

Razvoj i validacija metode za određivanje halooctenih kiselina u vodi

Filić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:889750>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

KRISTINA FILIĆ

RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE
HALOOCTENIH KISELINA U VODI

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za ekologiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija vode i obrada otpadnih voda
Tema rada je prihvaćena na VII: redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 2. svibnja 2023.
Mentor: prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić
Pomoć pri izradi: dr. sc. Adela Krivohlavek

Razvoj i validacija metode za određivanje halooctenih kiselina u vodi

Kristina Filić, 0113143025

Sažetak:

Halooctene kiseline su nehlapljivi nusprodukti dezinfekcije vode koji nastaju reakcijom između dezinfekcijskog sredstva klora i prirodno prisutne organske tvari u vodi, a njihova maksimalna koncentracija u vodi propisana je Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23). Praćenje udjela dezinfekcijskih nusprodukata, odnosno halooctenih kiselina važno je zbog njihovog potencijalnog djelovanja na zdravlje ljudi. U ovom radu opisana je razvijena modificirana metoda za određivanje halooctenih kiselina u vodi koja se bazira na ekstrahiranju halooctenih kiselina iz uzorka vode u eterski sloj, nakon čega slijedi metilacija halooctenih kiselina metanolom s kiselinom kao katalizator u odgovarajuće metilne estere te određivanje udjela halooctenih kiselina u ekstraktu uzorka plinskom kromatografijom s detektorom zahvata elektrona. Razvijena metoda je modificirana kroz parametre validacije i utvrđeno je da je metoda primjenjiva na stvarnim uzorcima vode. Određivanje halooctenih kiselina u vodi pomoću postavljene metode provedeno je na uzorcima vode za ljudsku potrošnju s područja Osječko baranjske županije i grada Zagreba. Udio ukupnih pet halooctenih kiselina u uzorcima kretao se od 1,59 µg/L do 21,50 µg/L, što predstavlja vrijednosti ispod maksimalne dopuštene koncentracije onečišćenja vode namijenjene za ljudsku potrošnju.

Ključne riječi: halooctene kiseline, nusprodukti dezinfekcije, plinska kromatografija, voda za ljudsku potrošnju

Rad sadrži: 61 stranica
13 slika
10 tablica
0 priloga
75 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić | član-mentor |
| 3. dr. sc. Adela Krivohlavek | član |
| 4. doc. dr. sc. Valentina Bušić | zamjena člana |

Datum obrane: 8. prosinca 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Ecology and Toxicology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Water technology and wastewater treatments

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII held on May 2, 2023.

Mentor: *Mirna Habuda–Stanić*, PhD, full professor

Technical assistance: *Adela Krivohlavek*, PhD

The Development and Validation of the Method for the Determination of Haloacetic Acids in Water

Kristina Filić, 0113143025

Summary:

Haloacetic acids are non-volatile disinfection by-products of water formed in the reaction between chlorine-based disinfection agents and naturally occurring organic matter in water. Their maximum proportions in water are regulated by the Regulation on compliance parameters, methods of analysis and monitoring of water intended for human consumption (NN 64/23). Monitoring the proportion of disinfection by-products, i.e. haloacetic acids, is important because of their potential impact on human health. In this paper, a modified method for the determination of haloacetic acids in water is described, which is based on the extraction of haloacetic acids from a water sample into an ether layer, followed by the methylation of haloacetic acids with acidic methanol into the related methyl esters and the determination of haloacetic acids proportion in the sample extract by gas chromatography with an electron capture detector. The developed method was modified through validation parameters and it was found that the method is applicable on real water samples. The determination of haloacetic acids in water using the set method was performed out on water samples for human consumption from the area of Osječko baranjske county and the city of Zagreb. The total proportion of five haloacetic acids in the samples ranged from 1.59 µg/L to 21.50 µg/L, which represents values below the maximum allowed concentration of water pollution intended for human consumption.

Key words: haloacetic acids, disinfection by-products, gas chromatography, water for human consumption

Thesis contains: 61 pages
13 figures
10 tables
0 supplements
75 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Dajana Gašo-Sokač, PhD, full professor | chair person |
| 2. Mirna Habuda–Stanić, PhD, full professor | supervisor |
| 3. Adela Krivohlavek, PhD | member |
| 4. Valentina Bušić, PhD, assistant professor | stand-in |

Defense date: December 8, 2023

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mirni Habudi-Stanić i komentorici dr. sc. Adeli Krivohlavek na ukazanom povjerenju, predloženoj temi, uloženom vremenu i stručnoj pomoći pri izradi diplomskog rada.

Posebna zahvala mag. nutr. Lani Ani Perunović s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu na nesebičnoj pomoći, strpljenju, uloženom vremenu i trudu tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Veliku zahvalu dugujem roditeljima i sestrama na bezuvjetnoj podršci, motivaciji i pomoći tijekom cijelog studiranja. Hvala Vam, bez vas ovaj uspjeh ne bi bio moguć.

Hvala mojim kolegama iz studentskih klupa jer bez njih iskustvo studiranja ne bi bilo isto.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. Dezinfekcija vode	5
2.2. Dezinfekcija vode klorom i njegovim spojevima	6
2.2.1. Sredstva za dezinfekciju vode na bazi klora	7
2.3. Nusprodukti dezinfekcije vode (DBP)	9
2.4. Haloctene kiseline (HAA) identificirane u dezinficiranoj vodi.....	10
2.5. Zakonska regulativa haloctenih kiselina na razini Europske unije	11
2.6. Čimbenici koji utječu na stvaranje haloctenih kiselina.....	12
2.7. Izloženost populacije haloctenim kiselinama.....	13
2.8. Zdravstveni učinak haloctenih kiselina na zdravlje čovjeka	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Zadatak.....	20
3.2. Analitička metoda	20
3.3. Materijali i oprema	21
3.3.1. Standardi i reagensi.....	21
3.3.2. Aparatura i oprema.....	22
3.4. Uzorkovanje.....	22
3.5. Postupak pripreme uzorka za analizu	23
3.5.1. Ekstrakcija uzorka	24
3.5.2. Metilacija uzorka metanolom uz dodatak kiseline	25
3.6. Analiza ekstrakta uzorka	26
3.7. Slijepa proba.....	28
3.8. Validacija metode	29
4. REZULTATI	30
4.1. Rezultati validacije metode.....	31
4.1.1. Linearnost.....	31
4.1.2. Granica kvantifikacije.....	33
4.1.3. Preciznost.....	35
4.1.4. Točnost.....	39
4.1.5. Selektivnost	42
4.1.6. Područje primjene metode	44
4.1.7. Sažetak rezultata validacijskih parametara	44
4.2. Rezultati uzoraka vode	46
5. RASPRAVA	47
6. ZAKLJUČAK	52
7. LITERATURA	54

Popis oznaka, kratica i simbola

°C	Celzijev stupanj
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitra
5HAA	Smjesa pet halooctenih kiselina monokloroctene, dikloroctene, trikloroctene, monobromooctene i dibromoctene kiseline.
Ā	Aritmetička sredina
BCA	Bromokloroctena kiselina
BDCA	Bromodikloroctena kiselina
BIA	Bromojodoctena kiselina
Ca(OCl) ₂	Kalcijev hipoklorit
CDBA	Klorodibromoctena kiselina
CIA	Klorojodoctena kiselina
Cl ₂	Elementarni klor
ClO ₂	Klorni dioksid
DBA	Dibromoctena kiselina
DBP	Dezinfekcijski nusprodukti
DCA	Dikloroctena kiselina
DIA	Dijodoctena kiselina
GC-ECD	Plinski kromatograf s detektorom zahvata elektrona
h	Sat
H ₂ SO ₄	Sumporna kiselina
HAA	Halooctene kiseline
HCIO	Hipokloritna kiselina
IRAC	Internacionalna agencija za istraživanje raka
k	Koeficijent korelacije
L	Litra
m	Metar
MBA	Monobromoctena kiselina

MCA	Monokloroctena kiselina
MIA	Monojodoctena kiselina
min	Minuta
mL	Millilitar
mm	Milimetar
MTBE	Metil- <i>tert</i> -butil-eter
Na ₂ CO ₃	Natrijev bikarbonat
NaClO	Natrijev hipoklorit
ng	Nanogram
NH ₂ Cl	Kloramin
NTP	Nacionalni toksikološki program
R	Iskorištenje
RSD%	Relativna standardna devijacija
RT	Vrijeme zadržavanja
stDEV	Standardna devijacija
TBA	Tribromoctena kiselina
TCA	Trikloroctena kiselina
US EPA	Američka agencija za zaštitu okoliša

1.UVOD

Voda kao strateški resurs 21. stoljeća preduvjet je za razvoj ljudskog društva. Ona je osnova za život i potreba svakog organizma. Ekonomski je resurs koji se nalazi u ograničenim količinama. Sve civilizacije nastale su u neposrednoj blizini izvora vode i njezina uloga u organizmu je neizmjenjivo važna. Voda se u kućanstvu osim za piće koristi i za pranje, u poljoprivredi za navodnjavanje, u industriji u različitim operacijama hlađenja, termičke obrade i sl.

Globalni problem 21. stoljeća predstavlja osiguravanje dovoljne količine vode za piće populaciji svijeta. Pitka voda, odnosno zdravstveno ispravna voda određene kakvoće nije dostupna svima. Stoga kako bi voda za piće bila mikrobiološki ispravna, odnosno određene kakvoće podvrgava se pročišćavanju različitim metodama. Voda iz javnih vodoopskrbnih sustava podrijetlom je iz površinskih ili podzemnih izvora. Njihova fizikalno–kemijska svojstva su promjenjiva i ovise o više vanjskih faktora. Izvori vode iz podzemnih ili površinskih vodotokova vrlo često su onečišćeni različitim prirodnim organskim tvarima. Prirodne organske tvari koje se nalaze u vodama su najčešće skup različitih organskih spojeva koji nastaju raspadanjem različitih biljaka, algi i bakterija te antropogenih izvora ili djelovanjem čovjeka. Prisutnost prirodnih organskih tvari čine vodu nepoželjnom, jer utječu na boju, okus i miris vode, mogu utjecati na uspješnost procesa obrade vode kao i uspješnost uklanjanja željeza i mangana iz vode. Također, pojedine organske tvari (pesticidi, fenoli i sl.) mogu biti toksični ili kancerogeni.

