

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Nera Bebek

**RAZVOJ ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE KANCEROGENIH I
MUTAGENIH POLICIKLIČKIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA U PM₁₀
ČESTICAMA**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je u Državnom hidrometeorološkom zavodu u Sektoru za kvalitetu zraka na Odjelu organski laboratorij pod vodstvom dr. sc. Darija Dabića te mentorice prof. dr. sc. Sandre Babić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI UVOD.....	2
2.1. Policiklički aromatski ugljikovodici	2
2.1.1. Benzo[<i>a</i>]piren.....	3
2.1.2. PM ₁₀ čestice.....	4
2.2. Kromatografija	5
2.2.1. Podjela kromatografskih tehnika.....	6
2.2.2. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa	7
2.3. Validacija	8
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA	11
4. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
4.1. Materijali	12
4.1.1. Ispitivane tvari.....	12
4.2. Instrumenti	12
4.2.1. Uređaj za ekstrakciju krutih i polukrutih uzoraka	12
4.2.2. Uređaj za automatizirano uparavanje otapala	14
4.2.3. Plinski kromatograf spregnut sa spektrometrijom masa (GC-MS).....	14
4.2.4. Analitička vaga.....	15
4.3. Metode rada.....	16
4.3.1. Prikupljanje uzoraka.....	16
4.3.2. Priprema temeljne standarde otopine	16
4.3.3. Priprema otopine unutarnjeg standarda.....	17
4.3.4. Priprema otopine surogatnog standarda	18
4.3.5. Priprema radnih standarda za izradu kalibracijskih krivulja	19
4.3.6. Priprema kontrolnog standarda	19

4.3.7.	Ekstrakcija uzoraka	20
4.3.8.	Uparavanje uzoraka.....	20
4.3.9.	Analiza uzoraka plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrom masa	
	21	
4.4.	Razvoj metode i optimizacija postupka pripreme uzoraka	22
4.4.1.	Izbor kromatografske kolone.....	27
4.4.2.	Optimizacija uvjeta rada na instrumentu GC-MS	27
4.4.3.	Izbor unutarnjih standarda.....	28
4.4.4.	Optimizacija postupka ekstrakcije	29
4.5.	Validacija metode.....	29
5.	REZULTATI I RASPRAVA	31
5.1.	Izbor kromatografske kolone za GC-MS	31
5.2.	Optimizacija GC-MS metode.....	33
5.3.	Izbor unutarnjih standarda.....	38
5.4.	Optimizacija postupka ekstrakcije	39
5.5.	Validacija metode.....	46
5.6.	Rezultati analize realnih uzoraka	53
7.	Popis literatura:	59
	SAŽETAK.....	62

1. UVOD

Kemijski laboratorij Državnog hidrometeorološkog zavoda provodi sustavno praćenje kvalitete zraka putem analize uzoraka prikupljenih u oborinama, zraku te na filtrima PM₁₀ čestica. To obuhvaća praćenje koncentracija policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) na mjernim postajama diljem Hrvatske.

PAU predstavljaju značajnu skupinu onečišćujućih tvari zbog svojih kancerogenih, mutagenih i potencijalno teratogenih svojstava. Njihova prisutnost u okolišu izravno utječe na zdravlje ljudi i ekosustava. Među njima se osobito izdvaja benzo[*a*]piren, koji se u okolišu nalazi u prisutnosti ostalih PAU. Ovi spojevi nastaju kao produkt nepotpunog izgaranja ili pirolize organskih tvari, primjerice tijekom sagorijevanja fosilnih goriva, biomase, duhana te pri određenim industrijskim procesima. Zbog toga se u većoj mjeri nalaze u zraku i oborinama urbanih i industrijskih sredina. S obzirom na njihov štetan utjecaj, kontinuirano praćenje njihove koncentracije i izvora u okolišu ključno je za procjenu rizika i donošenje mjera zaštite okoliša i ljudskog zdravlja. Za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika u okolišnim matricama jedna od najčešće korištenih analitičkih tehnika je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS). Ova metoda kombinira visoku razlučivost plinske kromatografije u razdvajanju sastojaka složenih smjesa sa specifičnošću i osjetljivošću spektrometrije masa, koja omogućuje preciznu identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih analita. GC-MS tehnika osobito je pogodna za analizu policikličkih aromatskih ugljikovodika zbog njihove stabilnosti i hlapljivosti pri povišenim temperaturama, a uz odgovarajuću pripremu uzoraka moguće je postići vrlo niske granice detekcije i kvantifikacije koje zadovoljavaju zakonski propisane kriterije. Korištenjem unutarnjih standarda moguća je korekcija gubitaka tijekom pripreme uzoraka čime se povećava točnost određivanja. Upravo zbog ovih prednosti GC-MS se u velikom broju laboratorija diljem svijeta smatra zlatnim standardom za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika u zraku, vodi, tlu i oborinama [1].

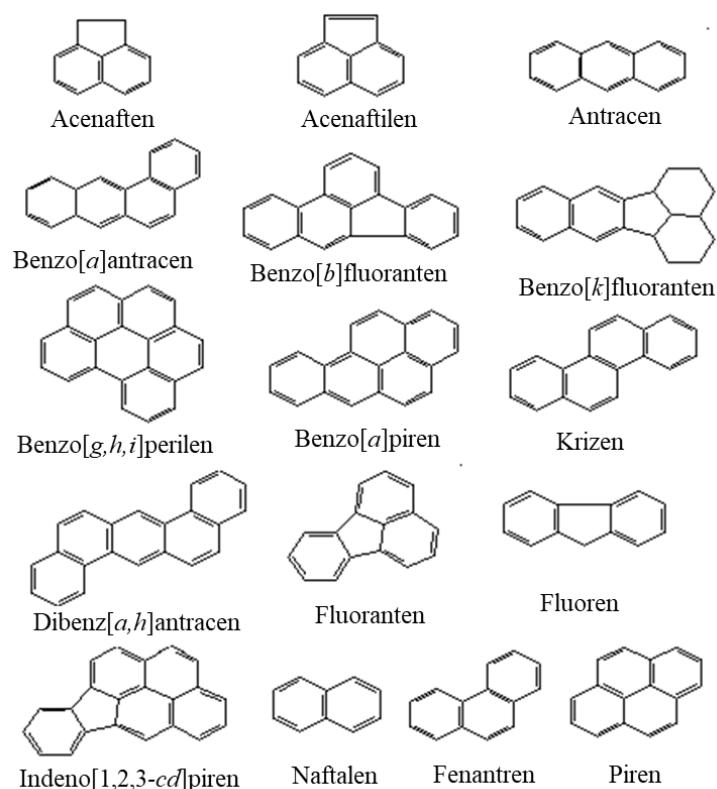
U ovom radu optimirani su uvjeti pripreme uzoraka za GC-MS analizu u odnosu na do sada korištenu metodu, s ciljem poboljšanja osjetljivosti i ponovljivosti, smanjenja utjecaja matrice ili gubitka analita te skraćivanja ukupnog vremena pripreme uzorka. Optimalni uvjeti određivani su za postupak pripreme uzorka za analizu, postupak ekstrakcije i GC-MS analizu. Potvrda da metoda i dalje zadovoljava sve propisane kriterije provedena je postupkom validacije metode.

2. TEORIJSKI UVOD

2.1. Policiklički aromatski ugljikovodici

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU ili PAH od engl. riječi *polycyclic aromatic hydrocarbons*) predstavljaju veliku skupinu organskih spojeva koji sadrže dva ili više kondenziranih aromatskih prstenova (Slika 1). Nastaju prilikom nepotpunog izgaranja ili pirolize organskih tvari, tijekom procesa proizvodnje ugljena, sirove nafte, benzina i goriva, prirodnog plina te lakih i teških metala. Također, mogu nastati kao produkt prirodnih procesa poput karbonizacije ili kao posljedica velikih šumskih požara i vulkanskih erupcija [2]. Nastaju i spaljivanjem otpada i plastičnih masa u nekontroliranim uvjetima. U zraku se nalaze u niskim koncentracijama, a njihova koncentracija raste zimi zbog povećane upotrebe drva ili ugljena za grijanje te zbog veće potrošnje goriva u vozilima. Izgaranjem dizelskih goriva u atmosferu se pretežno ispuštaju PAU niže molekulske mase, dok motori na benzin emitiraju spojeve veće molekulske mase. Duhanski dim je značajan izvor PAU u zraku jer sadrži vrlo visoke koncentracije. PAU se lakše vežu na čestice u zraku, poput PM_{10} i $PM_{2,5}$ na niskim temperaturama. Također, manje sunčevog zračenja i niže temperature usporavaju fotokemijske reakcije koje razgrađuju PAU u atmosferi i zbog toga se oni dulje zadržavaju u zraku [3]. Urbani i gusto naseljeni gradovi su najizloženiji visokim koncentracijama PAU zbog konstantnog porasta broja motornih vozila. Ljudi su izloženi PAU ne samo putem udisanja zraka, već i konzumacijom hrane uzgojene u tlu ili na područjima s povišenim koncentracijama ovih spojeva u zraku. Također, mogu se akumulirati u vodenim organizmima te prenositi kroz hranidbeni lanac [4].

Policiklički aromatski ugljikovodici su široko rasprostranjeni u okolišu zbog velikog broja izvora i načina na koji tamo dopijevaju. PAU s manjom molekulskom masom se najčešće nalaze u plinovitom obliku, dok su oni veće mase u čvrstom agregatnom stanju te imaju izraženije kancerogeno djelovanje. Imaju visoka tališta i vrelišta, a nizak tlak para. Slabo su topljivi u vodi, ali se jako dobro otapaju u organskim otapalima. PAU veće molekulske mase imaju smanjenu hlapljivost i topljivost u vodi te im hidrofobnost raste. Lako se vežu na organske i anorganske čestice pa ih zbog toga najviše ima u tlu (95%), zatim u vodi (<5%) pa u zraku (oko 0,2%) [5].



Slika 1. Struktura policikličkih aromatskih ugljikovodika

Praćenjem koncentracija PAU u Hrvatskoj bavi se Sektor za kvalitetu zraka Državnog hidrometeorološkog zavoda. Podatci s postaja na kojima se prikupljaju PM₁₀ čestice, šalju se u EBAS - globalnu bazu podataka mjerenja kemijskog sastava i fizikalnih svojstava atmosfere uspostavljene u okviru Programa suradnje za praćenje i procjenu daljinskog prijenosa atmosferskog onečišćenja u Europi (engl, *European Monitoring and Evaluation Programme*, EMEP) za potrebe dugoročnog praćenja i istraživanja atmosferskih procesa i pojava prekograničnog, daljinskog prijenosa i taloženja onečišćenja.

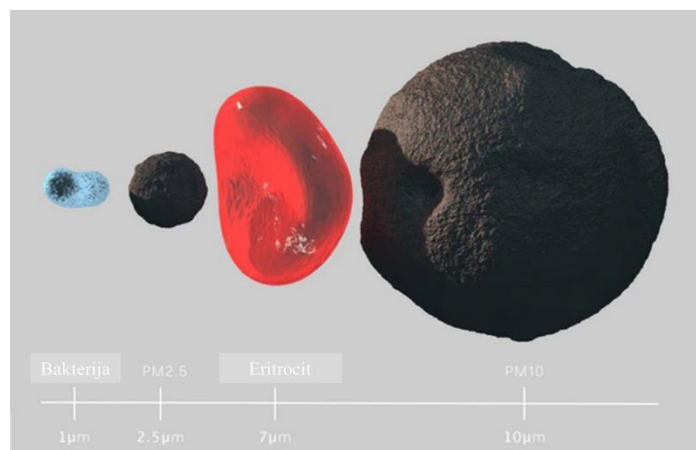
2.1.1. Benzo[a]piren

Pronađeno je na stotine različitih PAU u okolišu, a najviše proučavan je benzo[a]piren zbog svoje velike kancerogenosti i rasprostranjenosti u okolišu. Benzo[a]piren se često koristi kao indikator prisutnosti i ukupne razine PAU u okolišu jer se uvijek javlja u prisutnosti ostalih PAU [6]. Industrije i poslovi u kojima je izmjerena i prijavljena profesionalna izloženost benzo[a]pirenu uključuje: ukapljivanje ugljena, rasplinjavanje ugljena, proizvodnju koksa i koksne peći, destilaciju katrana, krovopokrivačke i radove popločavanja (uključujući smolu od katrana), impregnaciju/konzervaciju drva kreozotom, proizvodnju aluminija (uključujući

proizvodnju anoda), proizvodnju ugljičnih elektroda, čišćenje dimnjaka i elektrane. Najviše razine izloženosti PAU uočene su u proizvodnji aluminija (Söderbergov proces) s vrijednostima do $100 \mu\text{g m}^{-3}$ [4]. Metaboliti benzo[a]pirena dokazano su mutageni i kancerogeni, a prema IARC-u (Međunarodna agencija za istraživanje raka, engl. *International Agency for Research on Cancer*) benzo[a]piren spada u kancerogenu skupinu 1 – dokazano kancerogen za ljude. Benzo[a]piren se u jetri i plućima pretvara u benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid (BPDE), koji spada u enzime iz skupine citokroma P450. BPDE reagira s DNA i stvara adukt BPDE-dG koji ima utvrđen rizik za uzrokovanja raka pluća. Postoje i testovi koji su dokazali mutagenost i teratogenost benzo[a]pirena [7]. Zbog svega nabrojanoga, jako je bitno pratiti koncentraciju PAU u različitim uzorcima s obzirom da se u organizam mogu unositi udisanjem onečišćenog zraka ili putem hrane. Jedna od metoda za određivanje PAU je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa koja može pouzdano identificirati i kvantificirati PAU spojeve.

2.1.2. PM₁₀ čestice

Prema Europskoj agenciji za okoliš (EEA) PM₁₀ čestice su lebdeće čestice aerodinamičkog promjera manjeg ili jednakog 10 mikrometara (μm). Opasne su zbog svoje veličine (Slika 2) jer mogu dospjeti u pluća i izazvati ozbiljne zdravstvene probleme. U njihovom sastavu često se nalaze teški metali (poput olova, nikla, arsena i kadmija) te policiklički aromatski ugljikovodici, što dodatno povećava njihov štetni učinak. Prema Zakonu o zaštiti zraka i Uredbi o graničnim vrijednostima onečišćujućih tvari u zraku u službenom monitoringu od 2006. godine određuju se PM₁₀ čestice, a uz njih i teški metali poput olova, kadmija, mangana, nikla i arsena koji vezani na PM₁₀ čestice [8]. Praćenje PAU zakonski je definirano 2005., ali je njihovo praćenje započelo tek od 2016. Čestice PM₁₀ široko se koriste kao pokazatelj kvalitete zraka [9]. Međutim, kemijski sastav tih čestica i povezana toksičnost, genotoksičnost i štetni učinci na zdravlje mogu se značajno razlikovati ovisno o mjestu uzorkovanja, meteorološkim uvjetima i doprinosima prijenosa na velike udaljenosti [8].



Slika 2. Usporedba veličine $PM_{2.5}$ i PM_{10} čestica s bakterijom i eritrocitom [10]

2.2. Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika razdvajanja smjese spojeva na pojedine komponente temeljem njihove različite brzine kojom putuju kroz nepokretnu (stacionarnu) fazu nošene pokretnom (mobilnom) fazom. Osim za razdvajanje smjese spojeva, služi i za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Pokretna faza je plin u plinskoj kromatografiji ili kapljevina u tekućinskoj kromatografiji, a služi za transport analita kroz kolonu. Nepokretna faza je fiksirana unutar kolone ili na podlozi i može biti čvrsta tvar ili tekućina vezana na čvrstu inertnu podlogu. Kemijski spojevi imaju različito vrijeme zadržavanja na nepokretnoj fazi ovisno o njihovoj polarnosti, veličini molekula, hlapljivosti i topljivosti. Eluiranje je postupak ispiranja analita adsorbiranih na čvrstu podlogu pomoću otapala [11]. Pokretna faza i analit koji su prošli kroz nepokretnu fazu zajedno čine eluat, koji se zatim analizira. Kromatogram je grafički prikaz rezultata kromatografske analize koji na x -osi ima prikazano vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme), a na y -osi ima prikazan odziv detektora, koji je proporcionalan količini analita koja prolazi kroz detektor [12]. Vrijeme zadržavanja predstavlja vrijeme koje je prošlo od trenutka injektiranja uzorka do izlaska analita iz kolone. Svaka komponenta smjese daje pik na kromatogramu koji ima svoje vrijeme zadržavanja i površinu ili visinu. Kvalitativna analiza odvija se preko vremena zadržavanja i odziva detektora (najčešće spektrometra masa), a kvantitativna analiza rezultata provodi se preko visine (h) i površine (A) pika [13].

2.2.1. Podjela kromatografskih tehnika

Kromatografske metode dijele se na kolonska i plošna kromatografija. U plošnoj kromatografiji nepokretna faza je tanka ploča (npr. silicijska gel, staklena ili aluminijska ploča) ili papir na koji se nanosi uzorak, a pokretna faza putuje po ploči kapilarnom silom ili gravitacijom. Spojevi iz smjese razdvajaju se prema različitim afinitetima prema nepokretnoj fazi i otapalu. Plošna kromatografija dijeli se prema vrsti nepokretne faze na tankoslojnu kromatografiju (engl. *thin layer chromatography*, TLC) i kromatografiju na papiru [14]. Za identifikaciju spojeva koristi se faktor zadržavanja (R_F) koji se računa kao omjer udaljenosti koju je spoj prešao u odnosu na udaljenost koju je prešla fronta pokretne faze. Faktor zadržavanja je bezdimenzijska veličina i vrijednost mu je između 0 i 1 [13].

U kolonskoj kromatografiji uzorak se uvodi u kolonu ispunjenu nepokretnom fazom, a pokretna faza prolazi kroz kolonu pri čemu dolazi do razdvajanja spojeve iz smjese na temelju različitih afiniteta prema pokretnoj i nepokretnoj fazi što se očituje u različitim vremenima zadržavanja [14]. Dijeli se na tri osnovna tipa prema vrsti pokretne faze, a to su plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC), tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC) i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC). Plinska i tekućinska kromatografija dalje se mogu podijeliti prema nepokretnoj fazi. Plinska kromatografija dijeli se na plinsko-adsorpcijsku kromatografiju (engl. *gas-solid chromatography*, GSC) i plinsko-tekućinsku kromatografiju (engl. *gas-liquid chromatography*, GLC). Tekućinska kromatografija dijeli se na adsorpcijsku, razdjelnu, ionsko-izmjenjivačku, kromatografiju isključenjem i afinitetnu kromatografiju [15].

