrona s fotosustava II na fotosustav I u kloroplastima. Komercijalno je dostupan u obliku granula, peleta, emulzija, koncentriranih i razrijeđenih otopina.<sup>27</sup>

Oslobađanje simazina u okoliš događa se i u blizini tvornica gdje se proizvodi putem otpadnih voda. Iz voda se može ukloniti naprednim oksidacijskim procesima. Simazin je prema EPA-i karakteriziran kao slabo toksičan, ne iritira oči ni kožu, ali je endokrini disregulator. Ne akumulira se u ribama, ali je toksičan za vodene beskrležnjake.<sup>26</sup>



## 4. Eksperimentalni dio

### 4.1. Kemikalije

- Pesticidi:
  - atrazin, 99,1 %, Sigma-Aldrich, p.a.
  - diuron, 99,6 %, Sigma-Aldrich, p.a.
  - irgarol, 98,4 %, Sigma-Aldrich, p.a.
  - izoproturon, 99,8 %, Sigma-Aldrich, p.a.
  - simazin, 99,9 %, Sigma-Aldrich, p.a.
  
- Mobilna faza za HPLC:
  - acetonitril, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, J. T. Baker, HPLC kakvoća
  - metanol, CH<sub>3</sub>OH, J. T. Baker, HPLC kakvoća

### 4.2. Instrumenti

Modularan tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (SIL-10F jedinica za automatsko uzorkovanje, SPD-M20A UV/DAD detektor, LC-20AD VP pumpa), CBM-20A, LCMS-2020 maseni spektrometar, Shimadzu).

### 4.3. Kromatografska separacija

Kod provedbe eksperimenata smo koristili kromatografsku kolonu Ascentis Express C18 2,7 μm dimenzija 3 cm × 2,1 mm koja se može koristiti pri temperaturama do 60 °C. Kao mobilnu fazu smo koristili acetonitril i metanol HPLC kakvoće, a protok mobilne faze je iznosio 0,5 mL/min.

Gradijent je ostvaren različitim doziranjem acetonitrila i metanola iz njihovih spremnika.

#### 4.4. Eksperimentalni dizajn

Ispitivanja su rađena pri temperaturi 30 °C. Mjerena su retencijska vremena atrazina, diurona, iragola, izoproturana i simazina pri različitim izokratnim elucijama; sastavi mobilnih faza prikazani su u tablici 1. Volumen uzoraka koji su injektirani u kromatografski sustav je iznosio 1  $\mu$ L, a svako mjerenje je ponavljano tri puta. Protok mobilne faze pri svim mjerenjima je bio 0,5 mL/min.

Za potrebe testiranja modela proveden je i niz od 9 gradijentnih elucija, a rezultati su prikazani u tablici 2. Svi gradijenti započinjali su u trenutku injektiranja, te su linearno mijenjali sastav do postizanja konačne vrijednosti u 15 minuti.

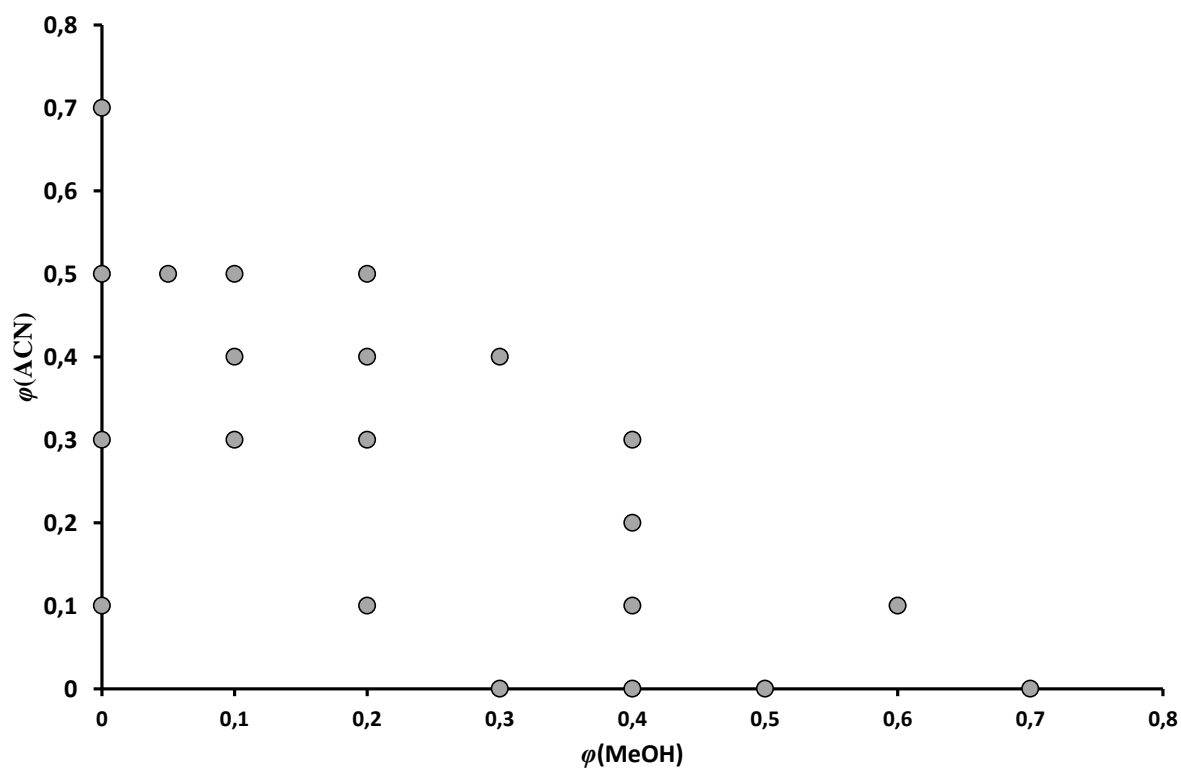
Regresijska analiza točnosti modela provedena u programskom pakeu MS Office Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, SAD), a izrada modela u programskom okruženju Matlab R2013a (The MathWorks Inc., Natick, MA, SAD).

Tablica 1. Sastav mobilne faze pri izokratnoj eluciji

|    | MeOH / % | AcN / % | H <sub>2</sub> O / % |
|----|----------|---------|----------------------|
| 1  | 30       | 0       | 70                   |
| 2  | 40       | 0       | 60                   |
| 3  | 50       | 0       | 50                   |
| 4  | 70       | 0       | 30                   |
| 5  | 0        | 10      | 90                   |
| 6  | 0        | 30      | 70                   |
| 7  | 0        | 50      | 50                   |
| 8  | 0        | 70      | 30                   |
| 9  | 5        | 50      | 45                   |
| 10 | 10       | 30      | 60                   |
| 11 | 10       | 40      | 50                   |
| 12 | 10       | 50      | 40                   |
| 13 | 20       | 10      | 70                   |
| 14 | 20       | 30      | 50                   |
| 15 | 20       | 40      | 40                   |
| 16 | 20       | 50      | 30                   |
| 17 | 30       | 30      | 40                   |
| 18 | 30       | 40      | 30                   |
| 19 | 40       | 10      | 50                   |
| 20 | 40       | 20      | 40                   |
| 21 | 40       | 30      | 30                   |
| 22 | 50       | 10      | 40                   |
| 23 | 60       | 10      | 30                   |

Tablica 2. Profil sastava mobilne faze pri gradijentnim elucijama

|   | MeOH poč.<br>/ % | AcN poč.<br>/ % | $t$ poč.<br>/ min | MeOH<br>kon. / % | AcN kon.<br>/ % | $t$ kon.<br>/ min |
|---|------------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 0                | 0               | 0                 | 15               | 35              | 15                |
| 2 | 3                | 7               | 0                 | 20               | 29              | 15                |
| 3 | 6                | 14              | 0                 | 25               | 35,5            | 15                |
| 4 | 0                | 0               | 0                 | 20               | 20              | 15                |
| 5 | 5                | 5               | 0                 | 25               | 25              | 15                |
| 6 | 10               | 10              | 0                 | 30               | 30              | 15                |
| 7 | 0                | 0               | 0                 | 15               | 35              | 15                |
| 8 | 7                | 3               | 0                 | 29               | 20              | 15                |
| 9 | 14               | 6               | 0                 | 35,5             | 25              | 15                |



Slika 9. Volumni udjeli metanola i acetonitrila u mobilnoj fazi

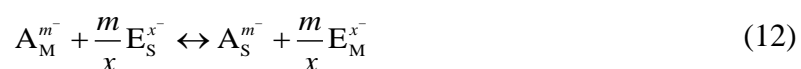
## 5. Modeliranje

### 5.1. Izokratni model vremena zadržavanja

Mnoštvo modela za predviđanje vremena zadržavanja komponenata pri izokratnoj eluciji razvijeno je do danas, kao što su: model linearne jakosti otapala, Hooverov model, model dvokompeticijskog eluensa, model multikompeticijskog eluensa, polinomni model i dr.

#### 5.1.1. Model linearne jakosti otapala

Model linearne jakosti otapala (engl. *linear solvent strength model*, LSS model) je najjednostavniji teorijski model za predviđanje vremena zadržavanja izveden je za monokompeticijske eluense, na temelju ravnoteže procesa ionske izmjene:



gdje je  $A^{m^-}$  ispitivani sastojak, a  $E^{x^-}$  kompeticijski ion iz eluensa. Pojednostavljeni izraz poprima sljedeći oblik<sup>28</sup>:

$$\log k_A = C - \frac{m}{x} \log c_M(E^{x^-}) \quad (13)$$

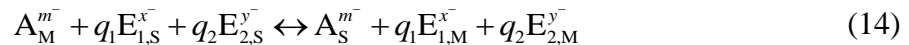
gdje je C konstanta vrijednost za određeni kromatografski sustav, a  $c_M$  koncentracija tvari u pokretnoj fazi. Primjećuje se kako je ovisnost logaritma faktora zadržavanja i logaritma koncentracije kompeticijskog iona u eluensu linearna, dok je nagib pravca jednak omjeru nabojnog broja analita i kompeticijskog iona iz eluensa.