Dezinfekcija vode smatra se najkorisnijim dostignućem za javno zdravstvo 20. stoljeća diljem svijeta. Smatra se i da je znatno smanjila pojavu bolesti uzrokovanih patogenim mikroorganizmima koje se prenose vodom. Dezinfekcija se najčešće vrši klorom i njegovim spojevima zbog dobrog dezinfekcijskog djelovanja, relativne niske cijene klora i njegovih spojeva te jednostavnosti upravljanja procesom dezinfekcije. Prilikom dezinfekcije vode s kemijskim dezinficijensima može doći do formiranja nusprodukata dezinfekcije vode, reakcijom između sredstva za dezinfekciju i organske tvari prisutne u vodi koja se dezinficira. Nusproizvodi dezinfekcije vode često su vrlo toksični, a kronično izlaganje malim količinama može biti kancerogeno za ljude (NTP, 2018). Oko 80 % ukupnog broja nusprodukata nastalih dezinfekcijom vode, čine trihalometani i halooctene kiseline. Ljudi su češće izloženi haloocenenim kiselinama u odnosu na trihalometane koji su hlapljiviji spojevi, trihalometani ispare iz vode a halooctene kiseline zaostanu u vodi (Chen i sur., 2009). Do danas je u dezinficiranoj vodi identificirano 13 haloocenenih kiselina koje sadrže klor, brom, jod ili kombinaciju ovih halogenih elemenata (NTP, 2018). Europsko Vijeće 2020. godine izdalo je Direktivu 2020/2184 kojom propisuje dopušteni udio 5 haloocenenih kiselina u vodi.

U nastavku diplomskog rada cilj je razviti i validirati metodu za određivanje pet haloocenenih kiselina (5HAA) koje se najčešće mogu pronaći u vodi za piće i koje su regulirane Europskom Direktivom 2020/2184 i Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analiza i

monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23), a predstavlja smjesu monokloroctene kiseline (MCA), monobromoctene kiseline (MBA), dikloroctene kiseline (DCA), trikloroctene kiseline (TCA) i dibromoctene kiseline (DBA). Metoda je razvijana na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu. Tijekom razvijanja i validacije metode, za određivanje haloctenih kiselina korištena je modificirana US EPA metoda 552.3. Determinacija haloctenih kiselina i dalapona (2,2-diklorpropionska kiselina) u vodi za piće tekućinsko–tekućnskom mikroekstrakcijom, derivatizacijom i plinskom kromatografijom s detektorom zahvata elektrona iz 2003. godine.

Princip metode je ekstrahirati haloctene kiseline iz vode pomoću metil-*tert*-butil-etera (MTBE), nakon toga slijedi metilacija haloctenih kiselina u odgovarajuće metilne estere, pomoću metanola uz dodatak sumporne kiseline kao katalizatora te određivanje udjela metilnih estera haloctenih kiselina plinskom kromatografijom s detektorom zahvata elektrona (GC-ECD). Postavljena modificirana metoda je validirana kroz parametre linearnosti, preciznosti, točnosti, granicu kvantifikacije, selektivnosti i određeno joj je područje primjene.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. Dezinfekcija vode

Početak 20. stoljeća počinje se primjenjivati dezinfekcija vode za ljudsku potrošnju kako bi se spriječio širenje bolesti vodom te kako bi se povećala kvaliteta vode. Postupkom dezinfekcije vode uklanjaju se različiti mikroorganizmi koji mogu biti patogeni, a time i izvor bolesti kod ljudi i životinja. Dezinfekcija je neophodna kod opskrbe vodom za ljudsku potrošnju. Značajna je za mikrobiološku kakvoću vode zbog eliminiranja i smanjivanja broja mikroorganizama koji se nalaze u vodi, koja može biti podrijetlom iz površinskih i podzemnih vodotokova. Voda za piće, kada nije mikrobiološki ispravna, može postati izvor infektivnih bolesti koje se prenose vodom. Bolesti koje se prenose vodom mogu izazvati epidemije koje se vrlo brzo šire i za kratko vrijeme javlja se veliki broj zaraženih osoba (Sundstrom i Klei, 1979).

Vodom se prenose bolesti kao što su kolera, trbušni tifus i paratifus, infektivni hepatitis, tularemija, dizenterija te razni paraziti. Različite zarazne bolesti stoke mogu se prenositi vodom kao i jaja parazita koja mogu inficirati životinje, a neke mogu biti infektivne za ljude. Zato je važno ukloniti uzročnike bolesti obradom vode odnosno kondicioniranjem vode za ljudsku potrošnju upotrebom odgovarajućih fizikalno-kemijskih metoda.

Osim mikroorganizama, onečišćena voda sadrži prirodne organske tvari, koje mogu biti prisutne u površinskim i podzemnim vodotokovima kao posljedica prirodnih događaja u okolišu. Prirodne organske tvari predstavljaju smjesu organskih spojeva različitog podrijetla, različitog molekulskog sastava i različitih veličina. U vodi su nepoželjne zbog utjecaja na organoleptička svojstva vode (boju, okus i miris vode), smetaju u procesu obrade vode, te u procesu uklanjanja mangana i željeza iz vode, izazivaju promjene u sistemima za opskrbu vodom, mogu imati toksičan i kancerogen učinak na ljudski organizam, mogu uzrokovati nestanak otopljenog kisika u prirodnim vodotokovima uslijed mikrobne razgradnje, te su prekursori za nastanak nusprodukata dezinfekcije vode koji bi mogli imati toksične ili kancerogene učinke na ljudsko zdravlje. Prirodne organske tvari koje su prisutne u vodi dijele se na:

- hidrofobne komponente (dijelovi biljaka, mikroorganizmi, ulja, humusne tvari i dr.) i
- hidrofilne komponente (humusne tvari, saharidi, masne kiseline, proteini, peptidi, aminokiseline, otopljeni organski plinovi, sintetski organski spojevi i dr.).

Iz površinskih voda veliki dio prirodnih organskih tvari predstavlja hidrofobne kiseline, koje se klasificiraju kao negativno nabijene makromolekule, odnosno humusne tvari, koje sadrže huminske kiseline, fulvinske kiseline, himetomelanske kiseline i druge sastojke. Humusne tvari

prisutne u vodi, cikličke su strukture i kisele su po prirodi. Huminske kiseline predstavljaju kisele sastojke humusne tvari koje su topljive u bazama, no talože se u kiselinama, dok su fulvinske kiseline topljive u bazama i kiselinama. Zbog svoje strukture huminske kiseline mogu na sebe vezati metale pri čemu nastaju kompleksi metala i huminske tvari. Zbog negativnog utjecaja prirodnih organskih tvari na kakvoću i kvalitetu vode, potrebno ih je u potpunosti ukloniti različitim metodama obrade vode.

Primjenom filtracije vode uklanjaju se grube čestice koje su prisutne u vodi. Nakon uklanjanja grubih nečistoća, primjenjuje se metoda koagulacije i flokulacije, kojoj je cilj uklanjanje disperzivnih čestica prisutnih u vodi, te dezinfekcija. Cilj dezinfekcije je inaktivacija mikroorganizama kao što su bakterije, virusi i protozoa kako bi se spriječilo širenje bolesti vodom, također uništavanje nepatogenih mikroorganizama ili živih organizama čije prisustvo u vodi negativno utječe na kakvoću vode. Uspješna dezinfekcija može se provesti samo u bistroj vodi. Dezinfekcija se može provesti i kao preventivna mjera u slučajevima rata, elementarne nepogode kao što je poplava ili potres, kada se voda mora transportirati ili skladištiti duže vremena i dr. Dezinfekcija vode može se provoditi fizikalnim metodama, kemijskim metodama ili kombinacijama fizikalno-kemijskih metoda. Najčešće se upotrebljavaju kemijske metode zbog svoje učinkovitosti i mogućnosti naknadnog djelovanja. Većinom se za kemijsku dezinfekciju koristi klor, klorni dioksid ili ozon. Dezinfekcija klorom i njegovim spojevima je najučestalija metoda dezinfekcije (Mijatović i Matošić, 2008).

2.2. Dezinfekcija vode klorom i njegovim spojevima

Dezinfekcija vode klorom i njegovim spojevima (klorni dioksid, kalcijev hipoklorit, natrijev hipoklorit i kloramin) najčešće se primjenjuje kao sredstvo za dezinfekciju, zbog dobrog dezinfekcijskog djelovanja, relativne niske cijene klora i njegovih spojeva te jednostavnosti upravljanja procesom dezinfekcije. Postrojenje za dezinfekciju vode klorom ne ovisi o električnoj energiji. Kada klor dođe u kontakt s vodom, nakon jedne minute djeluje na bakterije, napada stanice i razara enzimske sustave. Klor najslabije djeluje na inaktivaciju bakterijski spora i parazitskih protozoa (*Giardia lamblia*, *Giardia muris* i *Cryptosporidium*), nešto bolje na viruse, a najbolje djelovanje ima na bakterijske stanice.

Dezinfekcijska učinkovitost klorom pripisuje se slobodnom radikalu kisika (koji nastaje kao rezultat velikog afiniteta klora prema vodik iz vode) ili nastaloj hipokloritnoj kiselini (HClO) prilikom kloriranja. Mehanizam i dinamika baktericidnog djelovanja nisu još u dovoljnoj mjeri razjašnjenja. Dodavanje dovoljne količine klora u vodu kao i njegovih spojeva, važno je kako bi dezinfekcija vode klorom bila potpuna i učinkovita.