2.2.1.1. Plinska i tekućinska kromatografija

Pokretna faza u plinskoj kromatografiji je inertni plin poput N_2 , He, Ar, H_2 . Separacija spojeva unutar smjese provodi se na temelju različite hlapljivosti spojeva i interakcije s nepokretnom fazom koja je čvrsto vezana na podlogu unutar kolone. Spojevi koji se određuju moraju biti hlapljivi i dobro topljivi u plinu koji se koristi kao pokretna faza. Plinska kromatografija je vrlo osjetljiva i selektivna metoda koja često dolazi u kombinaciji sa spektrometrijom masa za identifikaciju organskih spojeva [16]. U plinskoj kromatografiji uobičajeno se koriste se 4 vrste detektora, a to su plamenoionizacijski detektor (engl. *flame ionization detector*, FID), detektor toplinske vodljivosti (engl. *thermal conductivity detector*, TCD), detektor zahvata elektrona

(engl. *electron capture detector*, ECD) i plamenofotometrijski detektor (engl. *flame photometric detector*, FPD) [17].

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina (eluens) koja prolazi kroz kolonu koja je ispunjena nepokretnom fazom. Separacija spojeva iz smjese provodi se na temelju interakcije analita s nepokretnom i pokretnom fazom, odnosno na temelju različitih afiniteta spojeva prema dvije faze. LC i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) pogodne su za analizu spojeva nestabilnih pri povišenim temperaturama i polarnih spojeva koji se ne mogu lako ispariti. U tekućinskoj kromatografiji koriste se različiti detektore za kvantifikaciju spojeva kao što su UV/VIS detektor, fluorescencije (engl. *fluorescence detector*, FLD) i elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*, ECD) [18].

2.2.2. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Vezana instrumentalna tehnika, plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) razvila se zbog potrebe za nedvosmislenom identifikacijom komponenti u složenim biološkim i nebiološkim uzorcima. Ova metoda koristi plinsku kromatografiju za razdvajanje komponenti smjese te za njihovu kvantifikaciju i spektrometriju masa za identifikaciju pojedinačnih komponenti. Koristi se za odvajanje komponenti složenih smjesa, njihovu identifikaciju i kvantifikaciju, identifikaciju nepoznatih pikova i određivanje razina onečišćenja u tragovima [19]. Kada se ove metode koriste zajedno to povećava njihove pojedinačne specifičnosti i osjetljivost čime je omogućena istovremena kvantitativna i kvalitativna analiza složenih smjesa koje mogu imati stotine spojeva. Uređaj za GC-MS sadrži dva glavna bloka, a to su plinski kromatograf i spektrometar masa. Plinski kromatograf sadrži jedinicu za ubrizgavanje uzorka u koju se smješta tekući uzorak koji se uparava pri visokoj temperaturi (najčešće 300 °C) te kromatografsku kolonu koja sadrži nepokretnu fazu i služi za razdvajanje komponenata ispitivane smjese [20].

Analiza na GC-MS instrumentu započinje u plinskom kromatografu pri čemu se uzorak unosi pomoću injektora i zagrijava se do plinovitog stanja, zatim se pomoću pokretne faze kreće kroz nepokretnu fazu u koloni te dolazi do razdvajanja komponenata smjese uslijed interakcija sa nepokretnom fazom. Postoje dva načina ubrizgavanja uzorka, a to su vruće i hladno ubrizgavanje. Vruće ubrizgavanje još može biti podijeljeno (samo jedan dio uzorka se ubrizgava u kolonu), nepodijeljeno (sav uzorak se ubrizgava u injektor, ali ne ide odmah u

kolonu) i ubrizgavanje ukupnog volumena (sav uzorak se ubrizgava direktno u kolonu). Uzorci kapljevina ubrizgavaju se u rasponu volumena od 1 do 2 μL .

Kada komponente izađu iz GC kolone, putuju prema spektrometru masa koji se sastoji od izvora iona, analizatora i detektora. Komponente prvo dolaze do izvora iona u kojemu se ioniziraju i fragmentiraju pomoću elektronskih ili kemijskih izvora ionizacije. Takve ionizirane molekule i fragmenti odlaze do analizatora masa, najčešće je to kvadrupol, koji omogućuje razdvajanje fragmenata na temelju omjera mase i naboja (m/z). Analizator pretvara ionizirane čestice u električni signal, koji se potom detektira i bilježi kao spektar masa karakterističan za pojedini spoj. Što je koncentracija komponente veća, to je veći elektronski signal koji ubrzani fragmentirani ioni stvaraju.

Primjena GC-MS instrumenta je raznolika, a izdvaja se njegova primjena u forenzici u kojoj uzorci koji dolaze na analizu sadrže složene matrice. Veliku primjenu ima u analizi hrane i pića kojom se mora potvrditi je li ona sigurna za konzumaciju. U analizi okoliša, primjenjuje se za praćenje onečišćenja u zraku, tlu i vodi, a posebno je koristan u analizi hlapljivih organskih spojeva, pesticida i policikličkih aromatskih ugljikovodika [17].

2.3. Validacija

Svaka nova razvijena analitička metoda mora biti validirana kako bi se osiguralo da metoda daje pouzdane i točne analitičke rezultate. Validacija je postupak utvrđivanja prikladnosti analitičke metode za svrhu za koju je namijenjena [21]. Svakoju metodi pristupa se individualno te se određuje koje je izvedbene karakteristike potrebno ispitati za njenu validaciju. Osam je osnovnih izvedbenih karakteristika koje se koriste prilikom postupka validacije: selektivnost, linearnost, preciznost (ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost), istinitost, granica detekcije, granica kvantifikacije, radno područje i robusnost. Ispitivanjem ovih izvedbenih karakteristika provodi se postupak validacije potpuno nove metode ili postojeće metode koja se prilagodila novoj svrsi. Validaciji se može pristupiti na dva načina, a to su međulaboratorijska ispitivanja ili unutarlaboratorijska ispitivanja, ovisno o tome koliko će široku primjenu metoda imati. Međulaboratorijska ispitivanja provode se u dva ili više laboratorija koji ispituju isti uzorak uz unaprijed definirane uvjete, a koriste se prilikom razvijanja metode široke primjene. Unutarlaboratorijsko ispitivanje provodi se kada je određena metoda razvijena za potrebe jednog laboratorija i provodi se u različitim uvjetima analize istih uzoraka [21, 22].

Sposobnost metode da pouzdano mjeri ciljane analite u prisutnosti drugih komponenti poput nečistoća i sastojaka matrice, naziva se selektivnost i spada u jednu od najbitnijih izvedbenih karakteristika koje se ispituju tijekom validacije.

Linearnost analitičke metode predstavlja sposobnost metode da daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita unutar određenog koncentracijskog područja. U kromatografiji se linarnost određuje preko odnosa površine pika/visine pika i koncentracije analita. Za procjenu linearnosti koriste se statistički pokazatelji, najčešće koeficijent determinacije (R^2) kojemu je vrijednost u idealnom slučaju 1. Za dokazivanje linearnosti potrebno je izraditi kalibracijsku krivulju te odrediti nagib pravca, odsječak i koeficijent determinacije. Nagib kalibracijskog pravca govori o osjetljivosti metode, metoda je osjetljivija što je veći nagib pravca [22].

Točnost je bliskost slaganja između izmjerene vrijednosti i prave vrijednosti mjerne veličine, a kvantitativno se iskazuje kao mjerna nesigurnost rezultata ispitivanja. Točnost se ispituje procjenom sustavne i slučajne pogreške, odnosno istinitosti i preciznosti [23].

Preciznost metode odnosi se na stupanj podudarnosti između pojedinačnih rezultata mjerenja dobivenih ponavljanjem analize istog uzorka, pri istim uvjetima analize. Kvantitativno se iskazuje se kroz standardno odstupanje (s) ili relativno standardno odstupanje (RSD). Preciznost se ispituje kao ponovljivost, međupreciznosti i obnovljivost. Ponovljivost se odnosi na ispitivanje u jednom laboratoriju u kratkom periodu, a analize provodi isti analitičar. Međupreciznost se odnosi na ispitivanje u jednom laboratoriju, ali kroz duži vremenski period a analize provode različiti analitičari. Obnovljivost se određuje provođenjem ispitivanja istog uzorka u više laboratorija uz primjenu iste analitičke metode [22].

Istinitost označava stupanj slaganja između prosječne vrijednosti dobivenih rezultata i prave vrijednosti koncentracije analita u uzorku. Na ovaj način određuje se sustavna pogreška metode. U praksi se procjenjuje usporedbom dobivenih rezultata s certificiranom vrijednosti referentnog uzorka ili obogaćivanjem matrice uzorka poznatom koncentracijom analita [21, 22].

Granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) predstavlja najmanju koncentraciju analita koja se može pouzdano detektirati analitičkom metodom, ali ne mora se nužno moći kvantificirati. Signal analita je moguće jasno razlikovati u odnosu na šumove. Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) označava najmanju koncentraciju koju je moguće pouzdano kvantitativno odrediti. Određivanje granica detekcije i kvantifikacije može

se provesti preko omjera signala i šuma (S/N) u kojemu se za LOD uzima omjer 3:1, a za LOQ omjer 10:1. Također se može odrediti na temelju standardnog odstupanja i nagiba pravca [24].

Radno područje metode predstavlja raspon koncentracija analita unutar kojeg je metoda dokazano linearna, precizna i istinita. Radno područje obuhvaća granicu kvantifikacije koja je ujedno i donja granica radnog područja, a gornja granica je koncentracija nakon koje dolazi do značajnih odstupanja osjetljivosti metode. Ispituje se raspon radnog područja ovisno o potrebama metode i koncentracijama analita u realnim uzorcima koji će se analizirati [21].

Robusnost predstavlja sposobnost metode da pri malim promjenama uvjeta rada daje pouzdane rezultate analize. Metoda je robusna ako ne dolazi do značajnih promjena u rezultatima analize nakon promjene jednog ili više radnih uvjeta. Pokazuje nam i koji uvjeti najviše utječu na rezultate analize pa ih je zbog toga potrebno održavati u granicama koje ne utječu na rezultate analize [21].

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati i validirati analitičku metodu koja će omogućiti točno kvantitativno određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika u PM₁₀ česticama. Validirana metoda omogućit će pouzdano praćenje onečišćenja zraka uslijed prisutnosti PAU. Kvantitativna analiza koncentracija onečišćujućih tvari u različitim frakcijama PM čestica pruža uvid u promjene u atmosferi. Zbog toga je kontinuirano praćenje njihove prisutnosti u frakcijama PM₁₀ čestica ključno za pravovremeno prepoznavanje mogućih problema i donošenje mjera usmjerenih na smanjenje rizika za okoliš i zdravlje ljudi.

Specifični ciljevi

1. Optimizacija postupka pripreme uzoraka PAU na PM₁₀ česticama
2. Optimizacija kromatografske metode GC-MS za kvantitativno određivanje PAU
3. Validacija optimirane metode
4. Primjena optimirane i validirane metode u analizi realnih uzoraka PM₁₀ čestica

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivane tvari

Policiklički aromatski ugljikovodici koji su ispitivani tijekom eksperimentalnog dijela rada prikazani su u tablici 1. Za provedbu ispitivanja korištena je otopina referentnog standarda *PAH Mixture 933* proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka) u kojem su analiti prisutni u koncentraciji $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ u diklormetanu.

Tablica 1. Ispitivani PAU te njihove kemijske formule.

NAZIV	KRATICA	KEMIJSKA FORMULA
Naftalen	Nap	C_{10}H_8
Acenaftilen	Anl	C_{12}H_8
Acenaften	Ane	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}$
Fluoren	Fln	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}$
Fenantren	Phen	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}$
Antracen	Ant	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}$
Fluoranten	Flt	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}$
Piren	Pyr	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}$
Benzo[<i>a</i>]antracen	BaA	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$
Krizen	Chry	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	BbF	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	BkF	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	BjF	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Benzo[<i>a</i>]piren	BaP	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Perilen	Per	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	InP	$\text{C}_{22}\text{H}_{12}$
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	DahA	$\text{C}_{22}\text{H}_{14}$
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	BghiP	$\text{C}_{22}\text{H}_{12}$

4.2. Instrumenti

4.2.1. Uređaj za ekstrakciju krutih i polukrutih uzoraka

Uređaj ASE 350 (Dionex, Sunnyvale, SAD) (Slika 3) je sustav namijenjen za ubrzanu ekstrakciju otapalom (engl. *accelerated solvent extraction*, ASE) spojeva iz krutih ili polukrutih uzoraka pri visokom tlaku i temperaturi. Filtri na kojima se nalaze PM_{10} čestice, stavljaju se u ekstrakcijske ćelije (Slika 4) i zatim se prenose na instrument. Za ekstrakciju su potrebni mali volumeni otapala, a ona mogu biti organska otapala poput diklormetana, metanola, acetona i

toluena, vodena otapala, kiseline ili lužine. U ovom radu korišten je diklormetan jer je pogodan za ekstrakciju nepolarnih spojeva, dobro podnosi visoke tlakove i ima nisko vrelište što u sljedećem koraku omogućava lakše uparavanje uzorka. Instrument je spojen cjevčicama s tri spremnika u kojima se nalazio aceton, metanol i diklormetan. Aceton i metanol koriste se za ispiranje instrumenta, a diklormetan je otapalo za ekstrakciju. Najbitnije karakteristike instrumenta su smanjeno vrijeme ekstrakcije zbog visoke temperature i tlaka, smanjena potrošnja otapala u odnosu na druge ekstrakcijske metode, kemijska inertnost te mogućnost automatske ekstrakcije, filtracije i pročišćavanja 24 uzorka istovremeno.



Slika 3. Uređaj za ekstrakciju krutih i polukrutih uzoraka Dionex ASE 350.



Slika 4. Ekstrakcijske ćelije za uređaj ASE 350.

4.2.2. Uređaj za automatizirano uparavanje otapala

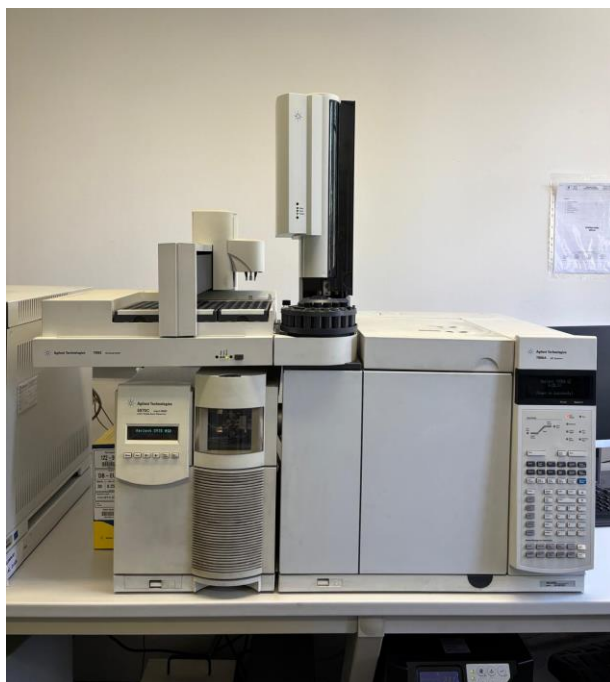
Sustav Dry-Vap proizvođača Horizon Technology (Salem, SAD) (Slika 5) automatizira uparavanje otapala i ukoncentriravanje uzorka koje se provodi prije GC-MS analize. Koristi kombinaciju vakuumu, topline i struje dušika za brzo uparavanje i koncentriranje uzorka do željenog volumena. Uvođenjem automatiziranog postupka ukoncentriravanja smanjuje se rizik od pogrešaka svojstvenih ručnom radu. Korištenje Dry-Vap sustava omogućuje dobivanje visoko ponovljivih rezultata.



Slika 5. Sustav Dry-Vap.

4.2.3. Plinski kromatograf spregnut sa spektrometrijom masa (GC-MS)

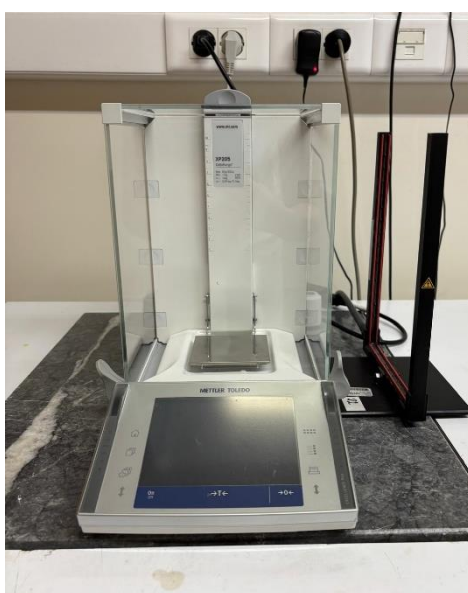
Za provođenje GC-MS analize u ovom radu korišten je Agilent 7890A GC-MS proizvođača Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) (Slika 6). Instrument je povezan sa softverom MassHunter u kojemu je moguće razviti metodu s brзом i pouzdanom identifikacijom spojeva koristeći njihove m/z vrijednosti i vremena zadržavanja. Pokrenta faza je inertni plin helij, a nepokretna faza ovisi o koloni koja se koristi za analizu, najčešće je to univerzalna kolona koja u svom sastavu sadrži 5% fenila i 95% dimetilsiloksana. Za provedbu ovoga rada korištena je kolona *Select PAH* koja sadrži posebno modificirana fenilpolisiloksansku fazu koja je optimirana za odvajanje PAU s naglaskom na izomere PAU.



Slika 6. Plinski kromatograf spregnut s masenim spektrometrom Agilent 7890A.

4.2.4. Analitička vaga

Za vaganje filtera na kojima se prikupljaju PM_{10} čestice iz zraka korištena je analitička vaga DeltaRange XP205 proizvođača Mettler Toledo (Columbus, SAD) (Slika 7). Potrebno je vagati filtere jer se PAU u PM_{10} česticama određuju primjenom dviju metoda: gravimetrije i GC-MS metode.



Slika 7. Analitička vaga DeltaRange XP205.

4.3. Metode rada

Za postupak određivanja policikličkih aromatskih ugljikovodika u frakciji lebdećih čestica PM₁₀ metodom plinske kromatografije vezane sa spektrometrijom masa potrebno je pripremiti temeljne otopine, unutarnji standard, surogatni standard, kontrolni standard (QC) te radne standarde za izradu kalibracijskih krivulja. Svi uzorci prolaze postupak ekstrakcije, uparavanja uzoraka na volumen od 1 mL te za kraj kromatografsku analizu. Rezultati analize obrađuju se u programu MassHunter Workstation-Quantitative analysis (Version 10.1.49). U nastavku su opisani svi postupci pripreme potrebnih standarda, postupci obrade uzoraka na instrumentima te analiza rezultata.