#### 5.1.2. Hooverov model

Hooverov model može se primijeniti za višekomponentne eluense, a uzima u obzir utjecaj svih sastojaka eluensa na vrijeme zadržavanja analita. Za svaku komponentu eluensa potrebno je eksperimentalno odrediti koeficijent selektivnosti odgovarajućeg procesa ionske izmjene.<sup>29</sup>

### 5.1.3. Model dvokompeticijskog eluensa

Primjena modela dvokompeticijskog eluensa (engl. dual eluents species model, DES) zahtijeva eksperimentalno određivanje dva parametra: konstante selektivnosti iona analita  $A^{m-}$  prema kompeticijskom ionu iz eluensa  $K_1^{x-}$  ( $K_{A/E1}$ ) i konstante selektivnosti drugog kompeticijskog iona iz eluensa  $E_2^{y-}$  prema ionu  $E_1^{x-}$  ( $K_{E1/E2}$ ). Konstante su definirane prema jednadžbi:



pri čemu su  $m$ ,  $x$  i  $y$  nabojni brojevi iona, a  $q_1$  i  $q_2$  stehiometrijski koeficijenti.<sup>30,31</sup>

### 5.1.4. Model multikompeticijskog eluensa

Model multikompeticijskog eluensa (engl. *multiple species eluent/analyte model*, MSEA) je najkompleksniji teorijski model jer pretpostavlja da prilikom kromatografskih ispitivanja razdvajanja analita u širokom području pH-vrijednosti dolazi do protonizacije iona iz uzorka. Upravo ta pretpostavka zahtijeva uzimanje u obzir interakcije svih tvari koje se nalaze u eluensu sa svim ionskim oblicima analita.<sup>32</sup>

### 5.1.5. Polinomni model

Model linearne jakosti (LSS) otapala je najjednostavniji model za predviđanje vremena zadržavanja pri izokratnoj eluciji. Obzirom da uzima u obzir samo elektrostatičke efekte koji uzrokuju ionsku izmjenu, prisutnost mehanizama koji uzrokuju zadržavanje utječe na sposobnost predviđanja, a to se očituje kao odstupanje od linearnosti. Kod analize većeg broja analita primijećeno je da nagib pravca u LSS modelu značajno odstupa od teorijskog.<sup>33</sup>

Predviđanja u situacijama kada se javlja odstupanje od linearnosti može se unaprijediti uključivanjem dodatnog faktora u model čime se dobiva polinomna ovisnost.

Kod jednokomponentnog eluensa dobijemo izraz iz kojeg je vidljivo da na zavisnu varijablu utječe samo jedan faktor:

$$\log k = a_0 + a_1 \cdot \varphi(\text{eluens}) \quad (15)$$

Za određivanje parametra ovog modela potrebna su minimalno dva eksperimenta. U slučaju kada imamo više faktora potrebno je uzeti u obzir utjecaj svih faktora na zavisnu varijablu.<sup>5,34</sup>

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (16)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (17)$$

## 5.2. Gradijentno modeliranje

Prilikom gradijentne elucije sastav eluensa tijekom analize nije konstantan, što se najčešće postiže dodatkom sastojka eluensa koji povećava njegovu jakost, tj. koncentraciju, a naziva se modifikatorom. Promjena sastava eluensa naziva se gradijentnim profilom, a opisuje se funkcijom:

$$c_{\text{mod}}(t) = c_{\text{mod,poč}} + (c_{\text{mod,kraj}} + c_{\text{mod,poč}}) \cdot \left( \frac{t - t_{\text{g,poč}}}{t_{\text{g}}} \right)^S ; \quad t_{\text{g,poč}} \leq t \leq t_{\text{g,kraj}} \quad (18)$$

u kojoj  $c_{\text{mod,poč}}$  predstavlja početnu koncentraciju modifikatora,  $c_{\text{mod,kraj}}$  njegovu konačnu koncentraciju,  $t_{\text{g,poč}}$  vrijeme početka gradijenta,  $t_{\text{g,kraj}}$  vrijeme njegova završetka,  $t_{\text{g}}$  vrijeme trajanja gradijenta ( $t_{\text{g,poč}} - t_{\text{g,kraj}}$ ), a  $S$  je parametar oblika gradijentnog profila koji određuje vrstu funkcije prema kojoj se mijenja koncentracija modifikatora između  $t_{\text{g,poč}}$  i  $t_{\text{g,kraj}}$ .

Često se umjesto vremena trajanja gradijenta koristi nagib gradijenta,  $G$ :

$$G = \frac{c_{\text{mod,kraj}} - c_{\text{mod,poč}}}{t_{\text{g}}} \quad (19)$$

pa funkcija (18) poprima oblik:

$$c_{\text{mod}}(t) = c_{\text{mod,poč}} + (c_{\text{mod,kraj}} + c_{\text{mod,poč}})^{1-S} \cdot (t - t_{\text{g,poč}})^S \cdot G^S \quad (20)$$

Predviđanje vremena zadržavanja pri gradijentnoj eluciji je složenije i manje istraženo od predviđanja pri izokratnoj eluciji. Stoga možemo uvesti tzv. efektivni faktora zadržavanja,  $k_{\text{ef}}$ , koji se postepeno mijenja s promjenom koncentracije eluensa tijekom gradijentne elucije, a izražava se kao:

$$k_{\text{ef}} = C_{\text{g}} R^{-m(m+x)} \quad (21)$$

gdje je  $C_g$  konstanta,  $R$  nagib gradijentnog profila koji se računa kao omjer promjene koncentracije eluensa s vremenom i volumnog protoka, a  $m$  i  $x$  nabojni brojevi iona analita, odnosno kompeticijskog iona iz eluensa.

Temeljeno na izrazu (21) možemo predvidjeti faktor zadržavanja u ovisnosti o nagibu gradijentnog profila. Za primjenu takvog modela potreban je samo jedan eksperiment pri gradijentnoj eluciji kako bi se odredila konstanta  $C_g$ , ali obzirom da model ne uzima u obzir vrijeme početka gradijenta, nije pogodan za složenije gradijentne profile.<sup>35,36</sup>

Neki drugi modeli predviđanja vremena zadržavanja su složeniji i iziskuju veliki broj eksperimenata pa se stoga pri gradijentnoj eluciji koriste eksperimentalni podaci dobiveni izokratnom elucijom. Prijenos informacija iz izokratnog u gradijentni model provodi se integriranjem, pri čemu se faktor zadržavanja dobiven izokratnom elucijom integrira od trenutka injektiranja uzorka do trenutka eluiranja.<sup>37</sup> Taj princip temelj je *iso-to-grad* modela, kojeg ću opisati u poglavlju što slijedi.

### 5.3. Iso-to-grad

Integralni gradijentni model temelji se na pretpostavci da je vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka u određenoj koloni uz stalan protok konstantno. Taj model proizlazi iz jednadžbe (5) kojom je definiran koeficijent zadržavanja,  $k_i$ , a prema kojoj se vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka može izraziti kao:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} (t_R - t_0) \quad (22)$$

pri čemu  $k_i [c]$  označava faktor zadržavanja uzimajući u obzir njegovu ovisnost o koncentraciji kompeticijskih iona iz eluensa,  $c$ . Jednadžba (22) može se zapisati i kao:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} \{ (t_R - t_0) - (t_0 - t_0) \} \quad (23)$$

Član u vitičastoj zagradi može se prikazati pomoću integrala:

$$t_0 = \frac{1}{k_i [c]} \int_{(t_0 - t_0)}^{(t_R - t_0)} d(t - t_0) = \frac{1}{k_i [c]} \int_0^{(t_R - t_0)} dt \quad (24)$$

Obzirom da pri izokratnoj eluciji faktor zadržavanja ne ovisi o vremenu može se pisati:

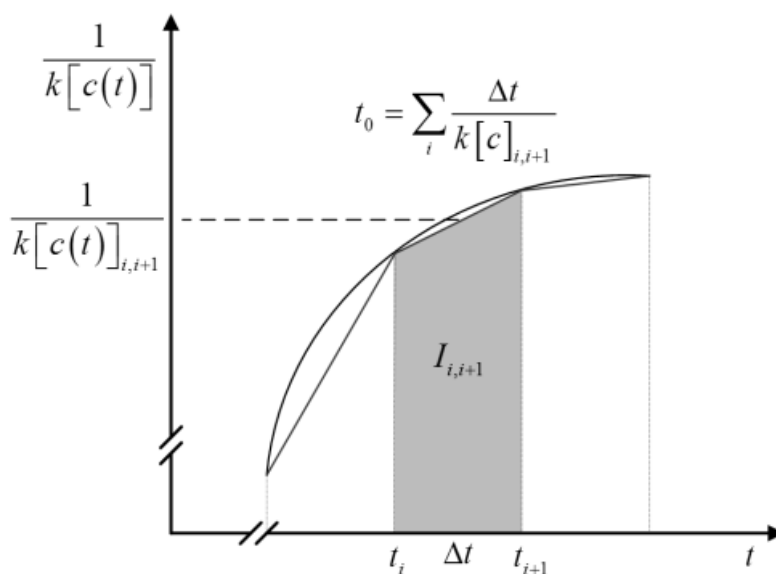
$$t_0 = \int_0^{(t_R - t_0)} \frac{dt}{k_i [c]} \quad (25)$$

Za razliku od izokratne elucije, pri gradijentnoj eluciji koncentracija kompeticijskih iona mijenja se tijekom vremena pa zbog toga i faktor zadržavanja postaje ovisan o vremenu:

$$t_0 = \int_0^{(t_R - t_0)} \frac{dt}{k_i [c(t)]} \quad (26)$$

Dobivena integralna jednadžba rješava se numerički, pri čemu se integral dijeli na velik broj malih integracijskih koraka. Za svaki integracijski korak može se pretpostaviti izokratna elucija:

$$t_0 = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k_i [c(t)]} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k_i [c(t)]} \quad (27)$$



Slika 11. Prikaz numeričke integracije trapeznom metodom.

