Određivanje glifosata ionskom kromatografijom

Kosir, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:149:127220

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kosir

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kosir

ODREĐIVANJE GLIFOSATA IONSKOM KROMATOGRAFIJOM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Šime Ukić
dr. sc. Lidija Furač, viši predavač
dr. sc. Zvonimir Katančić

Zagreb, srpanj 2016.

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

Izrada ovog diplomskog rada iziskivala je mnogo utrošenog vremena i napora, a njegova finalizacija bila bi uvelike otežana da nije bilo nekolicine ljudi kojima se ovdje ponaosob zahvaljujem.

Prvenstveno bih se htjela zahvaliti doc. dr. sc. Šimi Ukiću na nesebičnoj potpori, vodstvu i savjetima pruženim tijekom izrade ovog rada.

Potom, zahvalila bih se Matiji Cvetniću, mag. ing. cheming., na ukazanom strpljenju i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada, kao i M. Sc. Vladimiru Stankovu, voditelju instrumentalnih analiza u Sample Control d.o.o., na iskustvenim savjetima, pristupačnosti i tehničkoj pomoći.

Zahvaljujem se i cijelom Zavodu za analitičku kemiju što su mi omogućili kvalitetan, napredan, a posebice ugodan istraživački rad.

Naposljetku, najveće hvala mojoj obitelji, posebice ocu i mužu, te prijateljima što su me pratili u mojem dosadašnjem životu, uvijek bili puni razumijevanja i bezuvjetna podrška prilikom donošenja svih ključnih odluka!

I nakon svega, voljela bih se spomenuti svoje prerano preminule majke. Ona nažalost nije tu da sa mnom podjeli ovoj važan trenutak u mome životu, no zato je stalno u mojim mislima. Draga mama, tebi posvećujem ovaj rad.

SAŽETAK

Kromatografske metode su među najvažnijim metodama u analitičkoj kemiji jer omogućuju istovremeno odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka u složenim smjesama. Ionska kromatografija (IC), često primjenjivana u industriji, vrlo je važna za analiziranje uzoraka koji sadrže ionske čestice.

Najnoviji trendovi u kromatografiji općenito, pa time i u ionskoj, vezani su uz vezanje (uparivanje) više kromatografskih sustava u svrhu poboljšanja osjetljivosti analiza, ali i eventualne uštede troškova. Raspon analita je vrlo širok, od jednostavnih anorganskih iona do organskih molekula poput herbicida glifosata kojim se bavi i ovaj rad.

Glifosat, često upotrebljavani herbicid, a koji može biti opasan po ljudsko zdravlje, u ovom je radu analiziran ionskom kromatografijom. Pri tome su za analizu primijenjeni 1D i 2D IC sustav.

Za oba sustava razvijene su i validirane metode kromatografske analize glifosata.

Primijenjena 1D metoda pokazala se nedostatnom za analizu realnog uzorka piva.

2D IC analizom uspješno je detektirana i kvantificirana koncentracija glifosata u analiziranom uzorku piva.

Ključne riječi: ionska kromatografija, IC×IC sustav, glifosat, validacija

SUMMARY

Chromatographic methods are among the most important analytical methods since they enable simultaneously separation, identification and quantification of diverse compounds from complex matrices. Ion chromatography, often applied in industry, is very important for the analysis of samples containing ionic particles.

Current trends in chromatography are related to multidimensional chromatography where two or more chromatographic systems are paired and applied for analysis in order to improve the method sensitivity and potentially reduce the analysis cost. Accordingly, same trends can be found in ion chromatography (IC) also. The range of IC analytes is very wide: from simple inorganic ions to organic molecules like herbicide glyphosate which is the analyte in this work.

Glyphosate is very often used herbicide which can be dangerous to human health. This work describes development and validation of IC method for analysis of glyphosate in beer. 1D and 2D-IC systems were applied for this analysis.

IC methods for glyphosate analysis were developed and validated for both systems.

The applied 1D method proved to be insufficient for beer sample analysis.

The applied 2D-IC method successfully detected and quantified glyphosate in analysed beer sample.

Key-words: ion chromatography, IC×IC system, glyphosate, validation

SADRŽAJ

1 UVOD 1

2 TEORIJSKI DIO 2

2.1 Kromatografija 2

2.1.1 Nepokretna i pokretna faza 2

2.2 Podjela kromatografskih metoda 3

2.3 Karakteristične kromatografske veličine 4

2.3.1 Omjeri raspodjele 4

2.3.2 Vrijeme i faktor zadržavanja 5

2.3.3 Razlučivanje 7

2.4 Razvoj kromatografskih metoda 10

2.5 Ionska kromatografija 12

2.5.1 Povijesni razvoj ionske kromatografije 13

2.5.2 Princip rada ionske kromatografije 13

2.5.3 Ionski kromatografski sustav 14

2.6 2D tekućinska kromatografija 15

2.6.1 Heart-cutting 2D kromatografija 15

2.6.2 Comprehensive 2D kromatografija 16

2.6.3 Ionska 2D kromatografija 17

2.7 Glifosat 18

3 VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA 21

3.1 Unutarlaboratorijska validacija 21

3.1.1 Preciznost 21

3.1.2 Točnost 22

3.1.3 Granice detekcije i kvantifikacije 23

3.1.4 Linearnost 23
3.1.5 Selektivnost 24
3.1.6 Robusnost 25
3.1.7 Stabilnost 25
3.2 Međulaboratorijska validacija 25
3.3 Koraci validacije 26
3.4 Izvješća validacije 27
3.5 Ponovljena validacija 28

4 EKSPERIMENTALNI DIO 29
4.1 Reagensi i otopine 29
4.2 Jednodimenzionalni ionski kromatografski sustav (1D-IC) 30
4.3 Dvodimenzionalni ionski kromatografski sustav (2D-IC) 30

5 REZULTATI I RASPRAVA 32
5.1 Metoda vanjskog standarda pri 1D-IC analizi 32
5.2 Analiza realnog uzorka 37
5.3 Metoda standardnog dodatka pri 1D-IC analizi 38
5.4 Metoda standardnog dodatka pri 2D-IC analizi 39
5.5 Određivanje glifosata u pivskoj matrici 43

6 ZAKLJUČAK 44

7 LITERATURA 45

ŽIVOTOPIS 49

1 UVOD

Ruski znanstvenik Mihail Semjonovič Cvet, 1903. godine, proučavao je pojave nastanka obojenih vrpci uslijed razdvajanja biljnih pigmenata na kolonama punjenim kalcijevim karbonatom, polisaharidima, saharozom i indulinom te zaključio da se uočena pojava mora ponašati po strogim fizikalnim zakonitostima. Naime, pri upotrebi istog eluensa dobivao je uvijek isti raspored boja što nije mogla biti slučajnost. Uočen fenomen Cvet je nazvao kromatografijom, a to je ime zadržala i analitička tehnika nastala proizašla iz opaženih zakonitosti.

Kromatografija je danas među najzastupljenijim analitičkim separacijskim metodama, a omogućava raspodjelu komponenti između dviju faza; jedne nepokretne i druge pokretne koja spomenute komponente nosi u određenom smjeru.

Ionska kromatografija (eng. *ion chromatography*, IC) je metoda razdvajanja na načelu ionske prirode tvari, najčešće primjenjivana za razdvajanje i analizu anorganskih aniona te organskih iona malih dimenzija. Najčešće se koristi za analizu tvari u vodenom mediju, ali primjenjiva je i u drugim matricama. Kao i ostale kromatografske tehnike, IC omogućava brzu analizu, obogaćenu sposobnošću simultanog određivanja velikog broja komponenti.

Kako bismo postigli što efikasniju kromatografsku analizu, potrebno je odrediti optimalne uvjete kromatografskog razdvajanja; poput vremena zadržavanja komponente u sustavu, širine zone njezine raspodjele, vrste nepokretne faze, temperature i sl. Naravno, određivanje tih uvjeta najčešće se provodi metodom „pokušaja i pogreške“, ali budući da to iziskuje puno uloženog vremena, danas se naglasak stavlja na pronalaženje i razvijanje modela predviđanja vremena zadržavanja. Međutim, ponekad nam modeli stvaraju problem jer sposobnost predviđanja modela raste porastom njihove kompleksnosti. Nažalost, time raste i broj parametara potreban za modeliranje što zahtijeva provedbu većeg broja eksperimenata i podiže složenost proračuna.

Nagli razvoj znanosti u posljednjih 50 godina direktno je utjecao na porast primjene kromatografije dovodeći je do titule najzastupljenije analitičke tehnike. Stoga danas postoji velika potreba za daljnjim razvojem i usavršavanjem kromatografskih metoda.

Svaka analitička metoda, pa tako i kromatografske, da bi bila opće prihvaćena i odobrena mora biti validirana. Validacija je postupak dokazivanja prikladnosti metode za točno određenu namjenu. Ona je regulatorni zahtjev ali i profesionalna odgovornost analitičara.[1]

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma*; boja i *graphein*; pisati) je laboratorijska analitička tehnika za razdvajanje smjesa. Prema IUPAC-u (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), to je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga, pokretna, kreće u određenom smjeru. Kromatografska analiza omogućuje odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka u složenim smjesama. Taj proces uključuje kretanje ispitivane smjese, otopljene u pokretnoj, tj. mobilnoj fazi, kroz nepokretnu, odnosno stacionarnu fazu, čime se dijelovi smjese razdvajaju i izoliraju te ih je na taj način moguće analizirati i kvantitativno odrediti. Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija, eng. *liquid chromatography*, LC) ili plinovita (plinska kromatografija, eng. *gas chromatography*, GC).[2–4]

Kromatografija može biti pripremna i analitička. Pripremna se kromatografija bavi razdvajanjem komponenti iz smjese radi daljnje obrade te se može smatrati metodom pročišćavanja dok se u analitičkoj kromatografiji obično radi sa malim uzorcima te se pokušava izmjeriti relativni omjer komponenti u smjesi. Kromatografija je jedna od vodećih analitičkih metoda i omogućava razdvajanje i kvantitativno određivanje tvari veoma slične strukture i kemijskih osobina.[5]

Kako bismo bolje razumjeli kromatografiju, važno je spomenuti na početku neke od osnovnih pojmova kao što su: analit; tvar koja se razdvaja u kromatografiji, eluens; komponenta separacijskog sustava koja pokreće uzorak kroz stupac, vrijeme zadržavanja; vrijeme za koje analit prođe kroz kromatografski sustav u određenim uvjetima, kromatograf; uređaj kojim provodimo kromatografiju, kromatogram; grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka gdje svakoj tvari odgovara određeni vrh, odnosno tzv. pik na kromatogramu.[6]

2.1.1 *Nepokretna i pokretna faza*

Zbog dinamičke ravnoteže dolazi do narušavanja ravnotežnog stanja, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze. Nepokretna je faza čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču koja je fiksirana u stupcu (GC ili LC) ili ploči (npr. silikagel u TLC) i mora biti odabrana tako da zadržavanje molekula bude selektivno, tj. da različiti

sastojci smjese budu uz nju vezani u različitim vremenskim razdobljima, što uzrokuje razlučivanje smjese. Izbor nepokretne faze uvjetovan je prirodom ispitivanog spoja, prirodom ravnoteže kromatografskog procesa i vrstom veze koja nastaje između ispitivanog spoja i kromatografske podloge.[7]

Kako bi se s obzirom na izbor nepokretne faze omogućio optimalan kromatografski sustav za razdvajanje željene smjese treba izabrati pogodan sustav otapala koji čini pokretnu fazu. Priroda veze koja se ostvaruje između ispitivanog spoja te nepokretne i pokretne faze važan je čimbenik realnog kromatografskog procesa. Izbor pogodnog otapala, odnosno smjese otapala, provodi se s obzirom na sposobnost otapala da stvaraju vodikove veze (odjeljivanje hidrofilnih, odnosno hidrofobnih spojeva). Otapala moraju biti kromatografski čista, što znači da ne sadržavaju nikakvu nečistoću koja bi mogla smetati tijekom kromatografskog određivanja. Najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom je izokratno eluiranje pri kojem analit kroz kolonu nosi jedno otapalo, odnosno ne mijenja se sastav pokretne faze tijekom cijele analize. Međutim, često se bolje razdvajanje (veća djelotvornost) postiže primjenom gradijentnog eluiranja uz upotrebu dvaju ili više sustava otapala znatno različitih polarnosti. Pri gradijentnoj se eluciji sastav pokretne faze mijenja tijekom analize kontinuirano ili skokovito.

2.2 Podjela kromatografskih metoda

Kromatografske je metode moguće podijeliti prema različitim kriterijima; s obzirom na prirodu ravnoteže, na temelju sastava pokretne faze, prema obliku nepokretne faze, itd.
Kada govorimo o prirodi ravnoteže između pokretne i nepokretne faze razlikujemo:

- RAZDJELNU KROMATOGRAFIJU, gdje su obje faze kapljevine, međutim nepokretna faza je kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač,
- ADSORPCIJSKU KROMATOGRAFIJU, gdje je nepokretna faza čvrsta, pokretna kapljevina ili plin,
- AFINITETNU KROMATOGRAFIJU, gdje se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s tim kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- KROMATOGRAFIJU ISKLJUČENJEM, gdje nepokretna faza veličinom pora propušta ili isključuje tvar,

- IONSKU KROMATOGRAFIJU (ionsku izmjenjivačku kromatografiju) koja omogućuje razdvajanje iona ili nabijenih molekula.

Što se tiče sastava pokretne faze, kromatografske metode dijelimo na:

- PLINSKU KROMATOGRAFIJU, gdje je pokretna faza inertni plin,
- TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU, gdje je pokretna faza kapljevina male viskoznosti,
- FLUIDNU KROMATOGRAFIJU PRI SUPERKRITIČNIM UVJETIMA, gdje je pokretna faza tvar iznad svoje kritične temperature i tlaka,

dok su prema obliku nepokretne faze, kromatografske metode podijeljene na:

- PLOŠNU KROMATOGRAFIJU, gdje razlikujemo tanki homogeni sloj na inertnoj podlozi (tankoslojna kromatografija) i posebno pripravljen papir (papirna kromatografija);
- KROMATOGRAFIJU NA STUPCU, gdje je nepokretna faza gusto pakirana u stupcu.

Kombinacijom više kromatografskih sustava moguće je ostvariti višedimenzionalnu kromatografiju.

2.3 Karakteristične kromatografske veličine

2.3.1 *Omjeri raspodjele*

Kromatografska se odjeljivanja temelje na različitoj raspodjeli komponenata između pokretne i nepokretne faze:

$$\mathrm{A_M} \rightleftarrows \mathrm{A_S} \tag{1}$$

gdje $\mathrm{A_M}$ predstavlja komponentu A u pokretnoj fazi, a $\mathrm{A_S}$ u nepokretnoj fazi. Ako se pretpostavi da su pokretna i nepokretna faza u kontaktu dovoljno dugo da se uspostavi ravnotežno stanje ionske izmjene, raspodjela komponenata između dviju faza može se izraziti *konstantom razdjeljenja*, K_c. Konstanta razdjeljenja je omjer koncentracija razdijeljene komponente *i* u nepokretnoj, c_S, i pokretnoj fazi, c_M:

$$K_{\mathrm{C},i} = \frac{c_{\mathrm{S},i}}{c_{\mathrm{M},i}} \tag{2}$$

Komponente koji imaju izražen afinitet prema nepokretnoj fazi imaju visoke vrijednosti K_c, dok komponente čije su vrijednosti konstante razdjeljenja bliske nuli preferiraju pokretnu

fazu. Razlike u vrijednostima konstante razdjeljenja komponenti preduvjet su koji omogućava njihovo kromatografsko razdvajanje.

