# Ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja raspršenjem čaja kroz čvrstu fazu

**Blažek, Dijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:692987

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dijana Blažek

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dijana Blažek

# Ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja raspršenjem čaja kroz čvrstu fazu

DIPLOMSKI RAD

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

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

doc. dr. sc. Šime Ukić

doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, rujan 2015.

*Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za analitičku kemiju, akademske godine 2014./2015.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlovićna stručnoj pomoći i trudu koji mi je pružila pri izradi ovog rada, tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Tanji Ivančić i Slavici Kos na pruženoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada te Matei Dedić, mag. appl. chem. i Antoniji Periši, m. chem. eng. zaposlenima u Shimadzu d.o.o. Hrvatska na pomoći pri snimanju i očitavanju rezultata.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri i prijateljima, te svima koji su mi na bilo koji način pomogli i bili podrška kroz studij.*

# SAŽETAK


**Ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja raspršenjem**

**čaja kroz čvrstu fazu**

Čajevi predstavljaju vrlo osjetljivu poljoprivrednu kulturu, zbog toga što su osjetljivi na velik broj štetočina, osobito grinje, kukce koji se hrane listovima i gusjenice te na razne trave i bolesti. Kako bi se minimizirali ovi problemi, najjednostavniji način je korištenje velikog broja pesticida, odnosno tvari ili smjesa sa svrhom kontroliranja, uništavanja, sprječavanja i odbijanja bioloških organizama. Međutim, opasni ostaci pesticida u čaju povezuju se s poremećajima i bolestima živčanog sustava te je zbog toga određivanje njihovih ostataka ključno za utvrđivanje preventivnih mjera u javnom zdravstvu.

U ovom radu se za određivanje ostataka 13 različitih pesticida u čaju optimirala ekstrakcijska metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu. U svrhu određivanja optimalnih uvjeta spomenute ekstrakcije korišteni su različiti sorbensi (C18, osušene ljuskice jajeta, diatomejska zemlja i dr.) i različita otapala (čista otapala kao i različite kombinacije otapala) te čaj biljke trputac, organskog uzgoja, koji se sastoji od sluzi, iridoid glikozida i tanina. Iskoristivost ekstrakcije smjese 13 različitih pesticida određena je plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrijom masa. Utvrđeno je da je ekstrakcija najbolja pri sljedećim uvjetima: sorbens C18, otapalo za eluiranje heksan:aceton 8:2 te volumen otapala za eluiranje 5 mL.

Nakon optimizacije te validiranja prethodno razvijene metode određivanja pesticida, ona je primjenjena na realnim uzorcima čajeva (čaj lista breze, lista maline, čaj biljke priljepače, maćuhice, maslačka, djeteline, crvene djeteline te preslice) čije se biljke mogu pronaći na većini livada i polja.



**Ključne riječi:** *ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu, pesticidi, čaj, plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa*

# ABSTRACT

**Extraction of pesticides from teasamples by tea solid-phase dispersion**

Tea farming is vulnerable to a great multitude of pesticides, especially mites, leaf-eating beetles and caterpillars, and also to weeds and diseases. To minimise these problems, the most common practice in tea crop production is to use lots of pesticides, or substances and mixtures with the purpose of controlling, destroying, prevention and rejection of biological organisms. However, unsafe pesticide residues in tea have been associated with neurological dysfunction and disease. Consequently, determination of pesticide residues is at the forefront among preventive measures in public health safety.

In this study, to determine residues of 13 different pesticides in tea, extraction method by matrix solid-phase dispersion was optimized. To determine the optimal conditions for mentioned extraction method, different sorbents (C18, dried egg flakes, diatomaceous earth, etc.), different solvents (pure solvent and various mixture of solvents) and plantain tea plants, which was organically farmed, consists mucus, iridoid glycosides and tannins, was used. Efficiency of extraction mixture of 13 different pesticides was determined by gas chromatography tandem mass spectrometry. The best extraction was achieved in following conditions: C18 sorbent, eluting solvent of hexane:acetone 8:2 and the volume of the eluting solvent 5 mL.

After optimization and validation previously developed method for determination of pesticides, it was applied to real tea samples (tea birch leaf, raspberry leaf, tea plants catchweed, pansies, dandelions, clover, red clover and horsetails) which can be found on most grasslands and fields.



**Key words:** *matrix solid-phase dispersion, pesticides, tea, gas chromatography tandem mass spectrometry*

**SAŽETAK**

**ABSTRACT**

**1. UVOD.....1**

**2. TEORIJSKI DIO.....2**

**2.1. ČAJ.....2**

**2.1.1. Kemijski sastav i oksidacija.....2**

**2.1.2. Zdravstveni učinci.....3**

**2.2. PRIPREMA UZORKA.....3**

**2.2.1. Priprema tekućih uzoraka.....7**

***2.2.1.1. Ekstrakcija tekuće – tekuće (LLE).....7***

***2.2.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE).....7***

***2.2.1.3. Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME).....7***

**2.2.2. Priprema čvrstih uzoraka.....7**

***2.2.2.1. Ispiranje.....8***

***2.2.2.2. Soxhlet ekstrakcija.....8***

***2.2.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija (USE).....8***

***2.2.2.4. Mikrovalna ekstrakcija (MAE).....8***

***2.2.2.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE).....8***

***2.2.2.6. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD).....8***

**2.2.3. Ekstrakcija iz plinovitih uzoraka.....10**

**2.3. PESTICIDI.....10**

**2.3.1. Klasifikacija pesticida.....11**

***2.3.1.1. Klasifikacija obzirom na kemijska svojstva.....11***

**2.3.2. Pesticidi u okolišu.....15**

***2.3.2.1. Pesticidi u tlu.....15***

***2.3.2.2. Pesticidi u vodi i zraku.....16***

***2.3.2.3. Pesticidi u čajevima.....16***

**3. EKSPERIMENTALNI DIO.....18**

**3.1. MATERIJALI.....18**

**3.1.1. Čaj.....18**

**3.1.2. Sorbensi.....18**

**3.1.3. Kemikalije.....19**

**3.2. PESTICIDI.....20**

**3.2.1. Diklobenil.....20**

**3.2.2. Bifenil.....21**

**3.2.3. Klorprofam.....22**

**3.2.4. Heksaklorbenzen.....23**

**3.2.5. Dimetazon.....24**

**3.2.6. Lindan.....25**

**3.2.7. Vinklozolin.....26**

**3.2.8. Pirimifos-metil.....27**

**3.2.9. Metolaklor.....28**

**3.2.10. Ciprodinil.....29**

**3.2.11. Pirimifos etil.....30**

**3.2.12. p,p'-DDE.....31**

**3.2.13. Tetradifon.....32**

**3.3. INSTRUMENTI.....32**

**3.3.1. Analitička vaga.....32**

**3.3.2. Uređaj za ekstrakciju kroz čvrstu fazu.....33**

**3.3.3. Rotacijski uparivač.....33**

**3.3.4. Uređaj za plinsku kromatografiju vezan na spektrometriju masa.....34**

**3.4. METODA RADA.....35**

**3.4.1. Priprema standardnih otopina pesticida.....35**

**3.4.2. Postupak ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu.....35**

**3.4.3. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije GC-MS uređajem.....36**

**4. REZULTATI I RASPRAVA.....38**

**4.1. EKSTRAKCIJA PESTICIDA IZ UZORAKA ČAJA RASPRŠENJEM ČAJA KROZ ČVRSTU FAZU.....38**

**4.2. VALIDACIJA.....42**

**4.3. UTJECAJ MATICE.....46**

**4.4. ANALIZA REALNIH UZORAKA.....48**

**5. ZAKLJUČAK.....50**

**6. LITERATURA.....51**

**7. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....53**

**8. ŽIVOTOPIS.....54**

# *1. UVOD*

# 1. UVOD

Čaj je jedan od najpopularnijih napitaka na svijetu, a cijenjen je zbog svog specifičnog mirisa i okusa te zbog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Međutim, zbog učestalog tretmana čajeva velikim brojem pesticida nastaje potencijalni rizik za ljude koji ih konzumiraju te se povezuju s raznim bolestima živčanog sustava. Iz tog je razloga u prijašnjim godinama mnogo pažnje posvećeno istraživanju pesticida u čajevima.

Praćenje ostatka pesticida u čajevima postalo je važno zbog regularnih zahtjeva pojedinih članica EU i drugih zemalja koje uvoze čajeve. Metode analize ostataka pesticida su razvijene za analizu svježeg povrća, voća, vode, meda itd. Međutim, analiza ostataka pesticida u čajevima je vrlo složena jer čajevi sadrže složene komponente uključujući pigmente, alkaloide i polifenole koji izazivaju jak utjecaj matice odnosno nastaju smetnje u kvantifikaciji. [1]

U literaturi se mogu pronaći razne metode određivanja pesticida. Tradicionalne analitičke metode poput ekstrakcije otapalom pružaju zadovoljavajuće rezulate. Ekstrakcija čvrstom fazom s kolonicama punjenim silikagelom se često koristi za pročišćavanje, dok se za određivanje ostataka poljoprivrednih kemikalija, aditiva hrani za životinje te veterinarskih lijekova u hrani uglavnom primijenjuje japanska službena metoda. Ta metoda uključuje ekstrakciju čvrstom fazom u kojoj se koristi grafit ili silika gel za uklanjanje nečistoće u matici čaja. Osim ekstrakcije čvrstom fazom razvijene su i nove metode poput QuEChERS (eng. *quick easy cheap effective rugged and safe*).

Za kvalifikaciju i kvantifikaciju ostataka pesticida obično se primjenjuju plinska ili tekućinska kromatografija vezana na spektrometar masa (GC/MS ili LC/MS) koje omogućuju visoko osjetljivu analizu velikog broja pesticida jednim injektiranjem. [2]

Cilj ovog rada je razviti metodu kojom bi se određivali ostatci pesticida u čaju. Kao metoda korištena je ekstrakcija raspršenja matice čaja kroz čvrstu fazu, a optimirana je odabirom odgovarajućeg sorbensa i otapala za eluiranje. Optimirana metoda ekstrakcije se potom validira, odnosno određuje se linearno područje, granica detekcije i kvatifikacije te preciznost nove metode, koja je iskazana kao ponovljivost i obnovljivost. Određen je i utjecaj matice te se spomenuta metoda primijenila na realnim uzorcima. Svi rezultati su kvantificirani i kvalificirani GC/MS metodom.

# *2. TEORIJSKI DIO*

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. ČAJ

Kuhani čaj je najčešće konzumirani kuhani napitak u povijesti, što se pripisuje njegovom aromatičnom okusu i zdravstvenom učinku na ljudsko tijelo. [3] Iz biljke *Camellia sinensis* proizvode se sve vrste čajeva (Slika 2.1): bijeli, žuti, zeleni, oolong, crni i post-fermentirani. Svaki od tih čajeva ima jedinstvenu aromu, okus i izgled. [4]




**Slika 2.1.** Šest vrsta čajeva [5]

### 2.1.1. Kemijski sastav i oksidacija

Kemijski sastav je različit za svaku vrstu čaja, zbog kemijskih promjena koje nastaju tijekom procesa prerade lišća biljke. Drugačiji koraci u procesima prerade utječu na stupanj oksidacije i dovode do različitosti kemijskog sastava za svaku vrstu čaja. Također, na kemijski sastav može utjecati i okolina, vrijeme berbe, način održavanja te utjecaj pesticida i raznih bolesti. Čajevi sadrže mnoštvo različitih kemijskih tvari, a najvažnije od njih koje se odnose na okus, aromu i zdravstvene učinke su polifenoli, uglavnom flavonoidi. [4] Ostale tvari koje se nalaze u čajevima su vitamin P, alkaloidi, kofein, teofilin, teobromin, teanin, hlapljivi spojevi, fluoridi, minerali (aluminij i magnezij), elemenati u tragovima te mnogi drugi neidentificirani spojevi. [3]

Polifenoli u listovima biljke su stabilni samo kad se list nalazi na biljci. Proces oksidacije, izazvane oslobađanjem enzima polifenol oksidaze, započinje odmah nakon berbe

lišća. Oksidacijom iz polifenola nastaju teaflavin i tearubigin koji su antioksidansi. Zagrijavanjem tijekom procesa prerade može se zaustaviti oksidacija i enzimska aktivnost te se na taj način dobiva željeni okus i kemijski sastav čaja.

Zeleni, bijeli i žuti čajevi podliježu vrlo niskom stupnju oksidacije, pa je udio polifenola vrlo sličan onome u sviježim listovima, zbog čega kuhani čajevi imaju svijetlo žutu ili žuto-zelenu boju te blagi okus.

Crni čaj se dobiva na način da se lišće reže i gnječi kako bi se sokovi iz lišća, koji sadrže polifenole, i enzimi pomiješali. Na taj način se postiže potpuna oksidacija, zbog koje crni čajevi sadrže jako malo polifenola. Tearubigin, koji nastaje oksidacijom, crnom čaju daje izrazitu crveno-smeđu boju i jak okus.

Oolong čaj se podliježe poluoksidaciji. Tijekom procesa prerade se odvija kratka oksidacija, koja se prekida dovođenjem topline. Zbog toga oolong čajevi imaju složeniji okus od bijelog i zelenog čaja, ali ne toliko jak okus kao crni čaj.

Post-fermentirani čaj prolazi kroz period starenja od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. U tom periodu se odvija spora oksidacija i mikrobna fermentacija u kontroliranim uvjetima vlage i temperature. Na taj se način mijenja miris čaja te se dobiva trpak okus sličan crnom čaju. [4]

### 2.1.2. Zdravstveni učinci [3]

Čajevi se koriste diljem svijeta zbog svojih mnogobrojnih korisnih svojstava. Pokazuju antioksidativna svojstva, sadrže kelatirajuće željezo, djeluju antihiperglikemijsko i antidijabetično, inhibitori su tromboze, djeluju protuupalno, te štite kardiovaskularni sustav i slično. Napitci od čaja doprinose osvježenju i djeluju kao diuretik. Istovremeno pridonose osjećaju budnosti zbog male količine kofeina te djeluju opuštajuće zbog prisutnosti teanina.

## 2.2. PRIPREMA UZORKA [6]

Analiza uzoraka iz okoliša obuhvaća uzorkovanje, pripremu uzorka, odjeljivanje analita, detekciju i procjenu mjernih podataka na temelju kojih dobivamo informaciju o identifikaciji uzorka i njegovom kvantitativnom sastavu. Osnovni princip pripreme uzoraka je

prevesti realan uzorak u uzorak pogodan za analizu, pri čemu su neizbježne interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita i matice uzorka pa mogu utjecati na primijenjivost, djelotvornost i ponovljivost postupaka te pripremu uzorka. Stoga je prije pripreme uzorka potrebno odrediti njegovo početno fizikalno-kemijsko stanje.