Dio dodanog klora, odnosno dezinfekcijskog sredstva se utroši na oksidaciju prirodne organske tvari koja je prisutna u vodi, dio na oksidaciju željeza i mangana koji mogu biti prisutni u nekim vodama te se dio utroši na reakciju spojeva s dušikom (amonijak). To predstavlja potrebu vode za klorom odnosno količinu klora koju je potrebno dodati vodi do pojave rezidualnog klora, a izražena je u mg/L. Treba uzeti u obzir da vode s istog izvora, ali u različitim godišnjim dobima ili prilikama (nakon oborina ili suša) nemaju istu potrebu vode za klorom. Koncentracija klora koja je zaostala u vodi, kao višak, nakon završenog procesa dezinfekcije vode, odnosno nakon reakcije klora s tvarima koje se oksidiraju u vodi nazivamo rezidualni klor i izražena je u mg/L. Rezidualni klor je garancija da je dezinfekcija potpuna odnosno da je proces dobro izvršen te štiti vodu od naknadne kontaminacije (Mijatović i Matošić, 2008). Zakonski je reguliran, te su njegove dopuštene koncentracije u vodi do 0,5 mg/L kod normalnih uvjeta. U izvanrednim situacijama količina rezidualnog klora može biti do 0,6 mg/L (Uredba 2023/754, 2023). Kako bi učinkovitost procesa dezinfekcije bila što bolja, potrebno je dodati dovoljnu količinu klora kako bi se zadovoljile potrebe vode za klorom i stvaranje rezidualnog klora, odnosno doza klora koju je potrebno dodati vodi izražava se u mg/L.

Potrebno vrijeme za dezinfekciju vode klorom je minimalno 30 minuta, nakon čega se određuje u vodi koncentracija rezidualnog klora koja mora biti minimalno 0,1 mg/L, kako bi proces dezinfekcije bio dobro izvršen. Ako se nakon 30 minuta po dodatku klora ne utvrdi da je količina rezidualnog klora dovoljna, postupak se ponavlja, sve dok se ne utvrdi odgovarajuća količina rezidualnog klora nakon ponovljenog postupka i isteka vremena od 30 minuta.

Dezinfekcija vode se može obaviti unutar cjevovoda ako je vrijeme zadržavanja dovoljno dugo u cjevovodima ili u spremnicima gdje je vrijeme zadržavanja dovoljno za kontakt sredstva za dezinfekciju i mikroorganizama. Kod dezinfekcije vode u spremnicima potrebno je osigurati miješanje spremnika kako bi dezinfekcija bila učinkovita (Mijatović i Matošić, 2008).

2.2.1. Sredstva za dezinfekciju vode na bazi klora

Dezinfekcijska sposobnost sredstava za dezinfekciju na bazi klora ovisi o količini aktivnog klora. Pod pojmom aktivni klor podrazumijeva se količina hipokloritne kiseline koja se oslobađa dodatkom dezinfekcijskog sredstva u vodu. Najviše korištena sredstva u obradi vode na bazi klora su:

- elementarni klor (Cl_2),
- klorni dioksid (ClO_2),
- kalcijev hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$),

- natrijev hipoklorit (NaClO) i
- kloramin (NH_2Cl).

Elementarni klor (Cl_2) je plin zeleno-žute boje, dobiven je elektrolizom otopine natrijevog klorida (NaCl), neugodnog je mirisa i teži je od zraka. Plinski klor sadrži 100 % aktivnog klora, što ga čini učinkovitijim dezinficijensom. Izrazito je toksičan i ubraja u grupu bojnih otrova zagušljivaca (Mijatović i Matošić, 2008). Nadražuje dišne puteve, kožu i sluznicu, no važno je napomenuti da plinoviti klor kada dođe u kontakt s vodom, pretvara se u hipokloritnu kiselinu i hipokloritne ione. Zbog toga toksična svojstva elementarnog klora u vodi za ljudsku potrošnju ne predstavljaju opasnost za ljude. Klor se transportira u čeličnim bocama pod tlakom i u tekućem je stanju. Potrebna količina elementarnog klora za dezinfekciju vode ovisi o kvaliteti vode koja se dezinficira (Omerdić, 2021).

Klorni dioksid (ClO_2) je nestabilni plin zeleno žute boje koji je teži od zraka. Ima intenzivan miris i otrovniji je od klora. Prema dezinfekcijskom djelovanju klorni dioksid je najučinkovitiji dezinficijens na bazi klora i oksidacijsko djelovanje mu je 2,5 puta jače od elementarnog klora. Zbog nestabilnog svojstva plina klorni dioksid se ne može skladištiti ni transportirati te se zbog toga proizvodi na licu mjesta. Klorni dioksid koristi se za dezinfekciju vode koja ima neugodan miris i okus, a optimalna koncentracija koja se upotrebljava za dezinfekciju je 0,2-0,5 mg/L. Za razliku od klora, klorni dioksid je učinkovitiji prilikom uklanjanja parazitskih organizama (Mijatović i Matošić, 2008).

Kalcijev hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) je bijela krutina, koja dolazi u obliku granula ili tableta. Vrlo je stabilan i kada je pravilno zapakiran može se dugo skladištiti u odgovarajućim uvjetima čuvanja. Vrlo je nagrizajuća te zahtjeva strogo pravilno rukovanje tijekom obrade vode. Kalcijev hipoklorit nastaje otapanjem elementarnog klora (Cl_2) u otopini kalcijevog oksida (CaO) i natrijeva hidroksida (NaOH). Vrlo dobro se otapa u vodi, te prilikom hidrolize dolazi do nastanka hipokloritne kiseline (HClO). Prilikom obrade vode s kalcijevim hipokloratom, koriste se manje količine dezinfekcijskog sredstva za razliku od dezinfekcije s elementarnim klorom (Omerdić, 2021).

Natrijev hipoklorit (NaClO) često se upotrebljava kod dezinfekcije bazena. Sadrži 10-14 % aktivnog klora. Mehanizam djelovanja je isti kao kod elementarnog klora i ostalih dezinfekcijskih sredstava na bazi klora, u reakciji s vodom daje hipokloritnu kiselinu (HClO).

Kloramin (NH_2Cl) nastaje prilikom kloriranja vode uz prethodnu amonizaciju vode, odnosno dodatkom amonijaka (NH_3) ili njegovih soli koje s klorom stvaraju kloramine. Prilikom dodavanja kloramina u vodu, kloramini daju hipokloritnu kiselinu (HClO) i postepeno se otpušta klor. Zbog postepenog otpuštanja klora, odnosno produženog djelovanja, kloramini su prikladni

za dezinfekciju vode koja duže stoji ili duže cirkulira u vodoopskrbnom sustavu (Mijatović i Matošić, 2008).

2.3. Nusprodukti dezinfekcije vode (DBP)

Prilikom procesa dezinfekcije vode s kemijskim dezinficijensima dolazi do stvaranja nusprodukata dezinfekcije vode (*eng.* Disinfection By Products, DBP). Reaktivna priroda klora ili drugih dezinfekcijskih sredstava korištenih za dezinfekciju vode, osim što pomaže kod inhibicije mikroorganizama uzrokuju stvaranje niza spojeva nastalih kao nusprodukti dezinfekcije vode. Dezinfekcijsko sredstvo reagira s prirodnim organskim tvarima (humusnim tvarima) iz vode pri čemu dolazi do formiranja DBP. Nusprodukti dezinfekcije nalaze se u kloriranoj vodi za piće, hrani koja je obrađena ili prana u kloriranoj vodi, napitcima koja su pripremljena s kloriranom vodom, bazenima koji su tretirani klorom i mogu se pronaći u zraku za vrijeme tuširanja (NTP, 2018).

Proces dezinfekcije vode je kritično bitan proces za kontrolu mikrobiološke ispravnosti vode za ljudsku potrošnju, jer sprječava širenje bolesti koje mogu biti uzrokovane konzumacijom zdravstveno neispravne vode. Smatra se da su nusprodukti dezinfekcije vode „nužno zlo“, jer do utjecaja na organizam dolazi tek nakon dugoročnog izlaganja i nakupljanja u organizmu. Dok kod kontaminirane neobrađene vode posljedice su odmah vidljive i mogu biti velikih razmjera te uzrok različitih epidemija kao i bolesti koje se prenose vodom (Šarkanj, 2010). Važno je napomenuti da uporaba dezinficijensa na bazi klora rezultira stvaranjem DBP-a koji su često povezivane s toksičnim i kancerogenim učinkom na organizam. Rizici od takvih posljedica su mali, jer se potencijalno opasni nusproizvodi dezinfekcije često nalaze u malim količinama u dezinficiranoj vodi, u usporedbi s rizicima koji su povezani s neodgovarajućom dezinfekcijom vode. Važno je da učinkovitost dezinfekcije vode ne bude ugroženo u pokušaju kontrole nastanka nusprodukata dezinfekcije (IPCS, 2000).

Do danas je identificirano više od 500 jedinstvenih nusprodukata dezinfekcije vode, a neki od najvažnijih predstavnika su trihalometani, haloketoni, klorirani fenili i halooctene kiseline (HAA). Oko 80 % od ukupnog broja nusprodukata nastali dezinfekcijom vode čine trihalometani i halooctene kiseline. Često se njihov učinak na organizam povezuju s toksičnim i kancerogenim posljedicama. Kako bi se udio nusprodukata dezinfekcije vode minimizirao primjenjuju se procesi prerade vode kod kojih se uklanjaju prekursori za nastanak DBP ili se koriste druga dezinfekcijska sredstva.

Ljudi su češće izloženi unosu HAA u odnosu na trihalometane jer su hlapljiviji spojevi od HAA, odnosno vrelište trihalometana je na oko 60 °C (vrelište HAA je na oko 180 °C) te se vrlo lako

uklanjaju tijekom zagrijavanja vode (Chen i sur., 2009). Nusproizvodi dezinfekcije vode često su vrlo toksični, a kronično izlaganje malim količinama može biti kancerogeno za ljude (NTP, 2018).