Ova pretpostavka vrijedi za idealne slučajeve kada se ostvari ravnotežna izmjena. Budući da je kromatografski sustav dinamičan sustav, ravnotežu je bolje promatrati kao odraz vremena kojeg pojedina komponenta provede u nepokretnoj fazi. Komponente s većom konstantom razdjeljenja zasigurno će provoditi više vremena u nepokretnoj fazi od onih s manjom konstantom. Kako se komponenta kreće samo dok se nalazi u pokretnoj fazi, prve će sustav napuštati one komponente koje u pokretnoj fazi provedu najviše vremena. Time dolazi do međusobnog razdvajanja komponenti, ovisno o afinitetu prema nepokretnoj fazi.[8]

2.3.2 *Vrijeme i faktor zadržavanja*

Vrijeme koje komponenta provede u sustavu naziva *se vremenom zadržavanja*, t_{R}, i pri identičnim uvjetima analize karakteristika je pojedine komponente. Pretpostavimo da je promatrani kromatografski sustav kolona obujma V, u kojoj volumen nepokretne faze iznosi V_{S}, a volumen pokretne V_{M}. Sve komponente koje se razdvajaju na koloni prolaze identičnim volumenom, jednakim umnošku vremena zadržavanja komponente u koloni i brzine njenog protoka kroz kolonu:

$$V_{\mathrm{M}} = t_{\mathrm{R},i} \cdot v_i = t_0 \cdot v_0 \tag{3}$$

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:

$$v_i = v_0 \cdot \frac{t_0}{t_{\mathrm{R},i}} = v_0 \cdot \frac{t_0}{t_0 + t'_{R,i}} = v_0 \cdot \frac{V_{\mathrm{M}}}{V_{\mathrm{R},i}} = v_0 \cdot \frac{V_{\mathrm{M}}}{V_{\mathrm{M}} + V'_R} \tag{4}$$

gdje $t'_{\mathrm{R},i}$ predstavlja *prilagođeno vrijeme zadržavanja*, odnosno vrijeme koje je komponenta i provela u nepokretnoj fazi, $V_{\mathrm{R},i}$ *volumen zadržavanja komponente*, a V'_{R} dodatni volumen pokretne faze potreban za eluciju komponente *i* uslijed njenog zadržavanja u nepokretnoj fazi (*prilagođeni volumen zadržavanja*). Iznos dodatnog volumena pokretne faze može se prema izrazu (2) povezati s volumenom nepokretne faze u koloni:

$$V'_{\mathrm{R}} = K_{\mathrm{c}} \cdot V_{\mathrm{S}} \tag{5}$$

$$v_i = v_0 \cdot \frac{V_{\mathrm{M}}}{V_{\mathrm{M}} + K_{\mathrm{c}} \cdot V_{\mathrm{S}}} \tag{6}$$

Uvrštavanjem jednadžbe (6) u jednadžbu (3) dobije se:

$$t_{\mathrm{R},i} \cdot v_0 = V_\mathrm{M} + K_\mathrm{c} \cdot V_\mathrm{S} \tag{7}$$

Umnožak vremena zadržavanja komponente i protoka pokretne faze jednak je volumenu zadržavanja komponente[8,9]:

$$V_{\mathrm{R},i} = V_\mathrm{M} + K_\mathrm{c} \cdot V_\mathrm{S} \tag{8}$$

Uzimajući umjesto omjera koncentracija tvari u dvjema fazama omjer množina (n_S za nepokretnu i n_M za pokretnu fazu), definira se još jedna bitna kromatografska veličina; *faktor zadržavanja*[9]:

$$k_i = \frac{n_{\mathrm{S},i}}{n_{\mathrm{M},i}} \tag{9}$$

Prikazujući množine kao umnožak koncentracije i volumena dobije se:

$$k_i = \frac{c_{\mathrm{S},i} \cdot V_\mathrm{S}}{c_{\mathrm{M},i} \cdot V_\mathrm{M}} \tag{10}$$

iz čega je, uvrštavajući jednadžbe (2) i (8), lako dobiti najčešće korišteni izraz za faktor zadržavanja:

$$k_i = \frac{V_{\mathrm{R},i} - V_\mathrm{M}}{V_\mathrm{M}} \tag{11}$$

Uz konstantnost protoka, volumni parametri mogu se prevesti u parametre vremena zadržavanja:

$$k_i = \frac{t_{\mathrm{R},i} - t_0}{t_0} \tag{12}$$

Iz izraza (12) jasno se vidi da faktor zadržavanja u biti predstavlja omjer vremena kojeg uzorak provede u nepokretnoj fazi i onog provedenog u pokretnoj fazi. Za razliku od vremena zadržavanja, faktor zadržavanja ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, pa je stoga često prikladniji izraz za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Ujedno, poznavanje faktora zadržavanja različitih komponenti dobar je pokazatelj njihovog razdjeljivanja odabranom kromatografskom metodom[12]. Mjera sposobnosti razdjeljivanja naziva se selektivnost, α, i definirana je kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi komponenta koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}; \qquad k_2 \geq k_1 \tag{13}$$

Selektivnost, jednako kao i faktor zadržavanja, ovisi o sastavu nepokretne i pokretne faze, ali i o temperaturi sustava.[10] U slučaju kada selektivnost poprima vrijednost 1

razdvajanje komponenti nije moguće jer pri tim uvjetima analize ne postoji kromatografski bitna razlika između ispitivanih komponenti.

2.3.3 *Razlučivanje*

Osim selektivnosti, koje je više kvalitativna mjera razdvajanja, kao mjera kvantitativnog razdvajanja koriste se razlučivanje, R_S, i broj teorijskih odsječaka, N. Putovanjem uzorka kroz kolonu dolazi do njegove raspodjele oko središnje maksimalne vrijednosti[8,10–13]. Područje raspodjele naziva se *zonom komponente* i, prema teoriji odsječaka, širi se s udaljenošću uzorka od ulaza u kolonu, odnosno s vremenom koje komponenta provede u koloni. Širina zone određuje kromatografsku djelotvornost kolone; uža zona – djelotvornija kolona. Djelotvornost kolone može se pak izraziti bilo *brojem teorijskih odsječaka* (eng. *number of theoretical plates*; N), bilo *visinom ekvivalentnom teorijskom odsječku* (eng. *height equivalent to a theoretical plate*; $HETP$). Prema definiciji, teorijski odsječak je hipotetska zona unutar koje dolazi do potpune ravnoteže između dviju faza.[10]

Uz pretpostavku idealne elucije, raspodjela unutar kromatografskih zona biti će Gaussova normalna raspodjela, a odzivi analize simetrične Gaussove funkcije. Tada se djelotvornost kolone može izraziti u terminima vremena zadržavanja komponente i standardne devijacije njene raspodjele oko centra zone. Broj teorijskih odsječaka u tom slučaju jednak je:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \tag{14}$$

Standardna devijacija Gaussove krivulje raspodjele odgovara njenoj polovici širine u točkama infleksije[25] (slika 1). U kromatografskoj praksi ponekad se, umjesto vrijednosti standardne devijacije, rabe vrijednosti širina, kako u točki infleksije tako i u nekim drugim točkama; primjerice na polovici visine kromatografske krivulje ili pak pri baznoj liniji. Uzimajući u obzir odnose tih širina i standardne devijacije funkcije raspodjele:

$$w_{ti} = 2\sigma \tag{15}$$

$$w_b = 4\sigma \tag{16}$$

$$w_{0,5} = 2,355\sigma \tag{17}$$

broj teorijskih odsječaka može se izraziti kao:

$$N = 4\left(\frac{t_R}{w_{ti}} \right)^2 = 5,54\left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \tag{18}$$

Simbolom w_{ti} označena je širina krivulje u točkama infleksije, w_b označava širinu krivulje pri baznoj liniji, a $w_{0,5}$ onu na polovici visine kromatografske krivulje.

Ponekad se za izračunavanje broja teorijskih odsječaka može koristiti omjer visine kromatografske krivulje, h, i površine ispod krivulje, A:

$$N = 2\pi\left(t_R \frac{h}{A}\right)^2 \tag{19}$$

Visina ekvivalentna teorijskom odsječku računa se pak kao omjer duljine kromatografske kolone, L, i broja teorijskih odsječaka:

$$HETP = \frac{L}{N} \tag{20}$$

odnosno, izraženo preko standardne devijacije raspodjele mase komponente unutar kromatografske zone[8]:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L} \tag{21}$$

Ukoliko se umjesto vremena zadržavanja, pri izražavanju djelotvornosti kolone koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja, t'_R, u obzir se uzima širenje zone do kojeg dolazi isključivo na nepokretnoj fazi. Tako izražen broj odsječaka naziva se *brojem efektivnih teorijskih* odsječaka (eng. *number of effective theoretical plates*; N_{eff}):

$$N_{eff} = \left(\frac{t'_R}{\sigma}\right)^2 \tag{22}$$

Odnos između broja efektivnih teorijskih odsječaka i broja teorijskih odsječaka dan je izrazom:

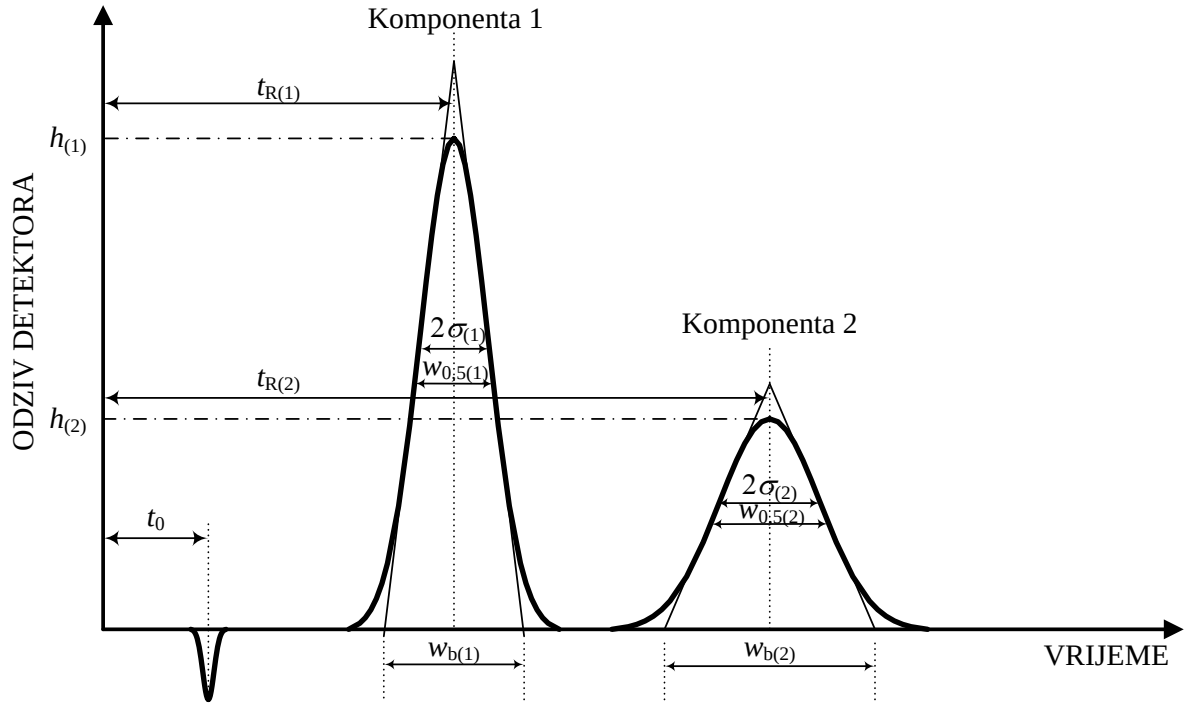
$$N_{eff} = N\left(\frac{k}{1+k}\right)^2 \tag{23}$$

Razlučivanje je pak jednako omjeru udaljenosti vremena zadržavanja dviju susjednih komponenti i dvostruke vrijednosti sume standardnih devijacija krivulja odziva:

$$R_S = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \tag{24}$$

Slično kao i kod izračuna broja teorijskih odsječaka, uvažavajući odnose (15), (16) i (17), razlučivanje se može računati preko širina krivulja odziva:

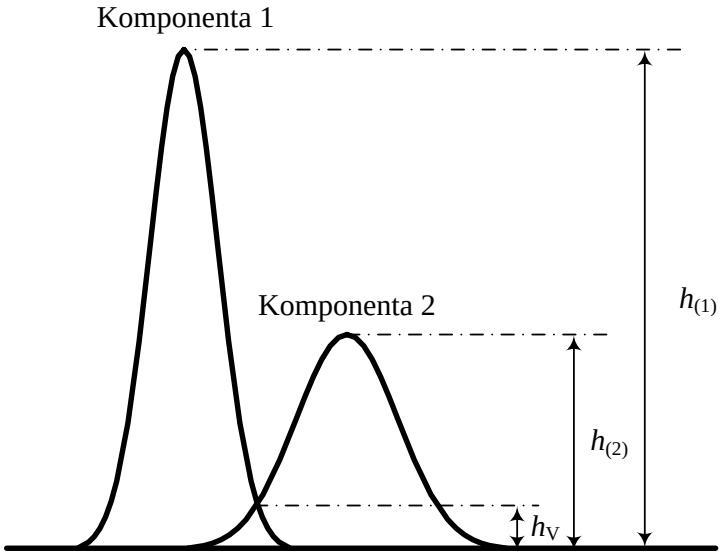
$$R_S = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{ti(1)} + w_{ti(2)}} = 1{,}18\frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} = 2\frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{b(1)} + w_{b(2)}} \tag{25}$$



Slika 1. Shema odziva kromatografske analize s naznačenim karakterističnim veličinama.

Ponekad se razlučivanje može procijeniti koristeći vrijednosti visina kromatografskih krivulja, *h*, i visine njihovog eventualnog preklopa[8] (slika 2):

$$R_S \approx 0{,}1\left(\frac{\bar{h}}{h_V}\right);\quad \bar{h} = \frac{h_1 + h_2}{2} \tag{26}$$



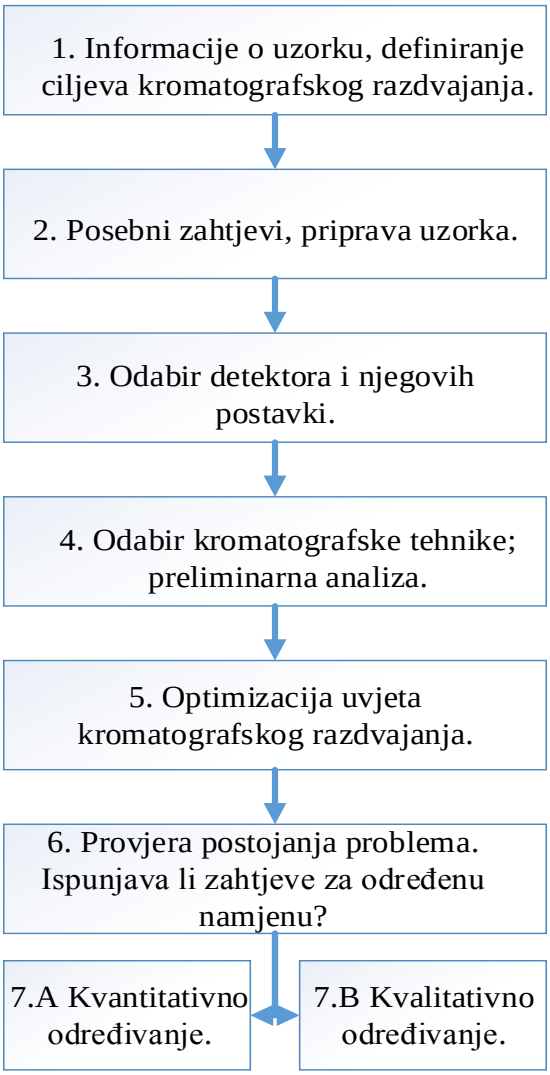
Slika 2. Procjena razlučivanja na temelju visina susjednih krivulja i njihove preklopljenosti.

Većina kromatografičara smatra da je za kvalitativnu analizu uzoraka potrebno postići vrijednosti razlučivanja veće od 1,5[24,25], dok neki za krivulje koje znatnije odstupaju od Gaussove funkcije razdiobe predlažu da minimalna potrebna vrijednost razlučivanja bude 2.[15]

2.4 Razvoj kromatografskih metoda

Kako bi se utvrdio kemijski sastav uzorka, potrebno je imati metodu za njegovo određivanje. Sastojci uzorka se često mogu odrediti s nekoliko različitih metoda. Izbor metode ovisi o nizu čimbenika kao što su kemijska svojstva analita i njegova koncentracija, matrica uzorka, cijena i brzina analize, vrsta mjerenja (kvalitativna ili kvantitativna analiza) i broj uzoraka.

Razvoj kromatografskih metoda, pa tako i onih ionskih, uobičajeno se provodi prema shemi prikazanoj na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz razvoja kromatografskih metoda.