Priprema uzorka mora biti usklađena s ciljem analize, uzimajući u obzir instrumente kojima će se mjeriti i stupanj željene točnosti. Pritom se nastoji:

- Povećati selektivnost metode uklanjanjem interferencija iz matice uzorka
- Povećati koncentraciju analita da bi se dostigla granica kvantifikacije metode
- Prevesti analit u oblik najpogodniji za odjeljivanje i određivanje
- Osigurati otpornost i ponovljivost metode kako bi bila neovisna o primjeni matičnog uzorka

Priprema tekućih i plinovitih uzoraka je relativno jednostavna jer se laboratorijski uzorak homogenizira miješanjem ili mućkanjem. Čvrsti uzorci nisu homogeni što zahtijeva puno individualniji i složeniji pristup pripremi uzorka, jer se oni prije otapanja moraju usitniti i homogenizirati. Postupci pripreme uzoraka se mogu podijeliti na one koji se temelje na fizikalnim procesima poput usitnjavanja, filtracije, destilacije, ekstrakcije, ionske izmjene te na one koji zahtjevaju kemijsku pretvorbu, poput derivatizacije. Moderne metode pripreme uzorka uglavnom se temelje na ekstrakciji.

Ekstrakcija je proces potpunog ili djelomičnog odvajanja smjese tvari na temelju različitih topljivosti u pojedinim otapalima. Efikasnost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala. Selektivnost je moguće povećati raspodjelom uzorka između dvaju nemješljivih tekućina u kojima analit i njegova matica imaju različitu topljivost. U idealnom slučaju postupak ekstrakcije trebao bi biti jednostavan, brz, jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati otopinu analita koja je dovoljno koncentrirana da se može izravno mjeriti bez potrebe za daljim koncentriranjem. Izbor metode ekstrakcije ovisi o strukturi, molekularnim masama, polarnosti, topljivosti i drugim svojstvima komponenti koje želimo izolirati ili razdvojiti. Željeni stupanj čistoće također se uzima u obzir. Tijekom ekstrakcije analita iz čvrstih uzoraka, analit mora difundirati s otapalom iz pora čvrstog uzorka, a ta difuzija ovisi o strukturi pora čvrstog uzorka i/ili o gradijentu električnog potencijala ukoliko se radi s ionskim otopinama čija je otopina električki nabijena. [7]

Za opisivanje razdiobe otopljene tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju, koriste se dvije osnovne veličine: *koeficijent* i *omjer razdiobe.*

**Koeficijent razdiobe** [8]

Koeficijent razdiobe je konstanta ravnoteže koja opisuje raspodjelu otopljene tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Na primjer, miješanjem vodene otopine u kojoj je otopljena organska tvar A s nekim organskim otapalom, dolazi do brzog uspostavljanja ravnoteže koja se može opisati jednadžbom:

$$\mathrm{A}(aq) \leftrightarrow \mathrm{A}(org) \tag{1}$$

Oznake *aq* i *org* predstavljaju vrste prisutne u vodenoj, odnosno organskoj fazi. Idealno je kada je omjer aktiviteta tvari, A, u obje faze stalan i neovisan o ukupnoj količini tvari A. To znači da pri bilo kojoj zadanoj temperaturi vrijedi:

$$K_d = \frac{A(org)}{A(aq)} \tag{2}$$

gdje je konstanta ravnoteže $K_\mathrm{d}$ koeficijent razdiobe. Izrazi u zagradama su isključivo aktiviteti tvari A u dva otapala. Često se umjesto aktiviteta mogu uvrstiti i molarne koncentracije. $K_\mathrm{d}$ je približno jednak omjeru topljivosti tvari A u dva otapala. Ako otopljena tvar postoji u različitim agregatnim stanjima u dva otapala, ravnoteža se može prikazati kao:

$$x\mathrm{A}_y(\mathrm{aq}) \leftrightarrow y\mathrm{A}_x(\mathrm{org}) \tag{3}$$

a koeficijent razdiobe dobiva oblik:

$$K_d = \frac{[A_x(org)]^y}{[A_y(org)]^x} \tag{4}$$

Kada se radi o raspodijeli analita između *n*-oktanola kao organskog otapala i vode, govori se o koeficijentu razdiobe oktanol/voda ($K_\mathrm{ov}$). Poznavanjem tog parametra može se procijeniti ponašanje zagađivala u okolišu.

**Omjer razdiobe** [8]

Omjer razdiobe, *D*, nekog analita definira se kao omjer koncentracija u dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Za jednostavne sustave (jednadžba 1), omjer razdiobe je istovjetan koeficijentu razdiobe. Međutim, u složenijim se sustavima dvije veličine mogu

znatno razlikovati. Na primjer, za raspodjelu kiseline HA između vode i dietil etera može se pisati:

$$D = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \tag{5}$$

gdje su $c_{org}$ i $c_{aq}$ molarne koncentracije HA u dvjema fazama. U vodenoj je sredini koncentracija kiseline jednaka zbroju ravnotežnih koncentracija slabe kiseline i njezine konjugirane baze:

$$c_{aq} = [HA(aq) + A^- (aq)] \tag{6}$$

U nepolarnom organskom sloju nema znatne disocijacije kiseline, te su analitička i ravnotežna koncentracija iste:

$$c_{org} = [HA(org)] \tag{7}$$

Uvrštavanjem jednadžbi 6 i 7 u izraz 5, dobiva se:

$$D = \frac{[HA\,(org)]}{[HA\,(aq) + A^-\,(aq)]} \tag{8}$$

U svrhu povezivanja veličina $K_d$ i $D$ za kemijske vrste HA, u tu se jednadžbu uvrštava izraz za konstantu disocijacije HA:

$$D = \frac{[HA\,(org)]}{[HA\,(aq)] + [HA\,(aq)]K_k/[H_3O^+(aq)]} \tag{9}$$

gdje je $K_k$ kiselinska konstanta disocijacije za HA. Izlučivanjem člana [HA(aq)] dobiva se:

$$D = \frac{[HA\,(org)]}{[HA\,(aq)]} * \frac{1}{1 + K_k/H_3O^+} \tag{10}$$

Uvrštavanjem $K_d$ za omjer ravnotežnih koncentracija HA i preuređivanjem dobije se izraz:

$$D = \frac{K_d[H_3O^+]}{K_k + [H_3O^+]} = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \tag{11}$$

Ta se jednadžba može primjeniti za izračunavanje dosega ekstrakcije HA iz puferskih vodenih otopina.

### 2.2.1. Priprema tekućih uzoraka

#### *2.2.1.1. Ekstrakcija tekuće – tekuće (LLE)*

Ekstrakcija tekuće – tekuće je jednostavan laboratorijski postupak odjeljivanja koji se provodi u lijevku za odjeljivanje. Otapala za ekstrakciju se biraju na temelju razlike topljivosti uzorka. Najčešće se koriste organska otapala kao što su razni eteri, halogeni ugljikovodici, alifatski alkoholi ili ketoni. [7] Klasična ekstrakcija tekuće – tekuće brza je i jednostavna metoda prikladna za automatizaciju. Glavni joj je nedostatak uporaba velikog obujma organskog otapala što poskupljuje odjeljivanje, šteti zdravlju i onečišćuje okoliš. [6]

#### *2.2.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)*

Ekstrakcija analita se ostvaruje njegovom raspodjelom između čvrste i tekuće faze. Afinitet prema čvrstoj fazi je puno veći nego prema matici uzorka, a vezani analiti desorbiraju se eluiranjem. [6] Selektivne nepokretne faze mogu zadržati otopljene tvari na temelju ionskih ili vodikovih veza, dipol – dipol, dipol - inducirni dipol ili disperzijskim silama. Najvažniji ciljevi ekstrakcije čvrstom fazom su koncentriranje analita, pročišćavanje ili pojednostavljivanje matice uzorka uklanjanjem neželjenih sastojaka te izmjenom otapala. Osnovne prednosti ekstrakcije čvrstom fazom su selektivnost i brzina, učinkovitost, ekonomičnost i sigurnost izvođenja. [7]

#### *2.2.1.3. Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME)*

Mikroekstrakcija čvrstom fazom je jedan oblik ekstrakcije čvrstom fazom. Koristi se za analizu hlapljivih i djelomično hlapljivih sastojaka. Koristi se mala količina sorbensa koji je u obliku vlakna, pa je metoda prikladnija za male količine analita. Glavna prednost ove metode je izuzetno mala potrošnja organskih otapala i selektivnost, jednostavnost, brzina i mogućnost povezivanja s plinskom i tekućinskom kromatografijom. [6]

### 2.2.2. Priprema čvrstih uzoraka

Oko 40% analitičkih uzoraka su krutine. Zbog ovako velikog udjela, čvrsti uzorci predstavljaju najveći izazov kod ekstrakcije, jer je potrebno nadjačati interakcije otapala i matice uzoraka, a potom otapalo mora difundirati kroz čvrsti uzorak. Iz tog razloga je razvoj metoda ekstrakcije iz čvrstih uzoraka usmjeren na rješavanje problema difuzije. [7]

#### *2.2.2.1. Ispiranje*

Ispiranje je jednostavan postupak namakanja uzorka u određenom ekstrakcijskom otapalu. Ova metoda ekstrakcije nije vrlo efikasna zbog pojave adsorpcije na uzorku i spore difuzije kroz čvrstu fazu. Efikasnost metode se može povećati zagrijavanjem, miješanjem ili smanjenjem veličine čestica. [7]

#### *2.2.2.2. Soxhlet ekstrakcija*

Soxhlet ekstrakcija ili klasična ekstrakcija iz čvrstih uzoraka je metoda koja se temelji na kontinuiranom uparavanju, kondenziranju i prolazu pogodnog otapala kroz uzorak. Postupak traje 6 do 48 sati te zahtijeva upotrebu znatne količine uzoraka te veliku količinu organskih otapala. Otapalo nakon ekstrakcije treba upariti radi koncentriranja analita. Kako bi se smanjili nedostaci metode, razvijen je automatiziran proces koji se naziva *Soxtec.* [6]

#### *2.2.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)*

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda u kojoj se primjenjuje energija ultrazvuka, pri čemu dolazi do zagrijavanja i povećanja tlaka. Pri frekvenciji ultrazvuka od 20 – 100 kHz dolazi do kavitacije, odnosno do nastajanja, rasta i naglog raspada mjehurića u tekućini. Metoda je brza i jednostavna, mogu se ekstrahirati relativno velike mase uzorka, ali je nedostatak što se njome postiže niža djelotvornost nego nekim drugim metodama pripreme uzoraka. [6]

#### *2.2.2.4. Mikrovalna ekstrakcija (MAE)*

Djelovanjem mikrovalnog zračenja na materijale sa stalnim dipolom, dolazi do zagrijavanja. U zatvorenim sustavima se mogu postići temperature koje su više od temperatura vrelišta u uvjetima atmosferskog tlaka te se na taj način smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije. Ovakvi sustavi se koriste kod polarnih otapala, dok se kod nepolarnih otapala ili otapala koja sadrže velik udio vode najčešće koriste otvoreni sustavi. [7]

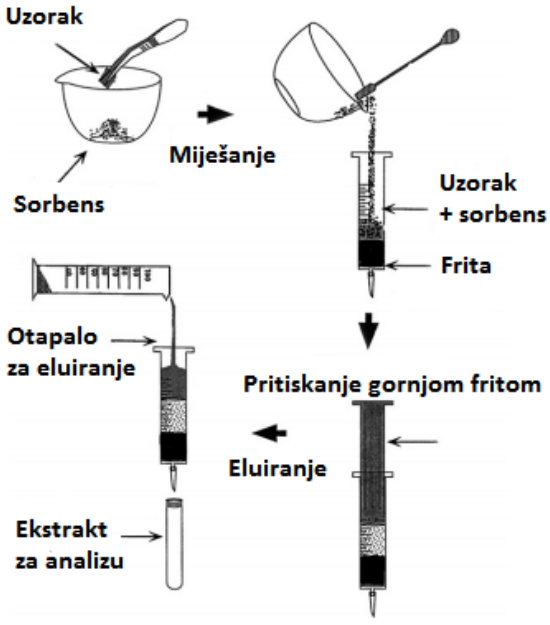
#### *2.2.2.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE)*

Za ovu metodu ekstrakcije se koriste superkritični fluidi kao što su $CO_2$, $N_2O$, $C_2H_6$, $NH_3$ i drugi, pri temperatruri i tlaku blizu ili iznad kritične točke. Superkritični fluidi imaju koeficijente difuzije i viskoznost poput plinova, a gustoću poput tekućine, odnosno pokazuju vrlo malu površinsku napetost. Korištenjem superkritičnih fluida mogu se smanjiti štetni učinci (npr. troškovi, zdravlje, problemi u okolišu) organskih otapala. [7]

### *2.2.2.6. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD)*

Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu je nova metoda ekstrakcije iz čvrstog uzorka i tehnika pročišćavanja uzoraka razvijena u svrhu analize uzoraka s pesticidima [9] te se pomoću nje mogu izolirati lijekovi i mnoga druga zagađivala iz tla, sedimenta, životinjskih tkiva, hrane, voća i voćnih sokova. Razvio ju je 1989. Baker s ciljem pojednostavljenja pripreme uzoraka s visokim udjelom masnoća. Prikladna je za viskozne, čvrste i za polučvrste uzorke. Temelji se na miješanju male količine (oko 0,5 g) ispitivanog uzorka s većom količinom čvrstog, abrazivnog materijalau keramičkom tarioniku (najčešći omjer masa 4:1 u korist čvrstog materijala). Nakon miješanja, uzorci se prebacuju u kolonicu i analiti se eluiraju s odgovarajućim otapalom (Slika 2.2). Potpunim miješanjem i raspršenjem uzorka preko abrazivnog materijala odnosno sorbensa, dolazi do velikog povećanja površine na kojoj se odvija ekstrakcija uzorka. Također, nečistoće se zadržavaju na sorbensu i na taj način dolazi do istovremene ekstrakcije i pročišćavanja uzorka, te se smanjuje vrijeme trajanja analize i količina potrebnog otapala. Navedeni materijali su, naravno, po sastavu isti onim sorbensima kojima su napunjene kolone za ekstrakciju čvrstom fazom. [10]

Najčešće korišteni sorbensi su reverzno-fazni materijali poput C8 ili C18-vezanog silikagela, zato što njihova lipofilna svojstva omogućavaju dobro raspršenje i zadržavanje lipofilnih vrsta. Osim navedenih, često se koriste i sorbensi poput florisila ili $Al_2O_3$. Izbor sorbensa se temelji na polarnosti analita i nečistoćama koje bi mogle biti ekstrahirane iz matice uzorka, te o prirodi otapala za eluiranje. [9]




**Slika 2.2.** Shematski prikaz raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu [10]

Kod MSPD metode dolazi do interakcija među molekulama kao što su razdvajanje u skupine, sorpcija i sparivanje iona. Zbog toga je ovo vrlo učinkovita metoda sorpcije i ekstrakcije. Na ovaj način moguće je eluirati frakcije koje sadrže neutralne lipide (heksan), fosfolipide (diklormetan), masne kiseline i sterole (acetonitril), te smjese fosfolipida, amino kiselina, inozitole, monosaharide, disaharide, nukleotide i proteine. [11]

MSPD ima nekoliko prednosti u usporedbi s tradicionalnim metodama ekstrakcije, kao što su pojednostavljeno i brže tretiranje uzorka, smanjena količina toksičnih otapala, eliminirano formiranje emulzija i povećana selektivnost i osjetljivost. Ekstrakcija i pročišćavanje uzorka se odvijaju u istom koraku uz korištenje malih količina sorbensa i otapala te se na taj način smanjuju troškovi i vrijeme trajanja analize. [9] Gledajući pripremljene kolonice i postupak koji slijedi nakon toga, MSPD podsjeća na ekstrakciju čvrstom fazom, ali primijenjenu na čvrste uzorke.