Unutar tako sitnih integracijskih koraka, faktor zadržavanja može se smatrati konstantnim, a ovisi samo o koncentraciji kompeticijskih iona iz eluensa. Njegova vrijednost može se aproksimirati srednjom vrijednošću pri koncentracijama eluensa u granicama integrala prikazanog na slici 11:

$$k [c]_{i,i+1} = \frac{k [c(t_i)] + k [c(t_{i+1})]}{2} \quad (28)$$

Uvažavajući sve navedeno, integrali iz izraza (22) mogu se aproksimirati:



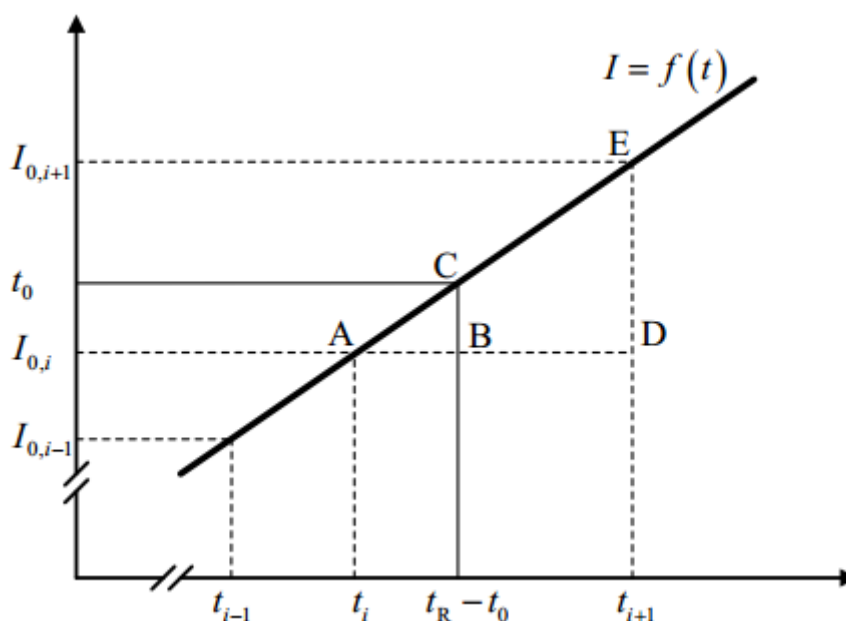
$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} = I_{0,i} + I_{i,i+1} = I_{0,i+1} \quad (29)$$

gdje je  $I$  aproksimativna vrijednost integrala u naznačenim granicama. Vrijednost kumulativnog integrala  $I_{0,i+1}$  računa se stupnjevito, dodajući doprinose pojedinih integracijskih koraka. Iteracijski postupak završava u trenutku kada je vrijednost kumulativnog integrala veća od vrijednosti  $t_0$ . Tada iz sličnosti trokuta ABC i ADE prikazanih na slici 12 slijedi:

$$\frac{t_0 - I_{0,i}}{(t_R - t_0) - t_i} = \frac{I_{0,i+1} - I_{0,i}}{t_{i+1} - t_i} \quad (30)$$

Iz jednadžbi (24) i (25) izračuna se vrijeme zadržavanja analita prema izrazu:

$$t_R = t_0 + t_i + (t_0 - I_{0,i})k[c]_{i,i+1} \quad (31)$$



Slika 12. Grafički prikaz završetka integracijskog postupka i računanja vremena zadržavanja pri gradijentnoj eluciji.

Za integralni gradijentni model potrebno je eksperimentalno odrediti vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka, te je potrebno definirati gradijentni profil, tj. ovisnost koncentracije kompeticijskih iona iz eluensa o vremenu. Tada se gradijentni profil može podijeliti na sitne intervale u kojima će se provesti numerička integracija i za koje će se moći pretpostaviti izokratna elucija.<sup>37,28</sup>

## 6. Rezultati i rasprava

### 6.1. Izokratna elucija

U tablicama 1. i 2. su prethodno navedeni sastavi pokretne faze korišteni pri ispitivanju. Iz tih podataka vidljivo je kako maksimalni udio organskih otapala u mobilnoj fazi do kojeg se išlo iznosi 70 %. Naime svaki udio organske faze iznad 70 % je prebrzo eluirao ispitivane pesticide van iz kromatografske kolone (elucija zajedno s nezadržanim sastojkom). Vremena zadržavanja svih pet ispitivanih pesticida pri izokratnim elucijama su navedena u tablici 3.

Pri konstantnim uvjetima protoka, uočeno je da vrijeme nezadržanog sastojka nije konstantno već donekle varira s obzirom na promjenu sastava mobilne faze. Kako je konstantnost elucije nezadržanog sastojka bitna za provedbu matematičkih proračuna, u svim proračunima korištena je srednja vrijednost vremena nezadržanog sastojka koja je iznosila 0,346 min.

Za potrebe opisivanja vladanja sustava pri izokratnim elucijama ispitani su različiti matematički modeli navedeni u tablici 3. Točnost modela ispitivana je za svaku pojedinu komponentu.

Tablica 3. Vremena zadržavanja analita pri izokratičnim elucijama

| $\varphi(\text{MeOH})$ | $\varphi(\text{AcN})$ | $t_0/\text{min}$ | $t_{R,\text{SIMAZIN}}/\text{min}$ | $t_{R,\text{DIURON}}/\text{min}$ | $t_{R,\text{ATRAZIN}}/\text{min}$ | $t_{R,\text{IRAGOL}}/\text{min}$ | $t_{R,\text{IZOPROTURON}}/\text{min}$ |
|------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 0,3                    | 0,0                   | 0,350            | 1,904                             | 5,226                            | 4,124                             | 4,998                            | 6,538                                 |
| 0,5                    | 0,0                   | 0,348            | 0,605                             | 0,896                            | 0,833                             | 0,931                            | 1,047                                 |
| 0,7                    | 0,0                   | 0,344            | 0,431                             | 0,471                            | 0,475                             | 0,484                            | 0,537                                 |
| 0,0                    | 0,1                   | 0,345            | 3,910                             | 22,744                           | 12,713                            | 20,233                           | 21,933                                |
| 0,2                    | 0,1                   | 0,350            | 1,311                             | 3,480                            | 2,619                             | 3,384                            | 3,859                                 |
| 0,4                    | 0,1                   | 0,350            | 0,620                             | 0,921                            | 0,854                             | 0,934                            | 1,146                                 |
| 0,6                    | 0,1                   | 0,350            | 0,432                             | 0,466                            | 0,473                             | 0,475                            | 0,536                                 |
| 0,0                    | 0,3                   | 0,350            | 0,730                             | 1,310                            | 1,144                             | 1,310                            | 1,255                                 |
| 0,1                    | 0,3                   | 0,350            | 0,614                             | 0,923                            | 0,860                             | 0,931                            | 0,966                                 |
| 0,2                    | 0,3                   | 0,340            | 0,526                             | 0,673                            | 0,659                             | 0,678                            | 0,744                                 |
| 0,4                    | 0,3                   | 0,360            | 0,425                             | 0,458                            | 0,464                             | 0,464                            | 0,508                                 |
| 0,0                    | 0,5                   | 0,325            | 0,462                             | 0,514                            | 0,533                             | 0,526                            | 0,553                                 |
| 0,05                   | 0,5                   | 0,345            | 0,439                             | 0,484                            | 0,499                             | 0,495                            | 0,526                                 |
| 0,1                    | 0,5                   | 0,345            | 0,429                             | 0,465                            | 0,475                             | 0,472                            | 0,505                                 |
| 0,2                    | 0,5                   | 0,345            | 0,402                             | 0,415                            | 0,423                             | 0,421                            | 0,431                                 |
| 0,0                    | 0,7                   | 0,350            | 0,413                             | 0,436                            | 0,446                             | 0,444                            | 0,482                                 |
| 0,1                    | 0,4                   | 0,342            | 0,479                             | 0,568                            | 0,570                             | 0,576                            | 0,620                                 |
| 0,2                    | 0,4                   | 0,342            | 0,427                             | 0,462                            | 0,471                             | 0,470                            | 0,503                                 |
| 0,3                    | 0,4                   | 0,342            | 0,406                             | 0,429                            | 0,438                             | 0,435                            | 0,466                                 |
| 0,4                    | 0,2                   | 0,348            | 0,466                             | 0,540                            | 0,538                             | 0,551                            | 0,610                                 |
| 0,4                    | 0,0                   | 0,345            | 0,890                             | 1,742                            | 1,513                             | 1,810                            | 2,093                                 |

Tablica 4. Modeli vremena zadržavanja pri izokratnim elucijama.

| BROJ MODELA | MODEL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I           | $\log k = a_0 + a_1 \cdot \varphi(\text{MeOH}) + a_2 \cdot \varphi(\text{ACN})$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| II          | $\log k = a_0 + a_1 \cdot \varphi(\text{MeOH}) + a_2 \cdot \varphi(\text{ACN}) + a_{12} \cdot \varphi(\text{MeOH}) \cdot \varphi(\text{ACN})$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| III         | $\log k = a_0 + a_1 \cdot \varphi(\text{MeOH}) + a_2 \cdot \varphi(\text{ACN}) + a_{12} \cdot \varphi(\text{MeOH}) \cdot \varphi(\text{ACN}) + \dots$<br>$\dots + a_{11} \cdot \varphi^2(\text{MeOH}) + a_{22} \cdot \varphi^2(\text{ACN})$                                                                                                                                                                                                                          |
| IV          | $\log k = a_0 + a_1 \cdot \varphi(\text{MeOH}) + a_2 \cdot \varphi(\text{ACN}) + a_{12} \cdot \varphi(\text{MeOH}) \cdot \varphi(\text{ACN}) + \dots$<br>$\dots + a_{112} \cdot \varphi^2(\text{MeOH}) \cdot \varphi(\text{ACN}) + a_{122} \cdot \varphi(\text{MeOH}) \cdot \varphi^2(\text{ACN}) + \dots$<br>$\dots + a_{11} \cdot \varphi^2(\text{MeOH}) + a_{22} \cdot \varphi^2(\text{ACN}) + a_{1122} \cdot \varphi^2(\text{MeOH}) \cdot \varphi^2(\text{ACN})$ |