Vidljivo je da se razvoj kromatografskih metoda može se podijeliti u nekoliko koraka:

- Prije samog razvoja metode potrebno je prikupiti informacije o uzorku poput broja komponenti koje je potrebno odrediti u uzorku i njihove kemijske strukture, UV spektra, koncentracijskog područja i sl. Također, potrebno je definirati ciljeve analize kao što su provođenje kvalitativne ili kvantitativne analize, postizanje razdvajanja svih komponenti uzorka ili samo nekih, definirati zahtjeve za validaciju metode, definirati matrice za koje metoda mora biti prikladna te postaviti zahtjeve za vremenskim trajanjem analize. Jedan je od najčešćih ciljeva u kromatografiji postizanje potpunog razdvajanja analita od onih sastojaka koji bi smetali daljnjoj analizi. Pri definiranju ciljeva kromatografskog razdvajanja uzima se u obzir očekivani broj uzoraka, dostupnost kromatografske opreme (detektori, kolone, mogućnost gradijentnog eluiranja i sl.) te vještine analitičara.[16] Ciljevi se mogu ostvariti pravilnim odabirom parametara kao što su: vrsta nepokretne faze, sastav pokretne faze, temperatura tijekom kromatografskog razdvajanja, dimenzije kolone, protok pokretne faze, količina analita koja se unosi u kromatografski sustav, način i postavke detekcije, priprema uzorka i sl.
- Neki se uzorci mogu direktno unijeti u kromatografski sustav, što je vrlo praktično i osigurava veću preciznost rezultata. Ipak, većina uzoraka zahtijeva pripravu, kao što je razrjeđivanje, podešavanje pH-vrijednosti, dodavanje unutarnjeg standarda, a ukoliko je uzorak krutina potrebno ga je otopiti ili ekstrahirati analit. Kod nekih uzoraka potrebno je uzorak koncentrirati, ukloniti interferencije ili tvari iz uzorka koje bi mogle uzrokovati oštećenje kromatografske kolone. Stoga je vrlo važno poznavati prirodu matrice i vjerojatne koncentracije analita.
- Sljedeća važna stavka je odabir detektora i njegovih postavki. Tijekom razvoja metode, prije prvog unošenja uzorka, potrebno je izabrati detektor. Detektor se bira ovisno o komponentama koji će se određivati i njihovim kemijskim svojstvima. Kod ionske kromatografije na izboru su konduktometrijski detektor, UV/VIS detektori, elektrokemijski detektori (mogućnost direktne kulometrije, amperometrijske detekcije i pulsne amperometrijske detekcije), a u novije vrijeme i spektrometar masa.
- Na temelju informacija o uzorku i ciljeva kromatografskog razdvajanja, odabire se kromatografska tehnika. Kreće se s preliminarnom analizom, koja

se obično provodi kod uobičajenih početnih uvjeta. Odabire se kolona (parametri odabira su dimenzija, veličina čestica, nepokretna faza), pokretna faza, protok pokretne faze, temperatura, volumen injektiranja.

- Nakon preliminarne analize, slijedi optimizacija uvjeta kromatografskog razdvajanja, odnosno uvjeti se sistematično mijenjaju kako bi se postiglo što bolje razdvajanje komponenti. U većini se slučajeva uvjeti optimiraju metodom pokušaja i pogreške. Kod ionske kromatografije najčešće se optimira sastav pokretne faze jer on utječe na razlučivanje, vrijeme trajanja analize, asimetriju kromatografskih krivulja itd. Ispituju se izokratični i gradijentni uvjeti eluiranja kako bi se ispunili postavljeni ciljevi iz prve stavke. Prilikom optimizacije uvjeta, osim razlučivanja ($R_S > 1,5$) koje je primarni zahtjev te trajanja analize, metoda mora zadovoljiti i ostale izvedbene karakteristike, kao što su asimetrija pika, prikladan tlak u sustavu, a poželjno je i da utrošak otapala bude što manji. Ukoliko se radi sa zahtjevnijim uzorcima ili ukoliko su postavljeni strogi ciljevi kromatografskog razdvajanja, potreban je velik broj eksperimenata kako bi se postiglo zadovoljavajuće razdvajanje. U nekim slučajevima striktno eksperimentalni pristup razvoju metode nije izvediv zbog velikog utroška vremena i financijskih troškova. Kao posljedica toga krajem 1980-ih počele su se razvijati računalne simulacije[17,18] kao pomoć u razvoju metoda. One zahtijevaju manji broj eksperimentalnih analiza, a omogućuju predviđanje kromatografskog razdvajanja za veliki skup različitih profila eluiranja. Na taj način najdugotrajniji dio razvoja metode znatno se skraćuje.
- U zadnjem dijelu razvoja metode, potrebno je provjeriti ponovljivost kromatograma, tj. razdvajanja. Također, provjerava se zadovoljava li metoda postavljene zahtjeve. Utvrđuje se je li metoda robusna te postoje li problemi koji bi mogli smetati prilikom rutinskog rada. Ukoliko se radi o kvantitativnoj metodi određivanja, izrađuje se kalibracijski dijagram te se metoda validira.[16]

2.5 Ionska kromatografija

Ionska kromatografija (IC) je kromatografska metoda u kojoj se separacija uglavnom temelji na razlici u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni na nepokretnoj fazi.

2.5.1 *Povijesni razvoj ionske kromatografije*

Ionsku su kromatografiju kao novu analitičku metodu prvi put predstavili Small, Stevens i Bauman[8]. Za vrlo kratko vrijeme ionska se kromatografija razvila od postupka za određivanje nekoliko kationa i aniona u modernu tehniku za određivanje niza ionskih vrsta. Godine 1979. Fritz[19] je opisao tehniku za određivanje anorganskih aniona u kojoj je kolonu za odjeljivanje izravno vezao s konduktometrijskom ćelijom. U tom su ionskom kromatografskom sustavu nepokretnu fazu činili ionski izmjenjivači niskog kapaciteta izmjene, tako da se mogao upotrijebiti eluens niske ionske jakosti. Molarna je provodnost određivanih iona također bila niska te samim time nije bila moguća osjetljivija detekcija analita. Krajem 1970-ih ionska je kromatografija prvi put upotrijebljena za analizu organskih iona. Zahtjevi za kromatografskom tehnikom koja bi omogućila odjeljivanje i analizu organskih kiselina doveli su do razvoja metode temeljene na mehanizmu ionskog isključivanja koju su prvi opisali Wheaton i Bauman[21]. Širina primjene ionske kromatografije uvelike se povećala uvođenjem elektrokemijskih i spektrometrijskih detektora. Pulsna amperometrijska detekcija olakšala je analizu ugljikohidrata[22]. Primjena poslijekolonske obrade uzorka u kombinaciji s fotometrijskim detektorom omogućila je određivanje teških i prijelaznih metala. Osobitu je popularnost ionska kromatografija stekla uvođenjem segmenata za prigušivanje pozadinskog šuma, tzv. supresora: 1970-ih diskontinuirani kemijski, 1980-ih kontinuirani kemijski te 1990-ih samoregenerirajući elektrokemijski supresori. Ovakav je razvoj ionskoj kromatografiji omogućio da se uvrsti u moderne analitičke tehnike, te da postane sastavni dio moderne anorganske i organske analize.

2.5.2 *Princip rada ionske kromatografije*

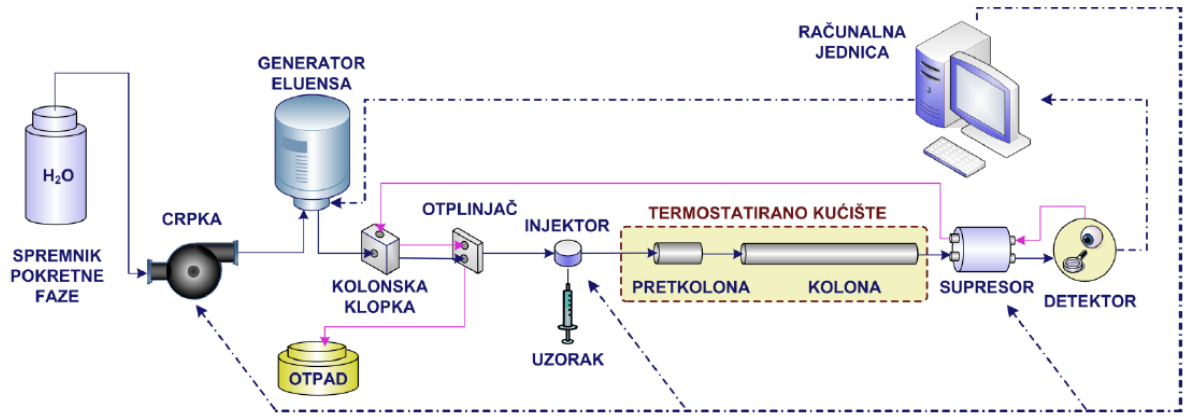
Ionska kromatografija tekućinska je kromatografija kod koje je nepokretna faza ionski izmjenjivač. Ionski izmjenjivač može biti u krutom ili gel obliku[8], a sastoji se od nosača; netopljive matrice koja po svojoj prirodi može biti organska ili anorganska tvar, funkcionalne skupine; ionizirane skupine koja su vezane na matricu i predstavljaju ionski aktivna mjesta nepokretne faze te protuiona; ekvivalentna količina suprotno nabijenih iona koji su privučeni na prije navedena aktivna mjesta u svrhu održavanja elektroneutralnosti sustava.

Prilikom kontakta izmjenjivača s otopinom, dolazi do izmjene mjesta protuiona izmjenjivača sa ionima iz otopine koji imaju naboj istog predznaka, a nazivaju se kompeticijski ioni. Posljedica izmjene iona, odnosno toga kada ion iz otopine zamijeni postojeći protuion na aktivnom mjestu, je zadržavanje tog iona na izmjenjivaču uslijed elektrostatskih sila. Ukoliko uzorak sadrži više komponenti koje imaju različit afinitet prema

izmjeni na nepokretnoj fazi, svaka će od tih komponenti biti zadržana različit vremenski period na aktivnim mjestima. Na taj način dolazi do razdvajanja komponenti uzorka na ionskom izmjenjivaču.[8,23]

2.5.3 *Ionski kromatografski sustav*

Na grafičkom prikazu (slika 4) je blokovski dijagram osnovnih sastavnica modernog ionskog kromatografa s konduktometrijskom detekcijom.



Slika 4. Shema modernog ionskog kromatografskog sustava s konduktometrijskom detekcijom.

Voda se kao pokretna faza iz spremnika crpi visokotlačnom crpkom s prigušivačem pulsova i potiskuje dalje kroz sustav. Eluens željene koncentracije nastaje elektrolitičkim putem u računalno kontroliranoj jedinici otkuda nastavlja dalje kroz sustav. Ako sustav sadrži jedinicu za generiranje eluensa, u pravilu se odmah iza nje mora nalaziti tzv. kolonska klopka, koja uklanja pojedine smetajuće ionske vrste te reducira trend povećanja pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon kolonske klopke iz eluensa se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. U injekcijskoj jedinici dolazi do uvođenja uzorka u tok pokretne faze kojim dalje biva nošen kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu, a unutar kojih dolazi do odjeljivanja sastojaka uzorka. Pretkolona i kolona najčešće se nalaze u termostatiranom kućištu. Na izlasku iz kolone nalazi se elektrokemijski supresor koji omogućava smanjenje pozadinskog šuma i pojačanje signala analita te detektor za mjerenje signala. Signal detektora sakuplja se i obrađuje u računalnoj jedinici. Iako ionski kromatograf ne koristi izrazito visoke tlakove, poput primjerice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), izvedbeni materijali moraju biti dovoljno čvrsti. Stoga su dijelovi koji dolaze u dodir s pokretnom fazom obično izrađeni od polietereterketona

i drugih polimera te materijala poput safira, rubina ili čak keramike, a koji se koriste u glavama crpki, sigurnosnim ventilima i injektoru.

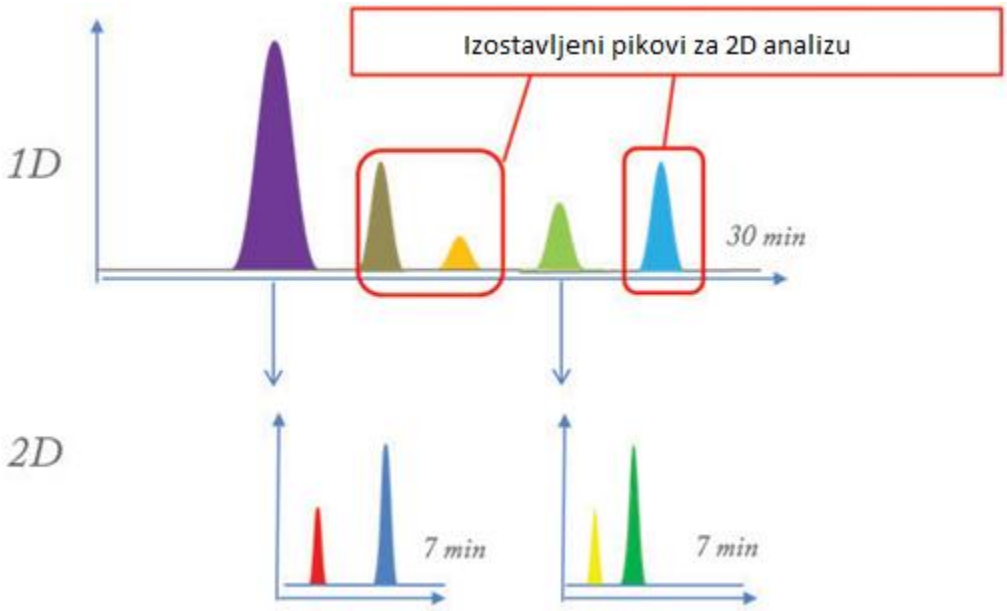
2.6 2D tekućinska kromatografija

Nerijetko se događa da kod složenih smjesa nije moguće kvalitativno, a posebice kvantitativno odvojiti sastojke, a to se vidi po nerazlučenim pikovima. U takvim slučajevima znatno veća selektivnost može se postići spajanjem dvaju zasebnih kromatografskih sustava. Naime, svaki od zasebnih sustava ima drugačiju selektivnost prema analiziranim analitima.
Prvu primjenu dvodimenzionalne kromatografije ostvarili su davne 1944. Consden i suradnici.[27] koristeći papirnu kromatografiju za odvajanje 22 hidroklorida aminokiselina. Nekoliko desetljeća kasnije, 1978., Erni i Frei razvijaju dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju na stupcu[28], nakon čega dolazi do eksplozije radova, kako iz područja 2D-LC-a[29], tako i drugih kromatografskih tehnika.[30-34]

Danas se 2D kromatografija općenito upotrebljava kroz dva načina izvedbe: *heart-cutting* i *comprehensive* izvedbu.

2.6.1 *Heart-cutting 2D kromatografija*

Heart-cutting 2D kromatografija uzima samo dijelove uzorka iz prve dimenzije (pikovi eluirani iz kolone) koji će biti injektirani u drugu dimenziju (slika 5).

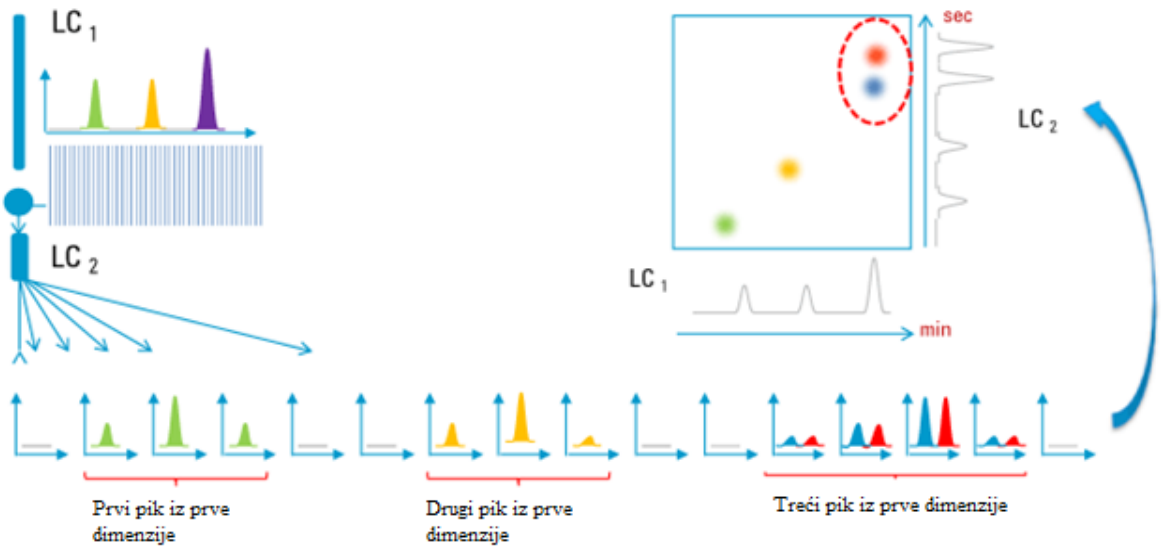


Slika 5. Shema *heart-cutting* provedbe 2D kromatografije.

Dakle, cijeli se pik iz prve dimenzije, gledajući vrijeme početka i vrijeme kraja pika, odjednom uzorkuje, a analiza u drugoj dimenziji traje duže od samog vremena uzorkovanja. U drugom se sustavu koriste duže kolone sa višom efikasnosti separacije i različitom selektivnosti od prve kolone.[35] Načelno, u drugom se sustavu koristi manji protok kako bi se ostvarila što bolja razlučivost pikova. Za ovaj način korištenja 2D kromatografije nije potreban dodatan *software* već se rezultati očitavaju promatrajući kanal koji prikazuje odziv detektora drugog kromatografskog sustava.