4.3.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljeni na mjernoj postaji Puntijarka koristeći uzorkivač PNS 16T-3.1 (Derenda). Svako uzorkovanje trajalo je 24 sata pri protoku zraka od 55,5 m³/h. PM₁₀ čestice sakupljane su na filterima od PTFE materijala (Fluoropore, Merck, FSL W01700) debljine 3 µm i promjera 47 mm. Nakon dva tjedna prikupljanja, uzorci su dostavljeni u Kemijski laboratorij, gdje su filteri pripremljeni za daljnju analizu.

4.3.2. Priprema temeljne standarde otopine

Temeljna standardna otopina priprema se iz ampule referentnog standarda *Standard EPA 610 PAH Mix* volumena 1 mL koja je otpipetirana u odmjernu tikvicu od 250 mL i nadopunjena diklormetanom do oznake. U referentnom standardu prisutni su svi ispitivani analiti u poznatim koncentracijama. Koncentracija benzo[*a*]pirena u temeljnoj standardnoj otopini iznosila je 400 ng mL⁻¹. Otopina je čuvana u hladnjaku na temperaturi između 0 °C i 8 °C. U tablici 2. prikazan je popis svih analita u referentnom standardu, zajedno s njihovim masenim koncentracijama, CAS brojevima, čistoćom i vremenima zadržavanja (RT).

Tablica 2. Sastav referentnog standarda *Standard EPA 610 PAH Mix*

Naziv	γ , $\mu\text{g mL}^{-1}$	CAS broj	Čistoća, %	RT, min
Naftalen	20,1	91-20-3	99,8	11,46
Acenaftilen	20,09	208-96-8	97,6	14,27
Acenaften	20,12	83-32-9	99,9	14,57
Fluoren	20,09	86-73-7	98,4	15,44
Fenantren	20,08	85-01-8	99,7	17,04
Antracen	20,09	120-12-7	99,5	17,13
Fluoranten	20,12	206-44-0	98,6	18,97
Piren	20,2	129-00-0	99,2	19,32
Benzo[<i>a</i>]antracen	20,08	56-55-3	98,7	21,10
Krizen	20,09	218-01-9	96	21,10
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	20,09	205-99-2	99,8	22,40
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	20,09	207-08-9	98,9	22,43
Benzo[<i>a</i>]piren	20,11	50-32-8	97	22,78
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	20,08	193-39-5	98	24,06
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	20,08	53-70-3	99,44	24,06
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	20,14	191-24-2	93	24,40

4.3.3. Priprema otopine unutarnjeg standarda

Unutarnji standard koristi se kako bi se umanjio utjecaj matrice ili gubitka uzorka tijekom postupka ekstrakcije. Otopina unutarnjeg standarda pripremljena je iz otopine standarda *PAH Mix 9 deuterated* volumena 1 mL koja je otpipetira u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i nadopunjena diklormetanom do oznake. Otopina je čuva u hladnjaku na temperaturi između 0 °C i 8 °C. Ova otopina je dodana uzorcima prije procesa ekstrakcije. Koncentracija unutarnjeg standarda u konačnom volumenu uzorka od 1 mL nakon ekstrakcije i uparavanja iznosila je 50 ng mL⁻¹. U tablici 3. nalazi se popis analita u unutarnjem standardu zajedno s njihovim koncentracijama, CAS brojevima, čistoćom i vremenima zadržavanja. Pripadajući unutarnji standardi su deuterirani spojevi ispitivanih analita.

Tablica 3. Sastav otopine *Internal Standards Mix 33*

Naziv	γ , $\mu\text{g mL}^{-1}$	CAS broj	Čistoća, %	RT, min
Naftalen D8	100,01	1146-65-2	98,1	4,86
Acenaften D8	100	93951-97-4	98,2	11,95
Acenaften D10	99,96	15067-26-2	98,1	13,15
Fluoren D10	100	81103-79-9	98,3	17,13
Fenantren D10	99,99	1517-22-2	97,4	25,77
Antracen D10	99,29	1719-06-8	98,9	26,26
Fluoranten D10	99,99	93951-69-0	98,5	38,17
Piren D10	99,99	1718-52-1	96,8	40,30
Benzo[<i>a</i>]antracen D12	99,99	1718-53-2	97,2	53,82
Krizen D12	100,01	1719-03-5	98,2	54,15
Benzo[<i>b</i>]fluoranten D12	100,01	93951-98-5	98,5	65,05
Benzo[<i>k</i>]fluoranten D12	100,01	93952-01-3	98,3	65,36
Benzo[<i>a</i>]piren D12	99,99	63466-71-7	97,7	67,87
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren D12	100	203578-33-0	99,6	77,82
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen D14	100	13250-98-1	98,2	78,26
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen D12	100,01	93951-66-7	97	79,68

4.3.4. Priprema otopine surogatnog standarda

Surogatni standard služi za provjeru učinkovitost iskorištenja ekstrakcije i kako bi se izvršila korekcija rezultata s obzirom na to iskorištenje. Surogatni standard odabran je tako da bude strukturno i fizikalno-kemijski što sličniji analiziranim policikličkim aromatskim ugljikovodicima s usporedivim vremenom eluiranja kako bi se omogućila normalizacija odziva odnosno pouzdana korekcija varijacija tijekom ekstrakcije i kromatografske analize. Stoga je surogat odabran tako da eluira u području kromatograma reprezentativnom za većinu ciljnih analita. U ovom radu korišten je perilen-d12, deuterirani izotop perilena koji je reprezentativan za veće PAU, dobro je topiv u uobičajenim otapalima i stabilan tijekom ekstrakcije i analize, a njegova sličnost s ciljanim analitima omogućuje precizno praćenje gubitaka i korekciju rezultata bez interferencije s prirodnim PAU u uzorku. Budući da različiti policiklički aromatski ugljikovodici eluiraju u različitim vremenskim intervalima, nijedan pojedinačni surogat ne može u potpunosti pratiti sve analite. U tu svrhu unutarnji standardi dodani su prije postupka ekstrakcije, tim više jer analiza plinskom kromatografijom sama ne uvodi značajne pogreške u instrumentalnom odzivu.

4.3.5. Priprema radnih standarda za izradu kalibracijskih krivulja

Pripremljeno je 8 kalibracijskih otopina poznatih koncentracija analita i njihovih unutarnjih standarda koje su korištene za izradu kalibracijske krivulje. Pripremljene su dodavanjem određenog volumena temeljne standardne otopine (interne oznake MD66), surogatnog standarda, unutarnjeg standarda za surogat te unutarnjih standarda za sve analite u temeljnoj otopini (ISTD). Otopine su pripremane jednom tjedno i čuvane u hladnjaku na temperaturi između 0 °C i 8 °C. U tablici 4. prikazane su koncentracije svih analita u otopinama za pripremu kalibracijske krivulje.

Tablica 4. Sastav otopina za izradu kalibracijske krivulje

Oznaka	MD66, ng mL ⁻¹	Perilen D12, ng mL ⁻¹	Perilen, ng mL ⁻¹	ISTD, ng mL ⁻¹
L1	5	100	500	500
L2	10	250	500	500
L3	15	375	500	500
L4	20	500	500	500
L5	30	750	500	500
L6	40	1000	500	500
L7	50	1250	500	500
L8	60	1500	500	500

4.3.6. Priprema kontrolnog standarda

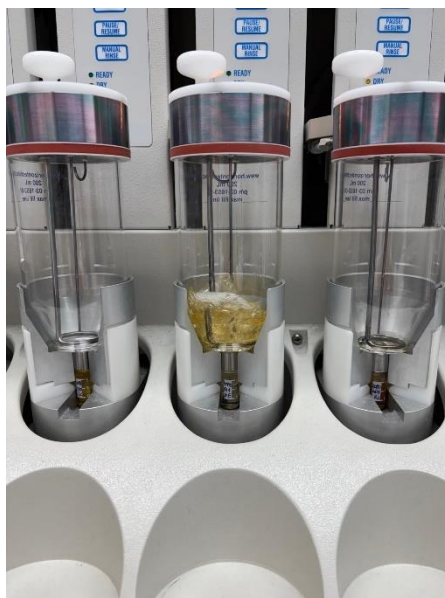
Kontrolni standard služi za kontrolu kvalitete, odnosno provjeru rada instrumenta GC-MS, njime se prati utjecaj sustavnih i slučajnih učinaka tijekom analize. Prilikom puštanja sekvence, odnosno analize uzoraka na instrumentu, kontrolni standard (QC) analiziran je na početku i na kraju sekvence. Temeljna otopina kontrolnog standarda pripremljena je tako da je 1 mL standarda PAH Mixture otpipetiran u odmjernu tikvicu od 100 mL i nakon toga tikvica je nadopunjen diklormetanom do oznake. Otopina je pripremljena iz ampule drugog proizvođača kako bi se osiguralo da instrument daje točne rezultate. Iz temeljne otopine pripremljena je radna otopina koncentracije 40 ng mL⁻¹ koja je korištena kao kontrolni standard.

4.3.7. Ekstrakcija uzoraka

Uzorci se iz filtera ekstrahirani ubrzanom ekstrakcijom otapalom (ASE) uz visoki tlak. Kao otapalo za ekstrakciju korišten je diklormetan, a prije početka definirani su uvjeti ekstrakcije poput broja ciklusa ekstrakcije, temperature pri kojoj se provodi ekstrakcija i volumena otapala. Konačni volumen ekstrakta iznosio je 26 mL i iz staklenih bočica nakon ekstrakcije prenesen je na sustav Dry-Vap na uparavanje.

4.3.8. Uparavanje uzoraka

Uzorak je nakon ekstrakcije prebačen na DRY-VAP sustav te je ispran diklormetanom. Nakon što je sav ekstrakt prošao kroz filter, isprane su i stijenke posude da dio PAU ne bi zaostao. Zatim je slijedilo uparavanje ekstrakta (Slika 8) uz povremeno ispiranje stijenki posude za isparavanje. Konačni volumen ekstrakta nakon uparavanja iznosio je 1 mL. Ekstrakt je prenesen u vialu koja se zatim stavlja na analizu plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrom masa na instrumentu GC-MS Agilent Technologies.



Slika 8. Uparavanje uzorka na DRY-VAP sustavu.

4.3.9. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrom masa

Postupak analize na instrumentu GC-MS kreće od kreiranja sekvence odnosno redoslijeda injektiranja koja sadrži popis uzoraka koji se analiziraju, uzorke radnih standarda za izradu kalibracijskih krivulja te kontrolne uzorke. Diklormetan se uvijek nalazi na početku sekvence i injektira se dva puta kako bi se osigurala stabilizacija sustava, uključujući postizanje ujednačene temperature kolone i konstantnog protoka plina, što omogućuje pouzdanu i reproducibilnu GC-MS analizu. Također, služi za uklanjanje potencijalnih onečišćenja prisutnih u uzorku s kolone i injektora, a zbog smanjenja prijenosa analita na nove uzorke povremeno se injektira i između uzoraka. Nakon njega injektiran je kontrolni standard pa zatim diklormetan, a onda radni standardi koji se analiziraju od najmanje do najveće koncentracije. Zatim slijedi ispiranje diklormetanom i potom uzorci. Ovisno o količini uzoraka, potrebno je povremeno kolonu ispirati diklormetanom, a na kraju analize uzoraka kolona se ispire dva puta. Na kraju svake analize još jednom se snima kontrolni standard i kolona se dva puta ispire diklormetanom. Analiza rezultata provedena je u programu MassHunter u kojem se integriraju pikovi i upisuju vremena zadržavanja pojedinih analita. Iz dobivenih rezultata izračunate su s i RSD vrijednost i iskorištenje prema formulama u nastavku:

Standardno odstupanje (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1)$$

gdje x_i predstavlja svaku pojedinačnu vrijednost u skupu podataka, $\bar{x}$ je aritmetička sredina svih vrijednosti skupa, a n je broj podataka.

Relativno standardno odstupanje (RSD):

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

gdje s predstavlja standardno odstupanje, a $\bar{x}$ aritmetičku sredinu skupa podataka.

Iskorištenje:

$$\eta (\%) = \frac{\gamma_{\text{eksperimentalno}}}{\gamma_{\text{teorijsko}}} \times 100 \quad (3)$$

gdje $\gamma_{\text{eksperimentalno}}$ predstavlja izmjerenu koncentraciju analita, a $\gamma_{\text{teorijsko}}$ predstavlja očekivanu (dodanu) koncentraciju analita.

4.4. Razvoj metode i optimizacija postupka pripreme uzoraka

Cilj ovoga rada bio je optimirati cijeli postupak pripreme uzoraka kako bi rezultati analize policikličkih aromatskih ugljikovodika u česticama PM₁₀ bili točniji. To možemo postići samo na način da svi pikovi u kromatogramu nakon GC-MS analize budu razlučeni i da imaju dovoljno velik odziv na kromatogramu. Kako bi se izgled pikova i njihova razlučenost u kromatogramu poboljšala potrebno je optimirati cijeli postupak određivanja policikličkih aromatskih ugljikovodika u uzorku. Zbog toga je provedena optimizacija svih postupaka kroz koje prolaze uzorci, a to uključuje:

- uvođenje novih unutarnjih standarda kako bi se osiguralo da svaki određivani analit (PAU) ima unutarnji standard što sličnijih fizikalno-kemijskih svojstva,
- optimizaciju postupka ekstrakcije uzoraka promjenom uvjeta ekstrakcije
- promjenu kromatografske kolone na instrumentu GC-MS u svrhu postizanja učinkovitijeg razdvajanja i razlučivanja i
- optimizaciju uvjeta rada spektrometra masa.

Prije analize rezultata potrebno je u program MassHunter upisati vremena zadržavanja analita i njihove m/z vrijednosti za kvantitativne i kvalitativne ione kako bi se mogli identificirati i kvantitativno odrediti. Kvantitativni ion je glavni ion koji se koristi za mjerenje koncentracije analita, ima najintenzivniji signal, stabilan je i reprezentativan. Kvalitativni ioni su dodatni ioni koji služe za potvrdu identiteta spoja usporedbom njihovih omjera s referentnim spektrom. Analiti se odvajaju po segmentima da bi se povećala osjetljivost i preciznost podataka jer se u svakom segmentu prati samo onaj skup iona koji je u segmentu koji se u to vrijeme analizira. U Tablici 5 prikazani su ispitivani PAU, zajedno sa segmentom u kojem se nalaze, kvantitativnim i kvalitativnim ionima i vremenima zadržavanja.

Tablica 5. Broj segmenta, kvantitativni ion, kvalitativni ioni i vrijeme zadržavanja za ispitivane analite

Naziv	Segment	Kvantitativni ion	Kvalitativni ioni	RT, min
Naftalen	1	128,1	127,1	2,10
Acenaftilen	1	152,1	151,1; 153,1	4,35
Acenaften	1	153,1	154,1; 152,1; 151,1	4,52
Fluoren	1	166,1	165,1; 164,2	5,39
Fenantren	2	178,1	176,0	8,43
Antracen	2	178,1	176,0	8,60
Fluoranten	3	202,1	200,10	14,53
Piren	3	202,1	200,10	16,22
Benzo[<i>a</i>]antracen	4	228,1	226,10	26,58
Krizen	4	228,1	226,10	26,99
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	5	252,1	250,1; 253,1	31,67
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	5	252,1	250,1; 253,1	31,82
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	5	252,1	250,1; 253,1	31,90
Benzo[<i>a</i>]piren	5	252,1	253,1; 250,10	34,14
Perilen D12	6	264,1	260,0	34,78
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	6	276,1	277,10	40,73
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	6	278,1	279,0; 276,10; 139,0	40,76
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	6	276,1	277,0	41,87

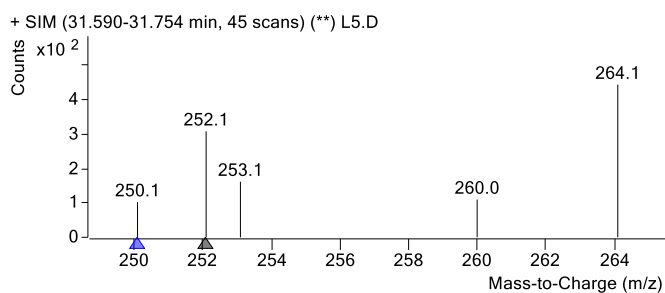
Vrijeme zadržavanja daje informaciju kada spoj izlazi iz kolone i ona je specifična za uvjete metode jer ovisi o vrsti kolone, temperaturi i pokretnoj fazi. Vrijednosti m/z govore o tome koji ioni čine spektar spoja, naziva se još i “otisak prsta” molekule u spektru masa. Kada imamo podatke o vremenu zadržavanja i m/z vrijednosti, tek tada je osigurana selektivnost i pouzdanost metode jer različiti spojevi mogu imati slično vrijeme eluiranja, a samo m/z vrijednost može biti nedovoljna informacija jer različiti spojevi mogu imati iste fragmente. Takav primjer su u ovom slučaju analiti fluoranten i piren i strukturni izomeri benzo[*b*]fluorantena, benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena koji imaju zajedničke kvantitativne ione, ali se mogu razlikovati prema vremenu zadržavanja. U Tablici 6 prikazani su korišteni unutarnji standardi, zajedno sa segmentom u kojem se nalaze, kvantitativnim i kvalitativnim ionima i vremenima zadržavanja.

Tablica 6. Broj segmenta, kvantitativni ion, kvalitativni ioni i vrijeme zadržavanja za unutarnje standarde ispitivanih analita

Naziv	Segment	Kvantitativni ion	Kvalitativni ioni	RT, min
Naftalen D8	1	136,2	137,2	2,00
Acenaftilen D8	1	160,0		4,33
Acenaften D10	1	153,1	154,1; 152,1; 251,1	4,46
Fluoren D10	1	176,0		5,32
Fenantren D10	2	188,2	189,20	8,34
Antracen D10	2	188,0		8,51
Fluoranten D10	2	212,0		14,40
Piren D10	2	212,0		16,08
Benzo[<i>a</i>]antracen D12	3	240,0		26,41
Krizen D12	4	240,2	241,2	26,83
Benzo[<i>b</i>]fluoranten D12	5	264,0		31,52
Benzo[<i>k</i>]fluoranten D12	5	264,0		31,68
Benzo[<i>a</i>]piren D12	5	264,1	253,10	33,96
Perilen	5	252,1		35,00
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren D12	6	288,0		40,64
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen D14	6	292,0		40,64
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen D12	6	288,0		41,76

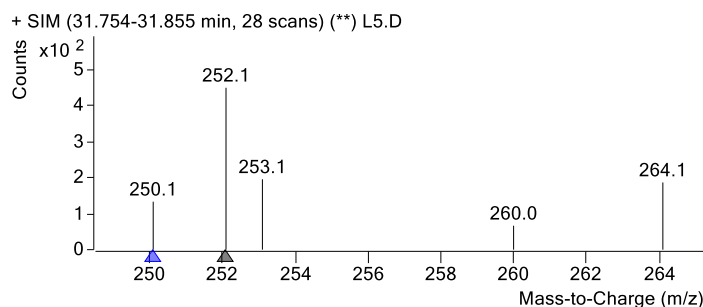
Iz tablice 6. može se vidjeti da indeno[1,2,3-*cd*]piren D12 i dibenz[*a,h*]antracen D14 imaju ista vremena zadržavanja na koloni, ali se mogu razlikovati prema kvantitativnim ionima. Ostali unutarnji standardi imaju različita vremena zadržavanja i zbog toga ih se jednostavno može identificirati i kvantificirati.