### 2.2.3. Ekstrakcija iz plinovitih uzoraka

Pri ekstrakciji hlapljivih uzoraka, često ih je potrebno prevesti iz čvrste faze u plinovitu i potom ih uhvatiti. Kod statičkih metoda moguće je lako uloviti hlapljive komponente iznad uzorka (najčešće nakon zagrijavanja). Dinamičke metode se zasnivaju na pročišćavanju i hvatanju uzoraka. Uzorci se kontinuirano pročišćavaju inertnim plinom, a hlapljive komponente se hvataju na čvrstu podlogu. [7]

## 2.3. PESTICIDI

Pesticidi su tvari ili smjese sa svrhom kontroliranja, uništavanja, sprječavanja i odbijanja bioloških organizama koji se smatraju štetnima za rast određenih kultura. Člankonošci imaju direktan utjecaj na zdravlje ljudi i vegetaciju, osobito na trave. Također, dijeluju na kralježnjake, osobito glodavce. Insekticidi se koriste za kontrolu insekata, za kontrolu vegetacije koriste se herbicidi, a za kontrolu glodavaca se koriste rodenticidi. Antropodi se koriste za organizme koji uzrokuju infektivne bolesti ljudi i životinja. [12]

### 2.3.1. Klasifikacija pesticida [12]

Pesticidi se mogu klasificirati na nekoliko načina: obzirom na njihova kemijska svojstva, način na koji funkcioniraju ili obzirom na vrstu organizama koju napadaju.

#### *2.3.1.1. Klasifikacija obzirom na kemijska svojstva* [12]

Obzirom na kemijska svojstva, pesticidi se dijele na *organske* i *anorganske*. *Organski pesticidi* se sastoje od tvari koje u bazi molekulske strukture sadrže ugljik. Tvari u organskim pesticidima su znatno kompleksnije od anorganskih pesticida i najčešće nisu topljive u vodi. *Anorganski pesticidi* su jednostavnije komponente koje imaju kristalične strukture, poput soli, stabilne su u okolišu i lako se otapaju u vodi. Prvi pesticidi su bili anorganski, a sadržavali su tvari poput sumpora i vapna. Velika većina modernih pesticida sastoji se od organskih tvari s kisikom, fosforom ili sumporom povezanim na strukture ugljika.

Organski pesticidi se mogu podijeliti u dvije grupe: prirodni i sintetski organski pesticidi. *Prirodni organski pesticidi* su proizvedeni iz prirodnih tvari poput biljaka, npr. rotenon i buhač. *Sintetski organski pesticidi* su proizvedeni umjetnim putem, odnosno kemijskom sintezom. Ova skupina obuhvaća većinu modernih pesticida, ali uključuje i DDT, permetrin, malation, glifosat te mnoge druge.

### *A. Insekticidi [14]*

Insekticidi služe za kontrolu insekata, a akaricidi za kontrolu krpelja i grinja. U javnom zdravstvu se najčešće koriste protiv komaraca, muha, krpelja, grinja, uši i buha. Ove dvije skupine najčešće predstavljaju isti pesticidi.

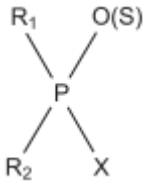
Po kemijskom sastavu mogu biti:

- **Klorirani insekticidi**

  Jedna od prvih sintetiziranih skupina pesticida, od kojih je najpoznatiji DDT. Zbog stabilnosti strukture kloriranoga prstena, svi su izrazito stabilniu okolišu, iz čega proizlazi mogućnost ugradnje u hranidbeni lanac i unosa u ljudski organizam. Prema kemijskoj strukturi, to su derivati aromatskih, odnosno alicikličkih ugljikovodika.

- **Organofosforni insekticidi**

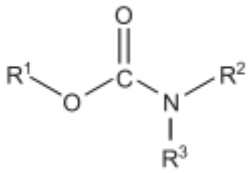
Organofosforni insekticidi su esteri fosforne ili tiofosforne kiseline opće formule:




Radikali $R_1$ i $R_2$ mogu biti alkilna, arilna, aloksilna ili amidna grupa, a X je halid, cijanid, tiocijanid, fosfat, karboksilat ili neki drugi radikal. Komercijalno gledano, možemo reći da postoje 3 glavne grupe organofosfornih pesticida: fosfati (bez sumpornog atoma), fosforotioati (s 1 sumpornim atomom) i fosforoditioati (s 2 sumporna atoma).

- **Karbamati**

Po kemijskoj građi, karbamati su esteri N-alkil i N,N-dialkilkarbaminskih kiselina:




Spojevi kojima je $R_1$ supstituirani benzen, naftalen ili neki drugi ciklički ili alifatski supstituent, $R_2$ vodik, a $R_3$ metilna skupina (monometilkarbamati) uglavnom se koriste kao insekticidi. Karbamati koji na molekuli nose jedan atom sumpora (tiokarbamati) većinom su herbicidi, a ako imaju dva atoma sumpora i $R_1$ je metal (cink, mangan) onda su fungicidi. Insekticidni karbamati koriste se pretežno u biljnoj zaštiti kao insekticidi, larvicidi i nematocidi te protiv štetočina u domaćinstvu, za zaštitu uskladištenih proizvoda, u veterinarstvu kao ektoparaziticidi, u humanoj medicini i javnoj higijeni.

- **Piretrini i sintetski piretroidi**

Piretrini su insekticidne tvari u sastavu cvjetova biljke *Chrysanthemum cinerariaefolium Visiani*- buhač i *Chrysanthemum cocineum*. Divlji buhač raste samo u Dalmaciji i u

primorskim dijelovima Hercegovine i Crne Gore, odakle je, zbog uzgoja, prenesen na druge kontinente. Ekstrakcijom iz cvijeta biljke izolirano je šest insekticidno aktivnih spojeva, od kojih su najaktivniji piretrini. Piretrini se, zahvaljujući niskoj otrovnosti i visokoj proizvodnoj cijeni, upotrebljavaju kao ektoparaziticidi na ljudima i domaćim životinjama u borbi protiv buha, stjenica i sl. te u zaštiti hrane od insekata.



**Slika 2.3.** Divlji buhač [13]

Sintetski piretroidi su analozi i derivati piretrina, kojih ima više od 1000. Stabilniji su od piretrina pa u zaštiti bilja uspješno zamjenjuju klorirane insekticide, organofosfate i karbamate. Piretroidi se uglavnom koriste u zaštiti sobnog i vrtnog bilja, upotrebljavaju se u borbi protiv komaraca u insekticidnim sprejevima, tabletama, isparivačima, krevetnim mrežama, a česti su i ektoparaziticidi za domaće životinje.

### *B. Fungicidi [14]*

Fungicidi čine veliku obitelj najrazličitijih spojeva, koji se koriste protiv gljivičnih nametnika. Koliko su gljivična oboljenja značajna u prehrani stanovništva, govore razne povijesne epizode, poput Peronospore koja je stigla u Europu iz Amerike 1874. i u našim se krajevima pojavila već 1882. Peronospora je u krajevima gdje su ljudi ovisili o proizvodnji vina dovela do sloma gospodarstva i do velikoga vala iseljavanja u prekomorske zemlje. Prvo fungicidno sredstvo, bordošku juhu (mješavina bakrenoga sulfata i vapna), primijenio je Francuz Millardet 1882. upravo za zaštitu vinove loze, a kasnije se pokazala učinkovita i protiv krumpirove plamenjače.

- **Benzimidazoli**

U benzimidazole ubrajamo neke vrlo česte i poznate fungicide, poput benomila, karbendazima i tiabendazola. Pripadaju sistemičnim fungicidima, s protektivnim i

kurativnim djelovanjem, djeluju na veliki broj fitopatogenih gljiva i imaju visok rizik za razvoj rezistentnosti. Benzimidazoli najviše se koriste za tretiranje sjemena, ali i za zaštitu plodova nakon berbe.

- **Ditiokarbamati**

Ditiokarbamati su se kao prvi organski fungicidi pojavili tijekom 1930., kao zamjena za skuplje bakrene preparate. Prema kemijskoj strukturi, to su kelati karbaminskih kiselina s metalima (cink, mangan, željezo). Koriste se intenzivno protiv gljivičnih oboljenja voćaka, vinove loze, žitarica, uljarica, duhana.

### *C. Herbicidi [14]*

Herbicidi su tvari koje se koriste za suzbijanje i uništavanje nepoželjnih biljnih vrsta zbog zaštite s nekom namjerom uzgajanoga bilja. Suzbijanje korova staro je koliko i sam uzgoj biljaka i opet, unatoč tome, gubici prouzročeni infestacijom mogu biti vrlo visoki (20 – 40%). Suzbijanje korova predstavlja glavni trošak pri proizvodnji hrane. Smanjenje prinosa izazivaju i neposredni štetni kemijski učinci korova i kompeticija s korisnim biljkama za vodu iz tla, hranjive tvari i svjetlo.

- **Triazini**

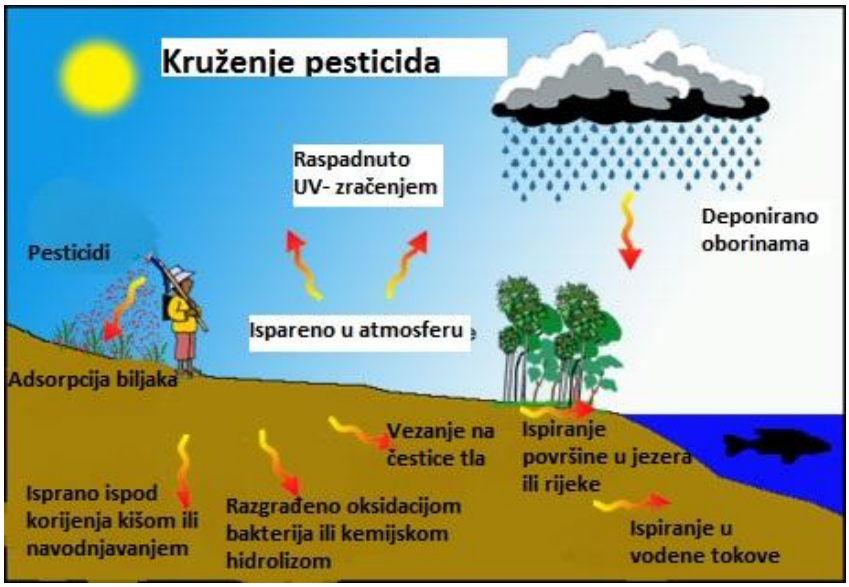
U svijetu je registrirano oko 15 triazinskih spojeva herbicidnoga karaktera. Najpoznatiji su: atrazin, simazin, ametrin, aziprotin, cianazin i terbutrin. Triazini su selektivni herbicidi, međutim, u većim dozama mogu djelovati kao totalni neselektivni herbicidi. Triazini se upotrebljavaju za suzbijanje širokolisnih i uskolisnih korova pri proizvodnji kukuruza, suncokreta, pamuka, soje i raznoga povrća.

- **Fenoksi karbonske kiseline**

Fenoksi karboksilne kiseline u formulacijama se uglavnom pojavljuju u obliku soli (amino soli, natrijeve soli) ili estera (izopropil ester), zbog jednostavnijeg rukovanja. Derivati fenoksikarbonskih kiselina jeftina su i, bez obzira na dugogodišnju uporabu, još uvijek značajna skupina herbicida, učinkovita u suzbijanju jednogodišnjih i višegodišnjih širokolisnih korova.

### 2.3.2. Pesticidi u okolišu

Pesticidi se koriste kako bi se zaštitile poljoprivredne kulture od nametnika. Međutim, velik broj pesticida ne utječe samo na željene štetočine, nego ima velik utjecaj i na ostale biljke i životinje. Učestalim tretiranjem kultura pesticidima, dolazi se do lokalnog uništavanja biološke raznolikosti. Također, većina pesticida nije biološki razgradiva, nego se zadržavaju u tlu te nakon oborina prodiru u podzemne i površinske vode. Ovisno o njihovim kemijskim svojstvima, mogu se bioakumulirati u životinjskim organizmima koji se koriste za prehranu ljudi te na taj način direktno ugroziti naše zdravlje. [15]




**Slika 2.4.** Kruženje pesticida u okolišu [16]

#### *2.3.2.1. Pesticidi u tlu [15]*

Velik dio pesticida koji se koriste za agrokulture i slične svrhe, akumuliraju se u tlu. Sastav tla ili mikro-flora utječu na sudbinu pesticida, odnosno određuju hoće li doći do razgradnje, transporta ili do procesa adsorpcije odnosno desorpcije. Razgrađeni pesticidi stupaju u interakciju s tlom i autohtonim mikroorganizmima te dolazi do promjene mikrobne raznolikosti, biokemijskih reakcija i enzimatske aktivnosti. Svaka promjena u aktivnosti mikroorganizama koji se nalaze u tlu izazvana korištenjem pesticida dovodi do poremećaja u ekosustavu i gubitka plodnosti tla. Također, korištenje pesticida utječe na rast, kolonizaciju i metaboličke aktivnosti korisnih mikroba poput bakterija, gljivica i algi u tlu.

Također, pesticidi mogu negativno utjecati na vitalne biokemijske reakcije u tlu kao što su fiksiranje dušika, nitrifikacija ili amonifikacija, na način da aktiviraju ili deaktiviraju specifične mikroorganizme ili enzime. Interakcije između pesticida, mikroorganizama i svojstava tla uvelike se povećavaju ili smanjuju brzine biokemijskih reakcija te na taj način dolazi do velikih promjena u tlu.

Pesticidi koji ulaze u tlo mogu ometati lokalni metabolizam ili negativno utjecati na enzimatsku aktivnost tla. Tla imaju enzimatske bazene koji sadrže slobodne enzime, imobilizirane ekstracelularne enzime i enzime koje izlučuju mikroorganizmi koji su indikatori biološke ravnoteže koja uključuje kvalitetu i plodnost tla. Razgradnja pesticida i prirodnih tvari u tlu katalizirana je enzimatskim bazenom, a mjerenjem promjene enzimatske aktivnosti moguće je odrediti degradacije tla.