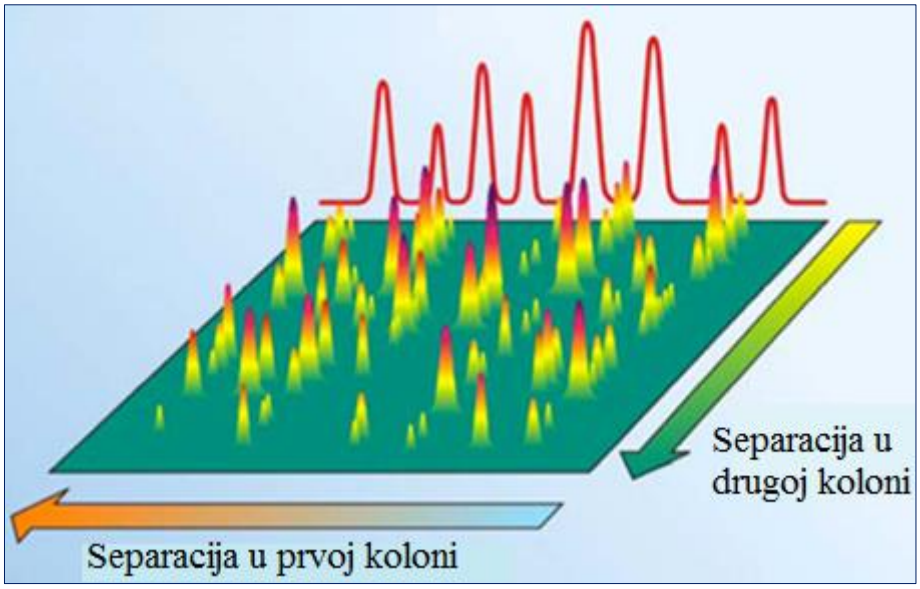
2.6.2 *Comprehensive 2D kromatografija*

Kod *comprehensive* 2D kromatografije kompletni set pikova iz prve kolone/dimenzije prenosi se sekvencijalno u drugu kolonu/dimenziju gdje se potom analizira brzim gradijentom (slika 6).



Slika 6. Shema *comprehensive* provedbe 2D kromatografije.

Na taj se način pik uzorkuje 3 do 4 puta te je moguće dobiti veću razlučivost i detektirati i kvantificirati spojeve koji su se možda preklapali na prvom sustavu. Vrijeme trajanja analize druge dimenzije treba se poklapati s vremenom uzorkovanja u prvoj dimenziji. Na kraju, pikovi su rekonstruirani. Pri upotrebi ove izvedbe 2D kromatografije potreban je programski paket koji će na kraju moći rekonstruirati dijelove pikova i, ukoliko je potrebno, izbaciti rezultate u 3D obliku (slika 7).[35]



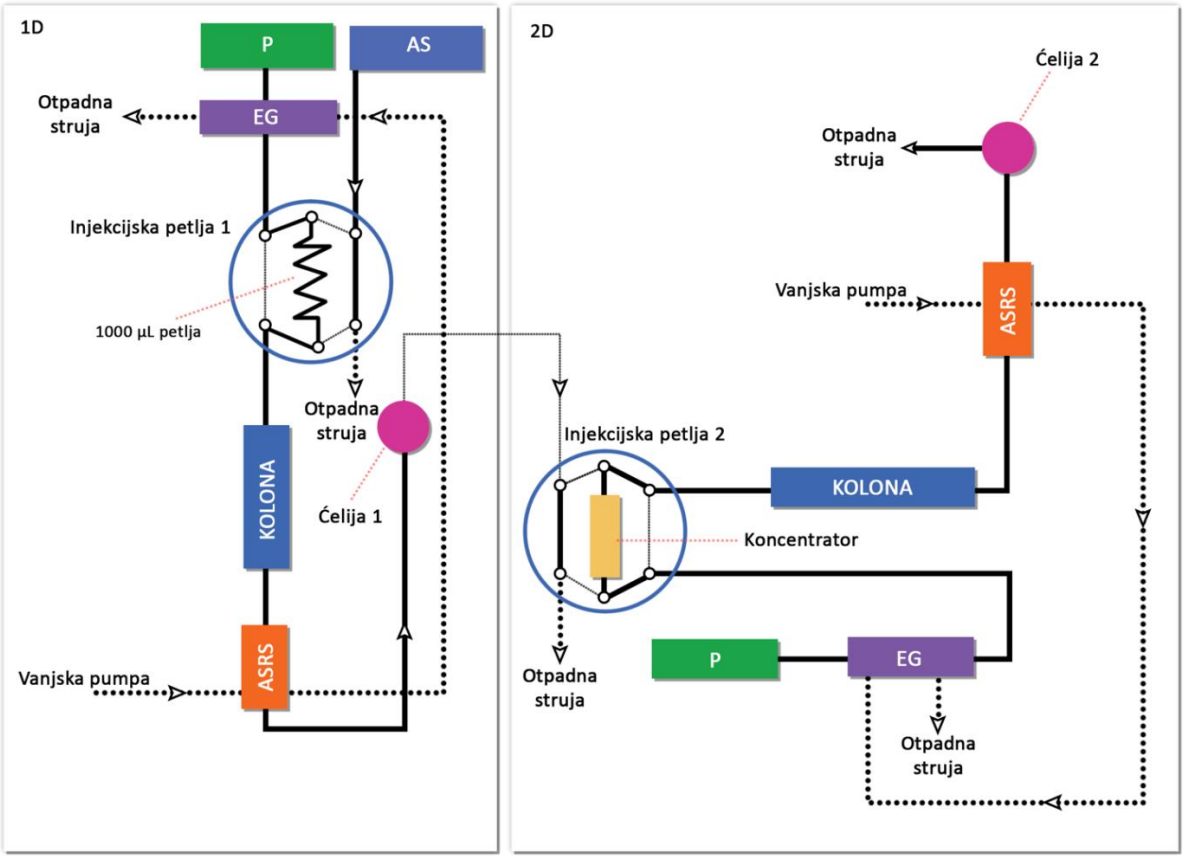
Slika 7. Shematski prikaz rezultata dobivenih *comprehensive* 2D kromatografijom.

2.6.3 *Ionska 2D kromatografija*

Primjeri uparenih ionskih kromatografskih sustava znatno su rjeđe prisutni u literaturi. Međutim, ima nekoliko aplikacija 2D-IC koje je ponudila kompanija Thermo Fisher Scientific za određivanje bromata i perklorata.[36-38]

Aplikacije sa prebacivanjem ventila injekcijskih petlji postaju sve popularnije u ionskoj kromatografiji, a primjer takvih aplikacija uključuje skretanje matrice ili uklanjanje matrice prije analize komponenti u tragovima. Konvencionalni sustav ionske kromatografije obično je opremljen s jednim ventilom, odnosno injekcijskom petljom, dok je instaliranje dodatnih ventila za primjenu dvodimenzionalne separacije ili pripremu uzorka prilično nezgrapno. Instrumenti koji se koriste u tu svrhu imaju integrirano automatizirano upravljanje modula koji podržavaju različite konfiguracije petlji.

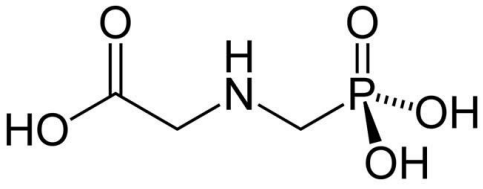
Sustav za 2D ionsku kromatografiju sastoji se od pumpe (SP ili DP), eluent generatora (EG), injekcijske petlje, pretkolone, kolone, supresora, detektora (DC), autosamplera (AS) i računala (slika 8). Svrha korištenja 2D ionske kromatografije je dobivanje veće razlučivosti pikova upotrebom drugog kromatografskog sustava različite selektivnosti. Na taj se način lakše detektiraju i kvantificiraju željeni anioni i kationi u uzorku, kao što se i dobiva uvid u cjelokupni sastav uzorka.[38]



Slika 8. Shema 2D-IC sustava.

2.7 Glifosat

Glifosat je široko primjenjivani herbicid i sredstvo za sušenje usjeva. Prema IUPAC-u njegov naziv je u *N*-(fosfonometil) glicin, a kemijska formula $C_3H_8NO_5P$ (slika 9). Molarna masa iznosi 169,07 g/mol, a pojavljuje se kao bijeli kristaliničan prah. Vrlo je opasan i ima nagrizajuća svojstva.[39]



Slika 9. Strukturna formula glifosata.

Koristi se kako za sprječavanje rasta korova, kao i određenih vrsta trava koje smetaju usjevima.[41] Globalno poznata tvrtka Monsanto je 1974. plasirala glifosat na tržište pod komercijalnim nazivom „*Roundup*“, a 2007. godine postao je najčešće korišten herbicid u

poljoprivredi Sjedinjenih Američkih Država s upotrebom oko 83000 t, a intenzivno se koristio i u kućnim odnosno vrtnim potrebama (oko 3500 t), te industriji.[41]

Glifosat se apsorbira kroz lišće, dok je njegova apsorpcija kroz korijenje minimalna.[42] On inhibira djelovanje biljnog enzima uključenog u sintezu tri važne aromatske aminokiseline; tirozin, triptofan i fenilalanin.[43] Stoga je efektivan samo na aktivno rastuće bilje, odnosno ne djeluje prije nicanja. Međutim, danas je sve veći broj usjeva genetski projektiran tako da bude tolerantan na glifosat, a to zapravo omogućava poljoprivrednicima korištenje glifosata nakon nicanja u svrhu uništavanja korova. U 2015. godini, 89 % kukuruza, 94 % soje i 89 % pamuka proizvedenog u SAD-u su genetski modificirani u svrhu dobivanja otpornosti na herbicide, pa tako i glifosat.[44] Problem počinje predstavljati činjenica da se u današnje vrijeme pojavljuju i mnoge vrste korova otporne na glifosat. Deaktivacija glifosata hidrolizom rezultira nastajanjem aminometilfosfonske kiseline (AMPA).[45] U nekim vrstama, poput mrkve i uljane repice, pronašli su AMPA-u čak dvije godine nakon što je zemlja bila tretirana glifosatom.

Provjera toksičnosti glifosata Njemačkog saveznog instituta za procjenu rizika 2013. godine govori o tome kako su dostupni podaci kontradiktorni i daleko od toga da budu uvjerljivi s obzirom na korelaciju između izloženosti formulacijama glifosata i riziku od raznih vrsta raka[46]. U ožujku pak 2015. godine, Međunarodna agencija za istraživanje raka Svjetske zdravstvene organizacije klasificirala je glifosat kao „vjerojatno kancerogen za ljude“ na temelju epidemioloških istraživanja i ispitivanja na životinjama.

Europska unija je 2002. propisala *prihvatljiv dnevni unos* za glifosat koji iznosi 0,2-0,3 mg/kg tjelesne mase dnevno.[47] No, neovisni znanstvenici upozoravaju da bi vrijednost prihvatljivog dnevnog unosa za glifosat trebala biti znatno manja, otprilike 0,025 mg/kg tjelesne mase dnevno, a to temelje na svim rezultatima istraživanja koji su objavljenim u periodu od 2002. do danas. Propisana maksimalna dozvoljena razina za rezidue glifosata u pšenici i grašku za EU iznosi 10 mg/kg. Usporedbe radi, uobičajen sadržaj vitamina E u pšenici se kreće između 7 i 10 mg/kg. No, maksimalna dozvoljena razina za sadržaj glifosata u soji, zobi i ječmu je čak i viša i iznosi 20 mg/kg (tablica 1). Međutim, treba uzeti u obzir da tijekom određenog vremenskog razdoblja propisane vrijednosti za maksimalno dozvoljenu razinu rezidua glifosata u većini glavnih žitarica su povišene.[47]

Budući da se u zadnje vrijeme dosta naglašava opasnost glifosata po ljudsko zdravlje, mnogi su proizvođači ali i agencije počeli intenzivnije kontrolirati razine glifosata, odnosno njegovih rezidua, u proizvodima dostupnima na tržištu. Tako je nedavno izbio veliki skandal u prehrambenoj industriji kada su u četrnaest njemačkih piva pronađeni tragovi glifosata.[48]

Prema istraživanju Instituta za zaštitu okoliša u Munchenu[49] očitanja za prisutni glifosat bila su između 0,46 i 29,74 μg/L, a najveće je očitanje bilo čak 300 puta veće od dozvoljene razine u pitkoj vodi u Njemačkoj.[50] Budući da se radi o svjetski poznatim markama nimalo ne čudi činjenica da se većina tih piva[51] mogla pronaći i na hrvatskom tržištu.

Tablica 1. Maksimalne dozvoljene razine rezidua glifosata za neke namirnice na području Europske unije.[52]

Namirnica	*w*, mg/kg	Namirnica	*w*, mg/kg
Grejp	0,1	Krastavac	0,1
Naranča	0,5	Slatki kukuruz	3
Limun	0,1	Ružmarin	0,1
Mandarine	0,5	Sjemenke suncokreta	20
Jabuke	0,1	Maslinovo ulje	1
Breskve	0,1	Ječam	20
Bademi	0,1	Zob	20
Lješnjaci	0,1	Raž	10
Krumpiri	0,5	Pšenica	10
Mrkva	0,1	Hmelj	0,1
Češnjak	0,1	Kozje mlijeko	0,05
Rajčice	0,1	Jaja	0,05

3 VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Validacija analitičkih metoda predstavlja potpuni postupak procjene izvedbenih značajki. Pod izvedbenim značajkama analitičkih kemijskih reakcija (metoda) podrazumijevaju se oni parametri čija brojčana vrijednost omogućuje procjenu valjanosti analitičkog postupka i njegovu svrsishodnost u rješavanju postavljenog analitičkog zadatka. Izvedbene značajke obuhvaćaju osjetljivost, preciznost (ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost), selektivnost/specifičnost, granicu dokazivanja, granicu određivanja, linearnost i koncentracijsko područje, robusnost.[53]

Validacija obvezuje svaku analitičku metodu te mora u sebi sadržati sve bitne podatke o analitičkom procesu određivanja i predstavlja sredstvo utvrđivanja potencijalnih problema u korištenju određenog procesa analize. Validacija može biti unutarlaboratorijska i međulaboratorijska. Unutarlaboratorijska se provodi unutar jednog laboratorija (dakle validacija metoda razvijenih u laboratoriju) dok se međulaboratorijska provodi među više laboratorija koji analiziraju isti uzorak.[54]

3.1 Unutarlaboratorijska validacija

Kada govorimo o unutarlaboratorijskoj validaciji valja razlikovati izvedbene značajke u kvalitativnoj i kvantitativnoj kemijskoj analizi. U kvalitativnoj kemijskoj analizi pod izvedbenim značajkama podrazumijevamo granične vrijednosti dokazivanja, selektivnost i otpornost. Od idealne reakcije traži se da bude specifična, osjetljiva i jednostavna za izvođenje. Takvih je reakcija malo. Obzirom na broj iona koji reagiraju pod određenim uvjetima s nekim reagensom reakcije mogu biti selektivne ili specifične, a obzirom na najniži sadržaj analita koji se još pouzdano može dokazati mogu biti više ili manje osjetljive.

3.1.1 *Preciznost*

Preciznost govori o odstupanju rezultata dobivenih nizom mjerenja uzoraka i višekratnim ponavljanjem cijelog procesa. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo:

- Ponovljivost – izražava preciznost pri istim operativnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Uvjeti uključuju isti laboratorij, analitičara i aparaturu.
- Međupreciznost – preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti,

reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača). Postupak može odražavati razlike u rezultatima. Cilj međupreciznosti je verifikacija metode i potvrda da će u istom laboratoriju metoda pružiti iste rezultate kada faza bude razvijena.

- Obnovljivost – izražava preciznost između laboratorija (kolaborativne studije se obično primjenjuju na standardizaciji metodologije). Dakle, promjenjivi uvjeti uključuju različite laboratorije. Taj se parametar određuje u svrhu normiranja metode i rijetko je sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij.

Određivanjem preciznosti kvantificiraju se slučajne pogreške metode, a numerički je pokazatelj standardna devijacija, koeficijent varijacije ili varijanca. Kod eksperimenata međupreciznosti iznimno je važno ponavljajuća mjerenja provoditi u uvjetima što sličnijima onima pri rutinskoj uporabi metode. U slučaju rezultata koji ne zadovoljavaju treba otkriti najvažniji izvor pogreške i pokušati ga ukloniti. Važno je naglasiti da se eksperimenti preciznosti rade na homogenom autentičnom uzorku, odnosno umjetno pripremljenom uzorku, a postupak se ponavlja prema propisu u metodi upravo onako kako će se ubuduće raditi u praksi. Broj ponavljanja treba zadovoljiti zahtjeve statistike. Najčešće se radi po tri ponavljanja na nekoliko koncentracijskih razina koji se, naravno, poklapaju s područjem linearnosti. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, matrici uzorka i koncentraciji analita koji se određuje.[54]

3.1.2 *Točnost*

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referentne vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta. Numerički pokazatelj točnosti eksperimentalno je utvrđeno sustavno odstupanje (eng. *bias*) metode, dobiven je kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti ili kao njihov odnos, što se posebno primjenjuje kod određivanja iskorištenja. Eksperimenti se provode nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Raspon koncentracija treba odgovarati stvarnom uzorku, ali treba uključiti i koncentraciju na granici kvantifikacije (GK) kada je ona bitna. Točnost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referentnom metodom
- analizom uzorka poznate koncentracije, primjerice certificiranoga referentnog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti
- cijepljenjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala.