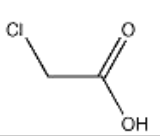
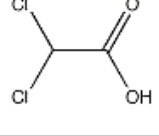
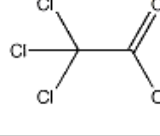
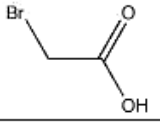
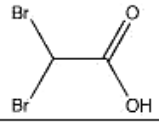
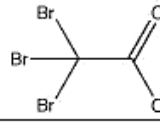
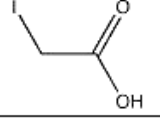
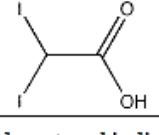
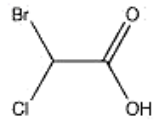
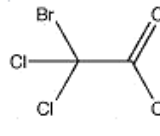
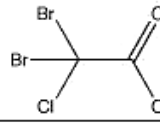
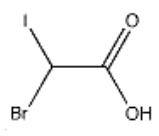
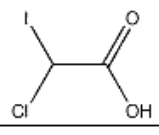
2.4. Halooctene kiseline (HAA) identificirane u dezinficiranoj vodi

Sve haloctene kiseline imaju kemijsku strukturu sličnu octenoj kiselini, odnosno molekule haloctenih kiselina sastoje se od dva atoma ugljika, koja uključuje karboksilnu skupinu (R-COOH), te α -ugljik. Haloctene kiseline nastaju zamjenom jednog, dva ili tri vodikova atoma koji se nalaze vezani za α -ugljik s nekim od halogenih elemenata. Halogeni elementi su elementi 17. skupine periodnog sustava elemenata a to su fluor (F), klor (Cl), brom (Br) i jod (I).

Do danas je u dezinficiranoj vodi identificirano 13 haloctenih kiselina koje sadrže klor, brom, jod ili kombinaciju ovih halogenih elemenata, a to su :

- monokloroctena kiselina (MCA),
- dikloroctena kiselina (DCA),
- trikloroctena kiselina (TCA),
- monobromoctena kiselina (MBA),
- dibromoctenakiselina (DBA),
- tribromoctena kiselina (TBA),
- monojodoctena kiselina (MIA),
- dijojodoctena kiselina (DIA),
- bromokloroctena kiselina (BCA),
- bromodikloroctena kiselina (BDCA),
- klorodibromoctena kiselina (CDBA),
- bromojodoctena kiselina (BIA) i
- klorojodoctena kiselina (CIA) .

Njihove strukture je prikazane su na **Slici 1**. Haloctene kiseline koje sadrže fluor, a nastaju kao nusprodukt dezinfekcije vode nisu identificirane. Pretpostavlja se da je to zato što je energija koja je potrebna za stvaranje takvih molekula veća od oksidativnog potencijala dezinficijensa (NTP, 2018).

Halogeni elementi	Mono-HAA	Di-HAA	Tri-HAA
Klor	Monoklorooctena kiselina (MCA) 	Diklorooctena kiselina (DCA) 	Triklorooctena kiselina (TCA) 
	Monobromooctena kiselina (MBA) 	Dibromooctena kiselina (DBA) 	Tribromooctena kiselina (TBA) 
	Monojodooctena kiselina (MIA) 	Dijodooctena kiselina (DIA) 	
Brom i klor		Bromklorooctena kiselina (BCA) 	Bromdiklorooctena kiselina (BDCA) 
			Klordibromooctena kiselina (CDBA) 
Jod i brom ili klor		Bromjodooctena kiselina (BIA) 	
		Klorjodooctena kiselina (CIA) 	

Slika 1 Struktura 13 halooctenih kiselina pronađenih u dezinficiranoj vodi (NTP, 2018)

2.5. Zakonska regulativa halooctenih kiselina na razini Europske unije

Europski parlament i Vijeće 2020. godine donijeli su Direktivu 2020/2184 o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju, kojom se propisuje da udio pet halooctenih kiselina (5HAA) ne smije biti veći od 60 µg/L kod vode koja je namijenjena za ljudsku potrošnju. 5HAA predstavlja zbroj pet halooctenih kiselina čija je prisutnost najčešća u dezinficiranoj vodi, a to

su monokloroocetna kiselina, dikloroocetna kiselina, trikloroocetna kiselina, monobromoocetna kiselina i dibromoocetna kiselina. Udio 5HAA se određuje samo kada se voda namijenjena za ljudsku potrošnju podvrgnuta procesu dezinfekcije s dezinficijensima koji mogu uzrokovati formiranje dezinfekcijskih nusprodukata. Određivanje 5HAA nije potrebno određivati kod vode s vodocrpilišta. Države članice se obavezuju da će do 12. siječnja 2026. poduzeti potrebne mjere kako bi se osiguralo da voda namijenjena za ljudsku potrošnju bude u skladu s navedenim parametrima iz Direktive (Direktiva (EU) 2020/2184). Ministarstvo zdravstva objavilo je Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23) u kojemu usvaja Direktivu (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća.

2.6. Čimbenici koji utječu na stvaranje haloocetnih kiselina

Poznavanjem procesa nastanka haloocetnih kiselina kao i čimbenika koji utječu na njihovo nastajanje, važno je, kako bi se njihov udio u dezinficiranoj vodi sveo na minimum. Najvažnija, odnosno primarna uloga obrade vode namijenjene za ljudsku potrošnju je inaktivacija ili uklanjanje patogenih mikroorganizama. Sekundarna uloga je smanjivanje koncentracije dezinficijensa u procesu dezinfekcije i stvaranju DBPa a time i HAA, bez da se ugrožava zdravstvena ispravnost vode (IPCS, 2000). Minimalni udio HAA u dezinficiranoj vodi, kojima se opskrbljuju potrošači, važan je cilj svakog vodoopskrbnog sustava. Strategija smanjenja ili sprječavanja stvaranja HAA najbolja je opcija. Takva strategija uključuje smanjenje koncentracije prekursora prisutnih kao što je prirodna organska tvar u vodi, ali i manipulaciju uvjeta u kojima se provodi dezinfekcija vode. Čimbenici koji određuju vrstu i količinu nastalog nusproizvoda dezinfekcije tijekom obrade vode su :

- prisutnost i udio organske i anorganske tvari u vodi (koja varira ovisno o godišnjem dobu kao i vremenskim uvjetima),
- odabirom metode dezinfekcije i sredstva koja su korištena u obradi vode,
- vrijeme kontakta dezinficijensa s organskom tvari u vodi,
- temperatura na kojoj se odvija proces dezinfekcije i
- pH vode tijekom procesa dezinfekcije.

Odabir metode dezinfekcije vode najčešće se bazira na učinkovitosti procesa dezinfekcije, jednostavnosti rukovanja i izvedbe te cijeni sredstva za dezinfekciju. Kemijska dezinfekcija klorom i njegovim spojevima je u tom pogledu najbolji mogući odabir, zato je i najrašireniji postupak diljem svijeta (NTP, 2018). Udio nastalih HAA dezinfekcijom vode ovisi o vrsti sredstva koje je korišteno u procesu dezinfekcije. Upotrebom klora (Cl_2) kao sredstva za dezinfekciju, dolazi do formiranja najviše HAA, dok kod primjene kloramina (NH_2Cl) kao

sredstva za dezinfekciju nastaje otprilike 1/2 manje HAA nego kod dezinfekcije s klorom. Dok korištenjem klornog dioksida (ClO_2) nastaje otprilike 1/3 manje HAA u odnosu na dezinfekciju klorom. Dezinfekcija vode ozonom doprinosi minimalnom formiranju HAA, odnosno samo u prisutnosti bromida u vodi nastaju HAA koje sadrže brom. Modifikacijom procesa dezinfekcije npr. mijenjanja sredstva za dezinfekciju i doze dezinficijensa koja se dodaje u vodu može se umanjiti udio nastalih HAA u dezinficiranoj vodi (Clark i sur. ,1994) .

Nakon dodavanja klora u vodu koja se dezinficira, počinje reakcija između prirodne organske tvari i klora koja rezultira stvaranjem DBP, a time i HAA. Razdoblje brzog nastajanja HAA predstavlja prvih 4 – 8 sati, nakon čega slijedi opadanje brzine nastajanja. U razdoblju brzog nastajanja formirat će se 90 % konačne koncentracije TCA i DCA, koje se stvaraju tijekom prvih 24 sata nakon dodatka klora u vodu. Nastajanje DBA, traje do 20 sati nakon početka procesa kloriranja. Formiranje i povećavanje koncentracije HAA traje čak i do 96 sati nakon dodatka klora u vodu (IPCS, 2000). Povećanjem temperature procesa dezinfekcije povećava se količina nastanka HAA. Također, pH vrijednost tijekom dezinfekcije vode jedan je od čimbenika koji utječu na nastajanje HAA, odnosno povećanjem pH vrijednosti vode ($\text{pH} > 8$) smanjuje se količina nastalih HAA dezinfekcijom (NTP, 2018).

Opće je poznato da će kloriranje zbog svojih mnogih prednosti i velike učinkovitosti kod dezinfekcije, biti i dalje najčešći postupak dezinfekcije. Zato je važno ukloniti prekursore DBP-a koji su prisutni u sirovoj, neobrađenoj vodi. Uklanjanje organskih i anorganskih tvari u vodi može se provoditi procesima filtracije aktivnim ugljenom, nanofiltracijom, ionskom izmjenom ili poboljšavanjem procesa koagulacije, flokulacije i sedimentacije. Predtretman vode ionskom izmjenom može ukloniti do 70 % prirodne organske tvari prisutne u vodi, dok se nanofiltracijom uklanja čak do 99 % prirodne organske tvari u vodi koji su glavni prekursori za nastajanje HAA. Filtracija vode s aktivnim ugljenom uklanja oko 90 % prirodne organske tvari u vodi (NTP, 2018). Koagulacijom može se smanjiti udio organske tvari u vodi ali ne i udio bromida što može dovesti do nastanka HAA s bromom (IPCS, 2000). Povišene razine broma i joda koje se nalaze u izvorskim vodama iz antropogenih ili prirodnih izvora, pomaknut će nastanak HAA tijekom postupka dezinfekcije vode prema HAA s više broma i joda (NTP, 2018). Naknadno uklanjanje HAA nakon formiranja, s biološki aktivnim ugljenom s prirodnom mikroflorom na površini, uspio je biorazgraditi odnosno ukloniti i do 100 % HAA u dezinficiranoj vodi (Ratasuk i sur. 2008).

2.7. Izloženost populacije haloocetnim kiselinama

Većina vodoopskrbnih objekata koristi metodu dezinfekcije na bazi klora zbog praktičnosti i jednostavnosti upravljanja procesom dezinfekcije te niske cijene sredstva za dezinfekciju kao

i postupka. Stoga izloženost populacije HAA putem dezinficirane vode klorom obuhvaća svu populaciju koja konzumira i koristi vodovodnu vodu u svakodnevnom životu.