#### *2.3.2.2. Pesticidi u vodi i zraku [15]*

Ostaci pesticida u vodi predstavljaju ozbiljnu prijetnju za biološke zajednice, uključujući i ljude. Postoje različiti načini dospijevanja pesticida u vodu, kao što su slučajno izlijevanje, industrijske otpadne vode, ispiranje pesticida s tretiranog tla te njihovo prodiranje u podzemne vode, pranje opreme za špricanje u ribnjacima, potocima i riječnim vodama i slično. Pesticidi se najčešće kreću s polja do raznih vodospremnika otjecanjem do kojeg dolazi zbog oborina ili navodnjavanja.

Na sličan način, prisutnost pesticida u zraku može biti uzrokovana zaprašivanjem ili hlapljenjem iz obrađenih površina. Brzina hlapljenja ovisi o površini na koju padaju pesticidi, temperaturi, vlazi, brzini vjetra i tlaku pare sastojaka. Hlapljiva ili poluhlapljiva priroda pesticida predstavlja veliku opasnost za onečišćenje atmosfere velikih gradova. Na primjer, u talijanskim šumama je neselektivno korištenje pesticida i njihovih aktivnih metabolita dovelo do zagađenja vodenih sustava i zraka, što utječe na zdravlje riba, vodozemaca i ptica.

#### *2.3.2.3. Pesticidi u čajevima [2]*

Čajevi predstavljaju vrlo osjetljivu poljoprivrednu kulturu, zbog toga što su osjetljivi na velik broj štetočina, osobito grinje, kukce koji se hrane listovima i gusjenice. Također mogu biti osjetljivi na trave i bolesti. Kako bi se minimizirali ovi problemi, najjednostavniji način je korištenje velikog broja pesticida. Međutim, slično kao i kod drugih sirovih agrokultura, opasni ostaci pesticida u čaju povezuju se s neurološkim poremećajima i bolestima. Zbog toga je određivanje ostataka pesticida ključno za utvrđivanje preventivnih

mjera u javnom zdravstvu. Također, postoje i neke internacionalne barijere u prodaji čajeva koje su nastale zbog različitog zakonodavstva što se tiče maksimalnodopuštenih koncentracija ostataka pesticida. Postojeće maksimalno dopuštene koncentracije pesticida se s vremenom mijenjaju i postaju strože i sveobuhvatnije kako bi se smanjio potencijalni rizik na zdravlje ljudi.

# *3. EKSPERIMENTALNI DIO*

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. Čaj

U ovom radu se za određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije, validacijuukupne metodete utjecaj matice uzorka na rezultate koristio čaj biljke trputac organskog uzgoja. Trputac se sastoji od sluzi, iridoid glikozida (osobito aucubina) i tanina. Zbog ovih komponenata trputac ima blago protuupalno i antimikrobno djelovanje te olakšava iskašljavanje.

Razvijena i validirana metoda primijenjena je na realnim uzorcima čajeva i to na čaju listova breze (LB) i maline (LM), čaju priljepače (PRI), preslice (PRES), maćuhice (M), maslačka (MAS) te na čaju listova obične (D) i crvene djeteline (DC). Neki od čajeva su bili uzorkovani na različitim lokacijama i u različito vrijeme poput obične djeteline (D1, D2, D3 i D4), crvene djeteline (DC1 i DC2) i maćuhice (M1 i M2). Sve navedene biljke se mogu pronaći na većini livada i polja.

### 3.1.2. Sorbensi

U ovome radu korišteno je više različitih sorbensa kako bi se ispitao njihov učinak na učinkovitost ekstrakcije. Korišteni sorbensi su C18, ljuske kokošjeg jajeta, ljuske kokošjeg jajeta aktivirane na 160 °C, Strata-X, HLB Oasis, dijatomejska zemlja, natrijev sulfat i silikagel. Također, korištene su razne kombinacije navedenih sorbensa.

C18 je kemijski modificirani silikagel, koji ima lipofilna svojstva koja omogućuju dobro raspršenje i zadržavanje lipofilnih vrsta. [9]

Ljuske kokošjeg jajeta sastoje se od kalcijeva karbonata (94%), magnezijeva karbonata (1%), kalcijeva fosfata (1%) i organske tvari (4%). Celulozne su strukture i uključuju amino kiseline. [17]

Strata-X je funkcionalan polimerni sorbens koja sadrži N-vinilpirolidone, te omogućuje više načina zadržavanja kako bi se postigle jačeinterakcije analita i sorbensa.

Oasis HLB je jako hidrofilni polimer, sklon kvašenju u vodi, te ima jedinstvenu hidrofilno-lipofilnu ravnotežu. Idealan je za kisele, bazične i neutralne analite.

Dijatomejska zemlja je sitni pijesak koji se dobiva od silikatne sedimentne stijene nastale taloženjem ostataka dijatomeja, odnosno algi kremenjašica. Ima veliku moć adsorpcije, te se koristi za filtriranje vode, ulja i raznih kemikalija, te kao insekticid.

Silikagel je adsorbens koji se sastoji od polisilicijskih kiselina i ima slabo kisela svojstva. Može se koristiti za odvajanje analita od onečišćujućih spojeva različitih kemijskih polariteta.

### 3.1.3. Kemikalije

**Tablica 3.1.** Popis korištenih kemikalija

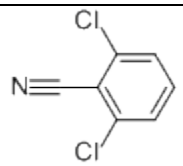
| **Naziv** | **Čistoća** | **Proizvođač** |
|---|---|---|
| Metanol(MeOH) | (Ultra)Gradient HPLC Grade | J. T. Baker, Nizozemska |
| Etanol(EtOH) | *p.a.* | Kefo, Ljubljana |
| Acetonitril(ACN) | HPLC grade | Fisher Chemical, SAD |
| Aceton(ACO) | *p.a.* | Gram – mol, Zagreb |
| Etil-acetat(EA) | *p.a.* | Kemika, Zagreb |
| Diklormetan(DKM) | *p.a.* | Kemika, Zagreb |
| Heksan(HEX) | *p.a.* | Sigma – Aldrich |
| Toluen(T) | *p.a.* | Kemika, Zagreb |
| Dietileter(DEE) | *p.a.* | Kemika, Zagreb |
| Petroleter(PE) | *p.a.* | Gram – mol, Zagreb |
| 2 – propanol (2-PrOH) | HPLC grade | Kemika, Zagreb |

## 3.2. PESTICIDI [18-21]

### 3.2.1. Diklobenil

Diklobenil je herbicid koji se u velikoj mjeri koristi za godišnje i višegodišnje suzbijanje korova. Njegova uporaba je zabranjena u cijeloj EU. Ima nisku topljivost i potencijal dopiranja u podzemne vode. Umjereno je otporan u tlu i vodi, te je umjereno toksičan za sisavace, vodene organizame, pčele i gujavice.

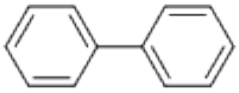
**Tablica 3.2.** Svojstva diklobenila

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Diklobenil, Silbenil |
| CAS broj | 1194-65-6 |
| Molekulska formula | $C_7H_3Cl_2N$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 2,6-Diklorobenzonitril |
| Svojstva | bijeli prah |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 172,0 |
| Temperatura tališta, °C | 143-146 |
| Stabilnost | nije zapaljiv, netopiv u vodi |
| log$K_{oc}$ | 2,83 |
| log$K_{ov}$ | 2,83 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.2. Bifenil

Bifenil je aromatski fungicid koji se najčešće koristi za agrume.

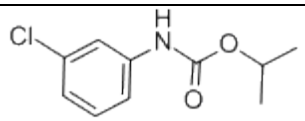
**Tablica 3.3.** Svojstva bifenila

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Bifenil |
| CAS broj | 92-52-4 |
| Molekulska formula | $C_{12}H_{10}$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 1,1-bifenil |
| Svojstva | bijeli kristali |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 154,2 |
| Temperatura tališta, °C | 68-70 |
| Stabilnost | stabilan, zapaljiv, nereaktivan s jakim oksidansima |
| log$K_{oc}$ | 3,48 |
| log$K_{ov}$ | 3,76 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.3. Klorprofam

Klorprofam je herbicid i koristi se za suzbijanje klijanja krumpira. Odobrenje za korištenje ima od strane EU. Umjereno je mobilan i topljiv u vodi. Klorprofam je blago toksičan za sisavce, ali se bioakumulira i djeluje nadražujuće. Umjereno je toksičan za ptice, pčele i većinu vodenih organizama.

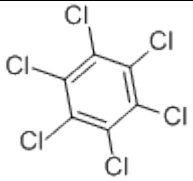
**Tablica 3.4.** Svojstva klorprofama

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Klorprofam |
| CAS broj | 101-21-3 |
| Molekulska formula | $C_{10}H_{12}ClNO_2$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | Izopropil 3-klorokarbanilat |
| Svojstva | smeđa, zrnasta krutina |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 213,7 |
| Temperatura tališta, °C | 41 |
| Stabilnost | stabilan, nereaktivan s jakim kiselinama, lužinama i oksidansima |
| log$K_{oc}$ | 2,76 |
| log$K_{ov}$ | 3,30 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.4. Heksaklorbenzen

Heksaklorbenzen je fungicid kojim se tretira sjeme pšeničnih kultura.

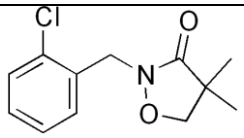
**Tablica 3.5.** Svojstva heksaklorbenzena

| Generičko ime | Heksaklorbenzen |
|---|---|
| CAS broj | 118-74-1 |
| Molekulska formula | $C_6Cl_6$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 1,2,3,4,5,6-heksaklorobenzen |
| Svojstva | bijeli prah |
| $M$, $gmol^{-1}$ | 284,78 |
| Temperatura tališta, °C | 227-229 |
| Stabilnost | stabilan, nereaktivan s jakim oksidansima |
| $\log K_{oc}$ | 4,24 |
| $\log K_{ov}$ | 5,86 |
| $pK_k$ | - |

### 3.2.5. Dimetazon

Dimetazon je herbicid koji se koristi prije sadnje biljaka kako bi se suzbio rast korova u nekim kulturama poput soje, graška, uljane repice, kukuruza, šećerne trske i duhana.

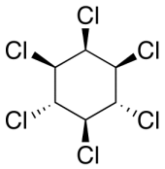
**Tablica 3.6.** Svojstva dimetazona

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Dimetazon, Klomazon |
| CAS broj | 81777-89-1 |
| Molekulska formula | $C_{12}H_{14}ClNO_2$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 2 - [(2-klorfenil) metil] -4,4-dimetil-3-izoksazolidinon |
| Svojstva | bezbojna-smeđa tekućina |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 239,7 |
| Temperatura tališta, °C | 25 |
| Stabilnost | Stabilan |
| log$K_{oc}$ | 2,28 |
| log$K_{ov}$ | 2,50 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.6. Lindan

Lindan se koristi kao insekticid. Ima široki spektar djelovanja uključujući crve koji jedu lišće, kukce koji žive u tlu te ljudske i životinjske parazite kao što su buhe, krpelji i uši.

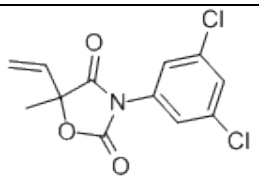
**Tablica 3.7.** Svojstva lindana

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Lindan |
| CAS broj | 319-86-8 |
| Molekulska formula | $C_6H_6Cl_6$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 1,2,3,4,5,6-heksaklorcikloheksan |
| Svojstva | bijelo-žuti kristalni puder |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 290,8 |
| Temperatura tališta, °C | 112,5 |
| Stabilnost | stabilan pri povišenoj temperaturi, svijetlosti, nereaktivan s jakim kiselinama |
| log$K_{oc}$ | 3,59 |
| log$K_{ov}$ | 4,26 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.7. Vinklozolin

Vinklozolin je fungicid iz skupine dikarboksimida. Koristi se za zaštitu usjeva odgljivica *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*, te za kontrolu ušiju i plijesni u vinogradima i za kulture poput malina, salate, kivija, graha i luka.

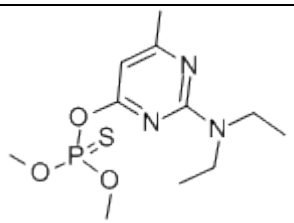
**Tablica 3.8.** Svojstva vinklozolina

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Vinklozolin |
| CAS broj | 50471-44-8 |
| Molekulska formula | $C_{12}H_9Cl_2NO_3$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 3- (3,5-diklorfenil) -5-etenil-5-metil-1,3-oksazolidin-2,4-dion |
| Svojstva | bezbojni kristali |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 286,1 |
| Temperatura tališta, °C | 108 |
| Stabilnost | stabilan u neutralnom pH području i slabim kiselinama |
| log$K_{oc}$ | 2,53 |
| log$K_{ov}$ | 3,03 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.8. Pirimifos-metil

Pirimifos-metil pripada skupini fosforotioata, a koristi se kao insekticid. Koristi se za kontrolu komaraca i štetočina kod stakleničkih usjeva te kao kontrola insekata kod skladištenih proizvoda.

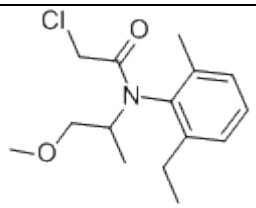
**Tablica 3.9.** Svojstva pirimifos-metila

| Generičko ime | Pirimifos-metil |
|---|---|
| CAS broj | 29232-93-7 |
| Molekulska formula | $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 4-dimetiloksifosfinotioniloksi-N, N-dietil-6-metilpirimidin-2-amin |
| Svojstva | žuta tekućina |
| $M$, $gmol^{-1}$ | 305,3 |
| Temperatura tališta, °C | 15 |
| Stabilnost | djeluje korozivno na kositar i čelik |
| $\log K_{oc}$ | 3,49 |
| $\log K_{ov}$ | 4,00 |
| $pK_k$ | 4,3 |

### 3.2.9. Metolaklor

Metolaklor je derivat anilina i pripada skupini herbicida. Vrlo je učinkovit za spriječavanje rasta brojnih vrsta trave.