Rezultati se mogu prikazati grafički kao odnos teorijske (očekivane) vrijednosti prema izmjerenoj koncentraciji, ali obavezno kao srednje iskorištenje. Relativna standardna devijacija (*RSD*) i ovdje može poslužiti kao pokazatelj preciznosti.

3.1.3 *Granice detekcije i kvantifikacije*

Granice detekcije i granica kvantifikacije definiraju se kao najmanja je količina analita u uzorku koja se može detektirati odnosno kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se razrjeđivanjem osnovne otopine. Procjena može biti vizualna, s pomoću omjera signal/šum ili statistička. Vizualna se procjena može primijeniti i kod klasičnih i kod instrumentalnih metoda, uglavnom samo za granicu detekcije, a procjenjuje se najmanji signal koji se nedvojbeno može prepoznati. Omjer signal/šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljivi su omjeri 3:1 za granicu detekcije i 10:1 za granicu kvantifikacije. Statistički se granice detekcije i kvantifikacije mogu odrediti na bazi standardne devijacije signala i nagiba. Parametar granice kvantifikacije iznimno je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš.

Granica detekcije često se miješa sa pojmom osjetljivosti. Osjetljivost analitičke metode je sposobnost metode da otkrije male razlike u koncentraciji i masu ispitivanog analita. U praktičnom smislu, osjetljivost je nagib krivulje kalibracije dobivene nanošenjem odziva na koncentraciju ili masu analita.[55]

3.1.4 *Linearnost*

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala; preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Procjenjuje se matematički i grafički.

Matematički pristup uključuje provedbu tzv. linearne regresije gdje se ovisnost nezavisne i zavisne varijable izražava jednadžbom pravca.

Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza:

- grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije,

- grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi *y* i odgovarajućih koncentracija na osi *x* log skale.

Kad se kalibracijske krivulje primjenjuju u svrhu kvantifikacije treba:

- pri njihovoj izradi upotrijebiti najmanje pet razina,
- opisati operativni raspon krivulje,
- opisati matematičku formulu krivulje i primjerenost podataka krivulji
- opisati raspone prihvatljivosti parametara krivulje.

Ako je pak potrebno serijsko kalibriranje na temelju standardne otopine, treba naznačiti prihvatljive raspone kalibracijske krivulje, koji mogu varirati od serije do serije.

Nerijetko se uz pojam linearnost spominje i pojam područje linearnosti. Područje linearnosti nije ništa drugo doli područje između donje i gornje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku za koje vrijedi linearan kalibracijski odnos te koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, točnost i linearnost. Za određivanje tog parametra nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz samog proučavanja linearnosti. U puno slučajeva područje je određeno svrhom metode i nema potrebe za ispitivanjem krajnjih mogućnosti metode. Naprotiv, sužavanjem područja na koncentracijski raspon uzoraka postižu se bolja točnost i preciznost metode. Međutim, kad se očekuju uzorci sa širokim rasponom koncentracija, isplati se definirati maksimalno područje metode. Raspon je obično izražen u postocima ili ppm, tj. rezultatima testiranja dobivenih analitičkom metodom.

3.1.5 *Selektivnost*

Selektivnost je svojstvo metode da odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata matrice uzorka u kojima se može očekivati da će biti prisutan pod utvrđenim uvjetima ispitivanja.

Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom.

Selektivnost je nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda. U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku. Kod kromatografskih metoda, osim usporedbe kromatograma referentnog materijala i uzorka, potrebno je dokumentirati razlučivanje te asimetriju pikova, a što je nužno za dobivanje kvantitativnih rezultata. Kod određenih metoda potrebno je prikupiti dokaze o čistoći pikova.

Nije uvijek moguće dokazati da je jedan analitički postupak specifičan za određeni analit. U tom se slučaju preporuča kombinacija dva ili više analitičkih postupaka za postizanje potrebne razine razlikovanja. Specifičnost u kromatografiji postiže se odabirom optimalnih kolona i postavljanjem kromatografskih uvjeta, kao što su sastav mobilne faze, temperatura kolone, parametri detekcije… Kromatografskim odvajanjem može se naime pospješiti selektivnost metode: komponente koje pojedini detektor ne bi mogao razlikovati napuštaju kolonu (eluiraju) u različitim vremenskim intervalima.

3.1.6 *Robusnost*

Robusnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. To daje naznaku o pouzdanosti postupka tijekom normalnog korištenja. Važan su dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode te upućuju na to što treba nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata. Primjerice kod tekućinske kromatografije ispituju se utjecaji sastava i pH mobilne faze, temperature, protoka i slično. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Uvjete za koje je utvrđeno da utječu na rezultat treba držati pod nadzorom i to jasno naznačiti u opisu metode. Prema podacima o robusnosti postavljaju se parametri za ispitivanje prikladnosti sustava.

Test robusnosti provodi se najčešće prema Youdenovom postupku.[1]

3.1.7 *Stabilnost*

Testiranje stabilnosti važno je za procjenu dopuštenog vremenskog razdoblja između uzimanja uzoraka i analizu uzorka. Nakon završetka željenog vremena skladištenja, stabilnost se testira usporedbom odgovora instrumenta sa svježe pripremljene otopine i skladištene otopine.[48]

3.2 Međulaboratorijska validacija

Kod međulaboratorijske validacije važno je spomenuti tri mogućnosti ispitivanja:

1. Ispitivanje izvedbene metode - ocjenjuju se izvedbene karakteristike, točnije utjecaj na preciznost metode; ponovljivost i obnovljivost.
2. Ispitivanje rada laboratorija - podrazumijeva se analiza uzorka poznate ili najtočnije moguće procijenjene koncentracije, najčešće putem samih

međulaboratorijskih eksperimenata. Svejedno je koja se metoda analize koristi, a rezultati se analiza laboratorija uspoređuju s ciljem procjene kvalitete rada pojedinih laboratorija te unaprjeđenja njihove izvedbe.

3. Ispitivanje uzoraka - potrebno je odrediti najvjerojatniju koncentraciju sa što manjom nesigurnošću i najčešće se koriste različite metode, a cilj ispitivanja je dobivanje referentnih rezultata.

3.3 Koraci validacije

Validacija metoda započinje kada se u laboratorij želi implementirati nova metoda, a završava kada metoda više nije u upotrebi. Proces je podijeljen u nekoliko faza zbog duljine trajanja i složenosti. Prvi korak je da se definira područje metode. Ovo uključuje spojeve u koncentracijskom rasponu, matricu uzorka, specifičnu opremu koja bi trebala biti korištena i mjesto gdje bi postupak trebao biti izveden. Kada definiramo što treba analizirati, sljedeći korak je definirati izvedbene karakteristike, izvedbeni test i kriterije prihvatljivosti. Testovi se provode u skladu s protokolima. Rezultati testova uspoređuju se s kriterijima prihvatljivosti. Konačno, rutinski postupci razvijeni su kako bi potvrdili kontinuirani rad sustava u vrijeme analize. Svi eksperimentalni uvjeti i rezultati provjere su dokumentirani u validacijskom izvješću.[56]

Opseg metode i kriterije validacije treba definirati rano u procesu. Definiranje opsega je zajednički napor nekoliko odjela, uključujući razvoj poslovanja, analitičkog razvoja, kontrole kvalitete i osiguranja kvalitete.

Definiranje opsega metoda također je važno za pronalazak optimalnih napora za testiranje. Na primjer, uključivanje opreme različitih proizvođača će povećati napor testiranja, ali i fleksibilnost laboratorija za korištenjem različitih instrumenata u rutinskoj analizi. Ako se metoda izvodi samo na specifičnim instrumentima, nema potrebe da se koriste instrumenti od drugih dobavljača u eksperimentima validacije. Na taj način, kod eksperimenata se može ograničiti ono što je stvarno potrebno. Slično tome, uključivanjem različitih mjesta u proučavanje validacije će se povećati napor testiranja, ali to će također omogućiti jednostavan prijenos metode na mjesta koje su dio proučavanja.[1]

Za učinkovitost procesa provjere, važno je odrediti prave parametre validacije i kriterije prihvaćanja. Nije uvijek potrebno provjeriti sve analitičke parametre dostupne za posebne tehnike. Na primjer, ako se metoda koristi za kvalitativnu analizu razine u tragovima, nema potrebe za testiranjem i validiranjem metode za granicu kvantifikacije ili linearnost. Što

je više parametara, više će se vremena potvrđivati. Međutim, potrebno je definirati sve one parametre koji su zahtijevani. Izbor parametara validacije i kriteriji prihvatljivosti trebaju se temeljiti na poslovnim, regulatornim i klijentskim zahtjevima, i, trebaju biti opravdani i dokumentirani.

Izračunavanje parametara u skladu s uobičajenim metodama zahtijeva izvođenje nekoliko pojedinačnih ispitivanja. Mora se odrediti svaka značajka učinkovitosti za svaku veću promjenu. Metodama za ispitivanje više analita moguće je istodobno analizirati nekoliko analita, uz uvjet da su prethodno isključene interferencije koje bi mogle biti značajne. Na isti način se može odrediti nekoliko značajki učinkovitosti. Dakle, da bi se smanjila količina posla, preporučljivo je kombinirati ispitivanja u što je moguće većoj mjeri.[1]

Za svaki pojedini projekt validacije treba razviti plan projekta. Na njemu se vidi što treba učiniti kako bi određena metoda ili postupak bili validirani. Plan treba sadržavati raspored sa specifičnim zadacima, isporučiteljima i vlasnicima.

Nema službenih smjernica za slijed validacije ispitivanja. Optimalna sekvenca može ovisiti o samom postupku. Na temelju literature, za tekuće kromatografske metode, dokazano je da je koristan sljedeći slijed:

1. specifičnost/selektivnost,
2. ponovljivost vremena zadržavanja i područje pika,
3. linearnost, granica kvantifikacije, granica detekcije, raspon,
4. točnost pri različitim koncentracijama,
5. međupreciznost,
6. obnovljivost.

Neki od parametara, kao što je navedeno u točkama 2-4, mogu se mjeriti u kombiniranim pokusima. Na primjer, kada se mjeri preciznost pikova preko raspona koncentracija, podaci se mogu koristiti za provjeru linearnosti.

Cilj validacije analitičkih metoda je ne samo kako bi se osigurali validirani podaci tijekom prve uporabe metode već tijekom cijelog životnog vijeka.[56]

3.4 Izvješća validacije

Nakon što je metoda razvijena i provjerena, treba pripremiti izvješće o validaciji. Izvješće treba sadržavati dovoljno informacija tako da iskusni analitičar može ponoviti ocjenu validacije.

Uobičajeno je da izvješća sadržavaju sljedeće:

- svrhu i područje metoda,
- sažetak metodologije,
- odgovornosti,
- vrstu spojeva i matrice, sve kemikalije i referentne standarde,
- postupke za kvalitetnu provjeru standarda i kemikalija koje se koriste,
- sigurnosne mjere,
- plan i postupak za provedbu metode,
- kritične parametre uzete iz robusnosti testiranja,
- detaljne parametre i uvjete o tome kako su eksperimenti bili provedeni, uključujući i pripremu uzorka,
- statističke postupke i reprezentativne izračune,
- postupke za kontrolu kvalitete,
- reprezentativne grafičke podatke (kromatogrami, spektri i kalibracijske krivulje),
- očekivanu nesigurnost mjernih rezultata,
- kriterije za ponovnu validaciju,
- reference (ukoliko je potrebno),
- odstupanja od plana validacije i protokola,
- sažetak i zaključke,
- odobrenje s imenima, naslovima, datumima i potpisima onih koji su odgovorni za pregled i odobravanje analitičkog postupka ispitivanja.

3.5 Ponovljena validacija

Analitičke metode zahtijevaju ponovnu provjeru, odnosno ponovljenu validaciju (eng. *revalidation*) ako se parametri metoda moraju mijenjati i ukoliko su te promjene izvan tolerancije propisane pravilnicima ili pak ako se promijeni matrica uzorka.[56] Svaka navedena izmjena treba biti dokumentirana, treba definirati razlog promjene i promjena biti odobrena za provedbu. Nakon toga provodi se ponovljena validacija.

4 EKSPERIMENTALNI DIO

4.1 Reagensi i otopine

Prilikom analiza otopina glifosata korištena su dva kalibracijska pristupa: metoda vanjskog standarda i metoda standardnog dodatka. Pri tome je korištena standardna otopina glifosata (Sigma-Aldrich, Njemačka) koncentracije 1000 ppm iz koje su razrjeđivanjem pripremljene radne standardne otopine različitih koncentracija. Za razrjeđivanje je korištena ultračista voda vodljivosti 18 MΩ, dobivena primjenom Milli-Q uređaja (Millipore, SAD, slika 10).

Za potrebe metode vanjskog standarda razrjeđivanjem standardne otopine glifosata pripremljene su radne standardne otopine sljedećih koncentracija: 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 25,0, 50,0, 75,0 i 100,0 ppm. Svaka otopina pripravljana je i mjerena 3 puta što je u konačnici činilo 9 mjerenja po jednakoj koncentracijskoj razini.

Prilikom metode standardnog dodatka rađene su 3 pripreme 3 različita dodatka. 10 mL otopine realnog uzorka dodavano je u tikvice od 100 mL, nakon čega je u tikvice dodavano redom 10, 25 i 50 mL radne standardne otopine glifosata od 10 ppm (1,0, 2,5 i 5.0 ppm dodatka) i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.

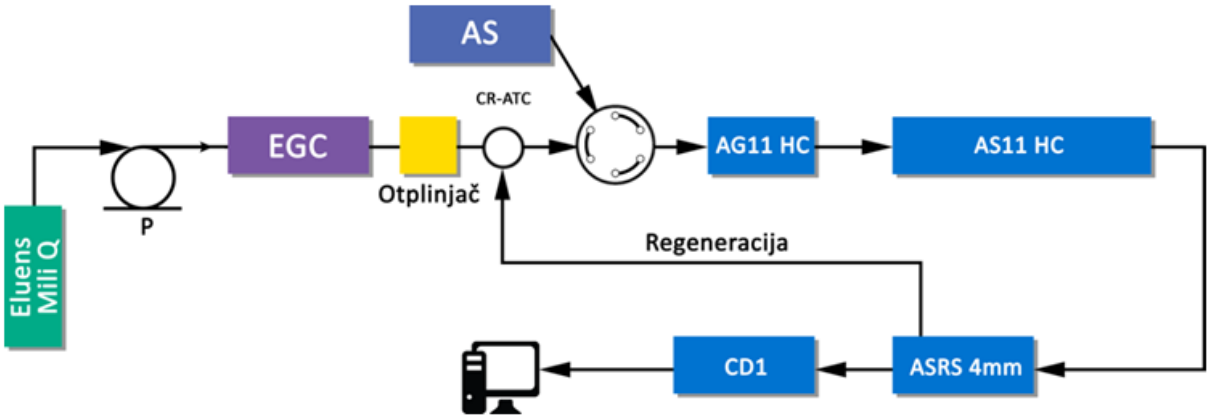
Kao realni uzorak, odabrano je neimenovano pivo stranog proizvođača. Uzorak piva prije analize tretiran je na ultrazvučnoj kupelji Bandelin SONOREX™ Digital 10 P (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Njemačka) da se uklone plinovi.



Slika 10. Korištena aparatura za dobivanje ultračiste vode.

4.2 Jednodimenzionalni ionski kromatografski sustav (1D-IC)

Preliminarna ionska kromatografska analiza, odnosno analiza glifosata u vodenom mediju, rađena je na jednodimenzionalnom analitičkom IC sustavu Dionex ICS-5000, shematski prikazanom na slici 11). Cijeli sustav računalno je upravljan programskim paketom Chromeleon 7.1.