Na slikama 9 do 15 prikazani su spektri masa, odnosno grafički prikazi intenziteta iona u ovisnosti o njihovom omjeru masa/naboj (m/z) za odabrane analite. Sve slike preuzete su iz programa MassHunter u kojemu je provedena kvantitativna analiza uzoraka.

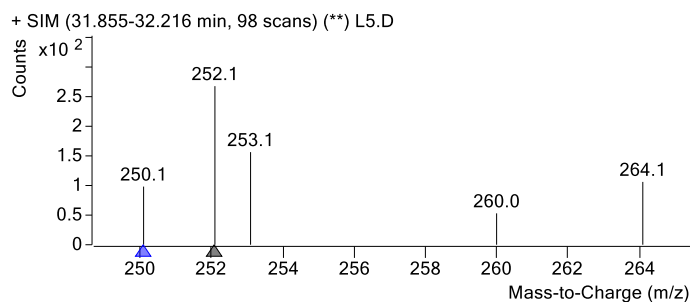


Slika 9. Spektar masa benzo[*b*]fluorantena

Spektar masa benzo[*b*]fluorantena sadrži kvantitativni ion m/z vrijednosti 252,1 i na spektru je jasno vidljivo da on daje najintenzivniji signal (Slika 9). Ostali ioni koji pripadaju benzo[*b*]fluorantenu imaju m/z vrijednosti 250,1 i 253,1 koji su manjeg intenziteta. Vrijednosti m/z koje su još prikazane na spektru masa 264,1 i 260,0 pripadaju perilenu D12.

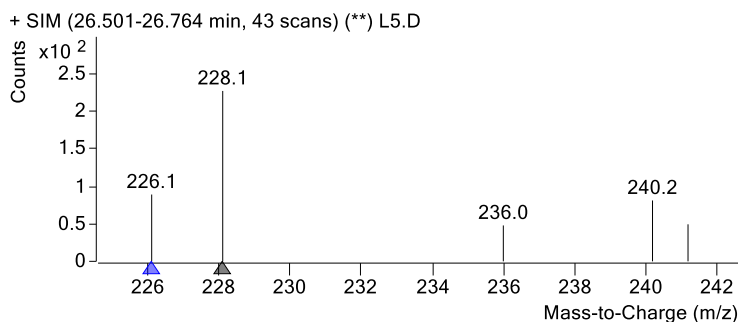


Slika 10. Spektar masa benzo[*k*]fluorantena



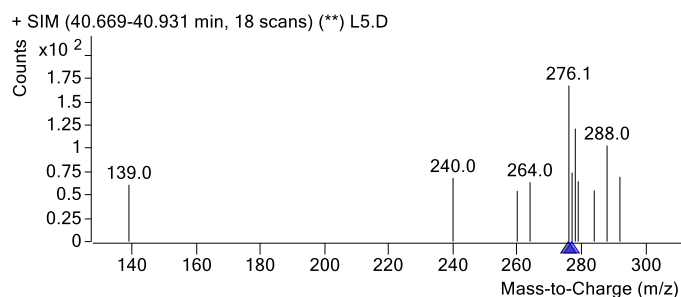
Slika 11. Spektar masa benzo[*j*]fluorantena

Na slikama 10 i 11 prikazani su spektri masa benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena koji dijele ione istih m/z vrijednosti zajedno s benzo[*b*]fluorantenom, ali ih razlikujemo po vremenima zadržavanja na koloni.

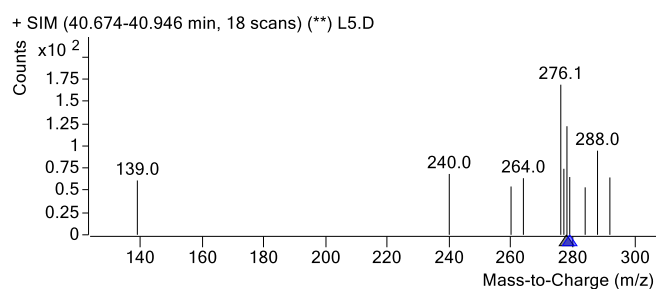


Slika 12. Spektar masa benzo[*a*]antracena

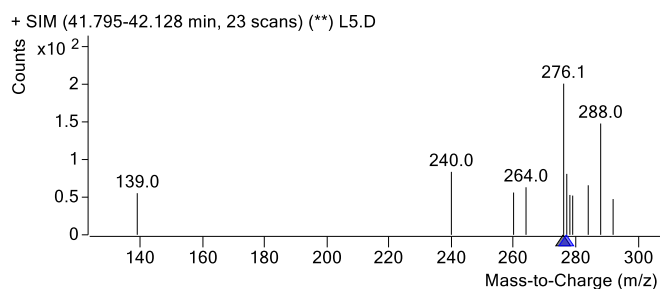
Na slici 12. prikazan je spektar masa benzo[*a*]antracena kojemu kvantitativni ion ima m/z vrijednost 228,1 i na spektru masa to je najintenzivniji ion, a kvalitativni ion ima m/z vrijednost 226,1.



Slika 13. Spektar masa indeno[1,2,3-*cd*]pirena



Slika 14. Spektar masa dibenz[*a,h*]antracena



Slika 15. Spektar masa benzo[*g,h,i*]perilena

Spektri masa PAU kao što su indeno[1,2,3-*cd*]piren, dibenz[*a,h*]antracen i benzo[*g,h,i*]perilen (Slika 13., 14, i 15.) karakterizirani su jednim dominantnim ionom uz više slabijih fragmenata što ih čini vrlo pogodnima za identifikaciju u GC-MS analizi.

4.4.1. Izbor kromatografske kolone

Kolona koja se koristi u instrumentu GC-MS najviše doprinosi razlučivosti pikova na kromatogramu. Kada analiti imaju bliska vremena zadržavanja, njihovi pikovi se znaju preklapati i zbog toga se ne može odrediti točna površina ispod pika za svaki analit. Najveća preklapanja pikova uočena su između analita benzo[*b*]fluorantena, benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena. Iako su ti spojevi izomeri i samim time kemijski slični, njihovi izvori nisu uvijek jednaki te se njihov utjecaj na ljude i okoliš razlikuje i zbog toga je potrebno njihovu koncentraciju pratiti zasebno. Da bi se postigla bolja razlučivost pikova svih analita s naglaskom na pikove benzo[*b*]fluorantena, benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena uvedena je nova kolona. Kolona *HP-5MS* proizvođača Agilent Technologies korištena je na instrumentu GC-MS, a zamijenjena je s kolonom *Select PAH* proizvođača Agilent Technologies (Slika 16) koja specifično služi za precizno razlučivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika.



Slika 16. Kromatografske kolone za instrument Agilent 7890A GC/MS

4.4.2. Optimizacija uvjeta rada na instrumentu GC-MS

Kako bi se postigla što bolja razlučivost pikova, a samim time olakšala detekcija i kvantifikacija spojeva, optimirani su i uvjeti rada na instrumentu Agilent 7890A GC-MS. Promijenjena je kromatografska kolona kako je opisano u prethodnom poglavlju i korišten je umetak *Ultra Inert Inlet Liners* proizvođača Agilent Technologies. Početna temperatura pećnice u kojoj je smještena kolona postavljena je na 70 °C, a zatim se postupno povećava do 325 °C, što predstavlja maksimalnu temperaturu koju kolona *Select PAH* može podnijeti. Plin koji je korišten kao pokretna faza je helij, a nepokretna faza ovisi o koloni. Uz uvjete rada, u programu MassHunter koji je povezan s instrumentom upisana su vremena zadržavanja te *m/z* vrijednosti kako bi se mogli identificirati spojevi koji se analiziraju.

4.4.3. Izbor unutarnjih standarda

Prilikom pripravljanja otopine analita u nju se dodaje otopina koja sadrži unutarnji standard za svaki pojedini analit iz uzorka (*PAH Mix 9 deuterated* proizvođača Dr. Ehrenstorfer). Cilj je dobiti što viša iskorištenja na kraju analitičkog procesa. Na ovaj način se najpouzdanije mogu umanjiti gubici tijekom analize i utjecaj matrice. Unutarnji standard mora biti što sličniji analitu po fizikalno-kemijskim svojstvima, a zbog toga se kao unutarnji standard za svaki analit dodaje njegov deuterirani spoj.

U tablici 7. prikazani su analiti te njihovi unutarnji standardi ovisno o standardu koji je korišten prilikom pripravljanja otopina. Standard *Internal Standards Mix 33* proizvođača Dr. Ehrenstorfer sadrži 6 unutarnjih standarda koji su podijeljeni na sve analite. Druga otopina unutarnjih standarda *PAH Mix 9 deuterated* sadrži unutarnje standarde za svaki pojedini analit, osim benzo[j]fluorantena, koji dijeli unutarnji standard s benzo[k]fluorantenom, budući da su to izomerni spojevi i slični su svojom strukturom i svojstvima, zajednički unutarnji standard benzo[k]fluoranten D12 odgovara svojim fizikalno-kemijskim svojstvima oba analita.

Tablica 7. Usporedba korištenih unutarnjih standarda za ispitivane analite.

NAZIV ANALITA	Internal Standards Mix 33	PAH Mix 9 deuterated
Naftalen	Naftalen D8	Naftalen D8
Acenaftilen	Naftalen D8	Acenaftilen D8
Acenaften	Acenaften D10	Acenaften D10
Fluoren	Acenaften D10	Fluoren D10
Fenantren	Fenantren D10	Fenantren D10
Antracen	Fenantren D10	Antracen D10
Fluoranten	Fenantren D10	Fluoranten D10
Piren	Fenantren D10	Piren D10
Benzo[a]antracen	Fenantren D10	Benzo[a]antracen D12
Krizen	Krizen D12	Krizen D12
Benzo[b]fluoranten	Krizen D12	Benzo[b]fluoranten D12
Benzo[k]fluoranten	Krizen D12	Benzo[k]fluoranten D12
Benzo[j]fluoranten	Krizen D12	Benzo[k]fluoranten D12
Benzo[a]piren	Benzo[a]piren D12	Benzo[a]piren D12
Perilen	Perilen D12	Perilen D12
Indeno[1,2,3-cd]piren	Perilen D12	Indeno[1,2,3-cd]piren D12
Dibenz[a,h]antracen	Perilen D12	Dibenz[a,h]antracen D14
Benzo[g,h,i]perilen	Perilen D12	Benzo[g,h,i]perilen D12

4.4.4. Optimizacija postupka ekstrakcije

U ovom radu, umjesto ranije primjenjivane mikrovalne ekstrakcije, korištena je ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *accelerated solvent extraction*, ASE). U odnosu na prethodnu metodu, ASE je pogodnija metoda za izolaciju PAU iz PM₁₀ čestica jer omogućuje precizniju kontrolu temperature i tlaka što rezultira većom ekstrakcijskom učinkovitošću, boljom reproducibilnošću, manjom potrošnjom otapala te u konačnici i kraćeg postupka obrade uzoraka. Također, ASE dodatno smanjuje rizik od mogućeg termičkog raspada analita uzrokovano lokalnim pregrijavanjima i neravnomjernom raspodjelom temperature. Cilj je bio postići što veće iskorištenje odnosno što manji gubitak analita tijekom postupka ekstrakcije. U ovom radu ispitivan je utjecaj broja ciklusa, temperature ekstrakcije i volumena otapala na učinkovitost ekstrakcije. Temperatura ekstrakcije ispitana je prva u postupku optimizacije s obzirom na njezinu ključnu ulogu u prijenosu analita iz matrice u otapalo. Povišene temperature pogoduju bržem otapanju analita zahvaljujući smanjenoj viskoznosti otapala i intenzivnijoj difuziji kroz matricu, zbog čega temperatura predstavlja jedan od presudnih parametara koji određuje selektivnost i učinkovitost ekstrakcije. Celulozni filteri imaju ograničenu primjenu pri povišenim temperaturama zbog niske toplinske otpornosti, stoga se u tu svrhu za temperature veće od 100 °C koriste stakleni filteri.. Prilikom optimizacije procesa ekstrakcije ispitivane temperature od 70 °C, 80 °C i 90 °C.

4.5. Validacija metode

Validacija metode provodi se kako bi se utvrdila njena prikladnost za određenu namjenu. Validacija metode provedena je ispitivanjem selektivnosti, linearnosti, ponovljivosti i istinitosti.

Selektivnost je izvedbena karakteristika koja se prva ispituje u okviru validacije metode kako bi bili sigurni da zaista mjerimo željeni analit. Selektivnost metode ispitana je analizom slijepe probe kojom se potvrđuje da u mjernom sustavu ne postoje interferencije koje bi mogle utjecati na određivanje analita. Linearnost je ispitana analizom 8 kalibracijskih otopina različitih koncentracija analita, a kriterij za linearnosti bio je $R^2 > 0.99$. Ponovljivost metode ispitivana je ponavljanjem analiza otopina tri koncentracije (5 ng mL⁻¹, 15 ng mL⁻¹ i 60 ng mL⁻¹) unutar linearnog područja, pri čemu je svaka otopina analizirana osam puta. Kriterij prihvatljivosti za ponovljivost je da relativno standardno odstupanje iznosi manje od 10%. Istinitost je ispitana analizom obogaćenih uzoraka pri koncentracijama 5 ng mL⁻¹ i 60 ng mL⁻¹ kako bi se obuhvatile

najniža i najviša ispitivana koncentracija. Istinitost je kvantitativno iskazana kao iskorištenje. Kriterij za iskorištenje koji mora biti zadovoljen je u rasponu od 80 % do 120 %.

5. REZULTATI I RASPRAVA

U nastavku rada prikazani su rezultati postignuti razvojem metode određivanja PAU u PM₁₀ česticama. Za potrebe razvoja metode analize PAU uvedena je nova GC-MS kolona, optimirana je priprema uzoraka korištenjem otopina s unutarnjim standardom za svaki analit, optimiran je postupak ekstrakcije ispitivanjem optimalnog broja ciklusa ekstrakcije, volumena i temperature ekstrakcije. Određeni su parametri GC-MS metode koji daju najbolju razlučivost pikova i u konačnici je provedena validacija nove metode kako bi se potvrdila njena primjena za analizu PAU u realnim uzorcima PM₁₀ čestica.

5.1. Izbor kromatografske kolone za GC-MS

Idealni pik u kromatografskoj analizi mora biti simetričan, odnosno bez *tailinga* ili *frontinga*, ne smije se preklapati sa susjednim pikovima kako bi se mogao jasno integrirati, mora imati stabilnu baznu liniju i biti umjereno širok. Kromatografski pik ne smije biti šiljast i nepravilnog oblika jer to direktno utječe na smanjenje točnosti rezultata ispitivanja. Na slikama (Slike 17. i 18.) u nastavku teksta uspoređen je izgled pikova na koloni *HP-5MS* proizvođača Agilent Technologies i koloni *Select PAH* istog proizvođača. Osnovni parametri kolona navedeni su u tablici 8.

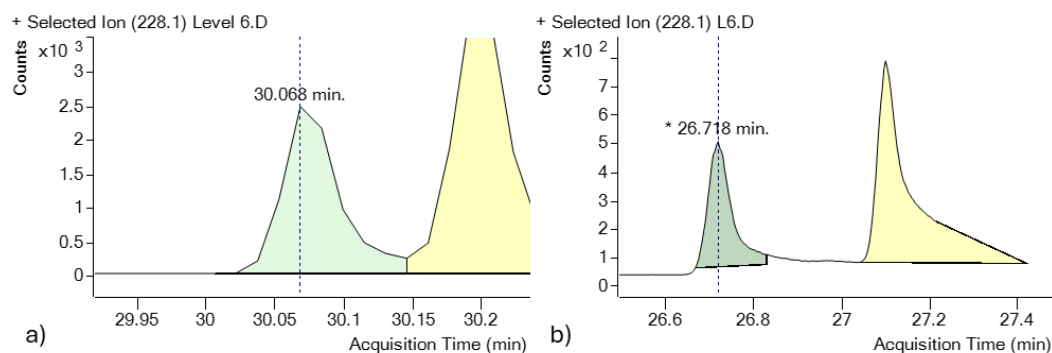
Tablica 8. Osnovni parametri korištenih GC-MS kolona

Naziv kolone	Duljina, m	Promjer, mm	Debljina filma, μm	Temperaturni raspon, °C
<i>HP-5MS</i>	30	0,25	0,25	-60 do 325
<i>Select PAH</i>	30	0,25	0,15	40 do 325

Nepokretna faza u koloni *HP-5MS* sastoji se od 5 % fenila i 95 % dimetilpolisiloksana. Univerzalna je za opću GC-MS primjenu te može dobro razdvojiti većinu organskih spojeva. Najčešće se koristi za analizu hlapljivih organskih spojeva, pesticida i poliaromatskih ugljikovodika. Kod odvajanja složenih PAU poput izomera benzo[*b*]fluorantena i benzo[*k*]fluorantena s ovom kolonom ne postiže se dobra razlučivost.

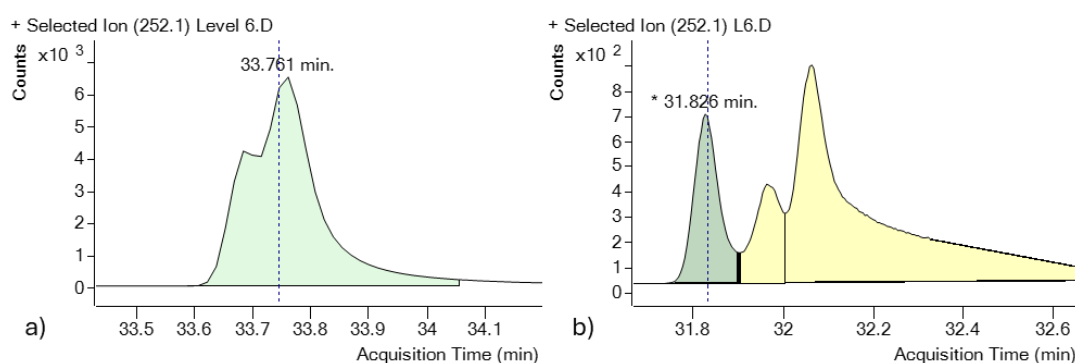
Nepokretna faza u koloni *Select PAH* je posebno modificirana fenilpolisiloksanska faza koja je optimirana za odvajanje PAU. Posebno je dizajnirana za odvajanje PAU izomera te omogućava

postizanje simetričnih i razdvojenih pikove što omogućava pouzdaniju kvantifikaciju prilikom analize.