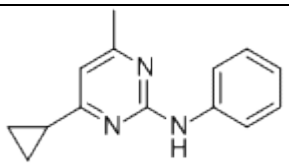
**Tablica 3.10.** Svojstva metolaklora

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Metolaklor |
| CAS broj | 51218-45-2 |
| Molekulska formula | $C_{15}H_{22}ClNO_2$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 2-klor-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(1-metoksipropan-2-il) acetamid |
| Svojstva | blijedo žuto ulje |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 283,8 |
| Temperatura tališta, °C | -62,1 |
| Stabilnost | stabilan, nekorozivan |
| log$K_{oc}$ | 2,39 |
| log$K_{ov}$ | 3,24 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.10. Ciprodinil

Ciprodinil je fungicid širokog spektra upotrebe, pripada klasi pirimidinaminata i njegova upotreba je odobrena od strane EU. Ima nisku topljivost, nije hlapiv i ne predstavlja opasnost za prodiranje u podzemne vode. Njegova stabilnost ovisi o lokalnim uvjetima, ali vjerojatno će se vrlo brzorazgraditi na dnevnom svjetlu. Umjereno je toksičan za sisavce, međutim, postoji opasnost od bioakumulacije. Iako je nadražujuće sredstvo, ne predstavlja ozbiljne probleme za ljudsko zdravlje. Umjereno je toksičan za ptice, većinu vodenih organizama i gujavica.

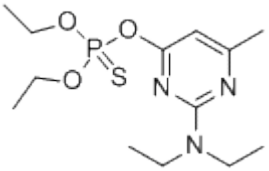
**Tablica 3.11.** Svojstva ciprodinila

| Generičko ime | Ciprodinil |
|---|---|
| CAS broj | 121552-61-2 |
| Molekulska formula | $C_{14}H_{15}N_3$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 4-ciklopropil-6-metil-N-fenilpirimidin-2-amin |
| Svojstva | bež prah |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 225,3 |
| Temperatura tališta, °C | 75,9 |
| Stabilnost | hidrolitički stabilan |
| log$K_{oc}$ | 3,49 |
| log$K_{ov}$ | 3,99 |
| p$K_k$ | 4,44 |

### 3.2.11. Pirimifos etil

Pirimifos etil je organofosfat koji se koristi kao insekticid.

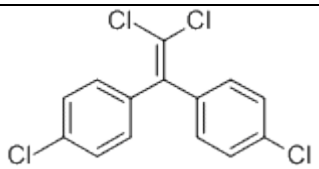
**Tablica 3.12.** Svojstva pirimifos etila

| Generičko ime | Pirimifos etil |
|---|---|
| CAS broj | 23505-41-1 |
| Molekulska formula | $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 4-dietoksifosfinotioloksi-N, N-dietil-6-metilpirimidin-2-amin |
| Svojstva | crveno-smeđa tekućina |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 333,4 |
| Temperatura tališta, °C | 15-18 |
| Stabilnost | stabilan pri sobnoj temperaturi |
| log$K_{oc}$ | 3,85 |
| log$K_{ov}$ | 4,98 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.12. *p,p'*-DDE

*p,p'*-DDE je insekticid koji se učestalo koristio za spriječavanje malarije, tifusa i drugih bolesti koje prenose insekti. Izaziva tumore na jetri kod glodavaca. Ima kancerogene i mutagene učinke. Ovaj pesticid je zabranjen u većini europskih zemalja 1970-ih godina. Njegovo korištenje kao pesticida u EU je u potpunosti zabranjeno direktivom79/117/EEC19 kojom se zabranjuje prodaja i korištenje ovog pesticida. Ipak, još uvijek se nalazi u okolišu.

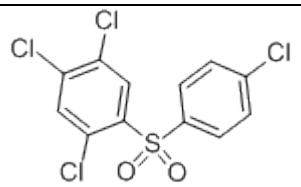
**Tablica 3.13.** Svojstva *p,p'*-DDE

| | |
|---|---|
| Generičko ime | *p,p'*-DDE |
| CAS broj | 72-55-9 |
| Molekulska formula | $C_{14}H_8Cl_4$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 1-klor-4- [2,2-dikloro-1- (4-klorofenil) etenil] benzen |
| Svojstva | Bijeli kristalan prah |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 318,0 |
| Temperatura tališta, °C | 88-90 |
| Stabilnost | pri zagrijavanju emitira vrlo otrovne plinove |
| log$K_{oc}$ | 5,65 |
| log$K_{ov}$ | 6,00 |
| p$K_k$ | - |

### 3.2.13.Tetradifon

Tetradifon se koristi za suzbijanje grinja na voću, povrću, ratarskim kulturama i ukrasnom bilju.

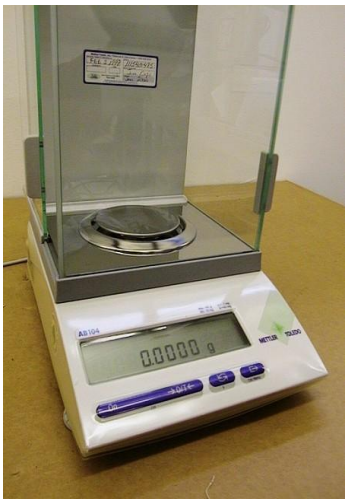
**Tablica 3.14.** Svojstva tetradifona

| | |
|---|---|
| Generičko ime | Tetradifon |
| CAS broj | 116-29-0 |
| Molekulska formula | $C_{12}H_6Cl_4O_2S$ |
| Strukturna formula |  |
| Naziv prema IUPAC nomenklaturi | 1,2,4-triklor-5-(4-klorofenil) sulfonilbenzen |
| Svojstva | bezbojni kristali |
| $M$, gmol$^{-1}$ | 356,1 |
| Temperatura tališta, °C | 148 |
| Stabilnost | stabilan u koncentriranim i razrijeđenim lužinama, mineralnim kiselinama, pri visokim temperaturama i UV svjetlu |
| log$K_{oc}$ | 3,64 |
| log$K_{ov}$ | 5,18 |
| p$K_k$ | - |

## 3.3. INSTRUMENTI

### 3.3.1. Analitička vaga

U radu je korištena analitička vaga *Mettler Toledo, AB104*, Švicarska. Analitička se vaga koristi za precizno određivanje mase uzoraka. Maksimalan kapacitet ove vage je 110 g, a mogućnost očitavanja iznosi 0,1 mg.



**Slika 3.1.** Analitička vaga *Mettler Toledo, AB104*

### 3.3.2. Uređaj za ekstrakciju kroz čvrstu fazu

Za ekstrakciju uzorka kroz čvrstu fazu korištena je Supelco Visiprep 24 aparatura prikazana na Slici 3.2. Aparatura se sastoji od vakuum pumpe i posude s poklopcem na koji se može istovremeno staviti do 24 kolonice. Poklopac aparature ima jedinstvenu kontrolu protoka ventilima koji omogućuju vrlo jednostavnu kontrolu kroz svaku SPE cijev. Ventili u poklopcu usmjeravaju uzorak u staklenu kiveticu.



**Slika 3.2.** Supelco Visiprep 24 aparatura za ekstrakciju uzorka kroz čvrstu fazu

### 3.3.3. Rotacijski uparivač

Uzorci su uparivani na rotacijskom uparivaču Rotavapor R-114/A, Büchi (Slika 3.3), pri sniženom tlaku koji se postiže pomoću vakuum sisaljke. Rotacijski uparivač se sastoji od

jedinice za rotiranje tikvice s ekstraktom, vodene kupelji, povratnog hladila i tikvice za prikupljanje kondenzata.



**Slika 3.3.** Rotacijski uparivač, R-114/A, Büchi

### 3.3.4. Uređaj za plinsku kromatografiju vezan na spektrometriju masa

Analiza uzoraka čaja nakon ekstrakcije izvedena je na Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra uređaju s autosamplerom AOC 5000 koji ima mogućnost „međuprostornog“i tekućeg injektriranja (Slika 3.4). Korištena je kolona InertCap 5MS/NP duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 um.

Za obradu kromatograma koristio se računalni program GC MS Solution.



**Slika 3.4.** Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

## 3.4. METODA RADA

### 3.4.1. Priprema standardnih otopina pesticida

Standardne otopine pesticida pripremljene su razrjeđivanjem temeljne otopine smjese pesticida koncentracije 100 mg/L u acetonitrilu kako bi se dobile željene koncentracije standardnih otopina. Korištene koncentracije standardnih otopina pesticida su 0.5, 1, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 i 50 μg/L.

### 3.4.2. Postupak ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu

Izvaže se 2 g uzorka čaja u posudicu za vaganje te na njega doda 2 mL standardne otopine pesticida i 4 mL acetonitrila. Takvu smjesu lagano promućkati kružnim pokretima te ostaviti do slijedećeg dana, dok sav acetonitril ne ispari.

Nakon što je sve otapalo isparilo, izvaže se 50 mg uzorka čaja i 100 mg sorbensa. Sve skupa se dobro promiješa te na kraju prebaci u SPE-kolonu u kojoj je prethodno stavljena prva frita na dno. Na kraju se stavi druga frita i sve se dobro sabije uz pomoć staklenog štapića.

Kad se SPE-kolona napuni uzorkom i sorbensom, dodaje se otapalo za ekstrakciju tako da se prvo pričeka da se cijela kolona navlaži sa 1 mL otapala. Provodi se statička ekstrakcija, odnosno kolona treba mirovati 5 min. Po završetku tih 5 min pusti se da otapalo prođe kroz kolonu (eluiranje gravitacijom) pri čemu se ekstrat hvata u koničnu epruvetu. Nakon toga se u dva navrata dodaje po 2 mL otapala pri čemu ekstrakcija traje 1 min, te se ekstrakt hvata u istu koničnu epruvetu. Svaki eksperiment se radi u tri paralelne serije te uz slijepu probu (SPE-kolonica koja sadrži uzorak čaja bez dodatka pesticida). Dobiveni ekstrakt se prenosi u vialicu za snimanje GC-MS.

U nizu eksperimenata ispitivana je učinkovitost ekstrakcije smjese 13 pesticida upotrebom kolonica punjenih različitim sorbensima (C18, ljuske kokošjeg jajeta, ljuske kokošjeg jajeta aktivirane na 160 °C, Strata-X, HLB Oasis, dijatomejska zemlja, natrijev sulfat i silikagel), s različitim čistim otapalima za eluiranje (metanol, etanol, 2-propanol, aceton, etil-acetat, acetonitril, diklormetan, dietileter, petroleter, toluen i heksan) kao i s raznim kombinacijama spomenutih otapala uz volumen otapala za eluiranje od 5 mL.

Nakon pronalaska optimalnih uvjeta razvijena metoda je validirana te se pristupilo analizi realnih uzoraka. Zbog toga što su realni uzorci čaja sadržavali neke pesticide obuhvaćene metodom, kao i spojeve koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje, masena koncentracija pesticida u realnom uzorku je određena metodom standardnog dodatka u tri koncentracijske točke (jedna bez dodatka standarda i dvije s dodatkom standarda pesticida u

realni uzorak čaja), što je i jedan od načina za isključenje utjecaja matice na analitički rezultat. Masene koncentracije ispitivanih pesticida u realnom uzorku čaja izračunate su kao razlika između masene koncentracije pesticida u uzorku sa i bez dodatka standardne otopine pesticida. Umjerni pravci s tri točke napravljeni su za svaki realni uzorak čaja.

### 3.4.3. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije GC-MS uređajem

Standardne otopine pesticida te uzorci nakon ekstrakcije i slijepi uzorak analizirane su pomoću plinskog kromatografa vezanog na spektrometar masa. Kao nepokretna faza korištena je slabo polarna kolona koja se sastoji od 95 % dimetilpolisiloksana i 5 % difenilla. Plin nosioc bio je helij.

Parametri metode:

- Temperatura injektiranja: 260 °C
- Tlak: 128,3 kPa
- Ukupni protok: 23,9 mL/min
- Protok kolone: 1.90 mL/min
- Linearna brzina: 50,8 cm/s

Parametri plinske kromatografije:

- Temperatura izvora iona: 200 °C
- Temperatura sučelja: 280 °C
- Naboj detektora: 0,93 kV

U svrhu optimiziranja metode, prvo se snimao SCAN svih komponenata standarda, za dobivanje vremena zadržavanja komponenata, njihovih ciljnih i potvrdnih iona. Potom se snimao SIM (engl. *Selected Ion Monitoring*) gdje su se odabrali *m/z* vrijednosti ciljnih i potvrdnih iona svake komponente, kako bi se postigla što bolja osjetljivost.

**Tablica 3.15.** Vrijeme zadržavanja, *m/z* vrijednosti ciljnih i potvrdnih iona pesticida

| **Pesticid** | **Vrijeme zadržavanja, min** | ***m/z* ciljnih iona** | ***m/z* potvrdnih iona** |
|---|---|---|---|
| **Diklobenil** | 10,71 | 171 | 173-100 |
| **Bifenil** | 11,58 | 154 | 153-152 |
| **Klorprofam** | 18,00 | 43 | 127-213 |
| **Heksaklorbenzen** | 19,15 | 284 | 186-282 |
| **Dimetazon** | 20,13 | 125 | 204-127 |
| **Lindan** | 20,21 | 181 | 181-183 |
| **Vinklozin** | 23,03 | 285 | 212-178 |
| **Pirimifos metil** | 24,27 | 290 | 305-276 |
| **Metolaklor** | 24,72 | 162 | 238-240 |
| **Ciprodinil** | 25,85 | 224 | 225-226 |
| **Pirimifos etil** | 25,94 | 280 | 333-318 |
| **p,p'-DDE** | 28,37 | 246 | 248-318 |
| **Tetradifon** | 33,96 | 159 | 111-229 |

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa GC MS Solution. Kvantitativna analiza provodila se integriranjem kromatograma, tj. očitavanjem površina ispod kromatografskih krivulja pesticida te njihovom usporedbom s površinama u standardnim otopinama pri čemu je određena koncentracija pesticida u ekstraktima odnosno učinkovitost provedenog ekstrakcijskog postupka.