Osim konzumiranjem vodovodne vode iz slavine, HAA mogu se unijeti i drugim napitcima koje su pripremljene s vodovodnom vodom u domaćinstvu kao što su kava, čaj, sokovi, formule za dojenčad ili putem industrijskih napitaka kao što su voćnih sokovi i bezalkoholna pića. Neke HAA, kao što su DCA, MCA, DBA i BCA poprilično su stabilne u vodi koja ključa te nakon 60 minuta gubitci su im manji od 20 % (Raymer i Michael, 2010), što znači da se u toplim napitcima koji su pripremljeni s vodovodnom vodom, kao što su kava ili čaj nalazi skoro ista količina HAA kao i u vodi iz slavine. Cardador i Galleo (2015), proveli su studiju u kojoj su određivali 10 HAA i njihov udio u voćnim sokovima i bezalkoholnim pićima. Studija je uključivala oko 150 uzoraka pića te je dokazala da su skoro u svakom uzorku pronađene HAA, što ukazuje na korištenje dezinficirane vode iz vodoopskrbnog sustava ili vode koja je izravno dezinficirana u proizvodnom procesu proizvodnje soka ili bezalkoholnih pića. Izuzevši 2 proizvoda od 100 % soka gdje nisu pronađene HAA ili ako jesu onda u minimalnim količinama, što se može prepisati kontaminaciji soka putem dezinficirane opreme.

Također, unos HAA putem hrane koja je došla u dodir s kloriranom vodom može isto biti jedan od izvora. Udio prirodno prisutnih HAA u hrani je minimalan, ali prilikom procesa obrade hrane pranjem, kuhanjem u dezinficiranoj vodi ili ispiranjem nakon kuhanja, udio HAA u hrani može se povećati (Raymer i Michael, 2010). Osim u svježim namirnicama ili namirnicama koje su prane ili termički obrađene u dezinficiranoj vodi, HAA se mogu pronaći u konzerviranom povrću i to do nekoliko puta veće koncentracije u tekućoj fazi nego u čvrstoj fazi konzerviranog proizvoda. Zbog kontakta dezinficirane vode s tvarima koje su korištene u procesu konzerviranja povrća. HAA prevladavaju uglavnom u tekućoj fazi (Cardador i Galleo, 2017).

Osim putem hrane i pića, populacija može biti izložena HAA na bazenima ili lječilištima, gdje je dezinfekcija vode obavezna. Izloženost na bazenima je veća nego kod dezinficirane vode namijenjene za ljudsku potrošnju. Dezinfekcija bazenske vode je neophodna radi održavanja mikrobiološke kvalitete i ispravnosti vode. Voda u bazenima sadrži veće ostatke klor, a temperature bazenske vode češće su veće nego kod vodoopskrbnog sustava, što rezultira stvaranju veće količine HAA u bazenskoj vodi. Također, ljudski faktori kao što su urin, znoj, kosa, stanice kože, kozmetika i slično, utječu na stvaranje veće količine HAA u bazenskoj vodi. Do unosa HAA u organizam može doći inhalacijom HAA kod zagrijanih bazena, gutanjem bazenske vode prilikom plivanja ili drugih aktivnosti u bazenima (Chowdhury i sur., 2014; Cardador i Gallego, 2011).

2.8. Zdravstveni učinak halooctenih kiselina na zdravlje čovjeka

Dezinfekcija vode namijenjena za ljudsku potrošnju, neophodan je proces, kako bi se izbjegla opasnost od širenja zaraznih bolesti kod ljudi i životinja uzrokovane mikrobnom kontaminacijom. Proces dezinfekcije štiti od trbušnog tifusa, kolere, amebne dizenterije i drugih crijevnih bolesti. Većina vodovodnih sustava primjenjuje dezinfekciju vode klorom i njegovim spojevima te ozonom, kao prevencija od širenja zaraznih bolesti uzrokovanih mikroorganizmima i praživotinja. Upotreba klora kao sredstva za dezinfekciju daleko je najčešći proces dezinfekcije i uveliko smanjuje rizik od prijenosa zaraznih bolesti vodom. Osim što klor uništava patogene mikroorganizme, dezinficijensi reagiraju s prirodnom organskom tvari iz vode te formiraju nusprodukte dezinfekcije (DBP), kojima se često pripisuju kancerogena i toksična svojstva. Međutim, dezinfekcija je proces od neupitne važnosti za svaki vodoopskrbni sustav zdravstveno ispravne vode. Loše provedena dezinfekcija u cilju smanjenja stvaranja DBP-a predstavlja daleko veći rizik i opasnost po zdravlje ljudi, za razliku od učinaka na ljudsko zdravlje izlaganjem DBP-u u iznimno malim količinama.

Halooctene kiseline uz trihalometane predstavljaju glavne predstavnike DBP-a. Ljudi su češće izloženi HAA jer nisu lako hlapljive komponente, za razliku od trihalometana, pa se prokuhavanjem vode njihov udio ne može umanjiti (OEHHA, 2022).

Do danas je u dezinficiranoj vodi za piće identificirano 13 HAA, od kojih monokloroocetna kiselina (MCA), dikloroocetna kiselina (DCA), trikloroocetna kiselina (TCA), monobromoocetna kiselina (MBA) i dibromoocetna kiselina (DBA) predstavljaju smjesu 5 halooctenih kiselina (5HAA) koje se najčešće mogu pronaći u dezinficiranoj vodi za ljudsku potrošnju. HAA izrazito se brzo apsorbira nakon unosa u gastrointestinalnom traktu kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Može doći i do apsorpcije kroz kožu, no takva apsorpcija je u neusporedivo manjim količinama za razliku od unosom HAA gutanjem. Općenito se smatra da postoji povezanost između DBP koji su prisutni u vodi za ljudsku potrošnju i pojave pojedinih negativnih učinaka na zdravlje ljudi. Izloženost HAA u vodi često je povezivana s karcinomom jetre, karcinomom debelog crijeva, citotoksičnošću kao i genotoksičnošću. Međutim, studije utjecaja izloženosti HAA na zdravlje ljudi su rijetke i nisu dovoljno pouzdane kako bi se navedene pretpostavke potvrdile.

Američka agencija za zaštitu okoliša (US EPA) 2003. godine klasificira monokloroocetenu (MCA) kiselinu u kancerogenu skupinu D, što znači, da se MCA „ne može klasificirati kao kancerogen za ljude (US EPA, 2003a). Studije kancerogenosti koje su provedene na pokusnim životinjama, nisu pokazale i dokazale povezanost izloženosti MCA i pojavu karcinogenih aktivnost kod pokusnih životinja (NTP, 1992; DeAngelo i sur. 1997). Na temelju provedenih studija na

pokusnim životinjama, National Toxicology Program (2018), zaključuje da dokazi studija o karcinogenom učinku MCA (provedeno na pokusnim životinjama) nisu dovoljni da ispune kriterije uvrštavanja MCA na popis kancerogenih tvari. Neurotoksičnost, metaboličke promjene, kardiotoksičnosti, toksičnost za jetru, bubrege i slezenu navedeni su kao nekancerogeni učinci MCA na pokusnim životinjama (Bhat i sur. 1991; Daniel i sur., 1991; NTP, 1992; DeAngelo i sur. 1997). Do danas nisu provedene studije na ljudima o štetnim utjecajima na zdravlje ljudi uzrokovano izloženosti MCA u vodi za ljudsku potrošnju. Oralno ili dermalno izlaganje koncentriranoj vodenoj otopini MCA ili MCA u krutom stanju izaziva ozbiljna oštećenja na mjestu kontakta (dišni putevi, koža, gastrointestinalni trakt), koja mogu rezultirati trovanje sa smrtnim ishodom. Akutno izlaganje MCA rezultira neurološkim simptomima, gubitkom svijesti, kardiovaskularnim nepravilnostima uključujući tahikardiju i hipotenziju (Millischer i sur., 1987; Rogers, 1995; Kusch i sur., 1990). Koncentrirana MCA može uzrokovati hidrolizu proteina i razaranje tkiva, nekrozu tkiva i sl. (Chapman i sur 2006). Akutno izlaganje MCA nije vjerojatno (osim u iznimnim slučajevima).

US EPA dikloroctenu kiselinu (DCA) navodi kao vjerojatni kancerogen (US EPA, 1998), a Internacionalna agencija za istraživanje raka (IARC) 2012. godine uvrštava DCA u 2B skupinu, kao mogući kancerogen za ljude, na temelju ne adekvatnih dokaza o kancerogenosti kod ljudi, ali dostatnih dokaza o karcinogenosti kod životinja (Guha i sur., 2012). Studije koje su provodile istraživanje povezanosti izloženosti DCA kod pokusnih životinja, pokazale su da su karcinom jetre u životinja bili najčešće utvrđeni učinci DCA kod pokusnih životinja. Osim karcinoma jetre, uočene su pojave tumora kod bubrega i debelog crijeva kod pokusnih životinja (Bull i sur., 1990; DeAngelo i sur., 1991; Daniel i sur., 1992; DeAngelo i sur., 1999; Bull i sur., 2002; Wood i sur., 2015; Wehmas i sur., 2017). Studije o genotoksičnim učincima DCA *in vitro* i *in vivo*, pokazale su da DCA vjerojatno posjeduje genotoksični potencijal. Malo je vjerojatno da genotoksičnost DCA može biti uzrokovana koncentracijama koje se nalaze u vodi za ljudsku potrošnju, no genotoksičnost DCA je primijećena pri višim dozama i najčešće u stanicama jetre (Herbert i sur., 1980; Giller i sur., 1997; Kargalioglu i sur., 2002; Ono i sur., 1991; Nelson i Bull, 1988; Nelson i sur., 1989; Chang i sur., 1992; Hassoun i Dey, 2008). Reprodukativna toksičnost, toksičnost za jetru i neurotoksičnost uočena je kod pokusnih životinja koje su bile izložene DCA (Cicmanec i sur., 1991; DeAngelo i sur., 1991; Daniel i sur., 1992; DeAngelo i sur., 1999; Hassoun i sur., 2010). No, malo je vjerojatno da učinci koju su uočeni kod pokusnih životinja koje su izložene DCA imaju isti i na ljude koji su kronično izloženi unosu DCA kroz vodu za ljudsku potrošnju, jer se radi o malim koncentracijama u odnosu na doze koje su davane pokusnim životinjama tijekom izvođenja studija.