Slika 17. Kromatogram benzo[a]antracena na koloni a) *HP-5MS* i b) *Select PAH*.

Na Slici 5. prikazan je kromatogram benzo[a]antracena na dvije ispitivane kolone. Na Slici 17a uz kromatografski pik benzo[a]antracena nalazi se pik krizena i jasno je vidljivo da pikovi tih analita nisu dovoljno razlučeni te da se preklapaju. Suprotno tome, na Slici 17b kromatografski pikovi benzo[a]antracena i krizena potpuno su razdvojeni. Osim što je kolona *Select PAH* utjecala na bolje razlučivanje analita, utjecala je i na poboljšanje izgleda pika koji nema oštre linije i nepravilan izgled u odnosu na pikove dobivene na koloni *HP-5MS*.



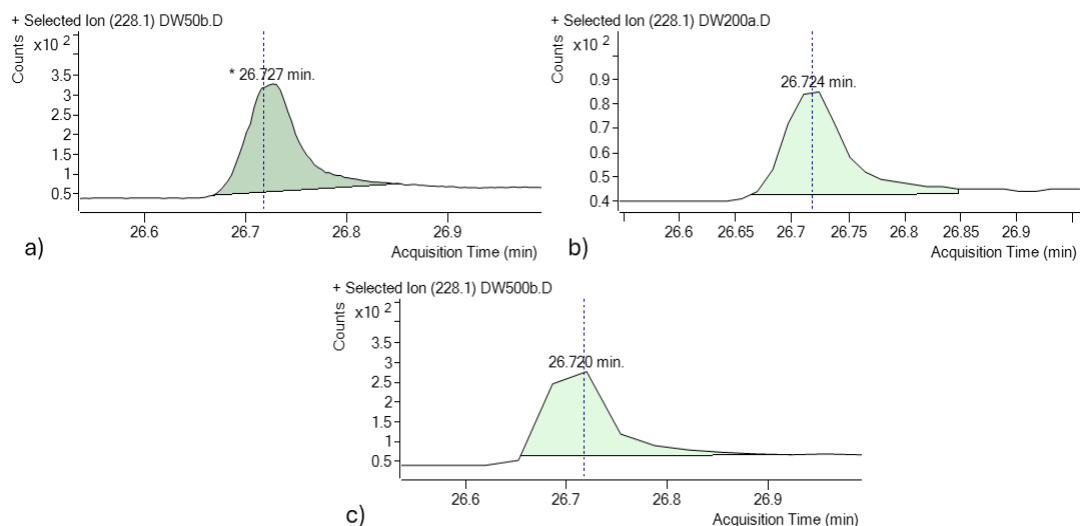
Slika 18. Kromatogram benzo[b]fluorantena na koloni a) *HP-5MS* i b) *Select PAH*.

Korištenje kolone *Select PAH* donijelo je najveću razliku u analizi strukturnih izomera benzo[b]fluorantena, benzo[k]fluorantena i benzo[j]fluorantena. Na Slici 18a vidljivo je da su

pikovi tih analita potpuno spojeni i da se ne mogu integrirati zasebno, nego je moguće pratiti samo njihovu ukupnu koncentraciju. Korištenje kolone *Select PAH* omogućuje praćenje svakog analita zasebno, a to je vrlo bitno jer nam njihovo zasebno određivanje pomaže u određivanju izvora onečišćenja. Izbor kolone bio je samo prvi korak u postizanju što veće razlučivosti između analita benzo[*b*]fluorantena, benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena. Daljnjom optimizacijom radilo se na tome da razlučivost svih analita, a pogotovo ovih strukturnih izomera, bude što bolja.

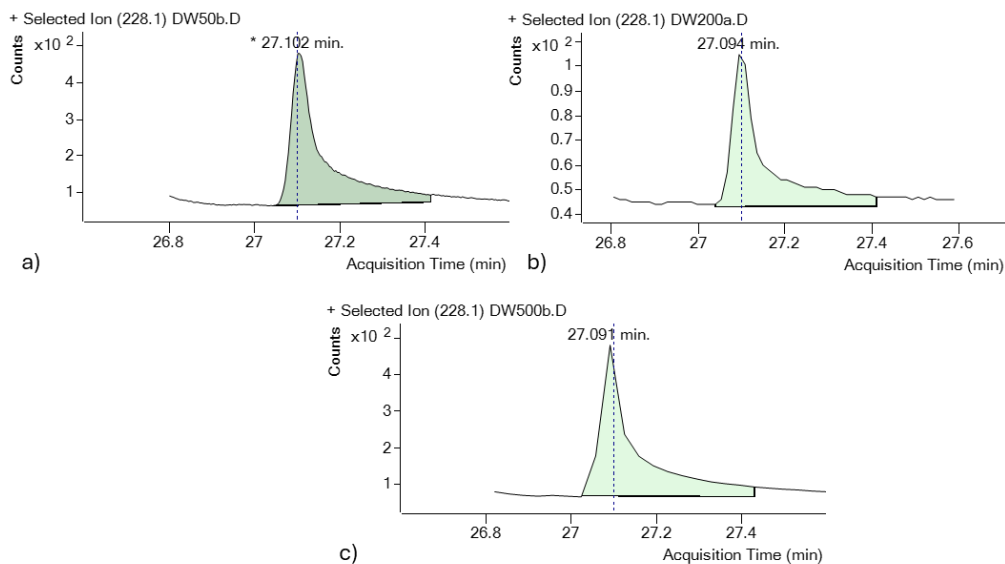
5.2. Optimizacija GC-MS metode

Ispitivani su određeni parametri rada instrumenta GC-MS za koje se smatralo da će imati značajniji utjecaj na izgled pikova. Za početak je uspoređen izgled pikova ovisno o tome je li analiza provedena pri konstantnom tlaku ili protoku. Konstantni protok daje bolju reproducibilnost rezultata i vrijeme zadržavanja analita je produljeno što omogućava bolju razdvojenost pikova. Kada se utvrdilo da će analiza provoditi pri konstantnom protoku, određivana je optimalna vrijednost protoka, a to je $1,6 \text{ mL min}^{-1}$. Takav protok daje najbolji omjer dobre razdvojenosti analita i prihvatljivog vremena trajanja analize. Određivana je i optimalna temperatura na samom ulasku u kolonu te temperatura u koloni, a optimalne vrijednosti iznose $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Najveći utjecaj na izgled pikova imalo je vrijeme mjerenja (*Dwell time*), koje predstavlja trajanje mjerenja intenziteta signala pojedinog iona prilikom skeniranja spektrometrom masa. Trajanje vremena mjerenja određuje koliko podataka će se prikupiti za ion. Dulje vrijeme povećava osjetljivost i omjer signal/šum, ali smanjuje broj točaka u vrhu kromatografskog pika, dok kraće vrijeme omogućuje bolju vremensku razlučivost, ali uz slabiju osjetljivost. Zbog toga su u ovom radu odabrana vremena mjerenja od 50 ms, 200 ms i 500 ms, a usporedba izgleda pikova ovisno o vremenu mjerenja prikazana je Slikama 18 - 23.



Slika 19. Usporedba izgleda pikova benzo[*a*]antracena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

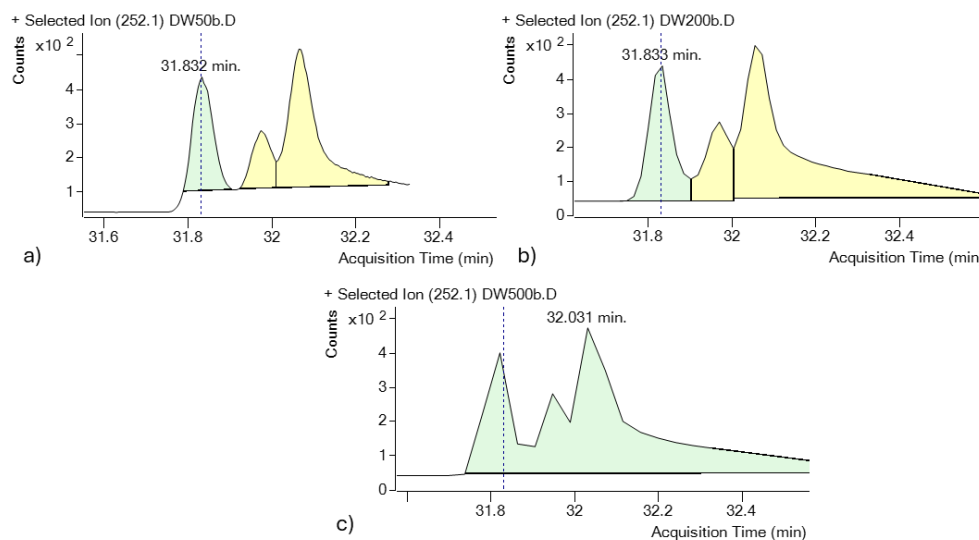
Na Slici 19. može se vidjeti da kromatografski pik benzo[*a*]antracena ima prihvatljiv izgled samo pri vremenu mjerenja od 50 ms. Pri ostalim vremenima mjerenja pik ima nepravilan oblik i oštre linije što daje loše rezultate prilikom integracije.



Slika 20. Usporedba izgleda pikova krizena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

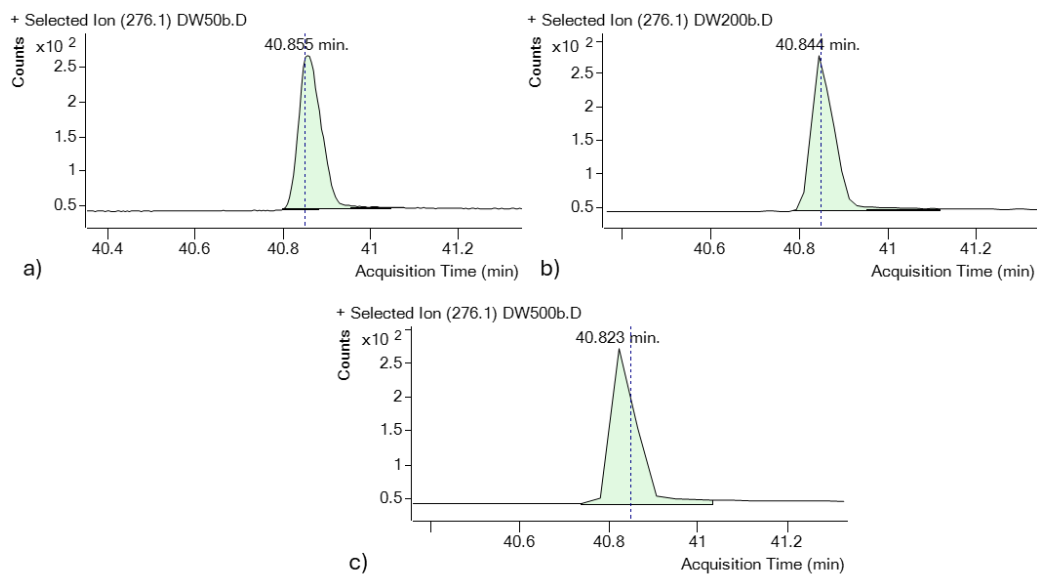
Na Slici 20. prikazani su kromatografski pikovi krizena, koji se prema izgledu slažu s pikovima benzo[*a*]antracena. Samo pri vremenu mjerenja od 50 ms pik nema nepravilan oblik i oštre

linije. Što je vrijeme mjerenja duže smanjuje se broj točaka u vrhu kromatografskog pika i zbog toga pikovi nemaju pravilan oblik.



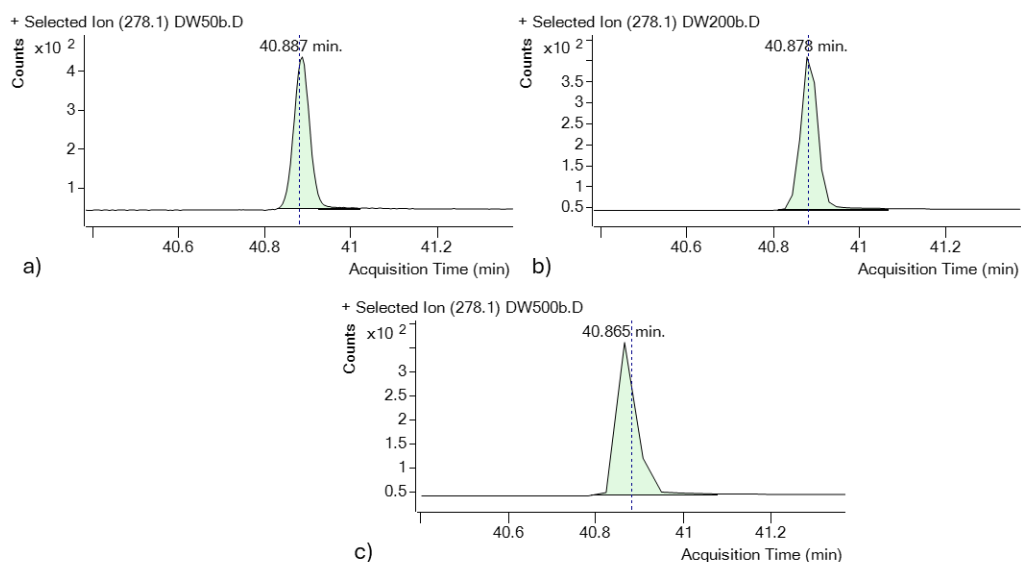
Slika 21. Usporedba izgleda pikova benzo[*b*]fluorantena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

Na Slici 21. prikazan je kromatografski pik benzo[*b*]fluorantena koji najbolju razlučivost ima pri vremenu mjerenja od 50 ms. Također, vidljiva je jasna razlika u izgledu pikova ovisno o vremenu mjerenja. Kada je vrijeme mjerenja 500 ms analiti benzo[*b*]fluoranten, benzo[*k*]fluoranten i benzo[*j*]fluoranten nisu razlučeni i nisu integrirani na prihvatljiv način. Vrhovi pikova su oštri i ne vidi se jasna razlika između pikova pojedinih analita.



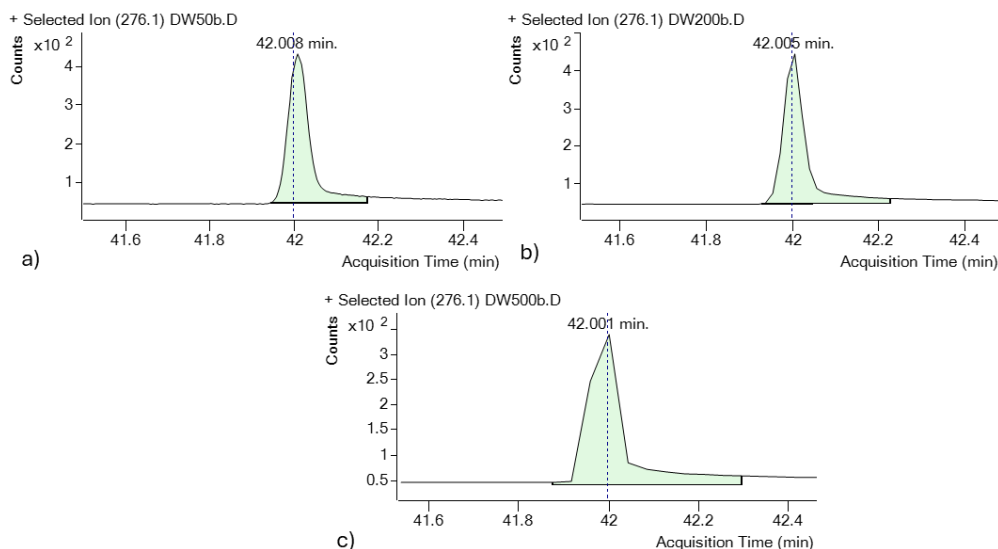
Slika 22. Usporedba izgleda pikova indeno[1,2,3-cd]pirena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

Na Slici 22. kromatografski pikovi indeno[1,2,3-cd]pirena ovisno o vremenu mjerenja slažu se s dosadašnjim rezultatima za ostale analite. Vrijeme mjerenja 50 ms jedino daje prihvatljiv izgled kromatografskog pika, što znači da samo pri njemu možemo dobiti pouzdane rezultate.



Slika 23. Usporedba izgleda pikova dibenz[a,h]antracena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

Na Slici 23. prikazani su kromatografski pikovi dibenz[*a,h*]antracena koji pri vremenu mjerenja od 200 ms i 500 ms imaju nepravilan oblik i oštre vrhove, odnosno nezadovoljavajući izgled kromatografskog pika.



Slika 24. Usporedba izgleda pikova benzo[*g,h,i*]perilena za vremena mjerenja a) 50 ms, b) 200 ms i c) 500 ms.

Na Slici 24. prikazani su kromatografski pikovi benzo[*g,h,i*]perilena koji se slažu s rezultatima dobivenim za prethodne analite. Vrijeme mjerenja od 200 ms i 500 ms ne daje prihvatljiv izgled pikova zbog loše integracije samog pika.

Kromatografski pikovi trebaju biti uski i simetrični kako bi rezultati analize bili pouzdani. Pri vremenu mjerenja od 200 ms i 500 ms kod svih ispitivanih analita pikovi imaju nepravilan oblik i oštre vrhove, što znači da integracija pikova nije dobra i rezultati nisu pouzdani. Vrijeme mjerenja od 50 ms daje najbolji izgled pikova za sve analite i najbolju razlučenost strukturnih izomera benzo[*b*]fluorantena, benzo[*k*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena. Zbog toga je vrijeme mjerenja od 50 ms izabrano kao optimalno za sve analite.

U tablici 9. prikazani su ostali ispitivani parametri GC-MS instrumenta za koje se ispostavilo da su optimalni za analizu PAU u PM₁₀ česticama. Pri ovim uvjetima provodile su se sve daljnje analize tijekom optimizacije cijele analitičke metode, što uključuje pripremu uzorka i kromatografsku analizu.