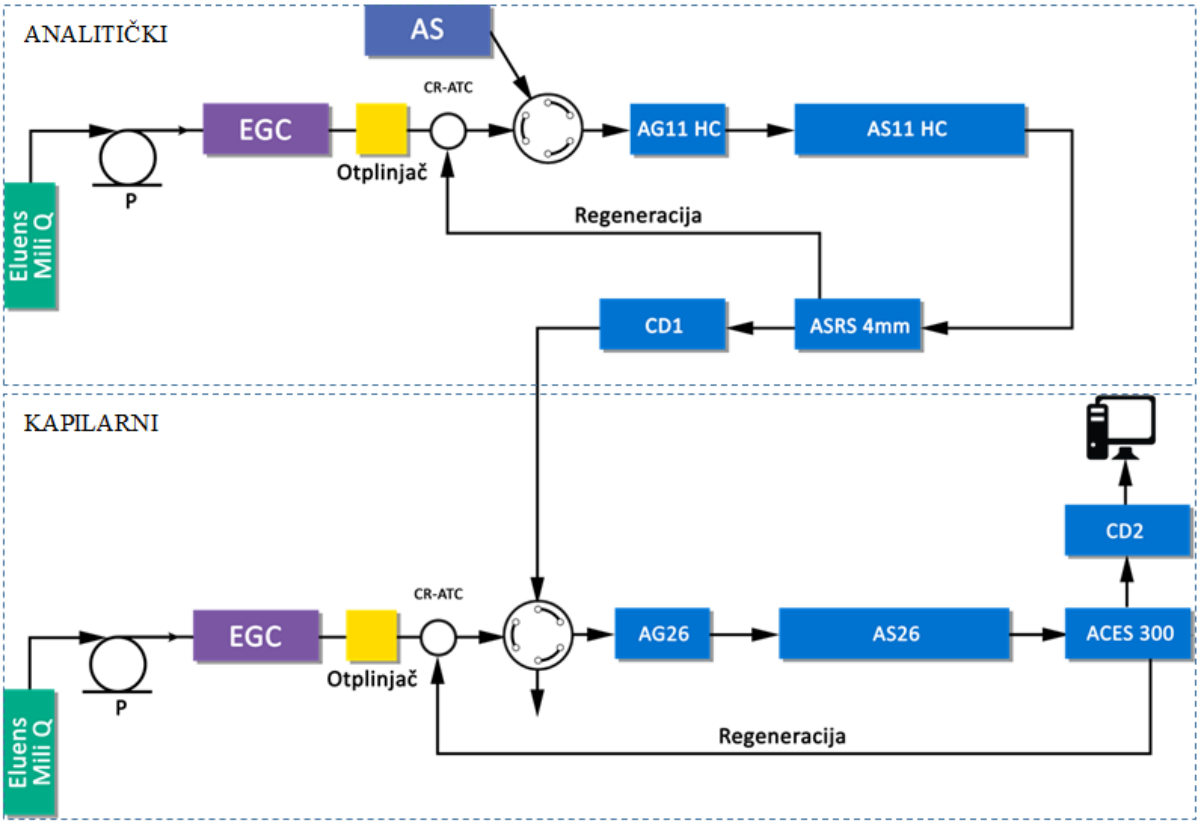
Slika 11. Shema upotrijebljenog 1D-IC sustava.

Kao pokretna faza korištena je otopina hidroksidnih iona (KOH), a elucija je provedena izokratično pri 30 mM KOH. Protok od 1 mL/min, radna temperatura kolone od 30 °C i temperatura detektora od 35 °C održavani su konstantnim. Volumen injekcijske petlje iznosio je 25 µL. Kao nepokretna faza korištena je kolona visokog kapaciteta izmjene AS11 HC s pretkolonom AG11 HC. Detekcija analita provodila se konduktometrijskim detektorom. Kao inertni plin za sprječavanje stvaranja podtlaka u spremnicima pokretne faze korišten je dušik čistoće 5,0. Za prigušenje signala mobilne faze korišten je elektrokemijski supresor ASRS 4mm s postavljenom jakošću struje od 75 mA. Svi spomenuti segmenti jednodimenzionalnog IC sustava su marke Thermo Fisher Scientific (SAD).

4.3 Dvodimenzionalni ionski kromatografski sustav (2D-IC)

Dvodimenzionalni sustav upotrijebljen u ovom istraživanju je upareni analitički i kapilarni IC sustav (slika 12), također proizvođača Thermo Fisher Scientific. Korišten je *heart-cutting* pristup gdje se iz prvog (analitičkog) sustava nakon 7. minute analize izdvaja analit u trajanju od 150 s (interval eluiranja glifosata) i prenosi u kapilarni IC sustav. Kod kapilarnog sustava analit se eluirao na AG26 pretkoloni i AS26 koloni, koncentracija KOH iznosila je 60 mM. Temperatura kućišta s kolonom i temperatura konduktometrijskog

detektora iste su kao u slučaju jednodimenzionalnog IC sustava (poglavlje 4.2). Kao supresor korišten je elektolitički supresor ACES 300 uz iznos struje od 9 mA. Protok u kapilarnom sustavu iznosio je 0,006 mL/min.



Slika 12. Shema upotrijebljenog 2D-IC sustava.

Dobiveni kromatogrami kao i kod 1D sustava obrađivani su u programskom paketu Chromeleon 7.1 nakon čega su iznosi površina pikova prebačeni u MS Excel 2016 (Microsoft Office, SAD) gdje je provedena daljnja računska analiza.

5 REZULTATI I RASPRAVA

Za potrebe analize glifosata danas se koriste različite metode poput SPE LC-MS[57], 2D-UPLC s MS detekcijom[58], LC-MS-MS[59,60]… Kao što se može vidjeti, sve ove metode koriste masenu detekciju. U ovom radu primijenjen je znatno jednostavniji pristup: glifosat je određivan IC metodom uz konduktometrijsku detekciju.

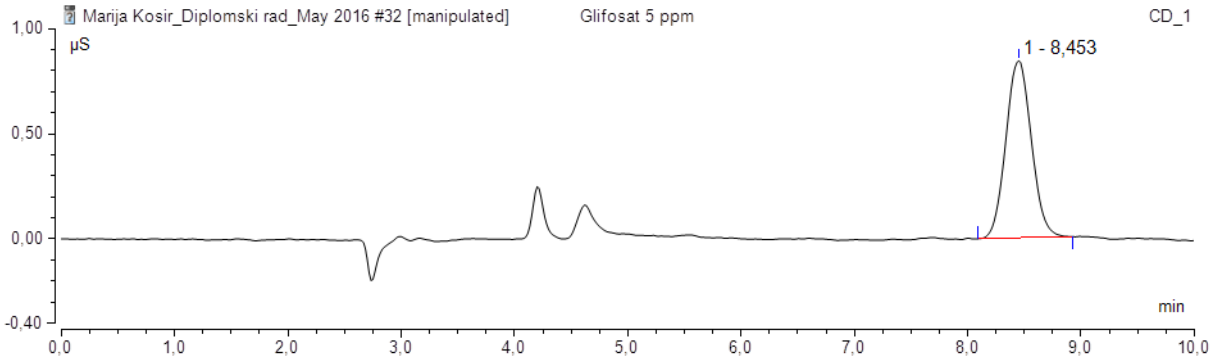
5.1 Metoda vanjskog standarda pri 1D-IC analizi

Kao prvi pristup analizi glifosata odabrana je uobičajena jednodimenzionalna IC analiza, a kao analit uzeta je vodena otopina glifosata.

Tablica 2. Dobivene eksperimentalne vrijednosti površina, *A*, za pojedinu koncentraciju glifosata, *γ*, u vodenoj otopini.

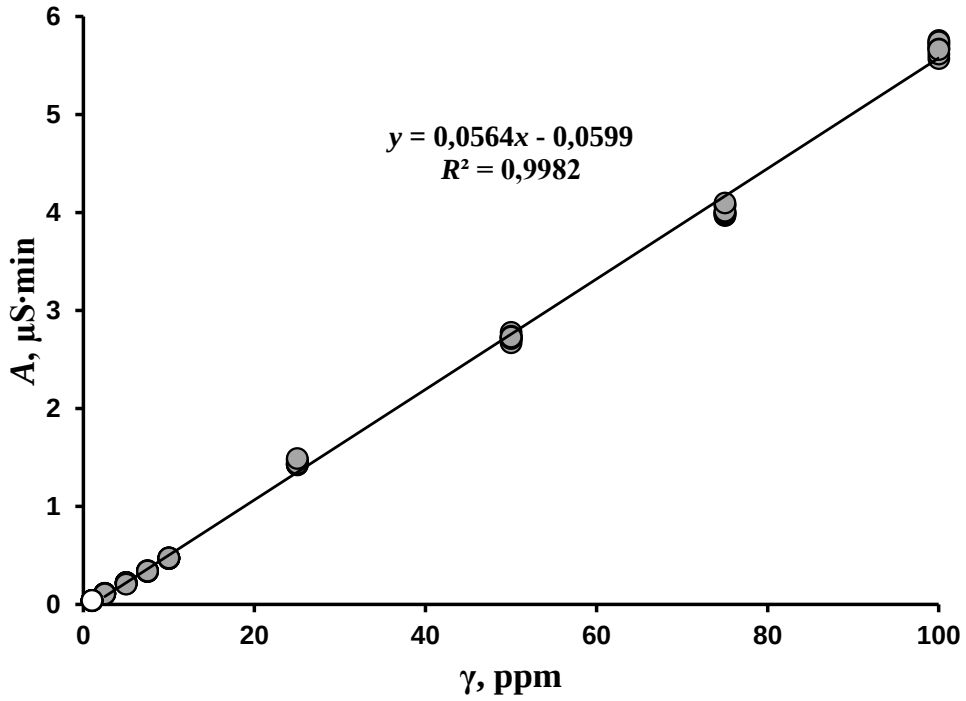
γ, ppm	*A*, µS·min	*γ*, ppm	*A*, µS·min	*γ*, ppm	*A*, µS·min
1,0	0,040	7,5	0,339	50,0	2,734
1,0	0,042	7,5	0,347	50,0	2,713
1,0	0,040	7,5	0,338	50,0	2,703
1,0	0,038	7,5	0,341	50,0	2,728
1,0	0,038	7,5	0,337	50,0	2,778
1,0	0,040	7,5	0,338	50,0	2,672
1,0	0,040	7,5	0,338	50,0	2,714
1,0	0,041	7,5	0,344	50,0	2,740
1,0	0,042	7,5	0,342	50,0	2,730
2,5	0,113	10,0	0,469	75,0	3,970
2,5	0,114	10,0	0,473	75,0	3,976
2,5	0,113	10,0	0,471	75,0	4,080
2,5	0,110	10,0	0,469	75,0	3,992
2,5	0,110	10,0	0,468	75,0	3,994
2,5	0,114	10,0	0,473	75,0	4,006
2,5	0,108	10,0	0,476	75,0	4,069
2,5	0,111	10,0	0,477	75,0	4,014
2,5	0,108	10,0	0,475	75,0	4,099
5,0	0,226	25,0	1,456	100,0	5,682
5,0	0,225	25,0	1,480	100,0	5,571
5,0	0,220	25,0	1,425	100,0	5,619
5,0	0,221	25,0	1,474	100,0	5,725
5,0	0,223	25,0	1,430	100,0	5,709
5,0	0,221	25,0	1,430	100,0	5,757
5,0	0,213	25,0	1,433	100,0	5,744
5,0	0,212	25,0	1,441	100,0	5,670
5,0	0,208	25,0	1,491	100,0	5,664

Standardizacija je provedena metodom vanjskog standarda. Za potrebe standardizacije pripravljene su (vidi poglavlje 4.1) i analizirane radne standardne otopine glifosata u ultračistoj vodi. Pokazalo se da glifosat eluira u 8,453 minuti (slika 13). Dobivene eksperimentalne vrijednosti odziva glifosata (površina ispod kromatografskog pika) prikazane su u tablici 2.



Slika 13. Kromatogram analize glifosata (pik broj 1) u vodenoj otopini.

Regresijskom analizom (primjenom metode najmanjih kvadrata) dobiven je kalibracijski pravac prikazan na slici 14.



Slika 14. Kalibracijski dijagram IC analize glifosata u vodenoj otopini. Sivi krugovi predstavljaju vrijednosti uzete za izradu kalibracijskog pravca, dok bijeli krugovi predstavljaju izostavljene eksperimentalne točke (pri 1 ppm).

Za potrebe određivanja granice detekcije, *GD*, i granice kvantifikacije, *GK*, korišteni su matematički izrazi[61]:

$$GD = \frac{3,3 \cdot a}{\sigma} \tag{27}$$

$$\mathrm{GK} = \frac{10 \cdot a}{\sigma} \tag{28}$$

pri čemu je a nagib kalibracijskog pravca, $y=a \cdot x+b$, a kao standardna devijacija σ korištena je standardna devijacija odsječka kalibracijskog pravca, s_b, izračunata nizom statističkih formula, počevši sa prosječnom vrijednosti x i y varijable:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \tag{29}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N} \tag{30}$$

gdje N predstavlja broj analiziranih uzoraka, a x_i i y_i set podataka za svaki pojedini uzorak. Zatim se računaju sume kvadrata odstupanja:

$$S_{xx} = \sum \left(x_i - \bar{x} \right)^2 \tag{31}$$

$$S_{yy} = \sum \left(y_i - \bar{y} \right)^2 \tag{32}$$

$$S_{xy} = \sum \left(x_i - \bar{x} \right)\left(y_i - \bar{y} \right) \tag{33}$$

Ukoliko se izraz (33) podijeli sa izrazom (31), dobiva se vrijednost nagiba a:

$$a = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \tag{34}$$

Odsječak pravca, b, jednak je izrazu:

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \tag{35}$$

Tada se računa standardno odstupanje regresije, s_r, prema sljedećem izrazu:

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - a^2 \cdot S_{xx}}{N-2}} \tag{36}$$

Konačno dolazimo do izraza za standardno odstupanje odsječka pravca, s_b:

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \cdot \sum x_i^2 - \left(\sum x_i \right)^2}} \tag{37}$$

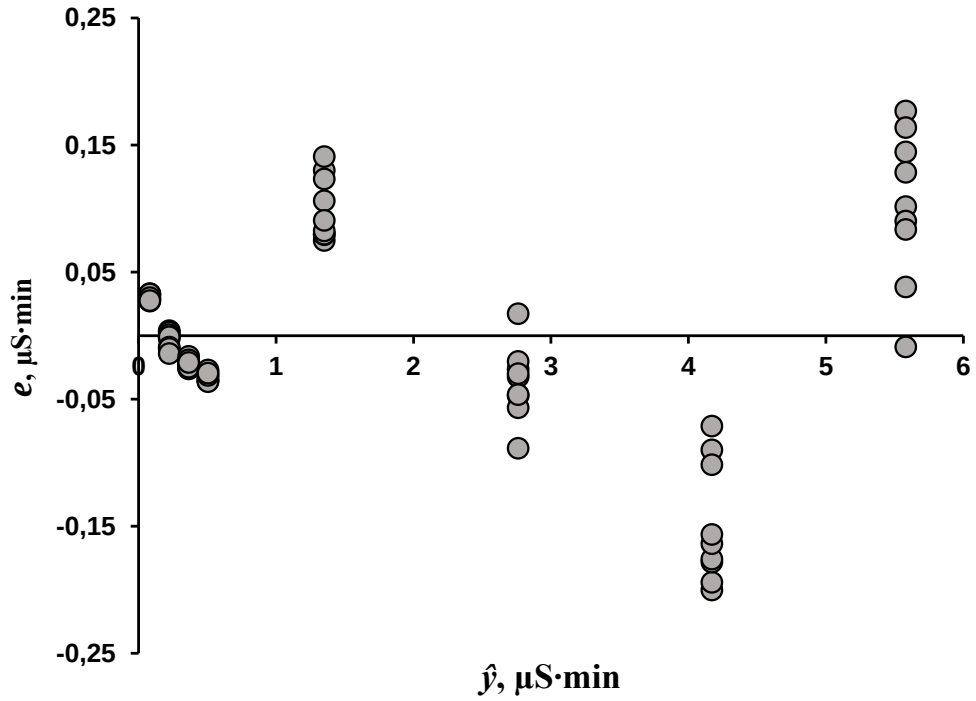
Izračunate vrijednosti prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti standardne devijacije odsječka, granice detekcije i granice kvantifikacije upotrijebljene IC metode analize glifosata u vodenoj otopini.

GD, ppm	*GK*, ppm	s_b
0,69	2,08	0,0118

Dobivena granica detekcije od 0,69 ppm ukazala je kako se glifosat u svim otopinama analiziranim za potrebe izrade kalibracijskog dijagrama može detektirati. Međutim granica kvantifikacije pokazala se većom od 1 ppm, pa stoga ta otopina nije korištena pri konstrukciji kalibracijskog dijagrama (bijeli krugovi na slici 14).

Visoka vrijednost koeficijenta determinacije, R^2, od 0,9982 (slika 14) govori u prilog izražene linearnosti metode u odabranom rasponu koncentracija. Ravnomjerna raspodjela reziduala (slika 15) ispod i iznad osi apscise uz izostanak vidljivih trendova ponašanja pokazatelj je opravdanosti odabira linearnog kalibracijskog modela.