### 6.1.1 Izokratni model I

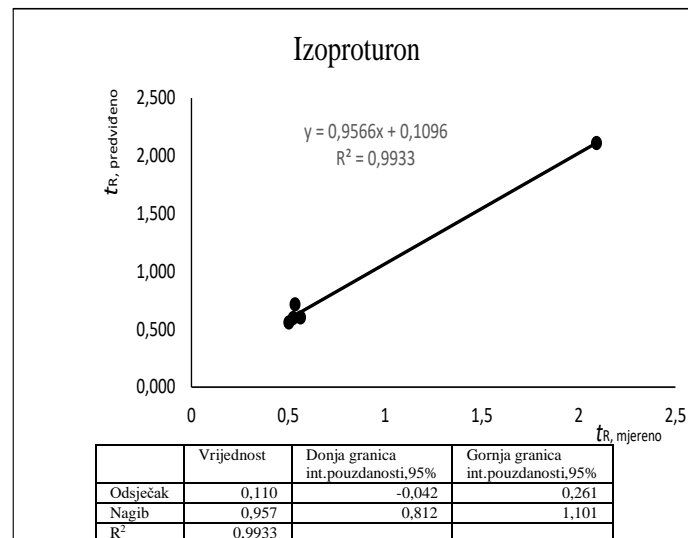
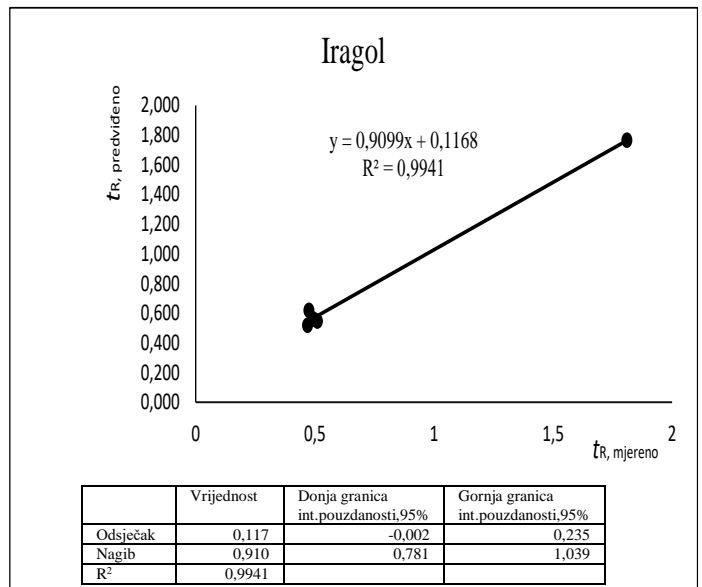
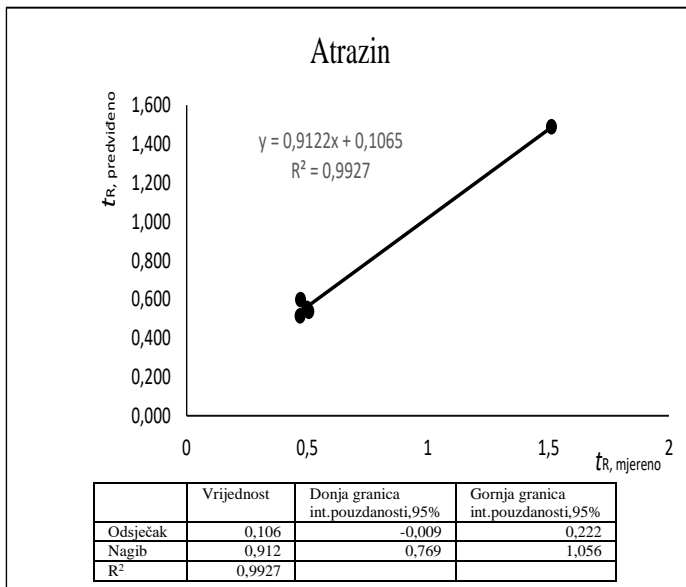
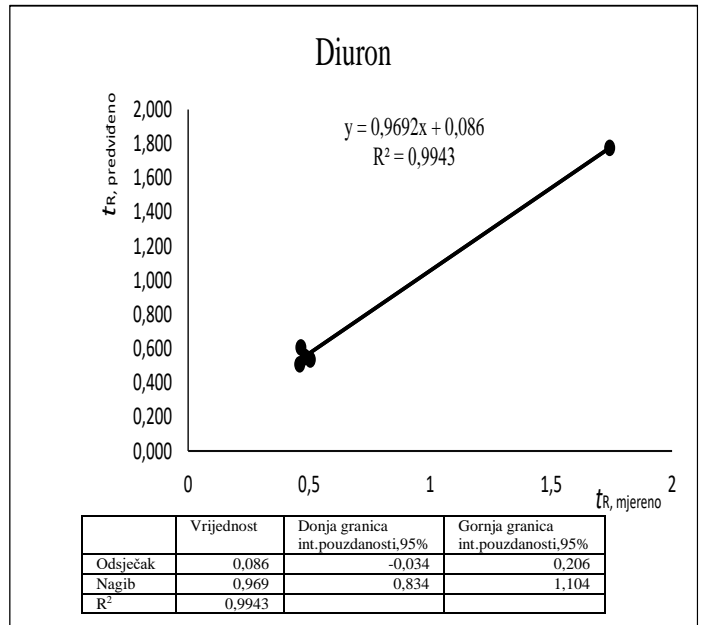
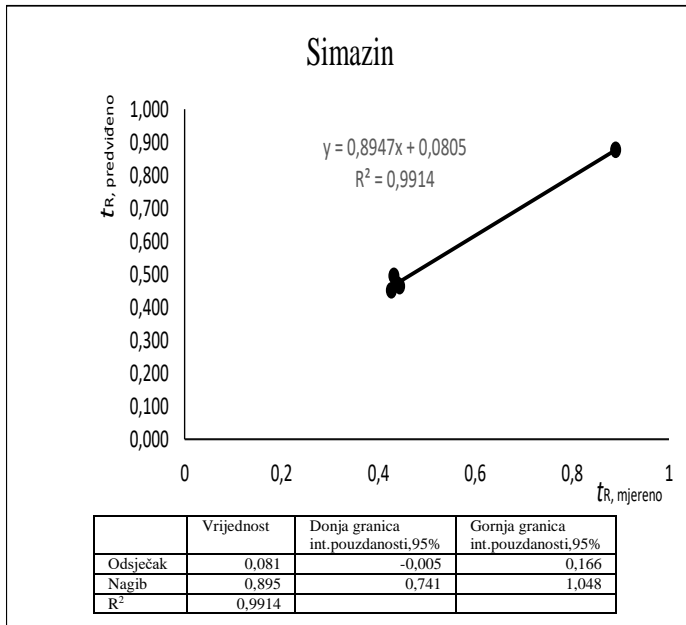
Primijenjeni model I sadržava samo linearnu kombinaciju doprinosa udjela metanola i acetonitrila što se reflektira u podosta lošem podudaranju s eksperimentalnim podacima ( $R^2 \geq 0,9249$ , tablica 5).

Tablica 5. Koeficijenti izokratnog modela I

|       | SIMAZIN | DIURON | ATRAZIN | IRAGOL | IZOPROTURON |
|-------|---------|--------|---------|--------|-------------|
| $a_0$ | 1,184   | 1,960  | 1,713   | 1,912  | 1,909       |
| $a_1$ | -2,495  | -3,360 | -2,986  | -3,247 | -3,003      |
| $a_2$ | -3,010  | -4,042 | -3,574  | -3,919 | -3,795      |
| $R^2$ | 0,9456  | 0,9458 | 0,9461  | 0,9466 | 0,9249      |

Točnost modela ispitana je provedbom regresijske analize eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti vremena zadržavanja. Točnost je ispitana za svaki pojedini analizirani pesticid (slika 13). Vidljive su relativno visoke vrijednosti koeficijenta determinacije,  $R^2$ , koja za svake pesticide poprima vrijednost iznad 0,9914. Također možemo primijetiti iz 95%-tnog intervala pouzdanosti da ni kod jedne komponente nije prisutna sustavna pogreška, kako konstantna tako ni proporcionalna. Naime svi intervali pouzdanosti za odsječak sadrže vrijednosti 0, odnosno intervali pouzdanosti za nagib vrijednost 1.

Svejedno, treba napomenuti da je odabir eksperimentalnih točaka nažalost pomalo nespretno, jer tri od četiri točke nalaze se u blizini ishodišta, dok je četvrta dosta udaljena. Ovakav odabir eksperimentalnih točaka smanjuje doprinos korisnih informacija triju točaka pozicioniranih u blizini ishodišta i rezultira visokom vrijednošću koeficijenta determinacije,  $R^2$ .