Tablica 9. Parametri rada instrumenta GC/MS

Parametar	Vrijednost
Ubrizgavanje	Nepodijeljeno
Volumen injektiranja	2 μL
Vrijeme odgode otapala	0 min
Temperatura injektiranja	250 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura kolone	280 $^{\circ}\text{C}$
Konstantan protok	1,6 mL min^{-1}
Vrijeme mjerenja	50 ms

5.3. Izbor unutarnjih standarda

Integracija pikova otežana je kada jedan unutarnji standard služi za analizu više analita, tada se rezultati ne mogu dovoljno precizno kvantificirati. Ključno je da svaki analit ima unutarnji standard koji je sličan po kemijskim i fizikalnim svojstvima. Unutarnji standard mora imati usporedivu hlapljivost, polarnost, topljivost i stabilnost kako bi postupci ekstrakcije i kromatografske analize djelovali na njega na isti način kao i na odgovarajući analit. Najbolji način za usporedbu rezultata prilikom korištenja zajedničkog unutarnjeg standarda za više analita i unutarnjeg standarda za svaki pojedini analit je preko iskorištenja. Rezultati koji su se očekivali su da je iskorištenje manje prilikom korištenja zajedničkog unutarnjeg standarda za više analita jer jedan unutarnji standard ne može u potpunosti odgovarati svojim kemijskim i fizikalnim svojstvima za više analita. U nastavku teksta prikazana je Tablica 10. u kojoj su prikazana dobivena iskorištenja prilikom korištenja otopine *Internal Standards Mix 33* u kojoj se nalaze samo određeni unutarnji standardi i otopine *PAH Mix 9 deuterated* u kojoj se nalazi unutarnji standard za svaki pojedini analit.

Tablica 10. Usporedba iskorištenja primjenom različitih otopina unutarnjih standarda

Naziv analita	$\gamma_{\text{teor,}}$ ng mL^{-1}	<i>Internal Standards Mix 33</i>		<i>PAH Mix 9 deuterated</i>	
		$\gamma_{\text{eksp,}}$ ng mL^{-1}	$\eta, \%$	$\gamma_{\text{eksp,}}$ ng mL^{-1}	$\eta, \%$
Benzo[a]antracen	50	43,16	86,33	47,68	95,37
Krizen	50	42,16	84,32	50,43	100,87
Benzo[b]fluoranten	50	41,51	83,02	43,62	87,23
Benzo[k]fluoranten	50	38,16	76,31	41,18	82,36
Benzo[j]fluoranten	50	46,53	93,05	47,55	95,10
Benzo[a]piren	50	42,85	85,7	44,51	89,02
Indeno[1,2,3-cd]piren	50	42,81	85,63	48,14	96,27
Dibenz[a,h]antracen	50	41,82	83,65	47,76	95,51
Benzo[g,h,i]perilen	50	42,50	85	45,55	91,09

Iz dobivenih iskorištenja jasno je vidljivo da korištenje otopine *PAH Mix 9 deuterated* koja sadrži unutarnji standard za svaki analit posebno, daje bolja iskorištenja u odnosu na analizu u kojoj je više analita dijelilo isti unutarnji standard. Posebno se izdvaja rezultat za benzo[k]fluoranten pri korištenju otopine *Internal Standards Mix 33* jer za njega nije zadovoljen kriterij iskorištenja koji mora biti $\eta > 80 \%$, a za benzo[k]fluoranten iskorištenje iznosi 76,31 %. Svi izračuni iskorištenja za otopinu *PAH Mix 9 deuterated* zadovoljavaju kriterij i zbog toga je ona odabrana kao otopina unutarnjih standarda koja će se koristiti prilikom pripreme uzoraka. Korištenje unutarnjeg standarda za svaki ispitivani analit posebno omogućava precizniju integraciju pikova i omogućava se najbolja korekcija gubitaka i instrumentalnih odstupanja, a samim time se postiže veća točnost kvantifikacije.

5.4. Optimizacija postupka ekstrakcije

Najvažniji parametri u postupku ekstrakcije su temperatura na kojoj se ona provodi, volumen otapala koji se uzima za ekstrakciju, broj ciklusa ekstrakcije i vrsta otapala. Ovi parametri ispitivani su na otopinama analita u kojima svaki analit ima svoj unutarnji standard te je korištena optimirana GC-MS metoda sa *Select PAH* kolonom za analizu ekstrakta. Svaki parametar ispitivan je na četiri paralelna uzorka s istim otopinama u kojima je koncentracija PAU iznosila $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Izračunate su srednje vrijednosti rezultata za svaki ispitivani parametar, a preko teorijske vrijednosti koncentracije PAU u početnoj otopini i dobivenih rezultata izračunate su iskorištenja i RSD vrijednosti kako bi se utvrdilo koji parametri ekstrakcije su optimalni za analizu PAU.

Temperatura ekstrakcije

Ispitivane temperature ekstrakcije morale su biti ispod $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ zbog celuloznog filtera koji se koristi u ćelijama prilikom ekstrakcije jer se pri temperaturi od $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili više filter raspada, što može uzrokovati kontaminaciju uzorka i smanjenje učinkovitosti ekstrakcije. Temperature ekstrakcije koje su ispitivane bile su $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostali parametri ekstrakcije uključivali su tri ciklusa ekstrakcije te volumen otapala u ćeliji 75 %. Dobivene srednje vrijednosti koncentracija analita pri ispitivanim temperaturama i izračunate RSD vrijednosti i iskorištenja prikazane su u Tablicama 9 - 11.

Tablica 11. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije pri 70 °C

Temperatura ekstrakcije 70 °C			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	41.57	6.28	83.15
Krizen	43.44	3.17	86.89
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	38.18	3.93	76.36
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	49.09	6.59	98.18
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	29.81	29.76	59.63
Benzo[<i>a</i>]piren	40.97	1.00	81.94
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	44.22	1.73	88.45
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	43.62	3.49	87.23
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	46.69	1.60	93.38

U Tablici 11. prikazani su rezultati dobiveni nakon ekstrakcije uzoraka pri 70 °C. Za analite benzo[*b*]fluoranten i benzo[*j*]fluoranten iskorištenja iznose 76,36 % i 59,63 % i ne zadovoljavaju kriterij $\eta > 80$ %. Prema dobivenim iskorištenjima zaključuje se da je temperatura ekstrakcije od 70 °C preniska i da nije prikladna za korištenje u analizi PAU.

Tablica 12. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije pri 80 °C

Temperatura ekstrakcije 80 °C			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	40.49	3.45	80.98
Krizen	44.47	3.43	88.95
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	38.97	7.49	77.95
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	54.65	14.97	109.30
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	27.99	16.31	55.99
Benzo[<i>a</i>]piren	41.60	2.23	83.19
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	45.11	2.51	90.22
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	42.65	4.31	85.30
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	47.14	2.10	94.28

U Tablici 12. prikazani su rezultati dobiveni nakon ekstrakcije uzoraka pri 80 °C. Pri ovoj temperaturi iskorištenja za analite benzo[*b*]fluoranten i benzo[*j*]fluoranten također ne zadovoljavaju kriterij te se za ekstrakciju PAU mora koristiti viša temperatura.

Tablica 13. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije pri 90 °C

Temperatura ekstrakcije 90 °C			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	48.42	4.95	96.83
Krizen	50.28	1.68	100.57
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	43.39	4.79	86.78
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	55.35	3.55	110.71
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	42.94	3.88	85.88
Benzo[<i>a</i>]piren	47.05	5.83	94.11
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	49.96	1.28	99.92
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	50.01	2.13	100.03
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	50.69	3.21	101.39

U Tablici 13. prikazani su rezultati ostvareni pri najvišoj ispitivanoj temperaturi ekstrakcije, koja je iznosila 90 °C. Pri ovoj temperaturi za sve ispitivane analite dobivena su iskorištenja koja iznose više od 80 %, a to se postiglo i kod benzo[*b*]fluorantena i benzo[*j*]fluorantena kojima iskorištenja iznose 86,78 % i 85,88 %. S obzirom na to da metoda zadovoljava iskorištenja za sve analite pri temperaturi ekstrakcije od 90 °C, upravo je ta temperatura odabrana kao optimalna te su se svi daljnji eksperimenti proveli uz temperaturu ekstrakcije od 90 °C.

Volumen otapala

Volumen ekstrakcijskih ćelija u kojima se provodi ekstrakcija pod povišenim tlakom i temperaturom iznosi 10 mL. Ispitivana su tri različita volumena diklormetana kojima se puni ćelija prije ekstrakcije u obliku postotka, odnosno 65 %, 75 % i 85 % volumena ćelije. Prazan prostor u ćeliji, koji se stvara dodavanjem dijatomejske zemlje, omogućava cirkulaciju otapala te poboljšava otapanje i ekstrakciju analita. Također, ekstrakcija pod povišenim tlakom i temperaturom zahtjeva prazan prostor u ćeliji za sigurno povećanje tlaka unutar ćelije. Svi volumeni otapala ispitivani su pri temperaturi od 90 °C i uz 3 ciklusa ekstrakcije. U Tablicama 14 – 16 prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 14. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije sa 65 % volumena diklormetana u ćeliji

Volumen diklormetana 65 %			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	40.18	2.05	80.35
Krizen	44.27	4.66	88.54
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	38.94	7.41	77.88
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	43.91	2.82	87.83
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	28.60	12.39	57.20
Benzo[<i>a</i>]piren	39.48	1.60	78.95
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	41.65	2.35	83.30
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	40.65	2.37	81.29
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	45.25	3.24	90.50

Tablica 15. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije sa 75 % volumena diklormetana u ćeliji

Volumen diklormetana 75 %			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	44.89	1.12	89.78
Krizen	44.04	1.33	88.09
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	42.65	2.20	85.30
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	54.81	4.94	109.62
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	42.99	1.63	85.98
Benzo[<i>a</i>]piren	44.31	5.14	88.63
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	47.95	2.01	95.90
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	48.92	2.65	97.83
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	46.13	7.11	92.25

Tablica 16. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije s 85 % volumena diklormetana u ćeliji

Volumen diklormetana 85 %			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[a]antracen	43.21	2.06	86.43
Krizen	41.85	4.80	83.70
Benzo[b]fluoranten	43.90	7.54	87.80
Benzo[k]fluoranten	58.27	18.72	116.55
Benzo[j]fluoranten	43.50	4.78	87.01
Benzo[a]piren	43.51	12.15	87.01
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	47.04	3.34	94.08
Dibenz[a,h]antracen	47.81	2.66	95.62
Benzo[g,h,i]perilen	44.50	4.71	89.01

Prema dobivenim rezultatima, s volumenom otapala 75 % postižu se najviša iskorištenja za analite benzo[a]antracen, krizen, benzo[a]piren i benzo[g,h,i]perilen. Za ostale analite volumen otapala 85 % pokazao se neznatno bolji, ali cilj metode je što manje negativno utjecati na okoliš i štedjeti na utrošku kemikalija kako bi se smanjilo onečišćenje vodenog okoliša. Diklormetan je kancerogeni spoj i zbog toga je volumen otapala 75 % odabran kao optimalan jer se pri tom volumenu otapala postižu iskorištenja svih analita koja zadovoljavaju kriterij iskorištenja, a to je da iskorištenje mora biti u rasponu od 80 % do 120 %. Uz volumen otapala 65 % nije zadovoljen kriterij iskorištenja za sve analite, najbitniji analit koji se prati je benzo[a]piren, a pri volumenu otapala od 65 % iskorištenje za benzo[a]piren iznosi 78,95 %. Zbog toga se ekstrakcija mora provoditi s većom količinom otapala. Korištenjem manjeg volumena, odnosno 75 % umjesto 85 % štedi se na kemikaliji i smanjuje nepotrebno izlaganje analitičara i okoliša kancerogenom otapalu.

Broj ciklusa ekstrakcije

Broj ciklusa ekstrakcije pokazuje koliko će se puta uzorak ispirati svježim otapalom tijekom ekstrakcije. On je ključan parametar optimizacije jer direktno utječe na učinkovitost ekstrakcije, reproducibilnost rezultata i ekonomičnost metode. Ako je broj ciklusa premalen, dio analita može zaostati u matrici što znači da je ekstrakcija nepotpuna. Prevelik broj ciklusa nepotrebno povećava potrošnju otapala i vrijeme analize bez značajnog povećanja iskorištenja ekstrakcije. Ispitani brojevi ciklusa za ekstrakciju PAU iz PM₁₀ čestica su 1, 2, 3 i 4 ciklusa ekstrakcije. Svi ciklusi ekstrakcije ispitivani su pri temperaturi od 90 °C i 75 % volumena otapala.

Tablica 17. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije u 1 ciklusu.

1 ciklus ekstrakcije			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	41.2	6.34	82.40
Krizen	42.84	3.21	85.68
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	38.65	3.88	77.30
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	44.82	7.22	89.64
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	33.56	26.44	67.12
Benzo[<i>a</i>]piren	40.58	1.01	81.16
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	43.44	1.76	86.88
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	42.68	3.56	85.36
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	43.12	1.73	86.24

U Tablici 17. prikazane su srednje vrijednost koncentracija analita u ekstraktu nakon što je proveden 1 ciklus ekstrakcije, izračunate RSD vrijednosti i iskorištenja. RSD vrijednost je prevelika za analit benzo[*j*]fluoranten i iznosi 26,44 %, a iskorištenje za taj analit iznosi samo 67,12 % što ne zadovoljava kriterij da iskorištenje mora biti veće od 80 %. Iskorištenje nije zadovoljeno ni za analit benzo[*b*]fluoranten jer iznosi 77,30 %. Za ostale analite kriterij za iskorištenje je zadovoljen, ali ne prelaze 90 %.

Tablica 18. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije u 2 ciklusa.

2 ciklusa ekstrakcije			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	43.56	3.21	87.12
Krizen	44.26	3.45	88.52
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	40.54	7.20	81.08
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	44.32	18.45	88.64
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	39.87	11.45	79.74
Benzo[<i>a</i>]piren	41.3	2.24	82.60
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	45.12	2.50	90.24
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	42.79	4.29	85.58
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	46.73	2.12	93.46

U Tablici 18. nalaze se rezultati koji su dobiveni analizom ekstrakta nakon ekstrakcije provedene u 2 ciklusa. Iz prikazanih rezultata može se uočiti znatna promjena u odnosu na rezultate dobivene s 1 ciklusom ekstrakcije. No, iskorištenje za analit benzo[*j*]fluoranten i dalje ne zadovoljava postavljeni kriterij ($\eta > 80$ %). S obzirom da svi postavljeni kriteriji moraju biti ispunjeni za sve analizirane analite, 2 ciklusa ekstrakcije nisu dovoljna.

Tablica 19. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije u 3 ciklusa.

3 ciklusa ekstrakcije			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	47.42	5.05	94.84
Krizen	48.52	1.74	97.04
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	46.35	4.48	92.70
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	49.23	3.99	98.46
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	47.42	3.51	94.84
Benzo[<i>a</i>]piren	48.05	5.71	96.10
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	49.96	1.28	99.92
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	50.70	2.10	101.40
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	48.96	3.32	97.92

U Tablici 19. prikazani su rezultati dobiveni analizom ekstrakta nakon ekstrakcije provedene u 3 ciklusa. Iskorištenja za sve analite zadovoljavaju postavljeni kriterij i značajno su veća u odnosu na iskorištenja dobivena ekstrakcijom u 2 ciklusa.

Tablica 20. Rezultati analize ekstrakta nakon ekstrakcije u 4 ciklusa

4 ciklusa ekstrakcije			
Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	RSD, %	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	48.53	1.70	97.06
Krizen	47.98	4.30	95.96
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	48.28	5.98	96.56
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	49.76	2.49	99.52
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	46.08	7.69	92.16
Benzo[<i>a</i>]piren	49.14	1.29	98.28
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	50.03	1.95	100.06
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	49.83	1.93	99.66
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	47.62	3.08	95.24

U Tablici 20. nalaze se rezultati dobiveni analizom ekstrakta nakon ekstrakcije u 4 ciklusa. Za analite benzo[*a*]antracen, benzo[*b*]fluoranten, benzo[*k*]fluoranten, benzo[*a*]piren i indeno[1,2,3-*cd*]piren dobivena iskorištenja su neznatno veća u odnosu na iskorištenja ekstrakcije u 4 ciklusa, ali kod ekstrakcije s otapalima poput diklormetana potrebno je paziti na količinu otapala koja se koristi. Zbog neznatne razlike u iskorištenjima ekstrakcije u 3 i 4 ciklusa te zbog uštede na otapalu koje je štetno za ljude i okoliš, odabrana je ekstrakcija u 3 ciklusa kao optimalna.

5.5. Validacija metode

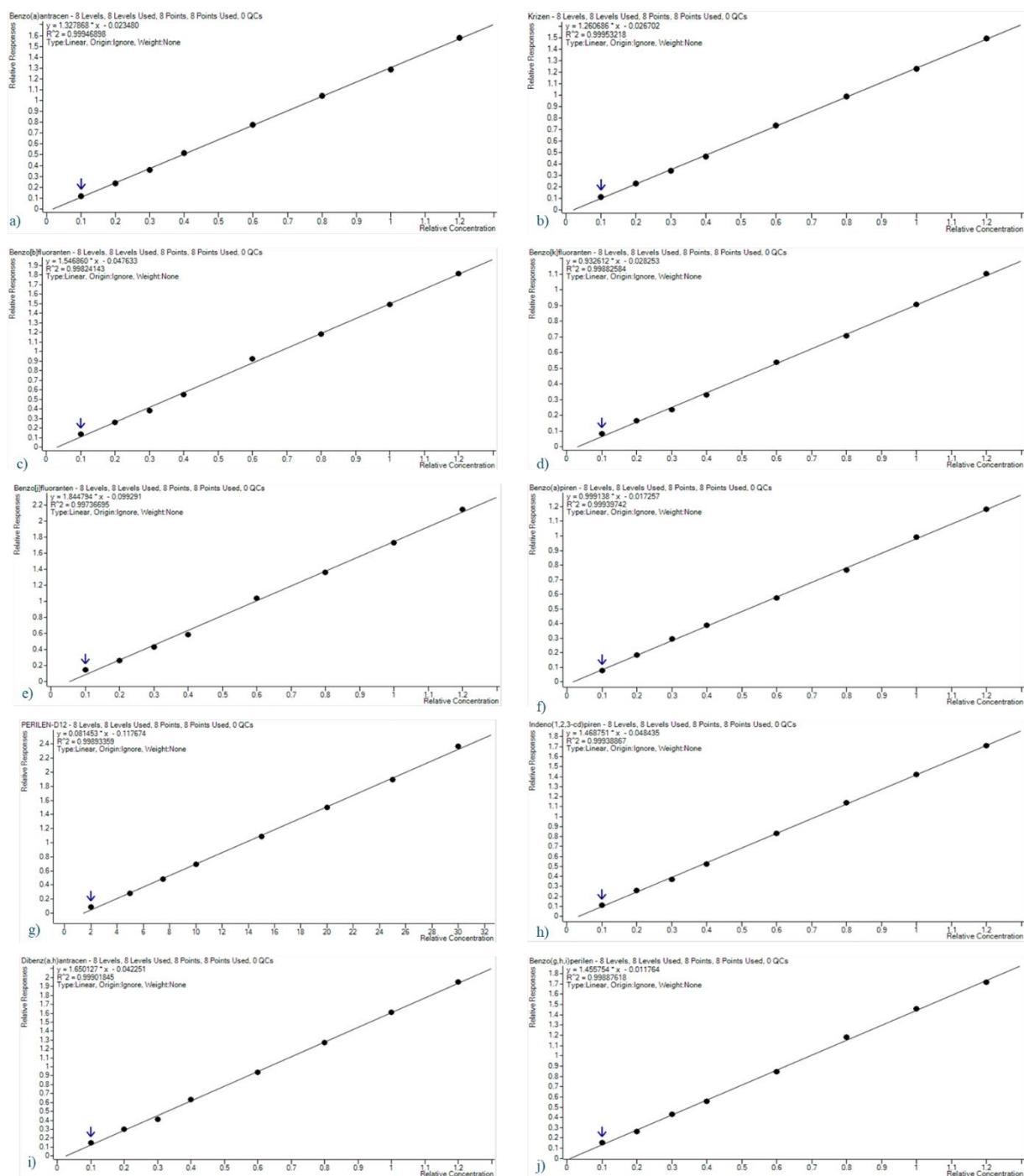
Validacija metode provedena je ispitivanjem selektivnosti, linearnost i ponovljivosti te računanjem iskorištenja za obogaćene uzorke. Obogaćeni uzorci pripremaju se jednako kao realni uzroci, odnosno otopini ispitivanih analita dodaje se surogatni standard, unutarnji standard za surogatni standard te otopina unutarnjih standarda za sve ispitivane analite. Obogaćena uzorak prolazi cijeli analitički proces, od pripreme uzoraka za analizu do kromatografske analize te se preko iskorištenja može zaključiti je li metoda prikladna za analizu realnih uzoraka. Osim toga, određivanjem ponovljivosti dobiva se uvid u preciznost metode, dok se linearnošću kalibracijskih krivulja potvrđuje njena sposobnost točnog kvantificiranja analita unutar ispitivanog koncentracijskog područja. Na taj način validacija omogućuje procjenu prikladnosti metode, kao i identifikaciju mogućih ograničenja u njezinoj praktičnoj primjeni. Dobiveni rezultati validacije čine osnovu za kasniju interpretaciju rezultata mjerenja realnih uzoraka te osiguravaju da su analitički postupci u skladu s prihvaćenim standardima kvalitete.