# *4. REZULTATI I RASPRAVA*

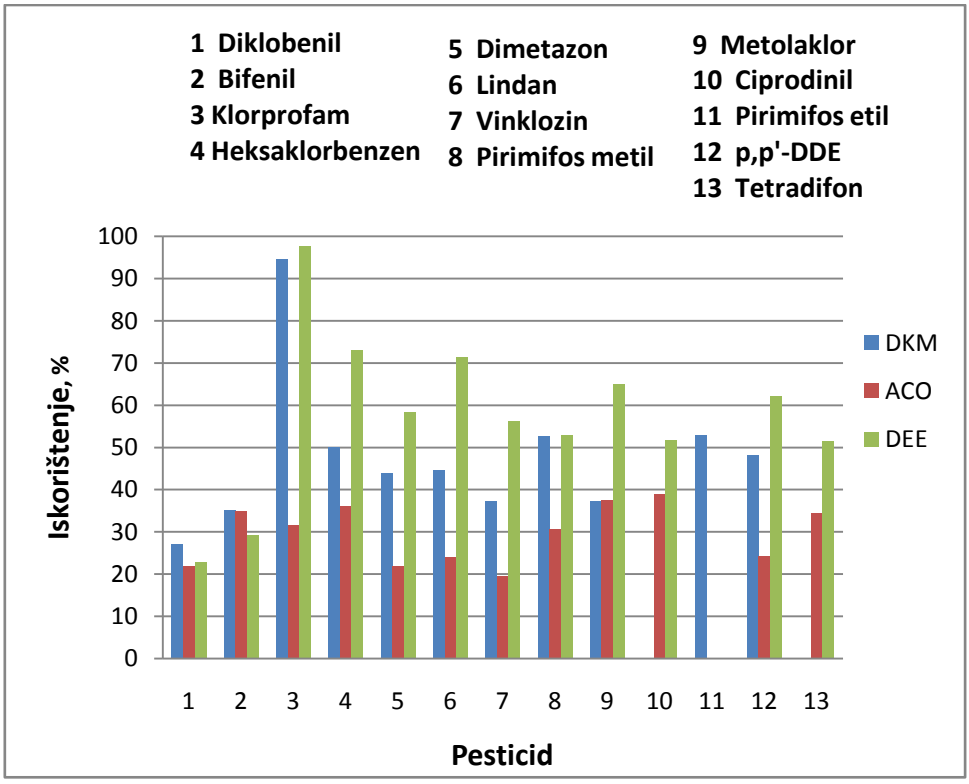
# 4. REZULTATI I RASPRAVA

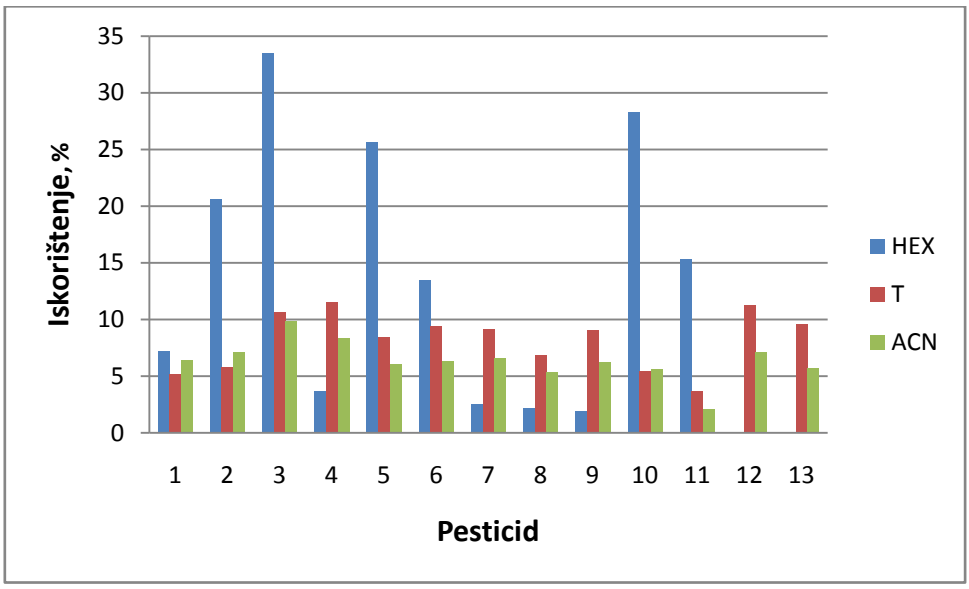
## 4.1. EKSTRAKCIJA PESTICIDA IZ UZORAKA ČAJA RASPRŠENJEM ČAJA KROZ ČVRSTU FAZU

Kritični korak u razvoju metode određivanja zagađivala u realnim uzorcima je postupak pripreme uzorka. Kod ekstrakcije raspršenjem matice uzorka čvrstom fazom ključni korak je odabir odgovarajućeg sorbensa a potom i otapala za eluiranje, jer to može utjecati na način izvedbe postupka. Odabir sorbensa ovisi o prirodi analita i interakcijama između sorbensa i funkcionalnih skupina analita. Međutim, veliki utjecaj ima i matica uzorka pogotovo u kompleksim uzorcima poput ovoga kao što je čaj.

S obzirom da se radi o pesticidima koji pripadaju različitim skupinama i koji samim time imaju dosta različita fizikalno-kemijska svojstva (poglavlje 3.2.) pravi je izazov provesti optimizaciju metode njihovog određivanja te pronaći optimalne uvjete za ekstrakciju svih pesticida u jednom koraku.

Iz navedenih razloga u prvom nizu eksperimenata ekstrakcija je provedena s najčešće korištenim C18 sorbensom, te s čistim otapalima (metanol, etanol, 2-propanol, aceton, etil-acetat, acetonitril, diklormetan, dietileter, petroleter, toluen i heksan) čiji je volumen bio 5 mL. Na Slici 4.1 prikazana su iskorištenja ispitivanih pesticida ostvarena primijenom organskih otapala diklormetana, acetona, dietiletera, heksana, toluena i acetonitrila. Prikazana su samo ova otapala, zbog toga što su od svih primijenjenih otapala najveća iskorištenja ostvarena u otapalima diklormetan i dietileter, najmanja iskorištenja u toluenu i acetonitrilu, dok su iskorištenja u heksanu i acetonu srednjih vrijednosti. U ostalim otapalima su iskorištenja također vrlo niska. U metanolu do 10 %, u etanolu oko 15 %, a u petroleteru i etilacetatu oko 20 – 25 % za sve pesticide.



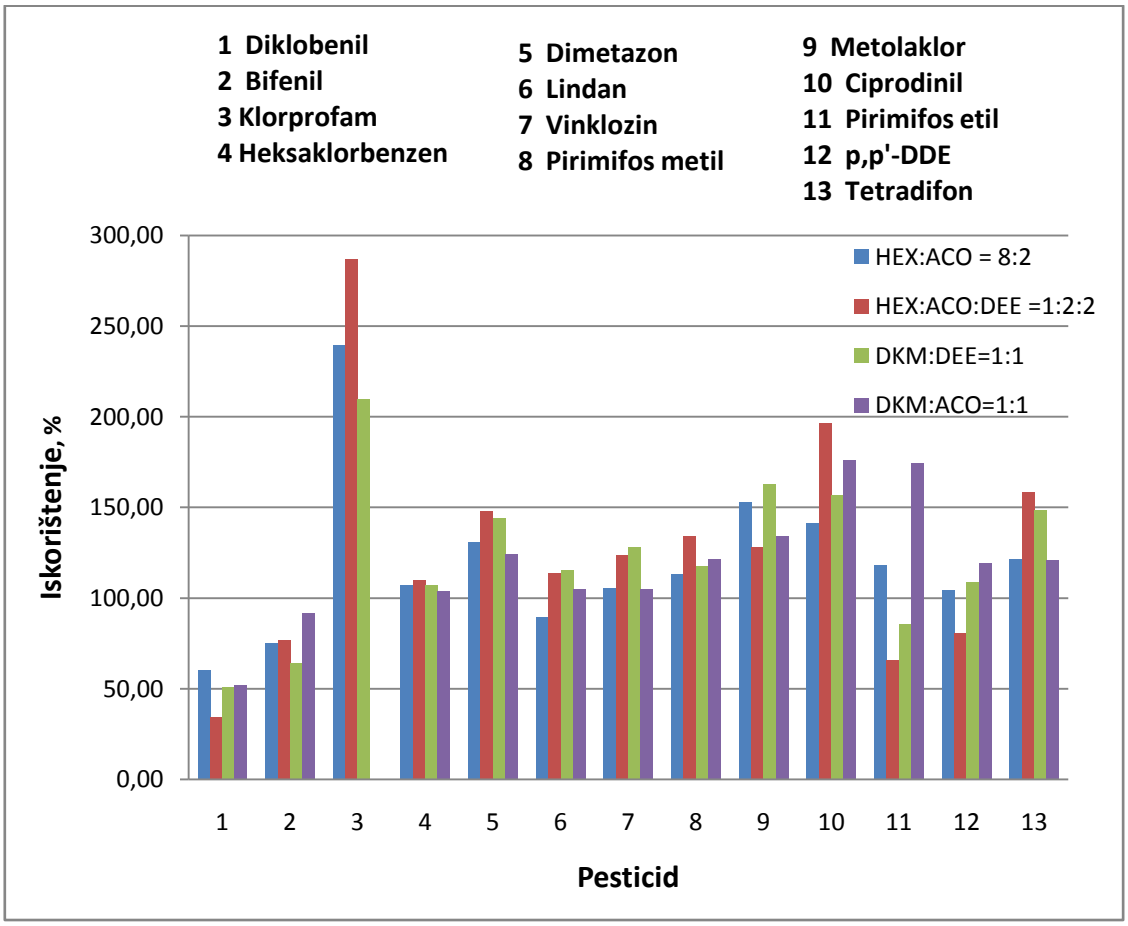




**Slika 4.1.** Iskorištenja pesticida primjenom različitih otapala na C18 sorbensu

Od izabranih otapala vidljivo je da se najmanje iskorištenje svih pesticidav ostvaruje primijenom acetonitrila (< 10 %), dok se najveća iskorištenja ostvaruju sa dietileterom (> 50 %). Diklobenil pokazuje najmanje iskorištenje primjenom svih otapala i ono je manje od 30 %. Klorprofam se najbolje ekstrahira iz čaja primjenom dietiletera i diklormetana čime se

postižu iskorištenja veća od 90 %. Acetonom se postižu srednje vrijednosti iskorištenja te ona iznose 20 – 40 %.

Na osnovu svega rečenog za daljnje eksperimente izabrana su sljedeća organska otapala: heksan, aceton, dietileter i diklormetan te su u sljedećem nizu eksperimenata korištene neke njihove smjese. Primjenjeni volumen za svako otapalo kao i pripremljene smjese otapala bio je i dalje 5 mL. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na Slici 4.2.

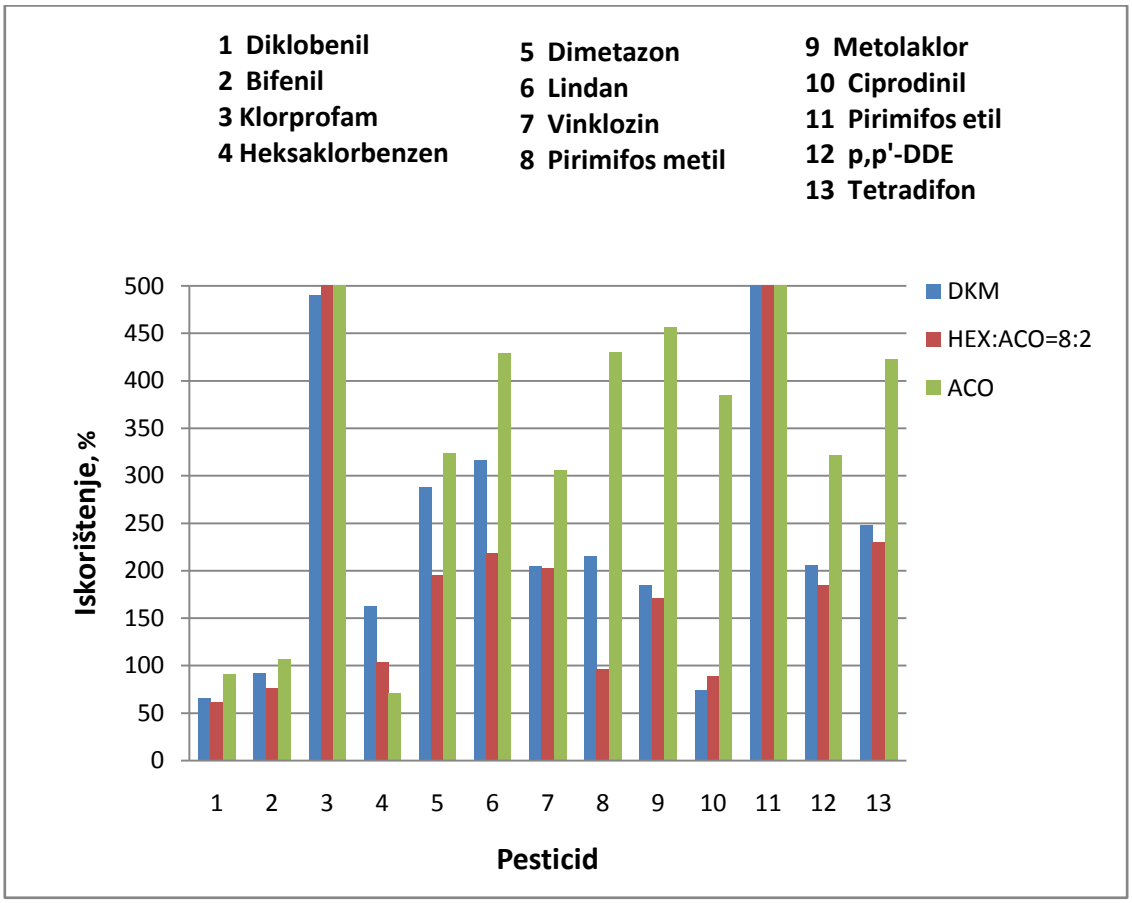



**Slika 4.2.** Usporedba iskorištenja ekstrakcije pesticida različitim smjesama otapala na C18 sorbensu

Najmanja iskorištenja ekstrakcije sa svim smjesama otapala ostvarena su za diklobenil te ona ne prelaze 60 %, dok su istovremeno najveća iskorištenja ostvarena za ciprodinil. Obzirom da je vidljivo da se većina pesticida primjenom navedenih smjesa otapala ekstrahira uz iskorištenja viša od 100 %, u obzir je potrebno uzeti i utjecaj matice čaja.

Ispitano je i iskorištenje ekstrakcije pesticida čistom vodom i smjesom voda:acetonitril 1:2, međutim,u tom slučaju pesticidi također pokazuju vrlo malo iskorištenje ekstrakcije. U čistoj vodi iskorištenje ne prelazi 27 %, dok se gotovo pola pesticida uopće ne ekstrahira. U smjesi voda:acetonitril 1:2 iskorištenje ekstrakcije raste u prosjeku za 15 %, ali se ni tada ne postižu zadovoljavajući rezultati.

S ciljem ostvarivanja boljih iskorištenja za sve pesticide, posebice za diklobenil i bifenil, sljedeći niz eksperimenata napravljen je na sorbensu dobivenom usitnjavanjem ljuski kokošjeg jajeta. Navedeni sorbens bio je nekako najbliži po sastavu florisilu koji se također kao sorbens dosta koristi u ekstrakciji raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu. S druge strane, usitnjena ljuska kokošjeg jajeta je sorbens koji nastaje kao otpad u kućanstvu, a na ovaj način bi taj isti otpad imao možda potencijalnu svrhu. U ovom nizu eksperimenata nisu korištena sva čista otapala kao u nizu eksperimenata sa C18 sorbensom, već su izabrana samo ona koja su se pokazala najboljima kao i njihove smjese. Rezultati su prikazani grafički na Slici 4.3.