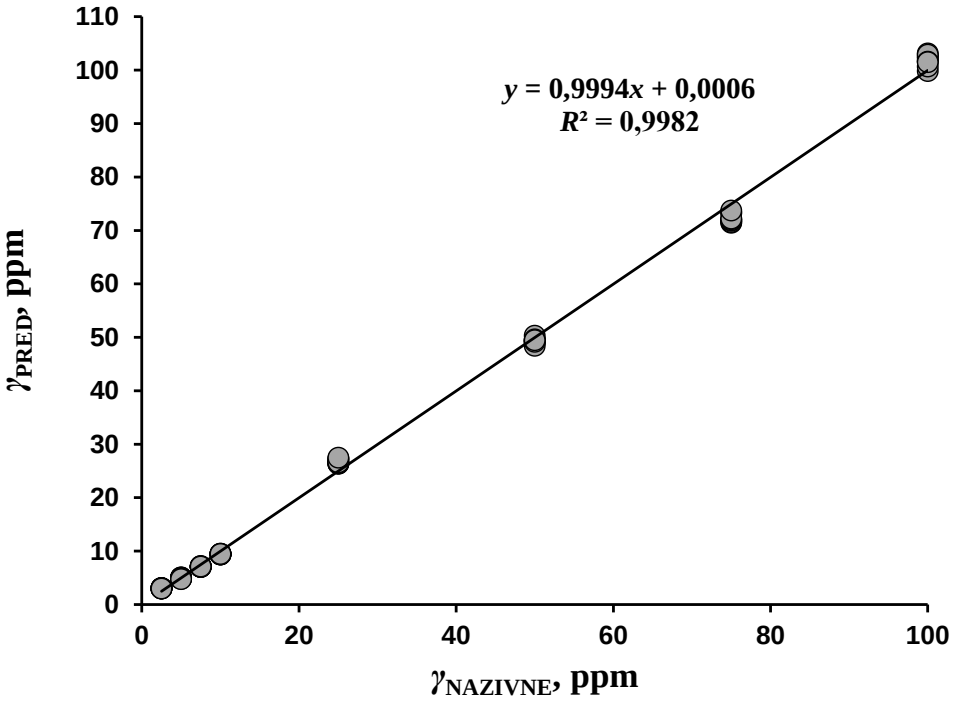
Slika 15. Grafički prikaz reziduala.

Sljedeći korak kod validacije metode bio je određivanje njene točnosti. Za potrebe analize regresijski smo uspoređivali teoretski očekivane vrijednosti koncentracija pripravljenih otopina glifosata s koncentracijama dobivenim uvrštavanjem eksperimentalnih površina u jednadžbu kalibracijskog pravca (slika 14). Regresijska analiza provedena je u MS Excel programskom paketu upotrebom alata „data analysis“, a rezultati analize prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Analiza točnosti primijenjene 1D-IC metode.

	Koeficijenti	Donja granica intervala pouzdanosti 95,0 %	Gornja granica intervala pouzdanosti 95,0 %
Odsječak	0,0006	-0,4848	0,4860
Nagib	0,9994	0,9894	1,0094

Budući da 95,0 %-tni interval pouzdanosti za odsječak uključuje i vrijednost 0,0000, zaključujem kako odabrani model ne sadrži apsolutnu sustavnu pogrešku. 95,0 %-tni interval pouzdanosti za nagiba uključuje pak vrijednost 1,0000, što znači da s 95,0 %-tnom vjerojatnošću mogu tvrditi kako model ne sadrži ni proporcionalnu sustavnu pogrešku (slika 16).



Slika 16. Regresijska analiza nazivnih i modelom predviđenih vrijednosti koncentracija za upotrijebljenu metodu 1D-IC.

Preciznost metode iskazana je kao relativna standardna devijacija, *RSD*:

$$RSD = \frac{SD}{c} \tag{38}$$

pri čemu je *c* koncentracija glifosata, a *SD* standardna devijacija mjerenja na određenoj koncentracijskoj razini izračunata prema:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i \left(c_i - \bar{c}\right)^2}{N-1}} \tag{39}$$

Preciznost je određena na svim koncentracijskim razinama glifosata, ali i ukupno kao srednja vrijednost preciznosti na pojedinim razinama (tablica 5).

Tablica 5. Preciznost na različitim koncentracijskim razinama glifosata, *γ*, vodenoj otopini. Preciznost je izražena kao relativna standardna devijacija, *RSD*.

γ, ppm	*σ*, ppm	RSD %	RSD_{uk} %
2,5	0,04	1,34	1,16
5,0	0,11	2,25	
7,5	0,06	0,86	
10,0	0,06	0,62	
25,0	0,44	1,66	
50,0	0,44	0,90	
75,0	0,85	1,17	
100,0	0,51	0,50	

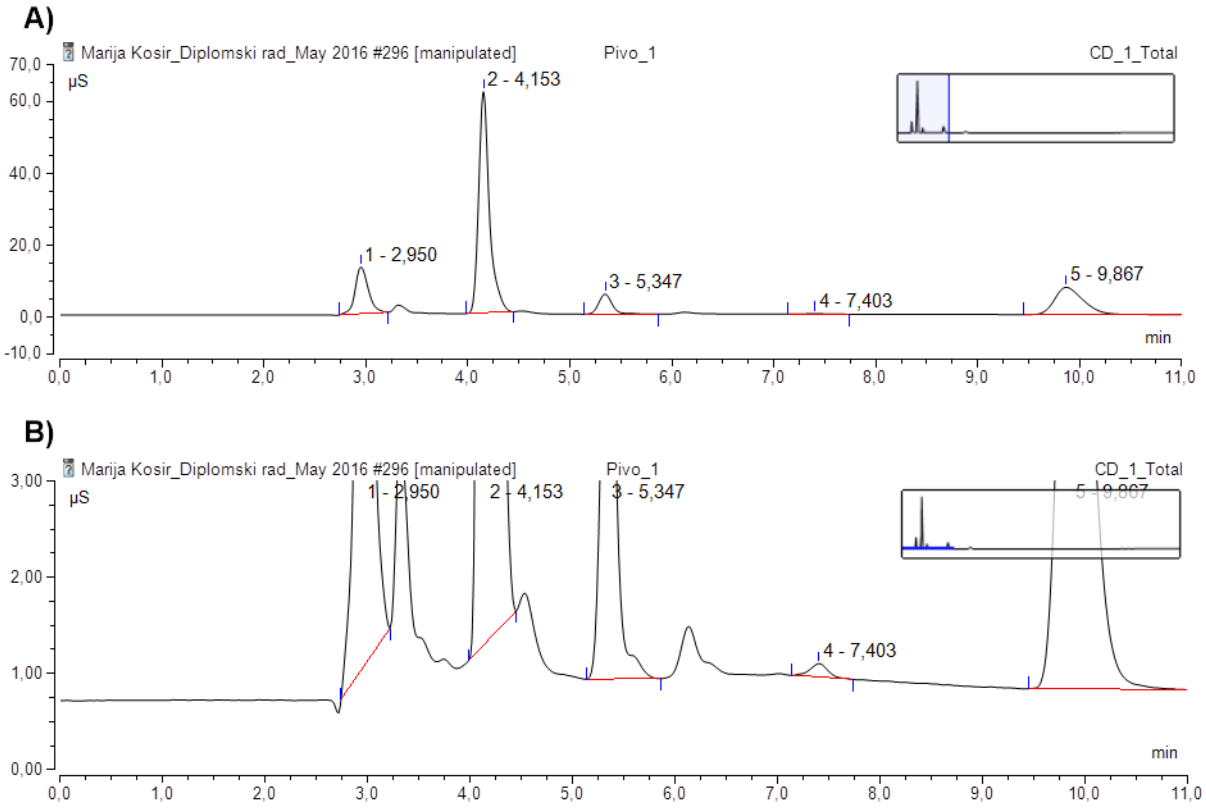
Iz rezultata se vidi kako se standardna devijacija povećava s porastom koncentracije glifosata, što se može tumačiti vjerojatnom razgradnjom dijela molekula glifosata. Naime udio razgrađenog glifosata trebao bi otprilike biti konstantan. Međutim, promatrano kvantitativno, pri visokim koncentracijama glifosata veće su apsolutne vrijednosti odstupanja signala uslijed razlaganja. Upravo stoga, kao pokazatelj preciznosti promatrala sam relativnu standardnu devijaciju. Pokazalo se da je *RSD* za svaku koncentracijsku razinu glifosata manji od 3 % što govori u prilog visoke preciznosti metode. Dodatnu potvrdu dala je ukupna srednja vrijednost *RSD* koja iznosi svega 1,16 %.

5.2 Analiza realnog uzorka

Razvijena metoda analize glifosata u ultračistoj vodi primijenjena je na realnom uzorku. Kao realni uzorak korišteno je komercijalno pivo (poglavlje 4.1) čiji je kromatogram prikazan na slici 17 A.

Na kromatogramu se vidi prisutnost velikog broja komponenti koje nismo mogli uočiti u čistoj vodenoj otopini glifosata pa možemo kazati da se u slučaju piva radi o kompleksnoj vodenoj matrici. Uvećanjem kromatograma u području bazne linije (slika 17 B) uočava se da

je bazna linija iznimno neravna, što je najvjerojatnije posljedica kompleksne pivske matrice. Također uočljivo je da na vremenu zadržavanja glifosata (prema analizi čiste vodene otopine 8,453 min) ne eluira nijedna komponenta. Međutim postoji osnovana sumnja da zbog kompleksnosti matrice glifosat eluira ranije te da njemu pripada pik na 7,403 minuta. Stoga je provedena nova kalibracija i to metodom standardnog dodatka.



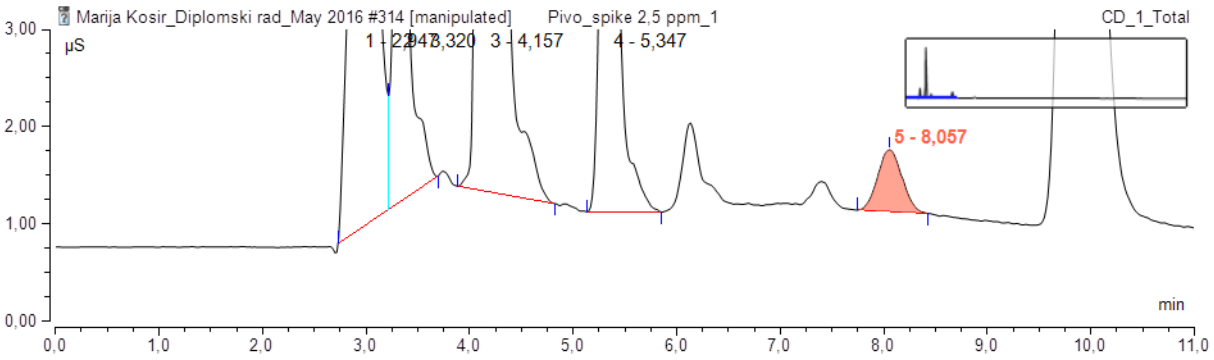
Slika 17. Kromatogram 10 puta razrijeđenog uzorka piva dobiven 1D-IC metodom prikazan: A) u potpunosti i B) uvećan u predjelu bazne linije.

5.3 Metoda standardnog dodatka pri 1D-IC analizi

Primjenom metode standardnog dodatka u uzorak piva dodavali smo poznate koncentracije glifosata. To je rezultiralo novim pikom na kromatogramu piva (slika 18).

Uočljivo je da pretpostavka o eluiranju glifosata u 7,403 minuti nije točna već se tada eluira neka druga, meni nepoznata komponenta. Glifosat eluira u 8,057 minuti, što je potvrdilo pretpostavku o snažnom utjecaju kompleksne pivske matrice na vrijeme zadržavanja glifosata.

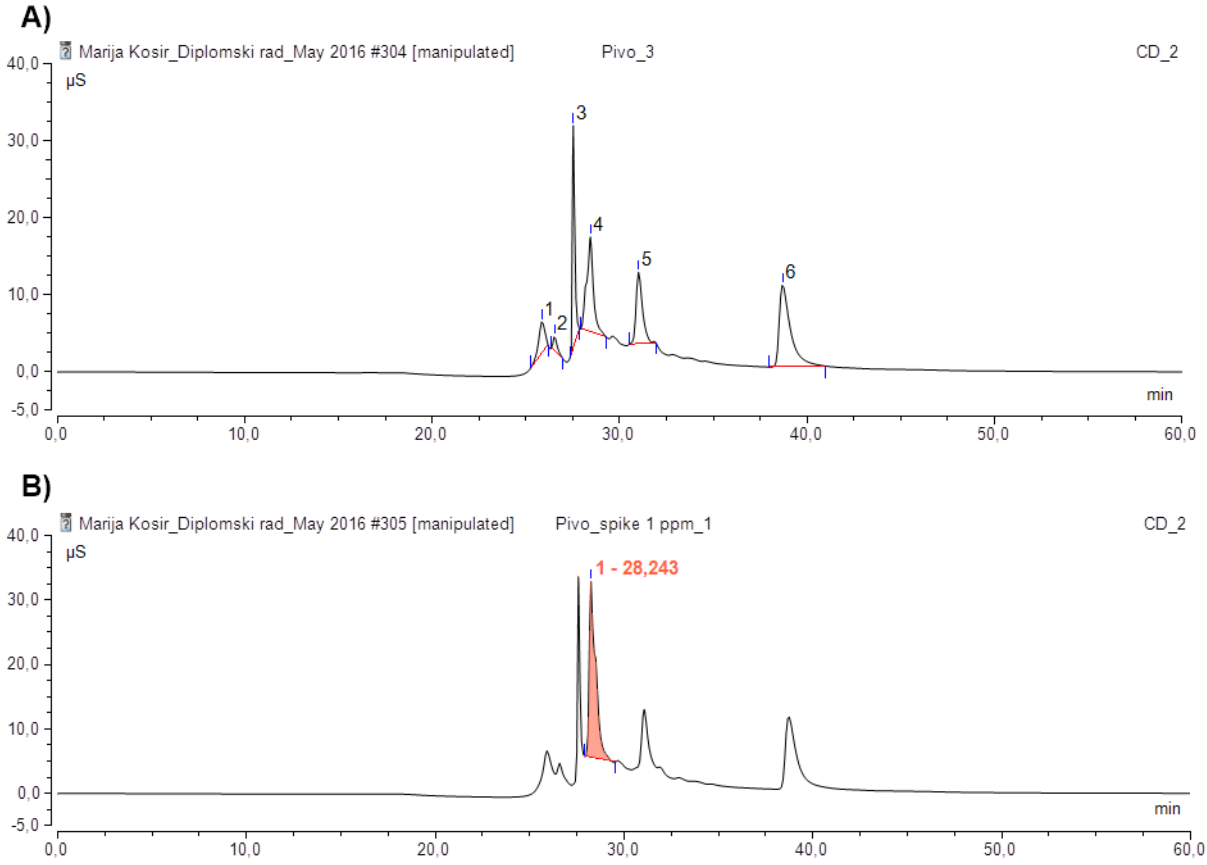
Budući da je prema pisanjima medija za očekivati bilo barem nekakvu koncentraciju glifosata, odlučila sam na uzorku piva primijeniti *heart-cutting* 2D-IC analizu. Time bi uklonili utjecaj glavnine pivske matrice, a ujedno na prvom sustavu (prvoj IC koloni) koncentrirali eventualno prisutni glifosat.



Slika 18. Kromatogram piva s poznatim dodatkom glifosata.
Pik glifosata označen je crvenom bojom.

5.4 Metoda standardnog dodatka pri 2D-IC analizi

Za potrebe *heart-cutting* 2D-IC analize, kao što je već prethodno rečeno, na prvom IC sustavu nakon 7. minute izdvajan je eluat u trajanju od 150 sekundi i injektiran u drugi (kapilarni) sustav. Na kapilarnom sustavu mogu se uočiti 6 intenzivnijih pikova (slika 19 A).

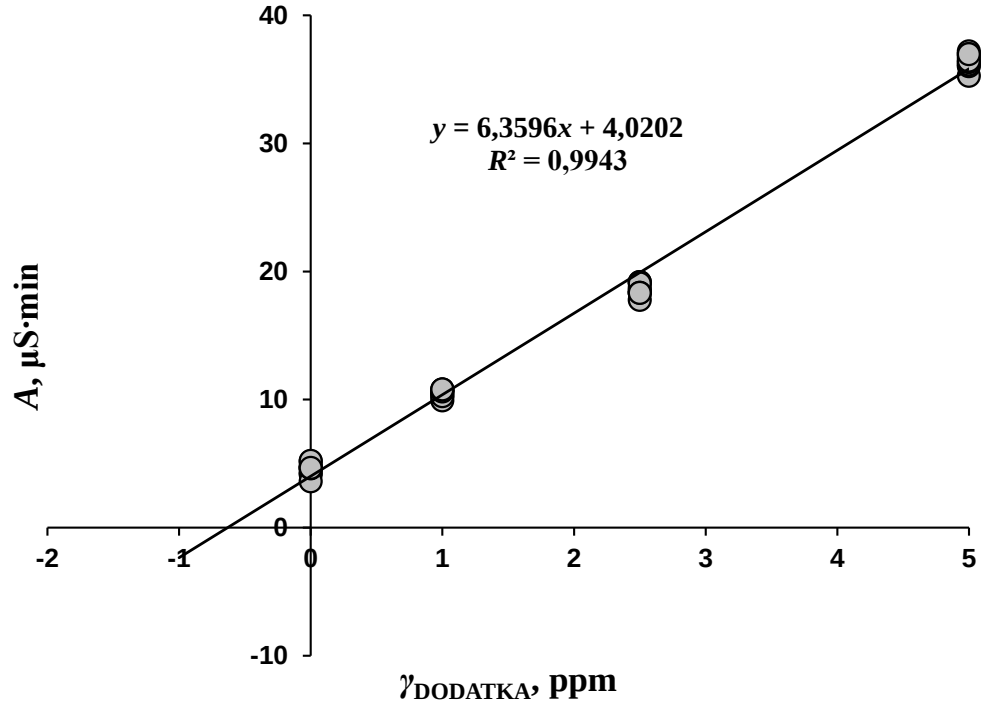


Slika 19. Analiza na kapilarnom IC sustavu; kromatogram izdvojenog segmenta uzorka: A) čistog piva i B) piva obogaćenog (eng. *spiked*) 1 ppm glifosata. Crvenim obojenjem prikazan je pik glifosata.