Selektivnost

Analizom slijepe probe, odnosno provedbom analitičkog postupka na uzorku koji ne sadrži ispitivane analite, samo s reagensom, dokazano je da u sustavu ne postoje interferencije koje bi mogle utjecati na određivanje ispitivanih analita. Selektivnost je osigurana i odabirom različitih fragmentnih iona koji služe za identifikaciju spojeva te dovoljnoj razlučenosti spojeva u kojima svi analiti imaju različito vrijeme zadržavanja na koloni.

Linearnost

Za ispitivanje linearnosti pripremljeno je 8 kalibracijskih otopina prema sastavu koji je prikazan u Tablici 4. Linearnost mora zadovoljiti kriterij $R^2 > 0,99$. Na Slici 25 u nastavku teksta nalaze se grafički prikazi kalibracijski krivulja iz programa MassHunter za ispitivane analite i surogatni standard. Na svakoj kalibracijskoj krivulji prikazana je jednadžba pravca zajedno s pripadajućom vrijednosti koeficijenta determinacije, čime se omogućuje jednostavna provjera kriterija linearnosti.



Slika 25. Grafički prikazi kalibracijskih krivulja ispitivanih analita za provjeru linearnosti metode

Zbog jednostavnije i preglednije analize dobivenih rezultata, koeficijenti determinacije određeni za svaki ispitivani analit prikazani su u Tablici 21. Uz navedene vrijednosti, u tablici je dodatno prikazan i raspon koncentracijskog područja unutar kojega je ispitivana linearnost metode. Na temelju dobivenih rezultata, odnosno izračunatih koeficijenata determinacije (R^2),

može se zaključiti da metoda pokazuje zadovoljavajuću linearnost za sve ispitivane analite u cijelom radnom području.

Tablica 21. Koncentracijsko područje kalibracijskih pravaca i koeficijent determinacije za ispitivane analite

Naziv analita	Koncentracijsko područje, ng mL ⁻¹	Jednadžbe pravca za linearnost	R ²
Benzo[<i>a</i>]antracen	5 - 60	$y=1,33x-0,02$	0,9994
Krizen	5 - 60	$y=1,26x-0,03$	0,9995
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	5 - 60	$y=1,54x-0,05$	0,9982
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	5 - 60	$y=1,93x-0,03$	0,9988
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	5 - 60	$y=1,84x-0,10$	0,9974
Benzo[<i>a</i>]piren	5 - 60	$y=0,99x-0,02$	0,9994
Perilen D12	100 - 1500	$y=0,08x-0,01$	0,9989
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	5 - 60	$y=1,47x-0,05$	0,9994
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	5 - 60	$y=1,65x-0,04$	0,9990
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	5 - 60	$y=1,46x-0,01$	0,9989

Ponovljivost

Ponovljivost rezultata ispitivana je ispitana pri tri odabrane koncentracije unutar radnog područja, pri čemu je svaka koncentracija analizirana osam puta. Odabrane koncentracije obuhvaćale su najnižu (5 ng mL⁻¹), srednju (15 ng mL⁻¹) i najvišu razinu (60 ng mL⁻¹), čime je osigurana procjena preciznosti u cijelom ispitivanom području. Rezultati ponovljivosti prikazani su u Tablicama 22 – 24, iskazani su kao standardna odstupanja (*s*) i relativna standardna odstupanja (RSD). Na taj način omogućeno je kvantitativno vrednovanje ponovljivosti rezultata mjerenja, a dobivene vrijednosti pružaju uvid u njenu pouzdanost i primjenjivost na realnim uzorcima. Kriterij prihvatljivosti za ponovljivost je da relativno standardno odstupanje iznosi manje od 10 %.

Tablica 22. Rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji analita 5 ng mL⁻¹

Mjerenje	BaA	Chry	BbF	BkF	BjF	BaP	InP	DahA	BghiP
1	4,97	4,73	4,78	4,82	5,31	5,08	4,8	5,38	5,11
2	4,91	4,75	4,73	4,32	5,67	5,19	4,92	5,39	5,07
3	5,02	4,93	4,89	4,71	5,43	5,09	4,66	5,42	5,13
4	4,95	4,82	4,86	4,69	5,69	5,1	4,88	5,45	5,17
5	5,01	4,79	4,86	4,49	5,6	5,1	4,99	5,4	5,08
6	5,09	4,89	4,93	4,31	5,25	5,1	4,74	5,46	5,07
7	4,99	4,73	4,86	4,7	5,68	5,13	4,68	5,41	5,16
8	4,93	4,8	4,9	4,57	5,7	5,06	4,79	5,48	5,06
$\bar{x}_{sr}$, ng mL ⁻¹	4,98	4,8	4,85	4,58	5,54	5,11	4,81	5,42	5,11
s , ng mL ⁻¹	0,0578	0,0729	0,067	0,1902	0,1843	0,0406	0,1173	0,0353	0,0425
RSD, %	1,16	1,52	1,38	4,16	3,33	0,79	2,44	0,65	0,83

Tablica 23. Rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji analita 15 ng mL⁻¹

Mjerenje	BaA	Chry	BbF	BkF	BjF	BaP	InP	DahA	BghiP
1	15,12	15,16	15,23	15,90	15,56	15,81	15,26	15,09	14,91
2	15,03	15,09	15,10	15,16	15,85	15,59	15,67	15,03	14,72
3	15,26	15,02	15,15	15,42	15,52	15,34	15,62	15,27	15,01
4	15,46	15,40	15,54	15,92	15,40	15,69	15,14	15,21	14,60
5	15,43	15,29	15,19	15,73	15,74	15,72	15,47	15,18	14,96
6	15,24	15,20	15,16	15,68	15,33	15,34	15,60	15,24	14,80
7	15,15	15,30	15,36	15,12	15,11	15,48	15,01	15,24	14,94
8	15,13	15,10	15,23	15,03	15,71	15,42	15,17	15,22	14,77
$\bar{x}_{sr}$, ng mL ⁻¹	15,23	15,19	15,24	15,50	15,53	15,55	15,37	15,19	14,84
s , ng mL ⁻¹	0,1520	0,1287	0,1424	0,3605	0,2423	0,1796	0,2541	0,0853	0,1379
RSD, %	1,00	0,85	0,93	2,33	1,56	1,16	1,65	0,56	0,93

Tablica 24. Rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji analita 60 ng mL⁻¹

Mjerenje	BaA	Chry	BbF	BkF	BjF	BaP	InP	DahA	BghiP
1	60,52	60,18	60,83	59,54	59,34	60,78	59,23	59,37	60,12
2	60,71	59,93	60,36	60,76	59,12	59,62	60,67	59,27	61,38
3	60,50	59,81	59,34	60,02	60,88	59,80	61,21	59,14	60,37
4	60,30	58,43	61,52	59,44	60,47	60,94	61,36	59,97	61,18
5	60,13	59,53	61,51	59,33	59,43	60,94	61,75	60,42	60,45
6	60,95	60,33	60,93	60,02	59,96	60,14	59,72	60,44	59,50
7	61,61	59,03	61,51	59,00	60,29	59,91	61,06	60,15	60,93
8	59,30	60,05	60,26	60,27	60,06	59,53	59,99	60,89	59,06
γ_{sr} , ng mL ⁻¹	60,50	59,66	60,78	59,80	59,94	60,21	60,62	59,96	60,37
s , ng mL ⁻¹	0,6652	0,6436	0,7721	0,5724	0,6084	0,5918	0,8881	0,6376	0,8050
RSD, %	1,10	1,08	1,27	0,96	1,01	0,98	1,46	1,06	1,33

U prvom stupcu tablica nalazi se broj mjerenja uzorka koji je sadržavao sve ispitivane analite. Iz osam mjerenja izračunata je srednja masena koncentracija za pojedinačne analite te je preko jednadžbi (1) i (2) izračunato standardno odstupanje (s) i relativno standardno odstupanje (RSD). Analizom dobivenih rezultata zaključuje se da je kriterij prihvatljivosti za ponovljivost zadovoljen pri sve tri ispitivane koncentracije (5 ng mL⁻¹, 15 ng mL⁻¹ i 60 ng mL⁻¹) uz uvjeti prihvatljivosti RSD<10 % za sve ispitivane analite. U tablicama 25 - 27 nalaze se sažeti rezultati ispitivanja ponovljivosti.

Tablica 25. Sažeti rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji 5 ng mL⁻¹

Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	s , ng mL ⁻¹	RSD, %
Benzo[a]antracen	4.98	0,0578	1,16
Krizen	4.80	0,0729	1,52
Benzo[b]fluoranten	4.85	0,0670	1,38
Benzo[k]fluoranten	4.58	0,1902	4,16
Benzo[j]fluoranten	5.54	0,1843	3,33
Benzo[a]piren	5.11	0,0406	0,79
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	4.81	0,1173	2,44
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	5.42	0,0353	0,65
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	5.11	0,0425	0,83

Tablica 26. Sažeti rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji 15 ng mL⁻¹

Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	s , ng mL ⁻¹	RSD, %
Benzo[<i>a</i>]antracen	15.23	0,1520	1.00
Krizen	15.19	0,1287	0.85
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	15.24	0,1424	0.93
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	15.50	0,3605	2.33
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	15.53	0,2423	1.56
Benzo[<i>a</i>]piren	15.55	0,1796	1.16
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	15.37	0,2541	1.65
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	15.19	0,0853	0.56
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	14.84	0,1379	0.93

Tablica 27. Sažeti rezultati ispitivanja ponovljivosti pri koncentraciji 5 ng mL⁻¹

Naziv analita	γ , ng mL ⁻¹	s , ng mL ⁻¹	RSD, %
Benzo[<i>a</i>]antracen	60.50	0,6652	1.10
Krizen	59.66	0,6436	1.08
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	60.78	0,7721	1.27
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	59.80	0,5724	0.96
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	59.94	0,6084	1.01
Benzo[<i>a</i>]piren	60.21	0,5918	0.98
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	60.62	0,8881	1.46
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	59.96	0,6376	1.06
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	60.37	0,8050	1.33

Istinitost

Istinitost metode je stupanj podudaranja stvarne vrijednosti i srednje vrijednosti velikog niza eksperimentalnih rezultata, a izražava se preko iskorištenja. Nakon što je dokazano da je metoda selektivna te da su zadovoljeni kriteriji za linearnosti i ponovljivosti, potrebno je na obogaćenim uzorcima dokazati da je iskorištenje u rasponu od 80 % do 120 %. Pripremljeni su obogaćeni uzorci s koncentracijama analita 5 ng mL⁻¹ i 60 ng mL⁻¹ kako bi se obuhvatile najniža i najviša ispitivana koncentracija. Obogaćene otopine pripremljene su iz istih otopina kao i otopine za izradu kalibracijske krivulje, ali su prošla cijeli analitički proces, od pripreme uzoraka za analizu što uključuje ekstrakciju pri odabranim optimalnim uvjetima (temperaturu ekstrakcije 90 °C, volumen diklormetana od 75 % volumena ćelije i 3 ciklusa ekstrakcije) i uparavanja otapala na sustavu Dry-Vap do GC-MS analize. Svaka koncentracija je analizirana šest puta (6 paralelnih uzoraka, replikata), a iz dobivenih rezultata izračunato je iskorištenje s obzirom na

stvarnu vrijednost koncentracije. U Tablicama 28 i 29 prikazani su rezultati iskorištenja za obogaćene uzorke pri koncentracijama 5 ng mL⁻¹ i 60 ng mL⁻¹.

Tablica 28. Iskorištenja pri koncentraciji 5 ng mL⁻¹

Naziv analita	γ_{teor} , ng mL ⁻¹	γ_{eksp} , ng mL ⁻¹	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	5	4,69	93,80
Krizen	5	4,63	92,56
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	5	4,55	90,95
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	5	4,52	90,46
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	5	4,59	91,70
Benzo[<i>a</i>]piren	5	4,64	92,82
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	5	4,40	88,05
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	5	4,52	90,43
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	5	4,67	93,49

Tablica 29. Iskoristivost pri koncentraciji 60 ng mL⁻¹

Naziv analita	γ_{teor} , ng mL ⁻¹	γ_{eksp} , ng mL ⁻¹	η , %
Benzo[<i>a</i>]antracen	60	56,63	94,38
Krizen	60	57,19	95,32
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	60	56,12	93,53
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	60	55,38	92,30
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	60	55,46	92,43
Benzo[<i>a</i>]piren	60	54,94	91,57
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	60	54,21	90,35
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	60	55,35	92,24
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	60	56,45	94,08

Iz rezultata iskorištenja zaključuje se da je kriterij prihvatljivosti za istinitost zadovoljen, odnosno da su iskorištenja pri obje ispitivane koncentraciji veće od 80 % i manje od 120 %. Najbitniji analit koji se prati je benzo[*a*]piren, a njegovo iskorištenje iznosi 92,82 % pri koncentraciji 5 ng mL⁻¹ i 91,57 % pri koncentraciji 60 ng mL⁻¹. Ovime je dokazano da su za sve ispitane izvedbene karakteristike zadovoljeni kriterije prihvatljivosti i da je metoda pogodna za analizi PAU u realnim uzorcima PM₁₀ čestica.

5.6. Rezultati analize realnih uzoraka

Optimirana i validirana metoda korištena je za analizu uzoraka prikupljenih tijekom 10 dana na mjernoj postaji Puntijarka u veljači 2025. godine. Uzorci su prikupljeni u zimskom periodu i zbog toga su očekivane veće koncentracije PAU nego ljeti kada intenzivnije sunčevo zračenje uzrokuje fotorazgradnju policikličkih aromatskih ugljikovodika.

U Tablici 30 prikazani su rezultati iskorištenja za surogatni standard perilen D12 koji je dodan u uzorke prije početka analize. U Tablici 29 prikazane su koncentracije PAU određivane tijekom 10 dana. Koncentracije su korigirane s obzirom na iskorištenje surogatnog standarda.

Tablica 30. Iskorištenja postignuta za surogatni standard perilen D12.

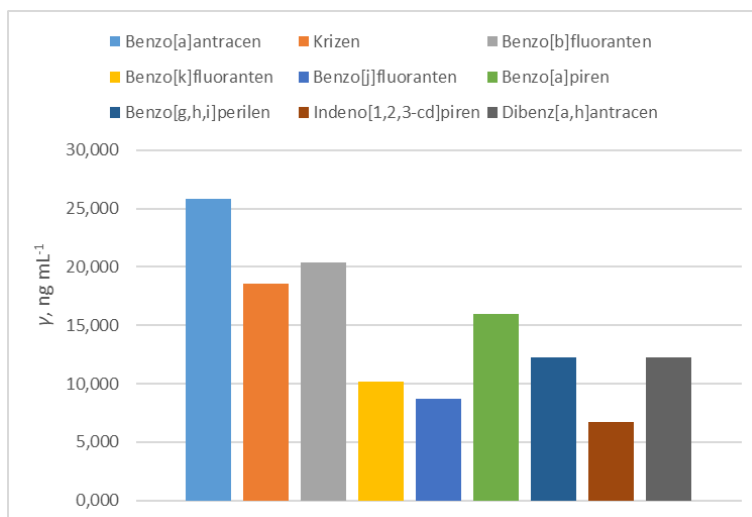
Perilen D12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dobiveno (ng mL ⁻¹)	465,33	462,80	453,87	455,27	468,78	454,56	468,88	463,68	472,68	466,82
Očekivano (ng mL ⁻¹)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Iskorištenje (%)	93,07	92,56	90,77	91,05	93,76	90,91	93,78	92,74	94,54	93,36

Tablica 31. Koncentracije analita (ng mL⁻¹) nakon korekcije s obzirom na iskorištenje surogatnog standarda.