**Slika 4.3.**Usporedba iskorištenja ekstrakcije pesticida različitim otapalima na ljuski kokošjeg jajeta

Gledajući rezultate prikazane na Slici 4.3 vidljivo je da se s usitnjenom ljuskom kokošjeg jajeta kao sorbensom ostvaruju viša iskorištenja nego sa C18 sorbensom. Ipak ti rezultati nisu toliko dobri da bi se tom sorbensu dala prednost pred C18. Naime, iskorištenja možda i jesu bolja u nekim slučajevima, ali su relativna standardna odstupanja veća kao i utjecaj matice koji se najbolje može vidjeti na samim kromatogramima. Prije nego se u svim daljnjim eksperimentima potpuna prednost nije dala C18 sorbensu, napravljeni su i eksperimenti s nekim drugim sorbensima poput ljuske kokošjeg jajeta aktivirane na 160 °C, Strate-X, OasisHLB i dijatomejske zemlje. Svi spomenuti eksperimenti samo su potvrdili da se kao sorbens za sve daljnje eksperimente uzima ipak C18.

Kako je u literaturi [22] nađeno da se vrlo često u ekstrakciji raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu uzorak prethodno namače u zasićenoj metanolnoj otopini KOH, miješa sa sorbensom te onda puni u kolonu u kojoj već prethodno postoji punjenje čistog sorbensa koji može biti istog ili različitog sastava kao onaj s kojim se uzorak miješao, željela se ispitati i ta mogućnost. Uloga dodatnog sorbensa u koloni tijekom eksperimenta služi za pročišćavanje dobivenog ekstrakta čime se izbjegava jedan dodatni korak u samom postupku. U tu svrhu napravljeni su još neki dodatni eksperimenti u kojima se kao dodatni sorbens koristila smjesa natrijevog sulfata i silikagela u omjeru 2:1. Utvrđeno je da se tim eksperimentima ne postižu bolji rezultati, zbog velikih relativnih standardnih odstupanja te velikog utjecaja matice, a uvelike se komplicira i sam postupak ekstrakcije.

Iz svega navedenog, zaključeno je da su optimalni uvjeti za ekstrakciju raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu 5 mL smjese otapala heksan:aceton 8:2 na sorbensu C18.

## 4.2. VALIDACIJA

Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta za ekstrakciju navedene smjese pesticida, potrebno je pristupiti validaciji. Budući da je priprema uzorka samo jedan korak u metodi određivanja pesticida te kako svaki od koraka utječe na konačni ishod primjenjivosti postupka, potrebno je validirati cijelu metodu određivanja (ekstrakcija pesticida raspršenjem matice čaja kroz čvrstu fazu + GC-MS), a ne samo pripremu uzorka. U tu svrhu napravljena su razrjeđenja standardne otopine smjese od 13 pesticida s acetonitrilom (poglavlje 3.3.1). Pripremljene standardne otopiname su se dodavale čaju (poglavlje 3.3.2) tako da su se koncentracije pesticida u tako pripremljenim uzorcima čaja kretale od 0,05 μg/g do 5 μg/g čaja.

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

**Tablica 4.1.** Raspon linearnosti, koeficijent korelacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) MSPD-GC-MS metode

| Pesticid | Linearno područje, µg/g | Jednadžba linearnosti | $R^2$ | GD, µg/g | GK, µg/g |
|---|---|---|---|---|---|
| **Diklobenil** | 0,5-5 | A = 1311,3γ + 814,21 | 0,9847 | 0,25 | 0,5 |
| **Bifenil** | 0,125 – 2,5 | A = 539,7γ + 1193,55 | 0,9934 | 0,1 | 0,125 |
| **Klorprofam** | 0,5 – 5 | A = 194,9γ + 1780,75 | 0,9908 | 0,25 | 0,5 |
| **Heksaklorbenzen** | 0,25 – 2,5 | A = 24,1γ + 28,73 | 0,9844 | 0,125 | 0,25 |
| **Dimetazon** | 0,25 – 5 | A = 3078,5γ + 709,09 | 0,9810 | 0,125 | 0,25 |
| **Lindan** | 0,25 – 5 | A = 502,2γ + 103,24 | 0,9955 | 0,125 | 0,25 |
| **Vinklozin** | 0,5 – 2,5 | A = 487,4γ + 64,07 | 0,9860 | 0,25 | 0,5 |
| **Pirimifos metil** | 0,125 – 2,5 | A = 1536γ + 5,19 | 0,9878 | 0,1 | 0,125 |
| **Metolaklor** | 0,25 – 2,5 | A = 4617,2γ – 223,25 | 0,9963 | 0,125 | 0,25 |
| **Ciprodinil** | 0,5 – 2,5 | A = 4423,9γ – 103,03 | 0,9905 | 0,25 | 0,5 |
| **Pirimifos etil** | 0,25-5 | A = 947,5γ + 28,99 | 0,9973 | 0,125 | 0,25 |
| ***p,p'*-DDE** | 0,5 – 2,5 | A = 1974,9γ + 258,33 | 0,9859 | 0,25 | 0,5 |
| **Tetradifon** | 0,5 – 2,5 | A = 887,8γ + 509,70 | 0,9964 | 0,25 | 0,5 |

Određeno je linearno područje za sve pesticide u uzorcima čaja u rasponu koncentracija od 0,05 do 5 µg/g. Umjerne krivulje prikazuju odnos površine kromatografske krivulje dobivene GC-MS uređajem i koncentracije analita. Dobiveni rezultati su analizirani linearnom regresijskom metodom i prikazani su u Tablici 4.1 u obliku linearnog područja, jednadžbe područja linearnosti, korelacijskog faktora te granice detekcije i kvantifikacije. Granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) određene su iz omjera signala i šuma usporedbom mjerenog signala ispitivanog pesticida najmanje poznate koncentracije s mjernim signalom slijepog uzorka. Za granicu detekcije taj omjer treba biti 3, a za granicu kvantifikacije 10.

Vrijednosti granice detekcije kreću se od 0,1 do 0,25 µg/g, a vrijednosti granice kvantifikacije su u području od 0,125 do 0,5 µg/g. Visoki koeficijenti korelacije (0,981-0,997) dokazuju linearnost metode.

U sljedećem koraku validacije određena je preciznost nove metode, koja je iskazana kao ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost i obnovljivost su izražene kao relativno standardno odstupanje (RSO). Ponovljivost razvijene metode je izračunata iz rezultata analize čaja trputca s dodanim pesticidima u koncentraciji 1 μg/g u seriji pet ponavljanja u istom danu. Obnovljivost je izračunata iz analiza istog uzorka čaja s dodanim pesticidima u pet ponavljanja provedbom opisane analitičke procedure tijekom tri različita dana. Rezultati tog ispitivanja navedeni su u Tablici 4.2.

**Tablica 4.2.** Ponovljivost i obnovljivost

| Pesticid | Ponovljivost, % | Obnovljivost, % |
|---|---|---|
| **Diklobenil** | 5,0 | 6,1 |
| **Bifenil** | 2,2 | 12,3 |
| **Klorprofam** | 9,9 | 18,9 |
| **Heksaklorbenzen** | 8,2 | 13,5 |
| **Dimetazon** | 15,9 | 18,9 |
| **Lindan** | 8,7 | 28,0 |
| **Vinklozin** | 5,2 | 12,3 |
| **Pirimifos metil** | 12,1 | 17,5 |
| **Metolaklor** | 6,4 | 13,4 |
| **Ciprodinil** | 8,1 | 15,7 |
| **Pirimifos etil** | 8,4 | 15,8 |
| **p,p'-DDE** | 9,8 | 13,2 |
| **Tetradifon** | 9,3 | 17,1 |

Najmanji stupanj obnovljivosti, odnosno relativno standardno odstupanje pokazuje diklobenil 6,1 %, a najveći lindan 28,0 %, dok se sve ostale vrijednosti kreću između 12,3 i 18,9 %. Za ponovljivost najmanje relativno standardno odstupanje ima bifenil 2,2 %, a najveće dimetazon 15,9 %, a sve ostale vrijednosti se kreću između 5,0 i 12,1 %. Odstupanja veća od 10 % mogu se tumačiti utjecajem matice uzorka.

**Tablica 4.3.** Iskorištenja pesticida primjenom optimalnih uvjeta MSPD metode unutar linearnog područja

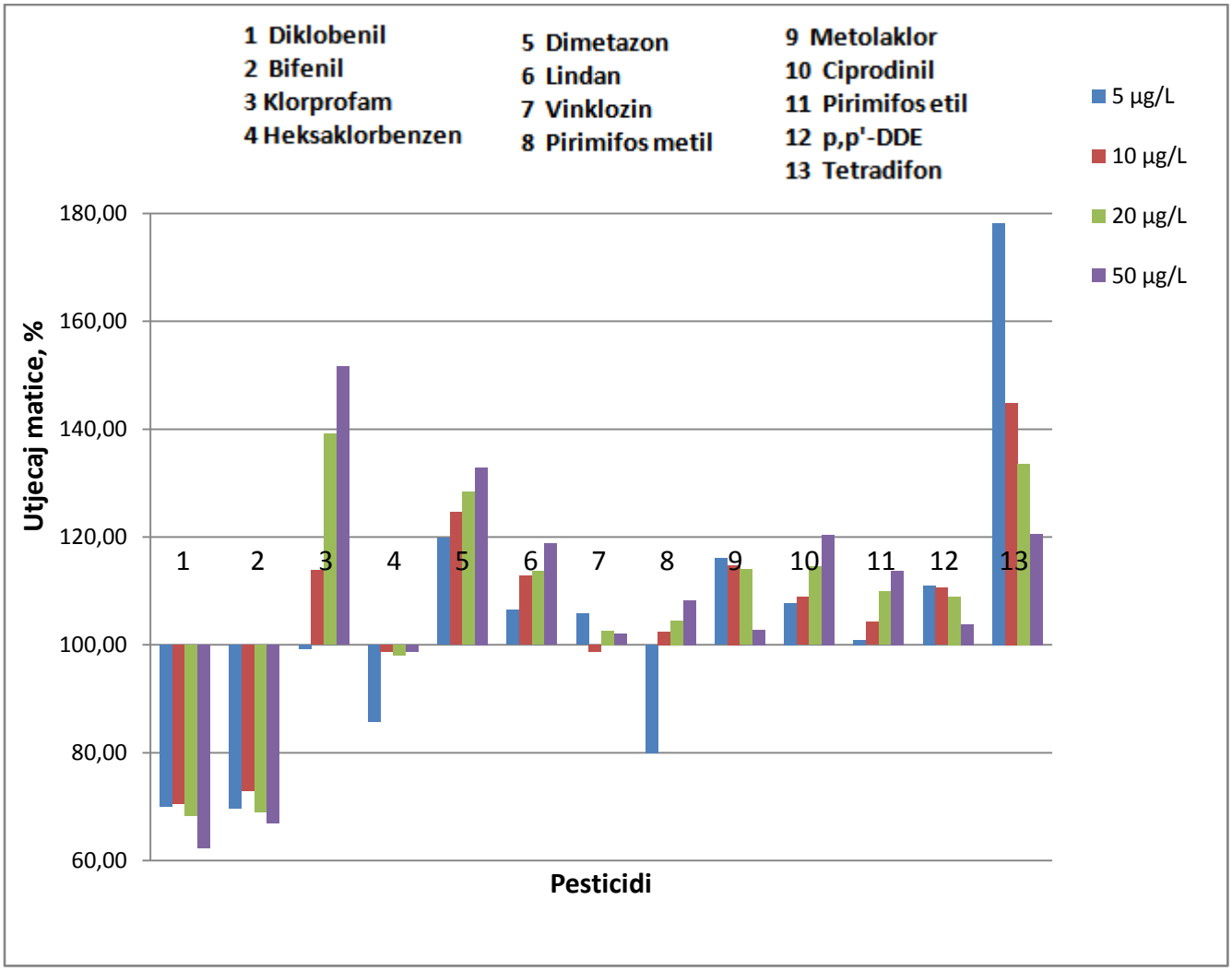
| Pesticid | Koncentracija, µg/L | Obnovljivost ± RSO, % | Pesticid | Koncentracija, µg/L | Obnovljivost ± RSO, % |
|---|---|---|---|---|---|
| **Diklobenil** | 5 | 78,6 ± 8,0 | **Pirimifos metil** | 5 | 94,2 ± 3,4 |
| | 15 | 68,8 ± 12,5 | | 20 | 102,7 ± 6,8 |
| | 25 | 59,6 ± 5,9 | | 25 | 102,0 ± 5,3 |
| **Bifenil** | 5 | 72,4 ± 8,9 | **Metolaklor** | 2,5 | 114,4 ± 16,8 |
| | 10 | 69,5 ± 9,6 | | 10 | 146,6 ± 5,9 |
| | 25 | 83,7 ± 7,4 | | 15 | 136,6 ± 9,0 |
| **Klorprofam** | 5 | 111,1 ± 7,1 | **Ciprodinil** | 10 | 75,9 ± 8,8 |
| | 20 | 104,4 ± 9,8 | | 15 | 89,1 ± 17,2 |
| | 50 | 83,8 ± 9,3 | | 20 | 128,6 ± 6,3 |
| **Heksaklorbenzen** | 10 | 102,5 ± 12,2 | **Pirimifos etil** | 20 | 100,0 ± 16,8 |
| | 15 | 89,6 ± 14,5 | | 25 | 107,4 ± 11,0 |
| | 25 | 95,4 ± 5,2 | | 50 | 100,0 ± 4,4 |
| **Dimetazon** | 5 | 99,9 ± 13,1 | ***p,p′*-DDE** | 10 | 104,2 ± 11,2 |
| | 20 | 99,0 ± 6,3 | | 15 | 114,8 ± 6,1 |
| | 50 | 73,1 ± 5,5 | | 25 | 112,7 ± 6,6 |
| **Lindan** | 10 | 106,0 ± 14,9 | **Tetradifon** | 5 | 65,0 ± 16,0 |
| | 20 | 104,5 ± 4,5 | | 15 | 116,5 ± 10,3 |
| | 50 | 93,1 ± 16,2 | | 25 | 115,9 ± 8,0 |
| **Vinklozin** | 5 | 105,7 ± 16,8 | | | |
| | 10 | 107,4 ± 13,1 | | | |
| | 20 | 108,0 ± 2,6 | | | |

Iz Tablice 4.3 vidljivo je da iskorištenja nekih pesticida više manje nisu ovisna o koncentraciji unutar linearnog područja (npr. bifenil, vinklozin, pirimifos metil i pirimifos etil) što je velika prednost razvijene metode, dok je kod nekih primijećeno da s promijenom koncentracije raste i utjecaj matice uzorka čaja. Utjecaj matice je vrlo vjerojatno uzrok porasta iskorištenja pesticida posebice iznad 100 %, što je slučaj kod metolaklora.