Slika 13. Analiza točnosti izokratnih modela I

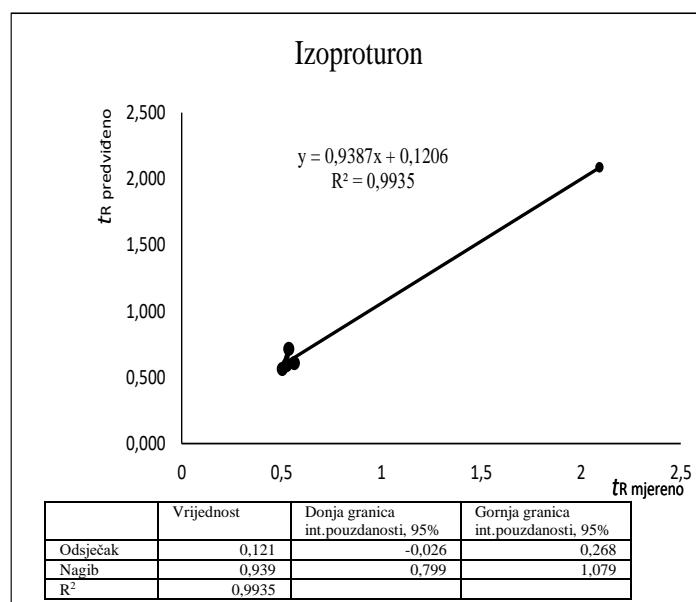
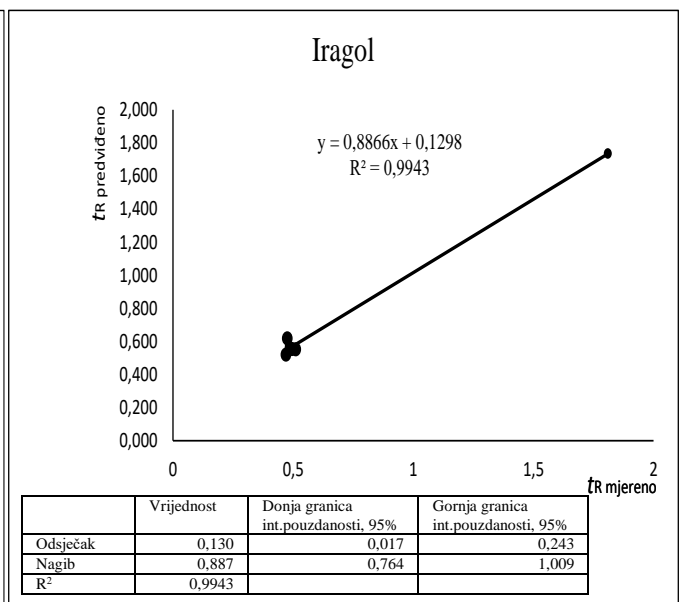
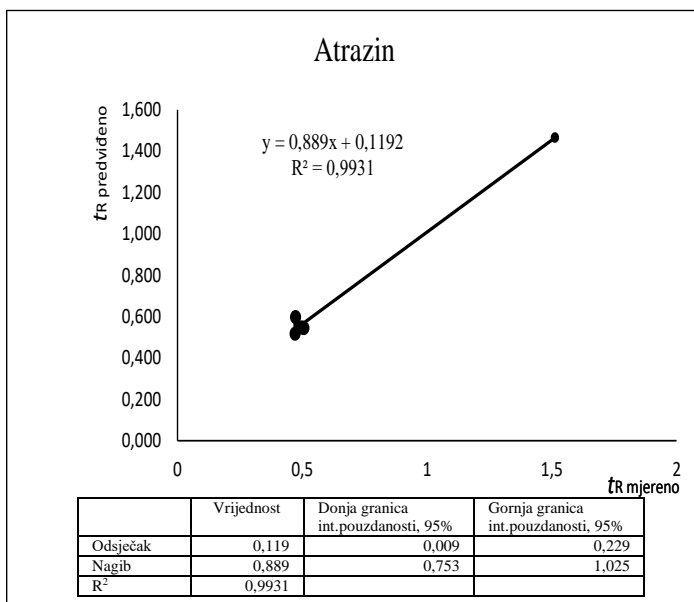
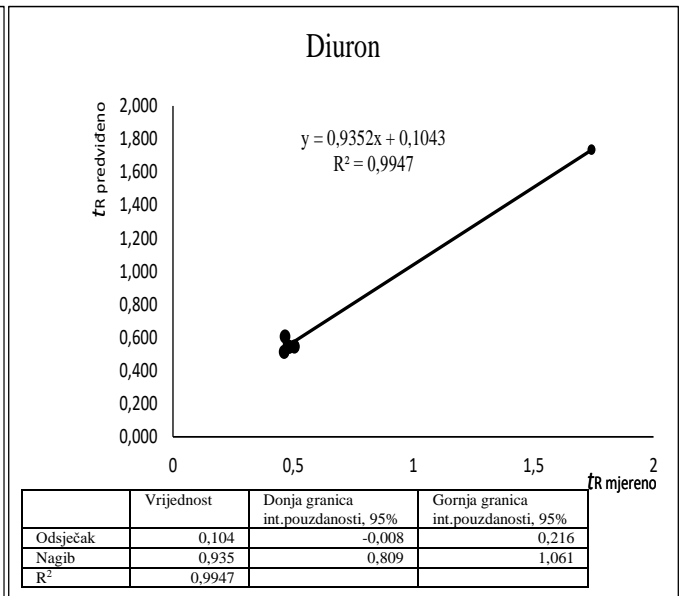
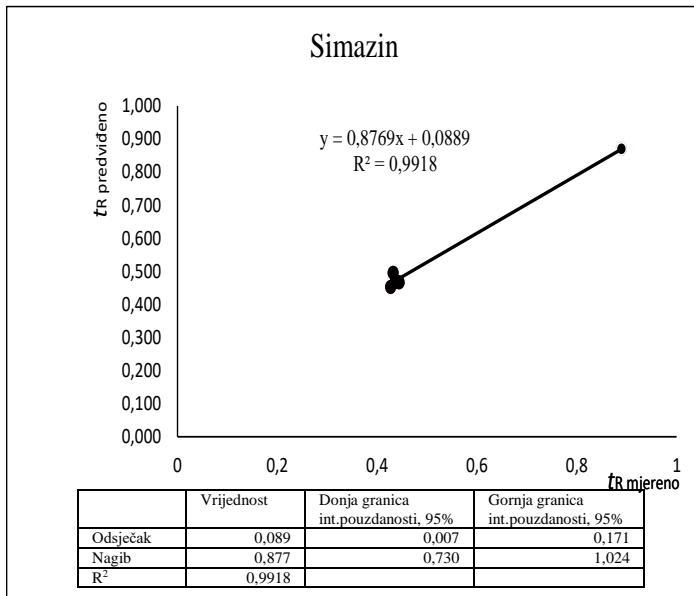
### 6.1.2. Izokratni model II

U slučaju izokratnog modela broj II, uveden je dodatni član koji predstavlja interakcije između dviju sastavnica mobilne faze: acetonitrila i metanola. Uvođenje ovog člana tek je za malo povećalo podudarnost modela s eksperimentalno izmjerenim vrijednostima zadržavanja ( $R^2 \geq 0,9252$ , tablica 6).

Tablica 6. Koeficijenti izokratnog modela II

|          | SIMAZIN | DIURON | ATRAZIN | IRAGOL | IZOPROTURON |
|----------|---------|--------|---------|--------|-------------|
| $a_0$    | 1,192   | 1,978  | 1,725   | 1,924  | 1,918       |
| $a_1$    | -2,532  | -3,436 | -3,038  | -3,302 | -3,042      |
| $a_2$    | -3,051  | -4,126 | -3,631  | -3,978 | -3,838      |
| $a_{12}$ | 0,274   | 0,565  | 0,385   | 0,405  | 0,293       |
| $R^2$    | 0,9459  | 0,9466 | 0,9466  | 0,9471 | 0,9252      |

Kako se može vidjeti na slici 14. i ovaj model dobro predviđa testne podatke za sve komponente i ne ukazuje na sustavnu pogrešku.  $R^2$  vrijednost je vrlo visoka, a što je više posljedica odabira točaka nego potvrda podudarnosti s primijenjenim modelom pravca (vidjeti komentar iz prethodnog poglavlja).