Naziv analita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Benzo[a]antracen	31,11	14,89	28,36	34,30	37,76	20,34	20,32	18,42	30,45	22,47
Krizen	25,19	9,13	16,34	21,02	25,03	12,97	15,18	13,16	27,11	20,59
Benzo[b]fluoranten	22,23	14,23	20,52	23,76	23,48	19,02	19,25	17,73	23,43	20,22
Benzo[k]fluoranten	10,95	9,90	10,71	10,82	10,98	8,86	9,50	9,60	11,46	8,95
Benzo[j]fluoranten	9,18	8,11	6,65	8,29	8,09	6,58	6,20	5,62	8,77	19,92
Benzo[a]piren	22,13	8,87	15,35	17,48	22,45	12,48	12,90	11,37	21,68	14,82
Benzo[g,h,i]perilen	17,81	7,02	10,36	14,61	15,75	8,88	9,92	8,46	17,24	12,23
Indeno[1,2,3-cd]piren	7,17	5,16	6,64	7,09	8,57	6,35	5,99	6,93	7,84	5,63
Dibenz[a,h]antracen	18,19	7,35	11,15	14,20	15,12	9,22	9,97	8,34	17,23	12,08

Iz rezultata prikazanih u Tablici 31 izračunate su srednje vrijednosti koncentracije svakog pojedinog analita kroz 10 dana. Na taj način lakše je usporediti koji analiti imaju najviše

koncentracije i procijeniti njihove izvore. Na Slici 29 prikazan je graf na kojemu su naznačene srednje koncentracije analita tijekom ispitivanja PAU u PM₁₀ česticama na mjernoj postaji Puntijarka.



Slika 29. Srednje koncentracije PAU tijekom 10 dana u veljači 2025. godine.

Najvišu srednju koncentraciju ima benzo[*a*]antracen, a zatim benzo[*b*]fluoranten i benzo[*a*]piren (Slika 29). Računajući omjere određenih analita može se procijeniti njihov primarni izvor. Tako omjeri poput $\text{Ant}/(\text{Phen}+\text{Ant}) > 0.1$, $\text{Fln}/(\text{Pyr}+\text{Fln}) > 0.5$ i $\text{BaA}/(\text{BaA}+\text{Chry}) > 0.35$ ukazuju na nepotpuno sagorijevanje organskih tvari poput drva i ugljena. S druge strane, omjer $\text{BaP}/\text{BghiP} > 0.5$ ukazuje na emisije PAU iz motornih vozila [25].

Računanjem omjera iz srednjih vrijednosti koncentracija dobije se da je $\text{BaA}/(\text{BaA}+\text{Chry}) > 0.35$, odnosno omjer iznosi 0,58 što ukazuje na to da je u blizini mjerne postaje došlo do nepotpunog sagorijevanja drva ili ugljena tijekom perioda mjerenja. Što ne začuđuje jer je mjerenje provedeno u veljači kada se puno ljudi grije na peći koje koriste drvo ili ugljen. Također, omjer BaP/BghiP iznosi 1,3 što je veće od kriterija ($\text{BaP}/\text{BghiP} > 0.5$), a to nam ukazuje na to da je do veće emisije PAU došlo i zbog motornih vozila.

Konačni iznosi koncentracija PAU u PM₁₀ česticama izražavaju se u mjernoj jedinici ng m⁻³. Svaki uzorak prikuplja se 24 h uz protok zraka 55,5 m³/h. Preračunate koncentracije svih analita prikazane su u Tablici 30.

Tablica 32. Koncentracije analita u ng m⁻³.

Naziv analita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Benzo[<i>a</i>]antracen	0,61	0,29	0,55	0,67	0,74	0,40	0,40	0,36	0,59	0,44
Krizen	0,49	0,18	0,32	0,41	0,49	0,25	0,30	0,26	0,53	0,40
Benzo[<i>b</i>]fluoranten	0,43	0,28	0,40	0,46	0,46	0,37	0,38	0,35	0,46	0,39
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	0,21	0,19	0,21	0,21	0,21	0,17	0,19	0,19	0,22	0,17
Benzo[<i>j</i>]fluoranten	0,18	0,16	0,13	0,16	0,16	0,13	0,12	0,11	0,17	0,39
Benzo[<i>a</i>]piren	0,43	0,17	0,30	0,34	0,44	0,24	0,25	0,22	0,42	0,29
Benzo[<i>g,h,i</i>]perilen	0,35	0,14	0,20	0,29	0,31	0,17	0,19	0,17	0,34	0,24
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]piren	0,14	0,10	0,13	0,14	0,17	0,12	0,12	0,14	0,15	0,11
Dibenz[<i>a,h</i>]antracen	0,36	0,14	0,22	0,28	0,30	0,18	0,19	0,16	0,34	0,24

Kategorizacija kvalitete zraka može se odrediti obzirom na tvari koje imaju propisane granične vrijednosti (GV) i ciljne vrijednosti (CV). U skladu sa Zakonom o zaštiti zraka kategorije kvalitete zraka utvrđuju se jedanput godišnje za proteklu kalendarsku godinu, i to za svaku pojedinačnu onečišćujuću tvar, kada je to primjenjivo, a odnose se na zaštitu zdravlja ljudi, kvalitetu življenja, zaštitu vegetacije i ekosustava [26]. Granične vrijednosti i/ili ciljne vrijednosti za tvari koje se određuju dane su Uredbom o razinama onečišćujućih tvari u zraku [27].

6. ZAKLJUČAK

Policiklički aromatski ugljikovodici ubrajaju se u skupinu spojeva poznatih po svojim kancerogenim i mutagenim svojstvima. U okoliš dospijevaju procesima proizvodnje goriva, prirodnog plina, lakih i teških metala ili prirodnim putem prilikom šumskih požara i vulkanskih erupcija. Najčešći izvori PAU su izgaranje goriva u motornim vozilima, spaljivanje otpada i plastičnih masa te kućna ložišta na drvo i ugljen. Zbog štetnog utjecaja na zdravlje ljudi, potrebno je kontinuirano pratiti njihove koncentracije u okolišu i dodatno na taj način prepoznati glavne izvore PAU u određenom području. Od PAU spojeva najviše se izdvaja benzo[*a*]piren jer se on pojavljuje u kada su prisutni i ostali PAU. Najčešće korištena metoda za određivanje PAU u okolišnim matricama je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).

Cilj ovoga rada bio je optimirati i validirati metodu GC-MS za određivanje PAU u PM₁₀ česticama. Razvoj metode započeo je zamjenom kolone *HP-5MS* koja nije mogla razlučiti sve ispitivane PAU što je onemogućilo preciznu integraciju površine pikova. Zamijenjena je s kolonom *Select PAH* koja je razlučila benzo[*a*]antracen i krizen te strukturne izomere benzo[*b*]fluoranten, benzo[*k*]fluoranten i benzo[*j*]fluoranten i omogućila praćenje koncentracije svakog od tih izomera posebno. Osim kolone, na instrumentu GC-MS optimirani su uvjeti rada, a kao optimalni odabrani su: konstantni protok od 1,6 mL min⁻¹, temperatura injektiranja 250 °C i temperatura kolone 280 °C, vrijeme mjerenja od 50 ms. Razvoj metode nastavljen je uvođenjem novih unutarnjih standarda tako da svaki ispitivani analit ima svoj unutarnji standard. Usporedbom dvije standardne otopine (*Internal Standards Mix 33* i *PAH Mix 9 deuterated*) pokazano je da otopina *PAH Mix 9 deuterated* koja sadrži unutarnje standarde za svaki analit omogućuje postizanje boljih iskorištenja. Štoviše, korištenjem otopine *Internal Standards Mix 33* nije zadovoljen kriterij iskorištenja za analit benzo[*k*]fluoranten. Ispitivanjem uvjeta postupka ekstrakcije utvrđeno je da su optimalni uvjeti ekstrakcije PAU iz PM₁₀ čestica: temperatura ekstrakcije 90 °C, ispiranje otapalom u volumenu od 75 % kapaciteta ekstrakcijske ćelije te 3 ekstrakcijska ciklusa. U odnosu na mikrovalnu ekstrakciju, ASE je pogodnija metoda za izolaciju PAU iz PM₁₀ čestica jer omogućuje precizniju kontrolu temperature i tlaka što rezultira boljom učinkovitošću, manjom potrošnjom otapala i kraćeg postupka obrade uzoraka. Validacijom novorazvijene metode ispitana je linearnost, pri čemu je uvjet $R^2 > 0,99$ u potpunosti zadovoljen za sve ispitivane analite. Ponovljivost rezultata također je potvrđena za sve analite uz uvjeti da je $RSD < 10\%$. Metoda je potom primijenjena u analizi obogaćenih uzoraka, pri čemu je iskorištenje za sve analite iznosilo više od 80%, što potvrđuje pouzdanost

metode za analizu realnih uzoraka. Na temelju rezultata validacije može se zaključiti da je novorazvijena i optimirana metoda prikladna i može se koristiti za analizu PAU u realnim uzorcima koji dolaze u Državni hidrometeorološki zavod uz dodatne provjere s certificiranim referentnim materijalima.

ZAHVALE

Želim se posebno zahvaliti svome mentoru na Državnom hidrometeorološkom zavodu dr. sc. Dariju Dabiću na svim idejama i svom uloženom trudu prilikom izrade ovoga rada i svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić koja me preporučila za rad na ovome projektu i puno pomogla u pisanju rada. Želim puno zahvaliti i tehničarkama na zavodu Silviji Škrtić i Ani Maleš na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvalu dugujem i svojoj obitelji, prijateljima i Marku na strpljenju i podršci u svakom trenutku.

7. Popis literatura:

- [1] C. M. Bridge, K. Jones, M. Maric, GC×GC–MS for Forensic Analysis, Spectroscopy Online, 34 (2018) 22–25.
- [2] S. Chen, S. Liao, Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources, Science of the Total Environment, 366 (2006) 112–123.
- [3] A. Šišović, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku u nas. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 51 (2000) 89–101.
- [4] I. Jakovljević, S. Žužul, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 62 (2011) 357–370.
- [5] J. Teixeira, C. Delerue-Matos, S. Morais, M. Oliveira, Environmental contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons and contribution from biomonitoring studies to the surveillance of global health, Environmental Science and Pollution Research 31 (2024) 54339–54362.
- [6] A. Šišović, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku u nas, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 51 (2000) 89–101.
- [7] K. Alexandrov, M. Rojas, S. Satarug, The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. Toxicology Letters 198 (2010) 63–8.
- [8] V. Vadić, S. Žužul, J. Rinkovec, G. Pehnec, Metali u sitnim česticama u zraku Zagreba, Sigurnost 55 (2013) 9–17.
- [9] URL: <https://www.haop.hr/hr/novosti/utjecaj-kvalitete-zraka-na-zdravlje-stanovnistva> (pristup: 2.8.2025.)
- [10] URL: <https://www.r-pur.com/en/blogs/air/comprendre-facilement-la-pollution-air-les-particules-fines-pm-2-5> (pristup: 26.6.2025)
- [11] URL: <https://www.britannica.com/science/chromatography/Elution-chromatography> (pristup: 15.7.2025.)
- [12] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, Medicina, 45 (2009) 218–232.

- [13] G. Guiochon, C. L. Guillemin, Chapter 15 Quantitative Analysis By Gas Chromatography Measurement of Peak Area and Derivation of Sample Composition, *Journal of Chromatography Library*, 42 (1988) 629–659.
- [14] URL: <https://www.longdom.org/open-access/retention-factor-and-its-role-in-chromatographic-method-development-1099425.html> (pristup: 3.7.2025.)
- [15] URL: <https://www.researchgate.net/figure/Classification-of-the-chromatographic-techniques> (pristup 22.5.2025.)
- [16] J. C. Giddings, Comparison of Theoretical Limit of Separating Speed in Gas and Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 37 (1965) 60–63.
- [17] S. J. Lehotay, J. Hajšlová, Application of gas chromatography in food analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 686–697
- [18] A. H. Ali, HighPerformance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6 (2022) 10–20.
- [19] B. S. Crimmins, J. E. Baker, Improved GC/MS methods for measuring hourly PAH and nitro-PAH concentrations in urban particulate matter, *Atmospheric Environment*, 35 (2006) 6764–6779.
- [20] A. Mueller, N. Ulrich, J. Hollmann, C. E. Z. Sanchez, U. E. Rolle-Kampezyk, M. Bergen, Characterization of a multianalyte GC-MS/MS procedure for detecting and quantifying polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH derivatives from air particulate matter for an improved risk assessment, *Environmental Pollution*, 255 (2019) 112967.
- [21] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri*, 1 (2012) 61–64.
- [22] H. Cantwell (ur.), *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 3. izdanje, Eurachem, 2025.
- [23] V. J. Barwick (ur.), *Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3*, 2. izdanje, Eurachem, 2023.

- [24] A. Forootan, R. Sjöback, J. Björkman, B. Sjögreen, L. Linz, M. Kubista, Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12 (2017) 1–6.
- [25] N. Vu-Duc, L. A. PhungThi, T. Le-Minh, L. A. Nguyen, H. Nguyen-Thi, L. H. Pham-Thi, V. A. Doan-Thi, H. Le-Quang, H. Nguyen-Xuan, T. T. Nguyen, P. T. Nguyen, D. B. Chu, Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Airborne Particulate Matter Samples by Gas Chromatography in Combination with Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS), *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, (2021) 641326.
- [26] Zakon o zaštiti zraka, NN 127/2019.
- [27] Uredba o razinama onečišćujućih tvari u zraku, NN 77/2020

SAŽETAK

Nera Bebek

Razvoj analitičke metode za određivanje kancerogenih i mutagenih policikličkih aromatskih ugljikovodika u PM₁₀ česticama

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) široko su rasprostranjeni spojevi poznati po svojim kancerogenim i mutagenim svojstvima. U okoliš dospijevaju procesima proizvodnje goriva, prirodnog plina, lakih i teških metala ili prirodnim putem prilikom šumskih požara i vulkanskih erupcija. Najčešći izvori PAU su izgaranje goriva u motornim vozilima, spaljivanje otpada i kućna ložišta na drvo i ugljen. Izgaranjem benzinskog goriva ispuštaju se PAU većih molekulskih masa, dok dizelska goriva emitiraju PAU manjih molekulskih masa. U okolišu su prisutni vezani na organske i anorganske čestice u tlu, na PM₁₀ čestice u zraku ili kao slobodne molekule u zraku. Iz navedenih razloga u Državnom hidrometeorološkom zavodu (DHMZ), kao i u ovom radu, pratila se koncentracija većeg raspona molekulskih masa PAU (od benzo[*a*]antracena do benzo[*g,h,i*]perilena) u PM₁₀ česticama.

U ovom istraživanju optimirana je i validirana metoda za određivanje PAU u PM₁₀ česticama na plinskom kromatografu spregnutom sa spektrometrijom masa (GC-MS). Razvoj metode uključivao je optimizaciju pripreme uzoraka, uvođenje postupka ubrzane ekstrakcije otapalom i optimizaciju metode GC-MS. U postupku pripreme uzoraka uvedeni su novi unutarnji standardi, postupak ekstrakcije optimiran je s obzirom na temperaturu ekstrakcije, volumen otapala i broj ciklusa ekstrakcije. U metodi GC-MS optimirani su uvjeti rada promjenom kolone, protoka pokretne faze, temperature ubrizgavanja uzorka i kolone. Određeni su optimalni uvjeti postupka ekstrakcije: temperatura ekstrakcije od 90 °C, volumen otapala 75 % volumena ćelije i 3 ciklusa ekstrakcije. Primjenom nove kolone (*Select PAH*) i nove otopine unutarnjeg standarda (*PAH Mix 9 deuterated*) postignuta su bolja iskorištenja u odnosu na prethodno korištenu kolonu i unutarnje standarde. Validacija metode provedena je ispitivanjem selektivnosti, linearnosti, ponovljivosti i istinitosti. Na temelju rezultata validacije pokazano je da se metoda može primjenjivati za analizu PAU u realnim uzorcima PM₁₀ čestica prikupljenih na postaji Puntijarka u Zagrebu i dostavljenih u Državni hidrometeorološki zavod.

Ključne riječi: policiklički aromatski ugljikovodici, PM₁₀ čestice, ubrzana ekstrakcija otapalom, GC-MS, validacija

ABSTRACT

Nera Bebek

Development of an analytical method for the determination of carcinogenic and mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁₀ particles

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widely distributed compounds known for their carcinogenic and mutagenic properties. They enter the environment through fuel production processes, natural gas, light and heavy metals, or naturally during forest fires and volcanic eruptions. The most common sources of PAHs are fuel combustion in motor vehicles, waste burning, and domestic heating using wood and coal. The combustion of gasoline releases PAHs with higher molecular weights, while diesel fuels emit PAHs with lower molecular weights. In the environment, they are present bound to organic and inorganic particles in soil, attached to PM₁₀ particles in the air, or as free molecules in the air. For the above-mentioned reasons, at the Croatian Meteorological and Hydrological Service as well as in this study, the concentration of a wider range of PAH molecular masses (from benzo[*a*]anthracene to benzo[*g,h,i*]perylene) in PM₁₀ particles was monitored.

In this research, a method for determination of PAHs in PM₁₀ particles using a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS) was optimized and validated. Method development included optimization of sample preparation, accelerated solvent extraction procedure, and GC-MS method optimization. In the sample preparation procedure, new internal standards were introduced, and the extraction process was optimized in terms of extraction temperature, solvent volume, and the number of extraction cycles. In the GC-MS method, working conditions were optimized by changing the column, carrier gas flow rate, injection and column temperatures. The obtained results show that the optimal extraction conditions are: extraction temperature of 90 °C, solvent volume equal to 75 % of the cell volume, and three extraction cycles. The introduction of a new column (*Select PAH*) and new internal standard solution (*PAH Mix 9 deuterated*) increased recoveries compared to the previously used column and internal standards. Method validation was carried out through testing of selectivity, linearity, repeatability, and accuracy. Based on the validation results, it was shown that the method can be applied for the analysis of PAHs in real samples of PM₁₀ particles collected at the Puntijarka station in Zagreb and submitted to the State Hydrometeorological Institute.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, PM₁₀ particles, accelerated solvent extraction, GC-MS, validation

ŽIVOTOPIS

Nera Bebek rođena je 20.12.2000. u Zagrebu. Nakon završene VII. Gimnazije upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2019. godine. Stručnu praksu na preddiplomskom studiju odradila je na Institutu Ruđera Boškovića u Zagrebu, u Laboratoriju za sintezu novih materijala, a tijekom diplomskog studija na Državnom hidrometeorološkom zavodu u Laboratoriju organske kemije. Završila je preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva 2023. godine i upisala istoimeni diplomski studij. Od 2023. godine tajnica je studentskog zbora Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije i članica etičkog povjerenstva te članica studentske sekcije HDKI. U sklopu HDKI-ja bila je dio organizacijskom tima za projekt „*Kemija i inženjerstvo u razvoju lijekova*“. Godine 2024. sudjelovala je na znanstveno stručnom skupu „Susret mladih kemijskih inženjera“ s posterskim izlaganjem pod temom „*Određivanje ekotoksičnosti rodanida, cijanida i fenola*“. Tijekom studiranja pohađala je dvije CeSaR radionice i CeSaR stručnu praksu na fakultetu. Sudjelovala je na Danima otvorenih vrata Fakulteta i predstavljala je Fakultet na MUZZA tjednima znanosti.