DeAngelo i suradnici (2008) proveli su studiju kronične izloženosti pokusnih životinja (miševa) trikloroctenoj kiselini u vodi za ljudsku potrošnju, gdje je uočeno da TCA uzrokuje karcinom

jetre. Također, provedene su nekolicine studija na životinjama gdje je uočeno nastajanje tumora jetre, kod pokusnih životinja, nakon kroničnog izlaganja životinja TCA (Herren-Freund i sur., 1987; Bull. i sur., 1990; Pereira, 1996; Bull i sur., 2002). Studije provedene na životinjama, radi utvrđivanja genotoksičnosti TCA pokazuju različite rezultate. Većina *in vitro* studija pokazuju negativni ishod genotoksičnosti TCA (Giller i sur., 1997; Harrington-Brock i sur., 1998; Varshney i sur., 2013; Stalter i sur., 2016) dok *in vivo* studije ukazuju na pozitivan ishod genotoksičnosti TCA (Giller i sur., 1997; Nelson i Bull, 1988; Chang i sur., 1992; Hassoun i sur., 2014; Hu i sur., 2017). Pozitivni genotoksični ishodi, *in vivo* studija, mogu biti posljedica korištenja visokih doza TCA tijekom studija ili kao rezultat djelovanja metabolita TCA, DCA koji je dokazano genotoksičan kod životinja *in vitro*. IARC 2012. godine uvrštava TCA u 2B skupinu „moguće kancerogeno za ljude“ na temelju provedenih studija na životinjama (Guha i sur., 2012). Istraživanja navode da nema povezanosti kronične izloženosti TCA putem vode za ljudsku potrošnju i pojave raka.

Studije kancerogenosti za monobromoctenu kiselinu (MBA) nisu provedene, no postoje jaki dokazi o genotoksičnim učincima *in vitro*. Usporedbom relativne mutagenosti 5HAA, utvrđeno je da su HAA koje imaju brom u svom sastavu više mutagene i citotoksične za razliku od HAA koje sadrže klor (Kargalioglu i sur., 2002; Plewa i sur., 2002; Plewa i sur., 2004; Plewa i sur., 2010; Zhang i sur., 2010; Prochazka i sur., 2015). Obzirom da su provedene studije kancerogenosti, za HAA koje su manje genotoksične (DBA, DCA i TCA) ukazuju na kancerogeno djelovanje, postoji mogućnost da bi MBA mogao imati kancerogeni učinak.

Nacionalni toksikološki program Sjedinjenih američkih država (eng. National Toxicology Program, NTP, 2018) zaključuje da je dibromoctena kiselina (DBA) karcinogen za ljude na temelju provedenih studija na pokusnim životinjama. Karcinogenost je primijećena kod kroničnog izlaganja životinja DBA putem vode za ljudsku potrošnju. Uočena je pojava tumora na jetri i plućima, kao i pojava leukemije i malignih nakupina kod životinja koje su bile izložene DBA (Melnick i sur., 2007; NTP, 2007). Također, uočena je razvojna i reproduktivna toksičnost kod životinja, pri izlaganju višim dozama (Bodensteiner i sur., 2004; Veeramachaneni i sur., 2007). Prosječne koncentracije DBA u vodi za ljudsku potrošnju ne predstavljaju rizik, odnosno nemaju potencijalno kancerogeno djelovanje.

Studije na ljudima za pojedine HAA su rijetke i nedovoljne da bi se određeni loši učinci pripisali kroničnom izlaganju HAA u vodi. No provedene studije koje povezuju izloženost ljudi različitim DBP putem vode za ljudsku potrošnju, usko su povezane s razvojnom toksičnošću, reproduktivnom toksičnošću i kancerogenoj aktivnosti (Quist i sur., 2018). Takvi učinci ne mogu se pripisati djelovanju samo jedne HAA, nego se smatra da su takvi učinci na zdravlje ljudi, posljedica dugotrajnog izlaganja smjesi DBP u vodi za piće, od kojih su HAA jedni od glavnih predstavnika.

Djeca i dojenčad predstavlja osjetljivu populaciju, koja je u većem riziku izloženosti HAA i štetnih utjecaja na zdravlje, zbog veće stope unosa vode za ljudsku potrošnju u odnosu na njihovu tjelesnu masu. Također, izloženost HAA, u ranoj dobi predstavlja veći rizik od raka za razliku od izloženosti odrasle osobe, odnosno opće populacije.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada je:

- razviti analitičku metodu za određivanje pet halooctenih kiselina (5HAA) prisutnih u dezinficiranoj vodi čije su maksimalne koncentracije u vodi namijenjenoj za ljudsku potrošnju, propisan Direktivom (EU) 2020/2184,
- provesti validaciju razvijene analitičke metode za svaku pojedinu halooctenu kiselinu, kroz parametre validacije i
- provesti kvalitativno i kvantitativno određivanje koncentracija 5 halooctenih kiselina prisutnih u uzorcima koji su uzeti na području Osječko-baranjske županije i grada Zagreba.

Metoda je razvijana i validirana na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu.

3.2. Analitička metoda

Analizirane halooctene kiseline su monokloroctena kiselina, dikloroctena kiselina, trikloroctena kiselina, monobromoctena kiselina i dibromoctena kiselina, a određene su prema modificiranoj metodi koju je izdala US EPA, Metoda 552.3. (2003b). Determinacija halooctenih kiselina i dalapona (2,2-diklorpropionska kiselina) u vodi za ljudsku potrošnju tekućinsko-tekućinskom mikroekstrakcijom, derivatizacijom i plinskom kromatografijom s detektorom zahvata elektrona.

Princip ove metode je ekstrahirati halooctene kiseline iz vode u metil-*tert*-butil-eter (MTBE) sloj, nakon čega slijedi metilacija halooctenih kiselina u odgovarajuće metilne estere, pomoću metanola uz dodatak sumporne kiseline kao katalizator te određivanje udjela metilnih estera halooctenih kiselina plinskom kromatografijom s detektorom zahvata elektrona (GC-ECD).

Tijekom razvijanja i validacije metode, za određivanje HAA korištena je modificirana US EPA metoda 552.3, zbog svoje praktičnosti i manjeg rizika izloženosti analitičara toksičnim tvarima.

3.3. Materijali i oprema

3.3.1. Standardi i reagensi

Certificirani referentni materijal s analitima od interesa visoke čistoće (99 %), kupljeni su od Absolute Standards, dolaze u smjesi od 10 HAA (monokloroctena kiselina, dikloroctena kiselina, trikloroctena kiselina, monobromoctena kiselina, dibromoctena kiselina, tribromoctena kiselina, bromokloroctena kiselina, klorodibromoctena kiselina, bromodikloroctena kiselina i 2,2-diklorpropionska kiselina), u MTBE-u .

Metil esteri halooctenih kiselina korišteni za kalibracijsku krivulju, visoke čistoće (99 %), dolaze u smjesi od 6 metil estera halooctenih kiselina (metil-kloracetat, metil-dikloracetat, metil-trikloracetat, metil-bromacetat, metil-bromokloracetat, metil-dibromacetat) otopljeni u MTBE-u, u koncentracijama od 100 µg/mL za svaki pojedini metil eter. Metil esteri HAA kupljen su od Absolute Standards.

Metilni esteri HAA i analiti od interesa HAA se čuvaju na temperaturama od 0 °C, na tamnom i suhom mjestu. Ultračista voda koja je korištena tijekom procesa razvoja metode dobivena je pomoću uređaja za proizvodnju demineralizirane vode (Evoqua Water Technologies GmbH, Günzburg, Njemačka) koji se koristi u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar.

U radu su korišteni sljedeći reagensi:

- natrijev sulfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)
- metil-*tert*-butil-eter (MTBE) visoke čistoće,
- koncentrirana 95 %-tna sumporna kiselina (H_2SO_4) ,
- natrijev sulfat (Na_2SO_4) granulirani,
- 10 %-tna sumporna kiselina u metanolu,
- zasićena otopina natrijeva bikarbonata (Na_2CO_3) i
- 15 %-tna otopina natrijeva sulfata (Na_2SO_4) pripremljena s ultračistom vodom.

Tijekom izvedbe metode, važno je pridržavati se mjera opreza, nošenja zaštitne odjeće, zaštitnih rukavica, obavezan je rad sa reagensima unutar uključenog digestora, koristiti čisti i ispravni pribor i uređaje.

3.3.2. Aparatura i oprema

Analiza je provedena na Shimadzu GC2010+ plinskim kromatografom s detektorom zahvata elektrona. Kolona Rxi-XLB serijskog broja 1647890 korištena tijekom analize. Kapilarna kolona s polarnom stacionarnom fazom duljine 30 m, unutarnjim promjerom 0,25 mm, debljinom filma od 0,25 μm i maksimalnom temperaturom rada od 360 °C korištena je za razdvajanje analita. Injektiranje uzorka je napravljeno u splitless modu, uz plin nosioc dušik (N_2) čistoće od 99,99 % čistoće. Plinski kromatograf koji je korišten tijekom izrade metode i analize uzoraka prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2 Plinski kromatograf Shimadzu GC2010+ s detektorom zahvata elektrona koji je korišten u analizi uzoraka

3.4. Uzorkovanje

Uzorci se prikupljaju u spremnik za uzorke, odnosno u plastičnu bocu, minimalnog volumena 50 mL, koji ima obloženi čep s navojem. Prije izuzimanja uzorka, u bocu za uzorke dodaje se par kristala natrijeva sulfata pentahidrata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$).

U bocu za uzorke treba dodati dovoljna količina natrijeva sulfata pentahidrata, kako bi se neutralizirao preostali slobodni klor, odnosno kako ne bi došlo do naknadnog nastajanja haloctenih kiselina u uzorku tijekom transporta do laboratorija te radi konzerviranja uzorka (mikrobiološka stabilnost).