Slika 14. Analiza točnosti izokratnih modela II

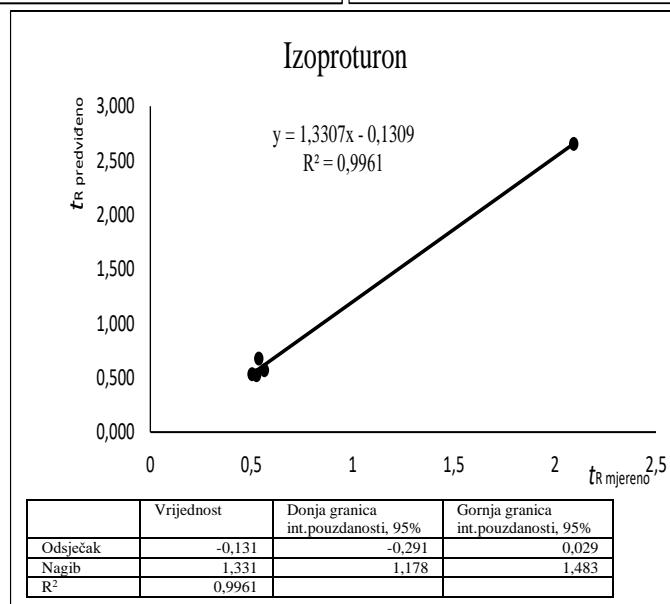
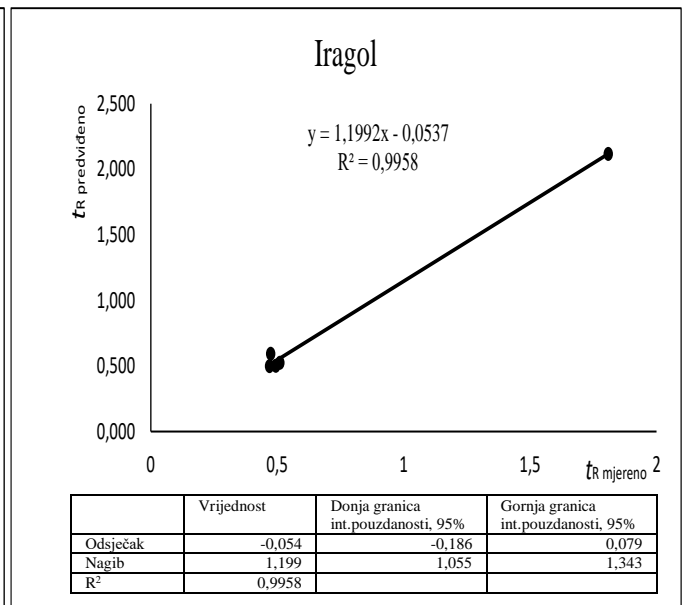
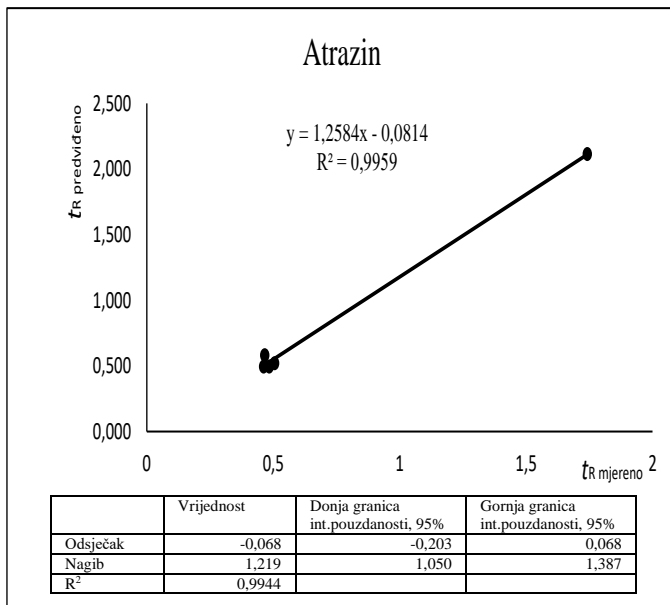
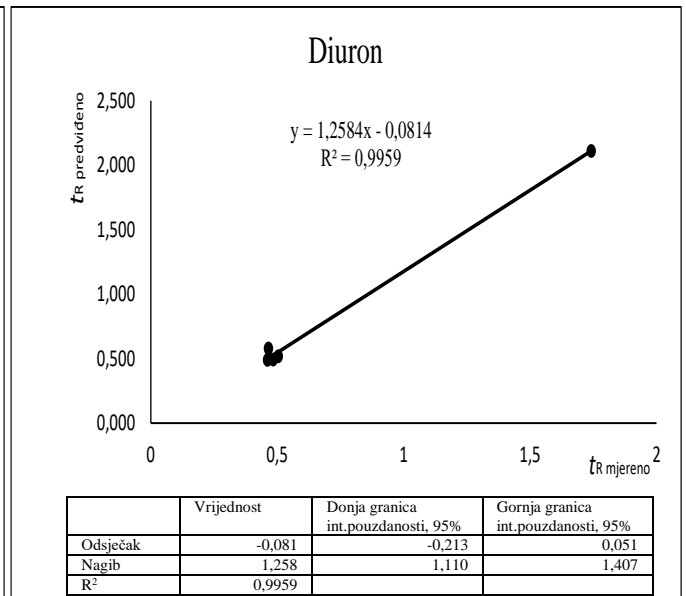
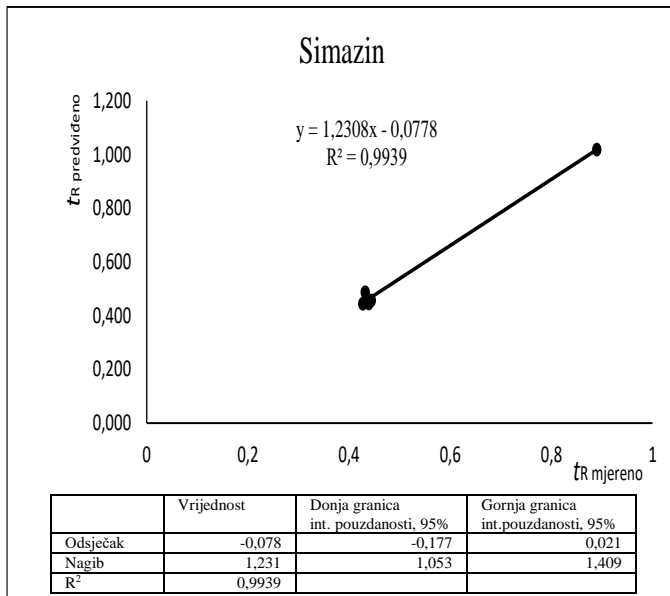
### 6.1.3. Izokratni model III

U slučaju izokratnog modela br. III, uvedena su dva nova kvadratna člana (tablica 3) što se osjetno očitovalo u podudarnost modela s eksperimentalno izmjerenim vrijednostima zadržavanja ( $R^2 \geq 0,9856$ , tablica 7).

Tablica 7. Koeficijenti izokratnog modela III

|          | SIMAZIN | DIURON | ATRAZIN | IRAGOL | IZOPROTURON |
|----------|---------|--------|---------|--------|-------------|
| $a_0$    | 1,588   | 2,600  | 2,243   | 2,519  | 2,584       |
| $a_1$    | -3,329  | -5,179 | -4,343  | -4,925 | -4,826      |
| $a_2$    | -6,201  | -8,697 | -7,554  | -8,380 | -8,794      |
| $a_{12}$ | 4,293   | 7,048  | 5,737   | 6,587  | 7,204       |
| $a_{11}$ | 0,203   | 1,122  | 0,694   | 1,002  | 1,066       |
| $a_{22}$ | 4,115   | 5,828  | 5,048   | 5,626  | 6,345       |
| $R^2$    | 0,9894  | 0,9908 | 0,9901  | 0,9913 | 0,9856      |

Nažalost provedena analiza točnosti ukazuje na to da se s ovim modelom u cijelu priču unosi i sustavna pogreška. Naime, interval pouzdanosti za nagib kod svih pet ispitivanih pesticida ne uključuje vrijednost 1 (slika 15), tj. primijenjeni model III s 95%-tnom vjerojatnošću sadržava proporcionalnu sustavnu pogrešku. Vrijednosti koeficijenta determinacije kod analize točnosti i dalje poprimaju visoke vrijednosti, no kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima, na važnost ovog parametra u cijeloj priči znatno utječe nepovoljan odabir eksperimentalnih točaka.



Slika 15. Analiza točnosti izokratnih modela III



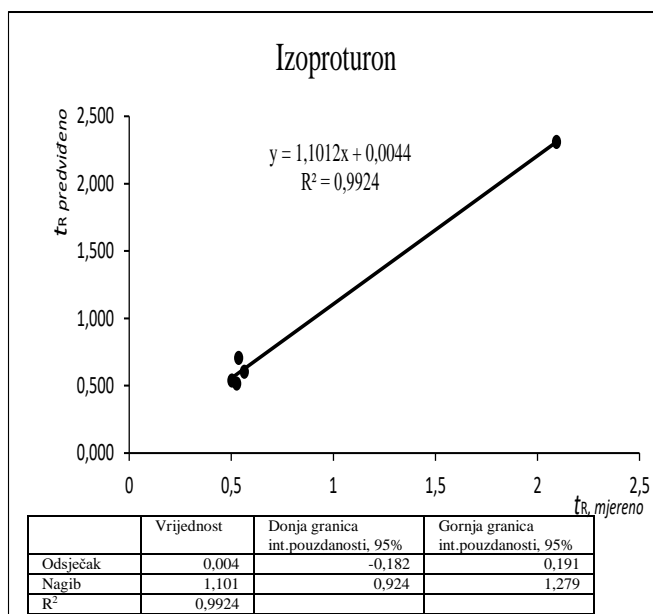
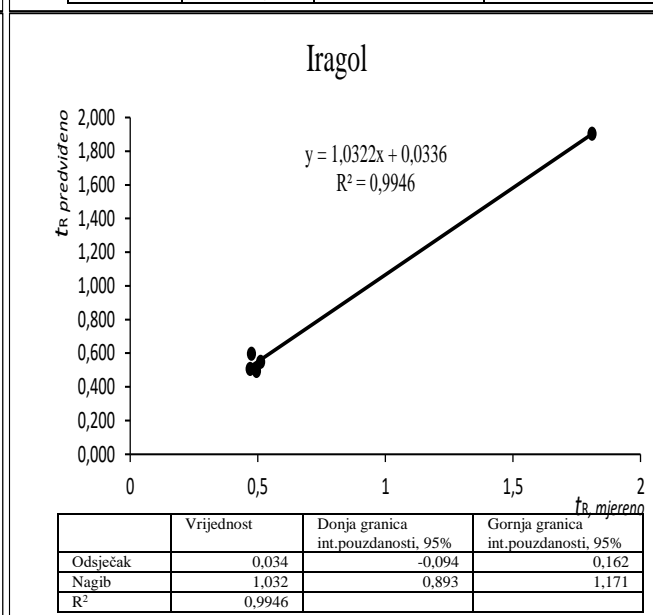
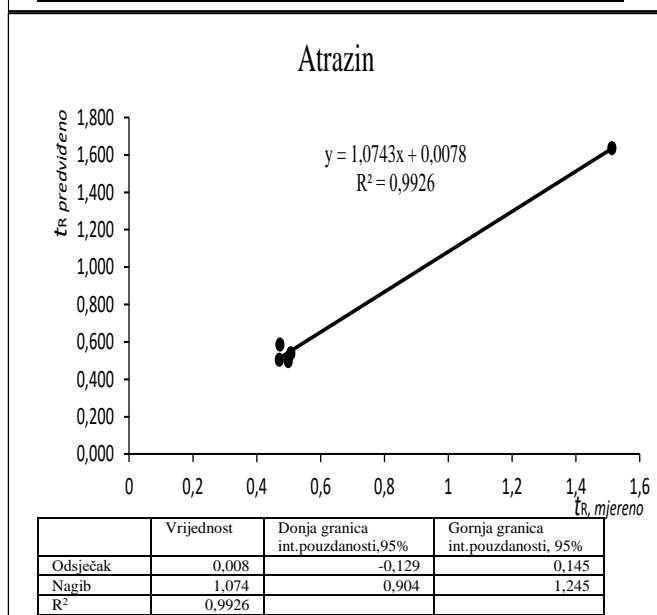
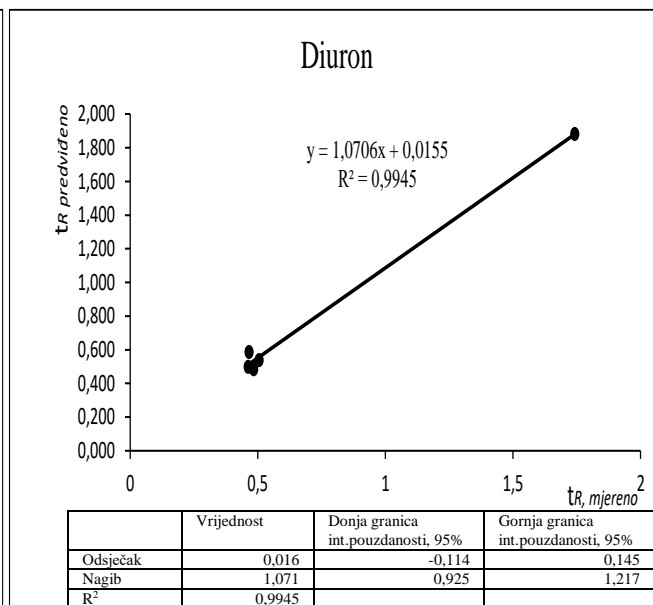
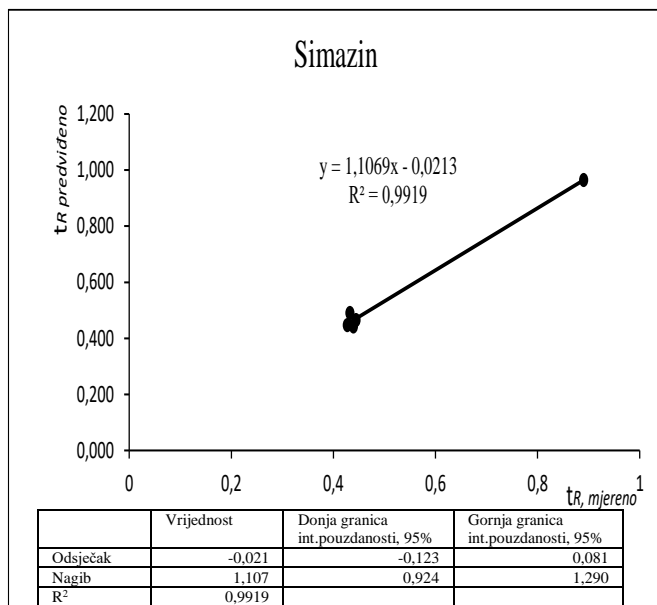
#### 6.1.4. Izokratni model IV