Bazna linija je i dalje neravna što ukazuje da je matrica još uvijek relativno kompleksan i možda krije neke manje koncentracije još uvijek nerazdvojenih komponenti. Upravo stoga, kalibracija metodom standardnog dodatka trebao bi biti dobar pristup određivanju koncentracije potencijalno prisutnog glifosata.

Tablica 6. Dobivene eksperimentalne vrijednosti površina, *A*, za dodana obogaćenja piva glifosatom, *γ*.

PRIPRAVA	*γ*, ppm	*A*, μS·min	*γ*, ppm	*A*, μS·min	*γ*, ppm	*A*, μS·min
1	1,0	10,525	2,5	18,334	5,0	35,277
		10,283		18,702		37,179
		9,929		19,168		36,959
2		10,772		19,174		36,023
		10,620		18,503		36,164
		10,258		19,054		36,714
3		10,627		17,775		36,340
		10,774		18,339		36,463
		10,795		18,318		36,968



Slika 20. Kalibracijski dijagram 2D ionske kromatografske analize glifosata u pivu. Prikazana je ovisnost površine kromatografskog pika, *A*, o koncentraciji standardnog dodatka, *γ*.

Dodatak poznatih koncentracija glifosata otopini piva doveo je do povećanja površine četvrtog kromatografskog pika (slika 19 B) potvrđujući da se izvorno u pivu ipak nalazi određena koncentracija herbicida glifosata. Dobivene eksperimentalne vrijednosti površina za pojedinu koncentraciju glifosata u pivu prikazane su u tablici 6.

Na slici 20 prikazan je kalibracijski dijagram 2D ionske kromatografske analize glifosata u pivu. Istim izračunom kao u prethodnom poglavlju (koristeći standardnu devijaciju odsječka pravca) dolazimo do vrijednosti za granicu detekciju i granicu kvantifikacije (tablica 7).

Tablica 7. Vrijednosti standardne devijacije odsječka, granice detekcije i granice kvantifikacije 2D-IC analizom glifosata u pivu.

GD, ppm	*GK*, ppm	s_b
0,12	0,37	0,234

Dobivene granice detekcije i kvantifikacije znatno su niže od onih koje su izračunate kod metode vanjskog standarda na 1D kromatografiji (tablica 3), što govori u prilog povećanja osjetljivosti metode uvođenjem dodatnog kromatografskog sustava. Ovo je vrlo vjerojatno direktna posljedica koncentriranja uzorka na prvom kromatografskom sustavu, ali i uklanjanja velikog dijela kompleksne pivske matrice.

Vrijednost koeficijenta determinacije, R^2, od 0,9943 (slika 20), kao i kod 1D metode, govori u prilog izražene linearnosti metode u odabranom rasponu koncentracija.

Analiza točnosti, ponovno je u MS Excel-u. Budući da sam radila metodom standardnog dodatka, koja direktno utječe na odsječak kalibracijske krivulje kod točnosti sam ispitivala isključivo postojanje proporcionalne sustavne pogreške. Dobiveni rezultati (tablica 8) ukazuju da s 95 %-tnom vjerojatnošću koeficijent nagiba kalibracijskog pravca nije bitno različit od 1, odnosno ne postoji proporcionalna sustavna pogreška.

Tablica 8. Analiza točnosti primijenjene 2D-IC metode.

	Koeficijenti	Donja granica intervala pouzdanosti 95,0 %	Gornja granica intervala pouzdanosti 95,0 %
Nagib	1,0000	0,9736	1,0264

Iako se na prvi pogled čini da i kod 2D-IC analiza imamo varijacije u odzivima, što bi možda bilo u skladu s nešto nižim vrijednostima koeficijenta determinacije, analiza preciznosti osporava takvo razmišljanje.

Tablica 9. Preciznost 2D-IC metode; *a* i *b* su koeficijenti pravaca $y = ax + b$ dobivenih *leave-one-out* pristupom, σ standardnu devijaciju, a *RSD* relativnu standardnu devijaciju.

a, μS·min ppm^{-1}	b, μS·min	γ, ppm	σ, ppm	*RSD* %
6,362	4,011	0,63	0,01	0,92
6,364	4,002	0,63		
6,352	4,047	0,64		
6,370	3,980	0,62		
6,374	3,966	0,62		
6,371	3,977	0,62		
6,380	3,942	0,62		
6,381	3,940	0,62		
6,371	3,977	0,62		
6,361	4,013	0,63		
6,359	4,025	0,63		
6,356	4,042	0,64		
6,363	4,001	0,63		
6,362	4,009	0,63		
6,359	4,026	0,63		
6,362	4,008	0,63		
6,363	4,001	0,63		
6,363	4,000	0,63		
6,364	4,055	0,64		
6,363	4,047	0,64		
6,362	4,037	0,63		
6,362	4,037	0,63		
6,364	4,052	0,64		
6,362	4,039	0,63		
6,366	4,068	0,64		
6,364	4,055	0,64		
6,364	4,056	0,64		
6,373	4,008	0,63		
6,326	4,050	0,64		
6,331	4,045	0,64		
6,355	4,025	0,63		
6,351	4,028	0,63		
6,337	4,040	0,64		
6,347	4,032	0,64		
6,344	4,034	0,64		

Preciznost smo u ovom slučaju računali na način da smo iz seta podataka za kalibraciju (tablica 6) izbacili po jednu vrijednost (*leave-one-out* pristup) i računali koncentraciju glifosata u pivu. Time smo dobili 35 vrijednosti koncentracija glifosata (tablica 9). Standardna devijacija pri tome iznosi 0,01 ppm, a relativna standardna devijacija svega 0,92 % što je iznimno zadovoljavajuća vrijednost.

5.5 Određivanje glifosata u pivskoj matrici

Nakon što je validacija pokazala da je razvijena 2D-IC metoda prikladna za analizu glifosata u pivu, iz jednadžbe pravca (slika 20) izračunata je koncentracija glifosata u uzorku piva u iznosu od 6,32 ppm. Dobivena vrijednost čak je 232 puta veća od maksimalne navedene vrijednosti prilikom nedavne afere s glifosatom u pivi[47].

Iako prema dostupnim podacima EU nema direktne klasifikacije rezidua glifosata u pivu, već samo u žitaricama i hmelju, čini se da je 6,32 mg/L piva ipak znatna vrijednost koncentracije herbicida.

Ipak, uzimajući u obzir da je prihvatljiv dnevni unos glifosata za odraslu osobu prema EU naputcima[47] 0,2-0,3 mg/kg tjelesne mase, to bi značilo da prosječna osoba od 80 kg smije dnevno konzumirati 2,5-3,8 litara piva, ukoliko ne konzumira ništa drugo što sadrži glifosat, što i nije tako mala vrijednost.

6 ZAKLJUČAK

U ovom radu proveden je razvoj IC metode analize glifosata u pivu. Pri tome su primijenjeni 1D i 2D IC sustavi.

Analizom uzorka piva 1D-IC kromatografijom dobiveni su kromatogrami piva na kojima nije bilo moguće detektirati pik glifosata. Rezultat je to vjerojatno niske koncentracije glifosata kao i iznimno kompleksne matrice u kojoj se nalazi.

Primjenom 2D-IC kromatografije ostvareno je uklanjanje dijela kompleksne matrice kao i koncentriranje glifosata na prvom kromatografskom sustavu, što je rezultiralo pikom glifosata kojeg je bilo moguće detektirati.

Na 2D-IC provedena je kalibracija metodom standardnog dodatka. Metoda je validirana te je određena granica detekcije od 0,12, odnosno granica kvantifikacije od 0,37 ppm. Analizom točnosti pokazalo se da ne postoji proporcionalna sustavna pogreška. Preciznost metode izražena je kroz relativnu standardnu devijaciju koja je iznosila svega 0,92 %.

Iz jednadžbe kalibracijskog pravca dobivenog metodom standardnog dodatka, određena je koncentracija glifosata u pivu u iznosu od 6,32 ppm što se čini zamjetno visokom razinom, osobito ako se uspoređuje vrijednostima navedenim u tiskovinama tijekom nedavne pivske afere[47].

7 LITERATURA

1. M. Rosković: Validacija u analitičkoj kemiji, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2014.
2. IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.* **74** (2002) 835.
3. L. S. Ettre, *Pure Appl. Chem.* **65** (1993) 819.
4. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina: Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
5. D. A. Skoog, S. R. Crouch, F. J. Holler: Principles of instrumental analysis, 6. izd., Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007.
6. P. C. Sadek: Illustrated pocket dictionary of chromatography, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2004.
7. M. Kaštelan-Macan: Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
8. H. Small: Ion Chromatography, Plenum Press, New York, 1989.
9. Š. Ukić: Matematički model za simuliranje odziva ionske kromatografske analize, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2009.
10. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch: Practical HPLC Method Development, 2. izd., Wiley, New York, 1997.
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Theoretical_plate (pristupljeno 20. travnja 2016.)
12. Š. Cerjan-Stefanović, *Kem. Ind.* **41** (1992) 227.
13. C. F. Poole, S. K. Poole: Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991.
14. R. Tijssen: The Mechanisms and Importance of Zone-Spreading, u E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (ur.): Handbook of HPLC, Vol. 78, Marcel Dekker, New York-Basel, 1998.
15. J. Weiss: Handbook of Ion Chromatography, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
16. M. Novak Stankov: Molekulsko modeliranje i umjetna inteligencija u razvoju ionskih kromatografskih metoda, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015.
17. L. R. Snyder, J. W. Dolan, D. C. Lommen, *J. Chromatogr. A* **485** (1989) 65.

18. J. W. Dolan, D. C. Lommen, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A* **485** (1989) 91.
19. D. T. Gjerde, J. S. Fritz, G. Schmuckler, *J. Chromatogr*. **186** (1979) 509.
20. H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman, *Anal. Chem*. **47** (1975) 1801.
21. R. M. Wheaton, W. C. Bauman, *Ind. Eng. Chem*. **45** (1953) 228.
22. R. D. Rocklin, C. A. Pohl: Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Liq. Chromatogr*. **6** (1983) 1577.
23. J. S. Fritz, D. T. Gjerde: Ion chromatography; *Wiley-VCH*: Weinheim, 2000.
24. C. F. Poole: The Essence of Chromatography, *Elsevier,* Amsterdam, 2003.
25. I. N. Bronshtein, K. A. Semendyayev, G. Musiol, H. Muehlig: Handbook of Mathematics, 5. izd., *Springer Verlag*, Berlin-Heidelberg, 2007.
26. B. L. Karger, L. R. Snyder, C. Horvath, An Introduction to Separation Science, *Wiley-Interscience*, New York, NY, **4** (1973) 560.
27. R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin, *Biochem. J.* **38** (1944) 224.
28. F. Erni, R. W. Frei, *J. Chromatogr*. **149** (1978) 561.
29. K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Chem*. **79** (2007) 3764.
30. J. P. Larmann, A. V. Lemmo, A. W. J. Moore, J. W. Jorgenson, *Electrophoresis* **14** (1993) 439.
31. G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem*. **69** (1997) 1518.
32. D. M. Lubman, M. T. Kachman, H. Wang *et al*., *J. Chromatogr.* B **782** (2002) 183.
33. S. Zheng, K. A. Schneider, T. J. Barder, D. M. Lubman, *BioTechniques* **35** (2003) 1202.
34. K. G. Mawuenyega, H. Kaji, Y. Yamauci *et al*., *J. Proteome Res*. **2** (2003) 23.
35. D. R. Stoll, J. D. Cohen, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* **1122** (2006) 123.
36. B. DeBorba, J. Rohrer, Application Note 168, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, SAD, 2013.
37. B. De Borba; J. Rohrer, C. A. Pohl, C. Saini, *J. Chromatogr. A.* **1085 (**2005) 23
38. H. P. Wagner, B. V. Pepich, C. Pohl, D. Later, R. Joyce, K.Srinivasan, D. Thomas, A. Woodruff, B. DeBorba, D. J. Munch, *J. Chromatogr. A* **1118** (2006) 85.
39. R. Mesnage, N. Defarge, J. Spiroux de Vendômois, G. E. Séralini, *Food Chem. Toxicol.* **84** (2015) 133.

40. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/legislation_en.htm (pristupljeno 10. lipnja 2016.)
41. United States Environmental Protection Agency, Pesticide Market Estimates Agriculture, Home and Garden, 2007. (www.epa.gov/pesticides, pristupljeno 10. lipnja 2016.)
42. P. Sprankle, W. F. Meggitt, D. Penner, *Weed Science*, **23** (1975) 224.
43. A. D. Baylis, *Pest Manag. Sci.* **56** (2000) 299.
44. J. M. Green, M. D. Owen, *J. Agric. Food Chem*., Washington, SAD, 2011.
45. J. Schuette: Environmental Fate of Glyphosate, 1998. (http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf, pristupljeno 1. srpnja 2016.)
46. www.efsa.europa.eu, European Food and Safety Authority (pristupljeno 10. lipnja 2016.)
47. http://www.hrvatski-fokus.hr/index.php/znanost/8084-glifosat-u-hrani-testiranje-hrane-na-rezidue-glifosata-provodi-se-vrlo-rijetko (pristupljeno 12. lipnja 2016.)
48. http://www.index.hr/vijesti/clanak/njemacka-piva-koja-se-prodaju-i-u-hrvatskoj-sadrze-pesticid-koji-je-mozda-kancerogen/877276.aspx (pristupljeno 14. lipnja 2016.)
49. http://www.umweltinstitut.org/suchergebnis.html (pristupljeno 14. lipnja 2016.)
50. http://naturalsociety.com/glyphosate-14-beer-brands-germany-63546/ (pristupljeno 14. lipnja 2016.)
51. http://www.vecernji.hr/hrvatska/u-njemackom-pivu-koje-se-prodaje-i-u-hrvatskoj-pronaden-pesticid-1063290 (pristupljeno 14. lipnja 2016.)
52. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-tabase/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN (pristupljeno 1. srpnja 2016.)
53. http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/LPTP/alacc_guide_2008.pdf, (pristupljeno 30. kolovoza 2014.)
54. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Hanbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, *Elsevier*, Amsterdam, 1997.
55. http://www.nata.com.au/ (pristupljeno 10. rujna 2014.)
56. L. Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, *Informa Healthcare*, New York, USA, 2007.

57. N. Cullum, B. Schuhn, Analysis of Glyphosate and AMPA in Drinking Water with the Agilent 1200 Infinity Series Online SPE Solution, Application Note, Agilent Technologies, 2013. (https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-3208EN.pdf, pristupljeno 5. srpnja 2016.)
58. C. Mallet, Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and AMPA in Tap and Surface Water Using Open-Architecture UPLC with 2D-LC Technology, Application note, Waters, 2014. (http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005169en.pdf, pristupljeno 5. srpnja 2016.)
59. http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_christensen_glyphosate.pdf (pristupljeno 5. srpnja 2016.)
60. Lj. Marek, W. C. Koskinen, *Pest. Manag. Sci.* **70** (2014) 1158. (doi: 10.1002/ps.3684)
61. V. Allegretti Živčić, T. Jednačak: Analitička kemija II, predavanje (https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/4_AK2_stat.pdf, pristupljeno 1. srpnja 2016.)

ŽIVOTOPIS

Marija Kosir (djevojački Rosković) rođena je 15. studenog 1992. u Našicama. Prvih pet razreda osnovne škole pohađala je u rodnom gradu, a zatim 2004. nastavlja školovanje u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, 2007. godine, upisuje XI. gimnaziju u Zagrebu (opća gimnazija). Studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2011. godine.

Nakon završene druge godine studija odradila je stručnu praksu u farmaceutskoj kompaniji Pliva Hrvatska d.o.o. (TAPI Istraživanje i razvoj, Odjel za analitiku, Analiza metala iz katalizatora).

Zvanje prvostupnice kemijskog inženjerstva stječe 2014. godine obranom završnog rada na temu „Validacija u analitičkoj kemiji“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Šime Ukića.

Iste godine, na matičnom fakultetu upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijsko procesno inženjerstvo.