Boca se napuni s uzorkom, tako da se natrijev sulfat pentahidrata, ne ispere. Bocu s uzorkom, nije potrebno potpuno popuniti, odnosno potpuno ostaviti bez zraka jer HAA nisu hlapljive te nema opasnosti od gubitka HAA iz uzorka.

Prilikom uzimanja uzorka iz slavine, potrebno je ukloniti perlator. Slavina se otvara i pušta da se sustav ispere kako bi se temperatura stabilizirala oko 3 – 5 min prije prikupljanja uzorka u bocu. Prilikom uzimanja uzorka iz drugih vodenih izvora (jezera, bunari, bazeni, rijeke i dr.) potrebno je izuzeti uzorak u bocu od 1 L sa širokim grlom i pažljivo prebaciti reprezentativan uzorak vode u bocu s $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ kao stabilizatorom. Nakon uzimanja uzorka boca se zatvara i protrese rukom oko 15 s.

Uzorci tijekom otpreme do laboratorija moraju biti ohlađeni na temperaturu od 10 °C tijekom prvih 48 h nakon prikupljanja i zaštićeni od svjetla. Uzorci koji se pohranjuju u laboratorij moraju se držati na temperaturi ispod 6 °C, zaštićeni od svjetla i ne smiju se zamrzavati. Uzorci nakon izuzimanja i zaprimanja u laboratorij, moraju se skladištiti po navedenim uvjetima te analizirati unutar 14 dana (US EPA, 2003b).

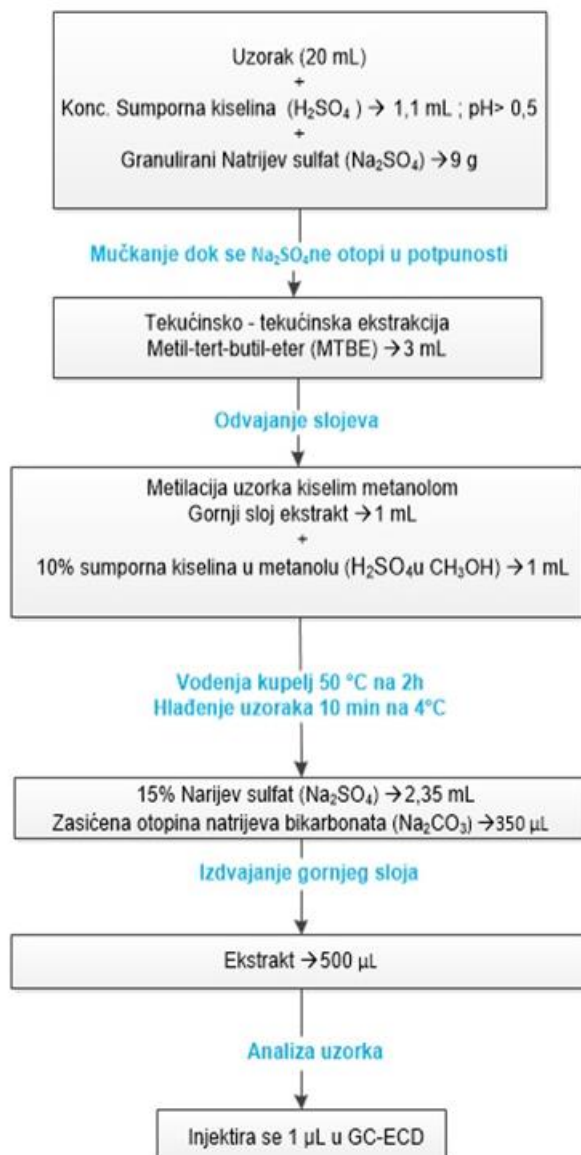
3.5. Postupak pripreme uzorka za analizu

Postupak pripreme uzorka za analizu halooctenih kiselina sastoji se od dvije ključne faze:

- ekstrakcija halooctenih kiselina iz uzorka vode i
- metilacija uzorka metanolom uz dodatak sumporne kiseline.

Tekućinsko–tekućinska ekstrakcija halooctenih kiselina prisutnih u uzorku vode provodi se ekstrakcijskim otapalom (MTBE). Halooctene kiseline iz vode prelaze u MTBE u obliku slobodnih kiselina. Zatim se provodi metilacija, odnosno Fisherova esterifikacija, metanolom uz dodatak sumporne kiseline kao katalizator, koji se dodaje u velikom suvišku kako bi se svaka molekula halooctene kiseline iz uzorka u potpunosti prevela u srodne metilne estere. Učinkovitost metilacije može imati veliki učinak na točnost i preciznost metode, kao i krajnjih rezultata.

Ispravno provođenje svakog koraka pripreme uzorka, kao i analize ekstrakta na GC-ECD, važno je, kako bi krajnji rezultat imao što točnije i istinitije vrijednosti. Shema pripreme uzorka prikazana je na **Slici 3**, a u nastavku rada je detaljnije pojašnjen svaki pojedinačni korak pripreme uzorka.



Slika 2 Shematski prikaz postupka pripreme uzorka vode za analizu

3.5.1. Ekstrakcija uzorka

Skladišten uzorak potrebno je izvaditi kako bi se temperirao na sobnu temperaturu, odnosno, kako bi se temperatura uzorka uravnotežila s radnom temperaturom. Kod ekstrakcije uzorka, svi postupci se rade unutar digestora, zbog hlapljivosti određenih reagenasa koja mogu imati toksični učinak. Kod razvoja metode i validacije, umjesto uzorka koristi se ultračista voda kojoj

se dodaju analiti od interesa, slobodne HAA otopljene u MTBE. Prilikom svake analize uzorka ili razvoja metode potrebno je napraviti slijepu probu, odnosno pripremiti uzorak destilirane ili ultračiste vode prema svim navedenim koracima koji su navedeni kod postupka pripreme uzorka za analizu.

20 mL uzorka stavlja se u čistu plastičnu kivetu od 60 mL koja ima obloženi čep s navojem. U uzorak dodaje se 1,1 mL koncentrirane sumporne kiseline (H_2SO_4), tako da pH uzorka bude manji od 0,5.

Nakon dodatka konc. H_2SO_4 potrebno je odmah dodati 9 g prethodno izvaganog natrijevog sulfata (Na_2SO_4), kako bi se Na_2SO_4 bolje otopio, zbog porasta temperature smjese koja se događa prilikom egzotermne reakcije između uzorka (vode) i konc. H_2SO_4 . Na_2SO_4 se dodaje uzorku kako bi se ionska jakost vodene faze povećala i potaknula prijelaz halooctenih kiselina iz uzorka u organsku fazu. Nakon dodatka Na_2SO_4 potrebno je dobro promućkati sadržaj dok se sav Na_2SO_4 ne otopi.

Nakon što se sva sol otopi, dodaje se 3 mL ekstrakcijskog otapala, odnosno MTBE, te je potrebno dobro izmiješati faze kako bi se halooctene kiseline što bolje ekstrahirale u otapalo. Pričekati da se faze odvoje otprilike 5 min.

3.5.2. Metilacija uzorka metanolom uz dodatak kiseline

Nakon što su se slojevi odvojili, 1 mL gornjeg sloja se izdvaja pomoću mikropipete u staklenu epruvetu koja ima obloženi čep s navojem. Nakon izdvajanja, gornjem MTBE sloju dodaje se 1 mL 10 %-tne H_2SO_4 u metanolu. Svaku epruvetu, nakon dodavanja metanola s kiselinom kao katalizator, potrebno dobro promućkati kako bi metilacija bila što učinkovitija.

Halooctene kiseline prisutne u uzorku metilacijom se prevode u odgovarajuće metilne estere. Staklene epruvete stavljaju se u vodenu kupelj na temperaturu od 50 °C i zagrijavaju 2 h. Temperatura metilacije, ne smije se povećavati zbog niske točke vrelišta MTBE, kako ne bi došlo do gubitka MTBE sloja, a time i netočnih rezultata. Niža temperatura metilacije također nije preporučljiva zbog učinkovitosti metilacije koja se povećava s porastom temperature.

Nakon isteka 2 h epruvete se uklanjaju s izvora grijanja (vodena kupelj) te se ostave da se ohlade na 4 °C oko 10 min.

U ohlađene epruvete s uzorkom dodaje se 2,35 mL 15 %-tna Na_2SO_4 . Zatim je potrebno sadržaj epruvete lagano izmućkati. Nakon što se slojevi odvoje, donji sloj (kiselu vodenu metanolnu fazu) ukloniti i odbaciti, korištenjem Pasteurove staklene pipete. Donji sloj uklanja se do zaostajanja zadnje kapi vodenog sloja u epruveti. Nakon izdvajanja donjeg sloja, dodaje

se 350 μL Na_2CO_3 u epruvetu s ekstraktom, nakon toga je potrebno izmiješati slojeve kako bi se ekstrakt u potpunosti neutralizirao.

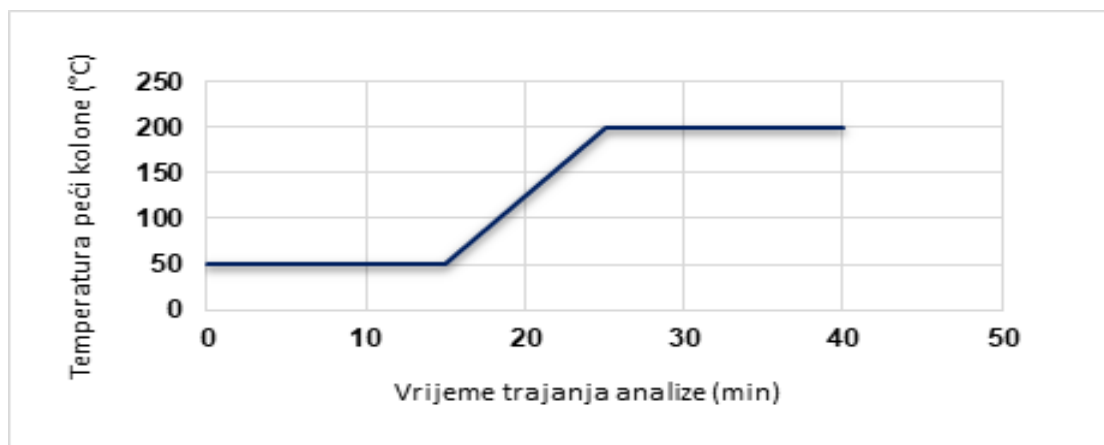
Nakon odvajanja slojeva, gornji sloj ekstrakta se izvlači, oko 500 μL i stavlja u bočice za automatsko uzorkovanje (vajale). Nakon što su ekstrakti pripremljeni, stavljaju se na analizu, ili se mogu čuvati na $-10\text{ }^\circ\text{C}$ zaštićeni od svjetla te analizirati unutar 21 dan od ekstrakcije uzorka.