Izokratnog model br. IV najkompleksniji je od četiri primijenjena modela ponašanja kromatografskog sustava pri izokratnim elucijama. Ovo je kvadratni model koji uzima u obzir sve moguće interakcije dvaju glavnih parametara: udjela acetonitrila i metanola. Uslijed spomenute kompleksnosti, ne čude još veće vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2 \geq 0,9916$ , tablica 8).

Tablica 8. Koeficijenti izokratnog modela IV

|            | SIMAZIN | DIURON  | ATRAZIN | IRAGOL  | IZOPROTURON |
|------------|---------|---------|---------|---------|-------------|
| $a_0$      | 1,638   | 2,688   | 2,307   | 2,600   | 2,678       |
| $a_1$      | -3,762  | -5,922  | -4,887  | -5,626  | -5,599      |
| $a_2$      | -6,661  | -9,485  | -8,134  | -9,112  | -9,648      |
| $a_{12}$   | 10,863  | 18,130  | 13,914  | 17,295  | 18,689      |
| $a_{112}$  | -8,723  | -14,774 | -10,688 | -15,073 | -13,221     |
| $a_{122}$  | -10,394 | -16,961 | -12,781 | -16,799 | -18,193     |
| $a_{11}$   | 0,739   | 2,051   | 1,364   | 1,896   | 1,969       |
| $a_{22}$   | 4,738   | 6,884   | 5,834   | 6,606   | 7,524       |
| $a_{1122}$ | 8,504   | 12,851  | 9,677   | 15,753  | 9,461       |
| $R^2$      | 0,9918  | 0,9944  | 0,9927  | 0,9947  | 0,9916      |

Analiza točnosti ukazala je na općenit izostanak sustavnih pogreški (slika 16), što je iznimno zanimljiv podatak s obzirom na prethodno primijenjen model III. Očito uvođenje samo dva kvadratna člana, a što je bio slučaj kod modela III, nije ispravan opis vladanja sustava. Uvođenje dodatnih interakcijskih članova ispravilo je ovaj nedostatak. Visoke vrijednosti koeficijenta determinacije nije potrebno dodatno komentirati zbog okolnosti objašnjenih u prethodnim poglavljima.



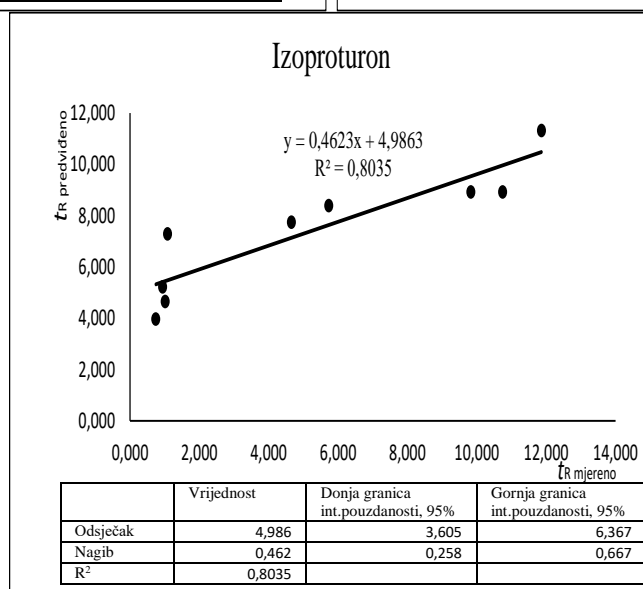
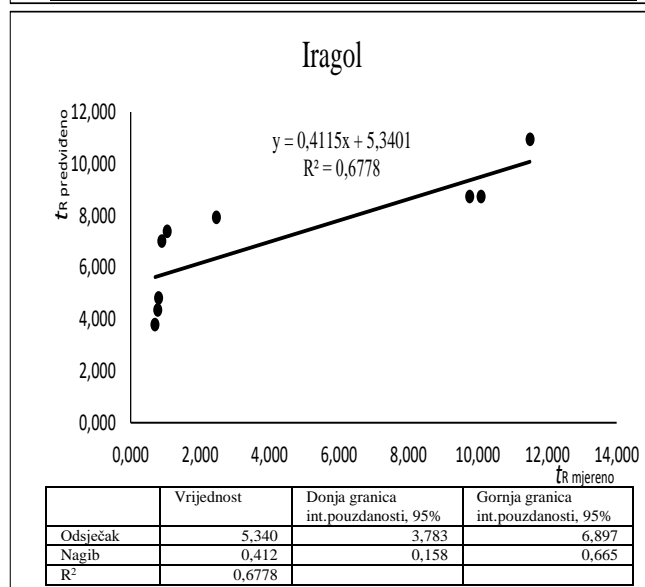
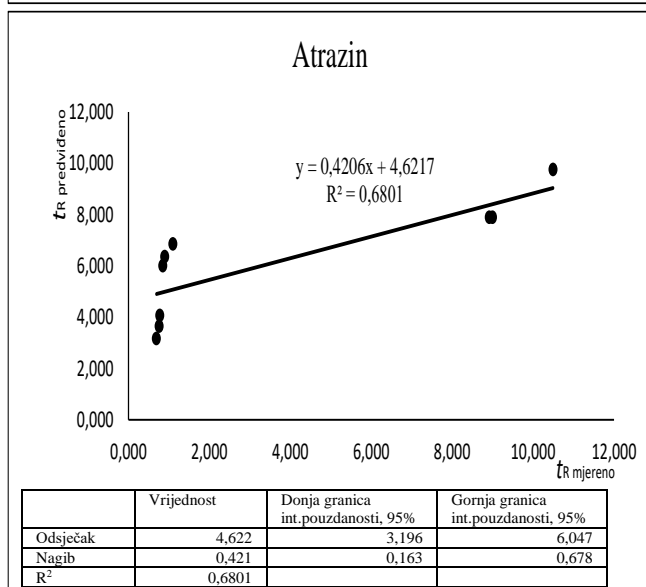
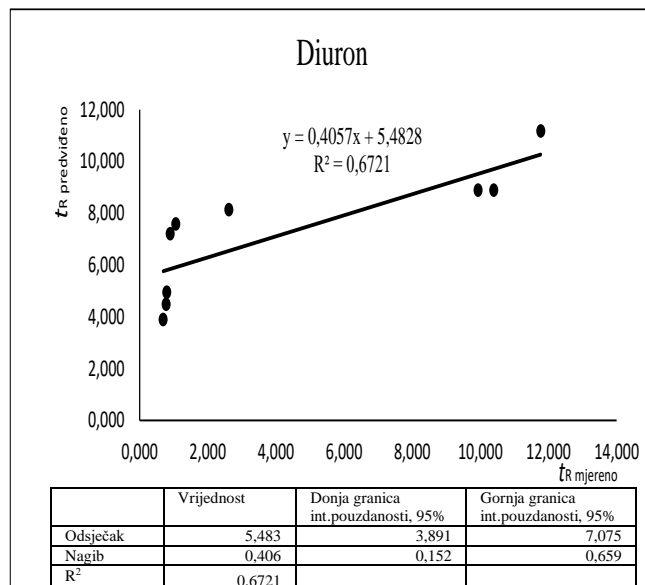
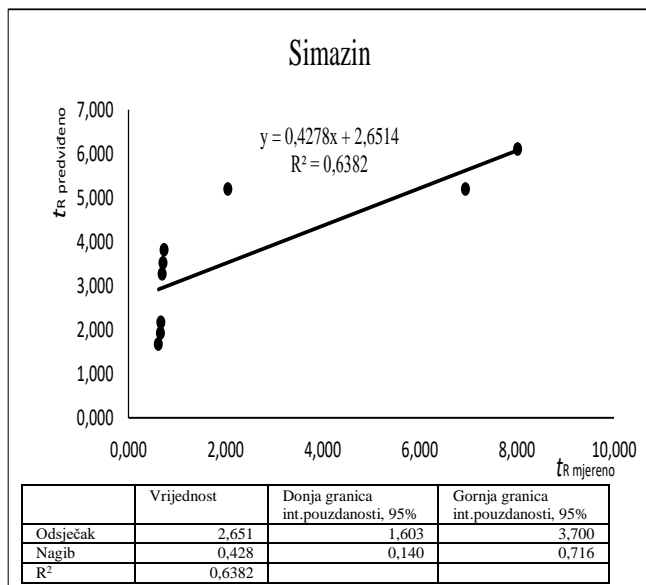
Slika 16. Analiza točnosti izokratnih modela IV

## 6.2. Gradijentna elucija

Izokratni modeli I i II pokazali su nedostatnu vrijednost podudarnosti modela vremena zadržavanja s eksperimentalnim podacima (niske  $R^2$  vrijednosti). Model III pokazao je znatno bolju podudarnost, ali nažalost i postojanje proporcionalne sustavne pogreške. Najkompleksniji od primijenjenih modela, model IV, očekivano je ponudio najbolju podudarnost s eksperimentalnim podacima, a uz sve to nije sadržavao sustavnu pogrešku. Upravo stoga, model IV odabran je kao temeljni model za transfer podataka iz izokratnog u gradijentno kromatografsko okruženje.