## 4.3. UTJECAJ MATICE

Plinska kromatografija vezana na spektrometar masa (GC-MS) predstavlja najučinkovitiju metodu za praćenje pesticida u hrani. Međutim, ova metoda je podložna utjecaju matice na kvantifikaciju rezultata, a ovisna je o vrsti analita, matici, pripremi uzorka i instrumentu. Signal interferiran utjecajem matice u plinskoj kromatografiji se javlja jer aktivna površina instrumenta (injektor, kolona ili detektor) uzrokuje razgradnju ili zadržavanje analita. Na primjer, kemikalije koje sadrže hidroksi, amino ili fosfatne skupine su podložnije reakcijama i interakcijama na staklenoj ili metalnoj površini u fazi zagrijavanja od nepolarnih spojeva kao što su organoklorni pesticidi. U standardnim otopinama, bez uzorka u kojem je prisutna matica, samo analiti ispunjuju aktivna mjesta te se na detektoru pojavljuju samo željene molekule. Međutim, u složenim ekstraktima se aktivna mjesta popunjavaju komponentama matice, čime se utječe na učinkovitost prijenosa analita do detektora plinske kromatografije, a time i na rezultat. Budući da je matica čaja vrlo složena jer se sastoji od raznih šećera, pigmenata, organskih kiselina, kofeina i sličnih spojeva [2], bilo je važno procijeniti njen utjecaj na analitički rezultat kako bi se taj utjecaj mogao svesti na najmanju moguću mjeru.

S ciljem kvantificiranja utjecaja matice radila se usporedba podataka dobivenih linearnog regresijom za pesticide u uzorku čajai za pesticide u čistom otapalu. Na Slici 4.4 je prikazan utjecaj matice svih pesticida za koncentracije 5, 10, 20 i 50 µg/L.




**Slika 4.5.** Utjecaj matice za 4 različite koncentracije

Utjecaj matice je prilično varijabilan, stoga je prikazan postotak samo relativan pokazatelj prigušenja ili povećanja instrumentalnog odziva pojedinih pesticida. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da na utjecaj matice jako utječe koncentracija ispitivanih pesticida pri čemu je kod nekih pesticida veći utjecaj matice kod nižih koncentracija, a kod nekih obrnuto. Neki pesticidi poput dimetazona, lindana, vinkozolina, metolaklora, ciprodinila, pirimifos etila i *p,p´*-DDE ne pokazuju značajan utjecaj matice jer je promjena signala manja od 20 % za sve ispitivane koncentracije. Iako većina ispitivanih pesticida ima isti trend (prigušenje ili povećanje) utjecaja matice, kod heksaklorbenzena i pirimifos metila primijećen je promijenjivi utjecaj matice, tj. kod najniže koncentracije prisutno je smanjenje signala dok kod ostalih koncentracija dolazi do povećanja signala. Najveći utjecaj matica ima na diklobenil i bifenil (smanjenje signala) te na tetradifon (povećanje signala).

## 4.4. ANALIZA REALNIH UZORAKA

Svi prethodno prikazani rezultati odnose se na uzorak čaja biljke trputac organskog uzgoja, međutim razvijena i validirana metoda primjenjena je i na realnim uzorcima čajeva i to na čaju listova breze (LB) i maline (LM), čaju priljepače (PRI), preslice (PRES), maćuhice (M), maslačka (MAS) te na čaju listova obične (D) i crvene djeteline (DC). Neki od čajeva su bili uzorkovani na različitim lokacijama i u različito vrijeme poput obične djeteline (D1, D2, D3 i D4), crvene djeteline (DC1 i DC2) i maćuhice (M1 i M2). Realni uzorci čaja analizirani su bez dodatka standardnih otopina pesticida u jednom slučaju te uz dodatak standardne otopine smjese pesticida koncentracija 10 odnosno 20 μg/L, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4.4.

**Tablica 4.4.** Koncentracije pesticida u realnim uzorcima

| | | | **Koncentracija u realnom uzorku, μg/g** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Pesticid** | **GD, μg/g** | **GK, μg/g** | **D1** | **D2** | **D3** | **D4** | **DC1** | **DC2** | **MAS** |
| **Diklobenil** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | n.d. | < GD | < GD |
| **Bifenil** | 0,1 | 0,125 | 0,207 | 0,125 | 0,153 | GD | 0,163 | 0,160 | 0,264 |
| **Klorprofam** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | n.d. | n.d. | 1,258 | < GD | n.d. |
| **Heksaklorbenzen** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | < GK | < GD | < GD | n.d. | < GK |
| **Dimetazon** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | < GD | n.d. | < GD | n.d. | n.d. |
| **Lindan** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | < GK | < GK | n.d. | n.d. | 0,584 |
| **Vinklozin** | 0,25 | 0,5 | < GD | GD | < GK | n.d. | < GD | < GD | < GK |
| **Pirimifos metil** | 0,1 | 0,125 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | n.d. | < GD |
| **Metolaklor** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |
| **Ciprodinil** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | n.d. | n.d. |
| **Pirimifos etil** | 0,125 | 0,25 | < GD | GD | < GD | < GD | < GD | n.d. | n.d. |
| **p,p'-DDE** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | n.d. | < GD |
| **Tetradifon** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | n.d. | < GD | < GD | n.d. |

| | | | M1 | M2 | LB | LM | PRI | PRES |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Diklobenil** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |
| **Bifenil** | 0,1 | 0,125 | 0,235 | 0,317 | 0,250 | 0,213 | 0,344 | 0,162 |
| **Klorprofam** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GK | n.d. | n.d. | < GD | n.d. |
| **Heksaklorbenzen** | 0,125 | 0,25 | < GK | < GD | < GD | GD | < GK | < GK |
| **Dimetazon** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | < GD | 0,253 | < GD | < GK |
| **Lindan** | 0,125 | 0,25 | 0,899 | < GD | n.d. | 1,220 | 2,185 | 1,105 |
| **Vinklozin** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |
| **Pirimifos metil** | 0,1 | 0,125 | 0,140 | < GD | < GD | 0,223 | 0,200 | 0,243 |
| **Metolaklor** | 0,125 | 0,25 | < GD | < GD | 0,300 | GD | 1,748 | < GK |
| **Ciprodinil** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |
| **Pirimifos etil** | 0,125 | 0,25 | < GD | GD | < GK | 0,260 | < GK | < GK |
| **p,p'-DDE** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |
| **Tetradifon** | 0,25 | 0,5 | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD | < GD |

Iz priložene tablice vidljivo je da su koncentracije pesticida u realnim uzorcima relativno niske. Najmanje prisutnih pesticida pokazuju svi uzorci obične djeteline, jedan uzorak crvene djeteline (C2) i jedan uzorak maćuhice (M2). U svima njima pomoću razvijene metode kvantificiran je samo bifenil u rasponu od GD-0,317 μg/g. Najviše pesticida pronađeno je u uzorku čaja lista maline, i to redom bifenil, dimetazon, lindan, pirimifos metil i pirimifos etil. Od njih 5, u listu maline je određena najviša koncentracija lindana i to čak 1,220 μg/g, dok se koncentracije svih ostalih pronađenih pesticida kreću od 0,2-0,25 μg/g. Ipak najzagađeniji čaj od svih ispitivanih realnih uzoraka čaja je čaj od priljepače koji, iako je našom metodom u njemu kvantificirano tek 4 ispitivana pesticida, ima najviše koncentracije prisutnih pesticida (bifenil 0,344 μg/g, lindan 2,185 μg/g, pirimifos metil 0,200 μg/g i metolaklor 1,748 μg/g). Bifenil je jedini pesticid koji je kvantificiran u svim realnim uzorcima čaja.

# *5. ZAKLJUČAK*

# 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je prikazan razvoj metode određivanja 13 različitih pesticida u uzorcima čajeva. Pesticidi su izolirani iz čajeva MSPD metodom, a određeni i kvantificirani GC-MS uređajem. Određeni su optimalni uvjeti, odnosno učinkovitost ekstrakcije u raznim čistim otapalima i smjesama otapala i učinkovitost ekstrakcije na različitim sorbensima te raspon linearnosti, koeficijent korelacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK), ponovljivost i obnovljivost metode te utjecaj matice.

Kao najbolje otapalo za eluiranje pokazala se smjesa heksan:aceton 8:2 zbog toga što su većina iskorištenja zadovoljavajuća (> 60 %), a ne dolazi do prevelikog utjecaja matice. Kao sorbens je izabran C18. Iako se s usitnjenom ljuskom kokošjeg jajeta kao ostvaruju nešto viša iskorištenja, relativna standardna odstupanja i utjecaj matice su veći, pa je zaključeno da je C18 optimalniji sorbens.

Bilo je važno odrediti preciznost razvijene metode koja se iskazuje kao ponovljivost i obnovljivost. Dobiveni rezultati su zadovoljavajući. Najmanje relativno standardno odstupanje za obnovljivost iznosi 6,1 %, a prosječne vrijednosti se kreću oko 15 %. Za ponovljivost najmanje relativno standardno odstupanje iznosi 2,2 %, dok je prosjek ispod 10 %.

Razvijenom i validiranom MSPD-GC-MS metodom analizirani su realni uzorci čajeva. Najmanje ispitivanih pesticida određeno je u svim uzorcima obične djeteline te u jednom uzorku crvene djeteline odnosno uzorku maćuhice, a najviše ispitivanih pesticida pronađeno je u uzorku čaja lista maline. Ipak, najzagađeniji čaj je čaj priljepače u kojem su nađene najviše koncentracije nekih pesticida te najviša ukupna koncentracija pesticida po jedinici mase. Bifenil je jedini pesticid koji je kvantificiran u svim realnim uzorcima čaja.

Može se zaključiti da je prikazana metoda vrlo efektivna alternativa za klasične metode ekstrakcije pesticida iz čajeva, zbog pojednostavljenog i bržeg tretiranja uzoraka, smanjene količine toksičnih otapala te zbog niskih troškova same metode. Također, bitna je i selektivnost metode te bolja iskorištenja ekstrakcije. Međutim, još uvijek ima puno prostora za istraživanja neželjenog utjecaja matice koji otežava kvantifikaciju rezultata.

# *6. LITERATURA*

# 6. LITERATURA


[1] B. Kanrar, S. Mandal, A. Bhattacharyya, Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides inmade tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, J.Chromatogr. A**1217** (2010) 1926–1933.

[2] G. Chen, P. Cao, R. Liu, A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure, Food Chemistry**125** (2011) 1406-1411.

[3] S. Ounjaijean, S. Fucharoen, S. Srichairatanakool, Green tea: Just a drink or nutraceutical, Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease,InTech, Rijeka, Croatia, 2014., str. 363-390.

[4] The science of tea, The university of Waikato, Hamilton, New Zeland, 2013.

[5] http://sciencelearn.org.nz/Innovation/Innovation-Stories/Zealong-Tea/Images/Six-types-of-tea, lipanj 2015.

[6] Skupina autora, Analitika okoliša (ur. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović), FKIT i HINUS, Zagreb, 2013., str. 140.-162.

[7] D. E. Raynie: Extraction, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press 2000.

[8] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 755-757.

[9] R. Đurović, T. Đorđević, Modern extraction techniques for pesticide residues determination in plant and soil samples, Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis,InTech, Rijeka, Croatia, 2011., str. 221-247

[10] S. A. Barker,Matrix solid-phase dispersion, J. Chromatogr. A**885**(2000)115-127.

[11] E.M. Thurman, M.S. Mills, Solid-Phase Extraction, Principles and Practise, John Wiley & Sons, Inc., Kanada

[12] B.F. Eldridge, Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides, University of California, 2008.

[13] http://i1110.photobucket.com/albums/h457/neznam9/moj%20vrt/mojvrt0606201236.jpg, lipanj 2015.

[14] B. Šarkanj, D. Kipčić, Đ. Vasić-Rački, F. Delaš, K. Galić, M. Katalenić, N. Dimitrov, T. Klapec, Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010., str. 83.-110.

[15] H. K. Gill, H. Garg, Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies, Pesticides - Toxic Aspects, InTech,Rijeka, Croatia, 2014., str. 187-230.

[16] http://commonsabundance.net/docs/alternative-and-biological-pest-controls/, lipanj 2015.

[17] M. M. Than et al., Utilization of eggshell powder as excipient in fast and sustained release acetominophen tablets, J. Pharm. Sci.**39**(3-4)(2012) 32-38.

[18] http://www.chemicalbook.com/, srpanj 2015.

[19] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/, srpanj 2015.

[20] http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm, srpanj 2015.

[21] http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm, srpanj, 2015

[22] M.T. Pena, M.C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, Development of a matrix solid-phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples, Anal. Chim. Acta**626** (2008) 155–165.

# *7. POPIS KRATICA I SIMBOLA*

# 7. POPIS KRATICA I SIMBOLA

$c_{org}$ i $c_{aq}$ - Molarne koncentracije, g/L

*D* - Omjer razdiobe

GC – MS – Plinska kromatografija vezana na spektrometriju masa

GD – Granica detekcije, µg/g

GK – Granica kvantifikacije, µg/g

$K_d$ - Koeficijent razdiobe

$K_k$- Kiselinska konstanta disocijacije

$K_{ov}$ - Koeficijent razdiobe oktanol/voda

LLE - Ekstrakcija tekuće – tekuće

MAE - Mikrovalna ekstrakcija *(eng. Microwave assisted extraction)*

MSPD - Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu *(eng. Matrix solid-phase dispersion)*

RSO - Relativno standardno odstupanje RSO, %

SFE - Ekstrakcija superkritičnim fluidima *(eng. Supercritical fluid extraction)*

SPE - Ekstrakcija čvrstom fazom *(eng. Solid-phase extraction)*

SPME - Mikroekstrakcija čvrstom fazom *(eng. Solid-phasemicroextraction)*

USE - Ultrazvučna ekstrakcija *(eng. Ultrasonic solvent extraction)*

# *8. ŽIVOTOPIS*

# 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. svibnja 1992. godine u Koprivnici. Pohađala sam osnovnu školu "Braća Radić" i gimnaziju "Fran Galović" (2006.-2010.), smjer opća gimnazija u Koprivnici. 2010. godine upisala sam preddiplomski studij ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Stručnu praksu odradila sam na Zavodu za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke županije. 2013. godine upisala sam diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo.

2013. godine sam dobila 3. nagradu Ina-e za najstudentske projekte s radom "Sorpcija farmaceutika na prirodna tla". 2014. godine sudjelovala sam na X. Susretu mladih kemijskih inženjera sposterskim priopćenjem. U suradnji s kolegicom dobila sam dekanovu nagradu 2014. za zapažen studentski znanstveni rad na temu "Sorpcija farmaceutika na različite otpadne tvari iz kućanstva". 2015. godine sam sudjelovala na radionicama 13. Festivala znanosti i koautorica sam jednog znanstvenog rada.

Od stranih jezika koristim engleski jezik u govoru i pismu, te osnove njemačkog jezika. U radu na računalu koristim Microsoft Word, Excel, PowerPoint, te programske pakete Mathematica, Matlab i Scientist.