Na slici 17 prikazani su rezultati regresijske analize točnosti gradijentnog modela vremena zadržavanja. Kod svih 5 pesticida vide se podosta velika odstupanja predviđenih od eksperimentalnih vrijednosti vremena zadržavanja i to za brze elucije (vrijeme eluiranja oko 1 minute). Kod dužih elucija postiže se znatno bolje podudaranje eksperimentalnih i proračunatih vrijednosti. Zamijećeno odstupanje moglo bi se tumačiti lošim odabito eksperimentalnih točaka u slučaju izokratnih modela. Naime, kao što je već spomenuto, u kreiranju izokratnih modela jedna od točaka znatno je odstupala od preostalih triju, smanjujući na taj način kvalitetu informacija koje su donosile spomenute tri točke, a upravo one nalazile su se u području brzih elucija (oko 0,5 minute, vidi slike 13-16).

Također, jedan od razloga lošijeg predviđanja gradijentnog modela može biti u činjenici da je vrijeme nezadržanog sastojka variralo, a u poračunima je uzeto kao konstantna vrijednost (srednja vrijednost vremena nezadržanog sastojka svih izokratičnih elucija provedenih za potrebe modeliranja).



Slika 17. Analiza točnosti izokratnih modela IV – gradijentna elucija

Potencijalni razlog može biti i nepotpuno uspostavljanje ravnoteže u kromatografskoj koloni nakon svake promjene sastava mobilne faze. Naime, nakon svake provedene gradijentne analize potreban je određeni period da se sustav ustali pri novom sastavu faze. Koliki je to period, nisam testirala, već sam proizvoljno uzela 15 minuta. U slučaju da je sustavu potreban duži stabilizacijski period, ovaj čimbenik sigurno bi utjecao na vremena zadržavanja.

## 7. Zaključak

U ovom radu pokušao se razviti model vremena zadržavanja gradijentnih HPLC analiza s tri komponente u mobilnoj fazi. Kao analit primijenjene su otopine pet pesticida: atrazina, diurona, iragola, izoproturona i simazina.

Podaci vremena zadržavanja dobiveni izokratnim elucijama poslužili su za izradu izokratnog modela vremena zadržavanja. Izokratni model poslužio je kao temelj za transfer podataka u gradijentno okruženje. Za transfer podataka iz izokratnog u okruženje gradijentnih elucija korišten je tzv. *iso-to-grad* pristup.

Prilikom izrade izokratnog modela korištena su 4 modela različite kompleksnosti. Najboljim se pokazao najkompleksiji od njih koji je uključivao sve interakcije dvaju ključnih parametara modela: udjela acetonitrila i metanola. Ovaj model pokazao je dobru podudarnost s eksperimentalnim vrijednostima i odsustvo sustavne pogreške.

Gradijentni model je na pojedinim mjestima ukazao na postojanje sustavne pogreške, no ova činjenica ni ne čudi ukoliko se kažem da su uočene dosta velike pogreške predviđanja. Kao glavni razlog nameće se loš odabir eksperimentalnih točaka pri definiranju parametara izokratnog modela.

Iako gradijentni model nije dao očekivanu kvalitetu predviđanja, poprilično sam sigurna da sam detektirala glavne izvore pogreške, čijom eliminacijom bi se trebali dobiti modeli znatno boljih prediktivnih karakteristika.

## 8. Literatura

1. Poole, C.F., *The essence of chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003
2. Sertić, M. *Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analizi statina*, doktorska disertacija FBF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2013.
3. L.R. Snyder, M.A. Stadalius, M.A. Quarry, *Gradient elution in reversed-phase HPLC separation of macromolecules*, *Anal. Chem.* **55**, (1983) 1412A–1430A
4. McMurry, J. *Organic chemistry: with biological applications*, 2.izd., Brooks/Cole, Belmont, 2011
5. Ašperger D., *Interna skripta „Instrumentalna analitička kemija“*, Zagreb, 2012.
6. Bolanča T., Ukić Š., *Ionska kromatografija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
7. Snyder L.R., Kirkland J.J., *Intorduction to modern liquid chromatography*, Wiley, New York, 1979
8. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999
9. Watson, D.G., *Pharmaceutical Analysis*, Churchill Livingstone, Elsevier Limited, Edinburgh, 2005
10. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J. L., *Practical HPLC method development*, Wiley, New York, 1997
11. Mornar, A., Sertić, M., Nigović, B., *Development of a Rapid LC/DAD/FLD/MSn Method for the Simultaneous Determination of Monacolins and Citrinin in Red Fermented Rice Products*. *J. Agr. Food Chem.* **61**, (2013) 1072–1080
12. Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A., *Spregnute tehnike tekućinski kromatograf–spektrometar masa: osnove metodologije i primjene*, *Medicina* **42**, (2009) 218–232
13. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 6. izd., Thompson Brooks/Cole, Belmont, 2008
14. H. Small: *Ion Chromatography*, Plenum Press, New York, 1989.
15. I.N. Bronshtein, K.A. Semendayayev, G. Musiol, H. Muehlig: *Handbook of Mathematics*, 5. izd., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2007.
16. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/2edaddvol2a.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edaddvol2a.pdf) (pristup lipanj 2017)
17. S. Parra, V. Sarria, S. Malato, P. Péringier, C. Pulgarin, *Photochemical Versus Coupled Photochemical–Biological Flow System For The Treatment Of Two*

- Biorecalcitrant Herbicides: Metobromuron And Isoproturon*, Applied Catalysis B: Environmental **27**, (2000) 153–168
18. United States Environmental Protection Agency, *Decision Documents for Atrazine*, Washington D.C., 2006.
  19. N. Shamsedini, M. Ali Baghapour, M. Dehghani, S. Nasser, *Photodegradation of Atrazine by Ultraviolet Radiation in Different Conditions*, Health Sci Surveillance Sys 3 (2015)
  20. H. Chena, E. Bramantib, I. Longoc, M. Onorb, C. Ferrari, *Oxidative Decomposition Of Atrazine In Water In The Presence Of Hydrogen Peroxide Using An Innovative Microwave Photochemical Reactor*, J. Hazard. Mater. **186**, (2011) 1808–1815
  21. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/diuron.pdf> (pristup lipanj 2017)
  22. United States Environmental Protection Agency, *Registration Eligibility Decision for Diuron*, Washington D.C. 2003.
  23. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/docs/november2011\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/docs/november2011_en.pdf) (pristup lipanj 2017.)
  24. V. A. Sakkas, D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, *Photochemical Degradation Study Of Irgarol 1051 In Natural Waters: Influence Of Humic And Fulvic Substances On The Reaction*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **147**, (2002) 135–141
  25. K. Lei, N. Lei, V. Tsang, Z. Cai, K. M.Y. Leung, M. Lam, *A Mechanistic Study On The Photodegradation Of Irgarol-1051 In Natural Seawater*, Mar. Pollut. Bull., (2008) 272–279
  26. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/simazine#section=Top> (pristup lipanj 2017)
  27. United States Environmental Protection Agency, *Registration Eligibility Decision for Simazine*, Washington D.C., 2006
  28. Š. Ukić, *Matematički model za simuliranje odziva ionske kromatografske analize*, doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2009.
  29. T.B. Hoover, *Multiple eluent and pH effects on ion chromatography of phosphate and arsenate*, Sep. Sci. Tech. **17**, (1982) 295–305
  30. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf, *Optimization of anion separation by nonsuppressed ion chromatography*, Anal. Chem. **56** (1984) 85–88
  31. D.R. Jenke, G.K. Pagenkopf, *Models for prediction of retention in nonsuppressed ion chromatography*, Anal. Chem. **56** (1984) 88–91



32. P. Hajós, O. Horváth, V. Denke, *Prediction of retention for halide anions and oxoanions in suppressed ion chromatography using multiple species eluent*, Anal. Chem. **67** (1995) 434–441
33. D.T. Gjerde, *Eluent selection for the determination of cations in ion chromatography*, J.Chrom. A **439** (1988) 49–61
34. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1998.
35. R.D. Rocklin, C.A. Pohl, J.A. Schibler, *Gradient elution in ion chromatography*, J. Chromr. A **411** (1987) 107–119
36. S.R. Souza, M.F. Tavares, L.R. de Carvalho, *Systematic approach to the separation of mono- and hydroxycarboxylic acids in environmental samples by ion chromatography and capillary electrophoresis*, J. Chrom. A **796** (1998) 335–346
37. M. Novak Stankov, *Molekulska modeliranje i umjetna inteligencija u razvoju ionskih kromatografskih metoda*, doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.

## 9. Životopis

Ljubica Nikolaš [REDACTED] Pohađala je Osnovnu školu „Hugo Badalić“ u Slavonskom Brodu, nakon čega je 2004. godine upisala Opću gimnaziju „Matija Mesić“, također u Slavonskom Brodu. Od 2008. godine studentica je Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija sudjeluje u znanstvenom radu, za koji 2013. godine osvaja Dekanovu nagradu. Obnašala je dužnost demonstratora auditornih vježbi iz kolegija „Programiranje i primjena računala“. Preddiplomski studij završava 2015. godine obranom završnog rada *Modeli kvantitativne povezanosti strukture i svojstava*. Iste godine na matičnom fakultetu upisuje diplomski studij Primijenjene kemije, smjer Zaštita okoliša.