3.6. Analiza ekstrakta uzorka

Pripremljeni ekstrakt uzorka analizira se u plinskom kromatografu s detektorom zahvata elektrona. Pripremljeni ekstrakt uzorka stavlja se na postolje kromatografa za analizu. Injekcijski volumen uzorka je 1 μL . Analiza svakog uzorka traje 40 minuta. Kolona se nalazi u temperiranom prostoru pećnice. Temperatura peći, a time i kolone kreće se od $50\text{ }^\circ\text{C}$ do $200\text{ }^\circ\text{C}$. Početna temperatura kolone je $50\text{ }^\circ\text{C}$ i zadržava se još dodatnih 15 minuta. Nakon 15 minuta od početka analize, temperatura kolone raste idućih 10 minuta, do temperature od $200\text{ }^\circ\text{C}$ na kojoj se zadržava do kraja analize. U **Tablici 1** su prikazani temperaturni režimi kolone kroz vrijeme, dok je na **Slici 4** prikazan grafički prikaz temperature kolone tijekom vremena trajanja analize. Plin nosioc, odnosno mobilna faza je dušik (N_2), visoke čistoće.

Tablica 1 Temperaturni režim kolone kroz vrijeme

Vrijeme trajanja analize (min)	Temperatura peći tijekom analize ($^\circ\text{C}$)	Vrijeme zadržavanja temperature (min)
0	50	15
15	50	10
25	200	15
40	200	-



Slika 3 Grafički prikaz temperaturnog režima kolone u odnosu na vrijeme provođenja analize

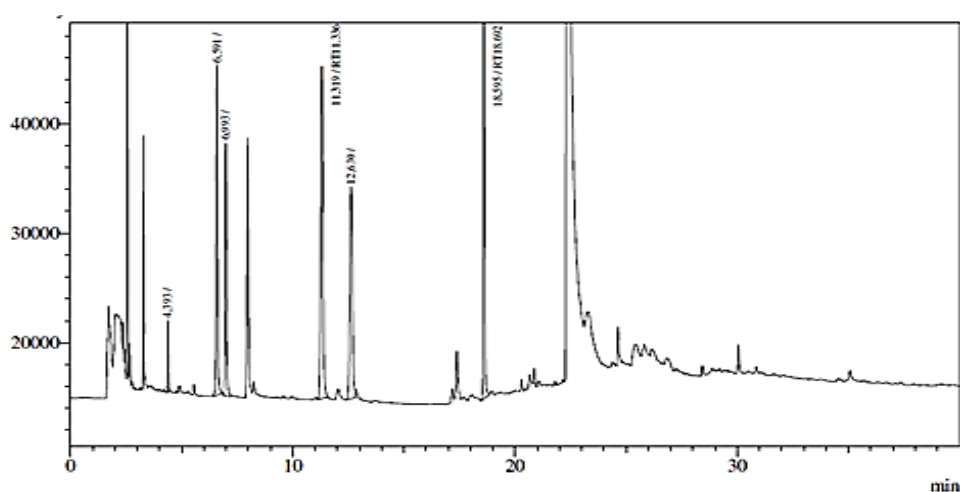
Haloctene kiseline u uzorku, odnosno njihovi metil esteri, detektiraju se detektorom zahvata elektrona (ECD). Usporedbom vremena zadržavanja (RT - predstavlja vrijeme između injektiranja ekstrakta uzorka i pojave signala, pika na detektoru) analizirane komponente (pikova) u kromatogramu uzorka, s vremenom zadržavanja iste komponente u standardnoj otopini određivanih 5HAA, čija su RT prije utvrđena s referentnom otopinom pojedinačnih metil estera koja je mjerena pod istim uvjetima.

Ako kromatogram ekstrakta uzorka ne sadrži pik u RT za specifičnu tvar na koloni, tada se smatra da analit u ekstraktu uzorka nije detektiran. Ako se pik pojavi u određenom RT na kromatogramu ekstrakta uzorka, tada se smatra da je ciljani analit prisutan. Nakon završene analize ekstrakta uzorka, dobije se kromatogram iz kojega se mjeri dobivena površina analita u određenom RT. Usporedbom površine ispod pika u nepoznatom uzorku s površinom pika poznate komponente istog, odgovarajućeg RT i poznate koncentracije dobije se koncentracija nepoznate supstance. Iz dobivene površine određuje se koncentracija pojedinog metil estera odnosno koncentracija pripadajuće HAA u uzorku.

Na **Slici 5** prikazan je kromatogram za pojedine metilne estere pripadajućih HAA. Kromatogram prikazuje ovisnost odziva detektora o vremenu zadržavanja i volumenu spoja u ekstraktu. **Tablica 2** prikazuje popis 5 HAA s njihovim odgovarajućim metilnim esterima i njihovo vrijeme zadržavanja.

Tablica 2 Vrijeme zadržavanja pet halooctenih kiselina i njihovih odgovarajućih metil ester

HALOOCENE KISELINE	METIL ESTERI	VRIJEME ZADRŽAVANJA (min)
Monoklorooctena kiselina	Metil-kloracetat	4,41
Monobromooctena kiselina	Metil-bromacetat	6,60
Diklorooctena kiselina	Metil-dikloracetat	7,00
Triklorooctena kiselina	Metil-trikloracetat	11,33
Dibromooctena kiselina	Metil-dibromacetat	18,61

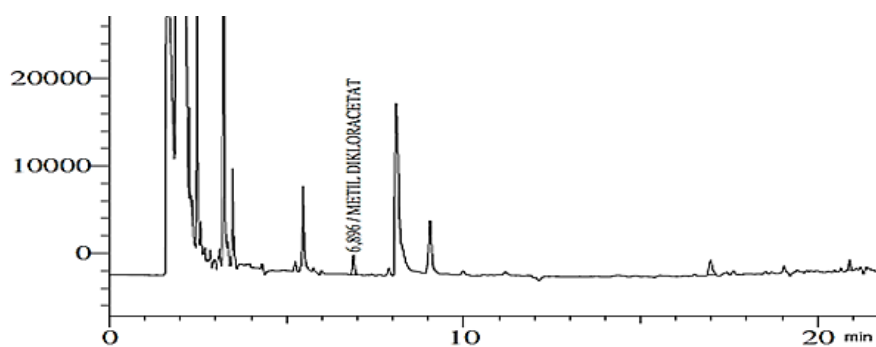
**Slika 4** Kromatogram odziva metilnih estera halooctenih kiselina ovisno o vremenu zadržavanja i volumenu

3.7. Slijepa proba

Prije početka provođenja analize uzorka, potrebno je dokazati da su laboratorijski reagensi relativno bez kontaminacije, provođenjem slijepa probe. Slijepa proba podrazumijeva provedbu cijelog postupka, bez ispitnog uzorka ili uz odgovarajući volumen otapala umjesto uzorka. Uzorak za pripremu slijepa probe je ultračista voda koja prolazi cijeli postupak kao i svi redovno analizirani uzorci, samo u njoj ne očekujemo halooctene kiseline. Slijepa proba se radi uz svaku seriju analiziranih uzoraka. Očitana površina prisutnih analita u uzorku slijepa probe, se oduzima od očitane površine analita u uzorku, prilikom izračunavanja koncentracija pojedinih halooctenih kiselina u uzorku vode (US EPA, 2003b). U uzorku slijepa probe očitana je mala koncentracija diklorooctene kiseline (0,09 µg/L) koja je ispod granice kvantifikacije (GK

= 0,45 µg/L) te se može zaključiti da su laboratorijski reagensi relativno bez kontaminacije.

Slika 6 prikazuje kromatogram slijepe probe.



Slika 6 Kromatogram slijepe probe

3.8. Validacija metode

Validacija metode slijedi nakon razvoja analitičke metode, ona predstavlja proces utvrđivanja prikladnosti metode korištenje u određenu svrhu. Validacija je provedena kroz parametre linearnosti, preciznosti, točnosti i selektivnosti, određena je granica kvantifikacije (GK) i određeno je područje primjene metode. Validacijski parametri određeni su za svaku pojedinu haloctenu kiselinu (MCA, MBA, DCA, TCA i MBA).

4. REZULTATI

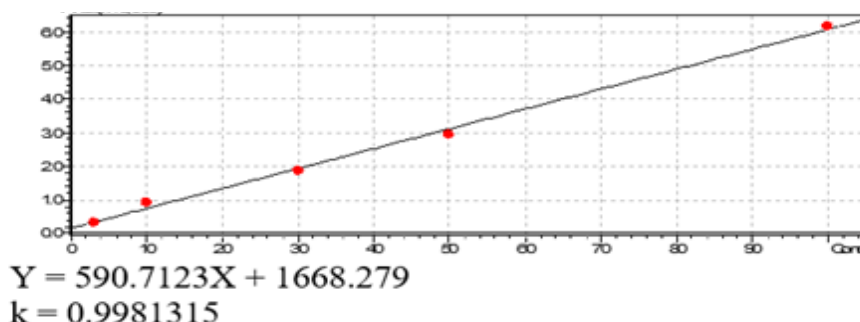
4.1. Rezultati validacije metode

4.1.1. Linearnost

Linearnost metode se definira kao sposobnost metode da unutar određenog radnog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentracijama traženih analita u uzorku. Linearnost se određuje vizualno grafičkim i matematičkim statističkim postupcima. Mjerenjem odziva na različitim poznatim koncentracijama certificiranog referentnog materijala, u najmanje 5 točaka odnosno koncentracijskih razina, uz ponavljanja (n) minimalno 3 puta. Linearnom regresijom izražava se jednadžbom pravca $y = ax + b$, gdje a parametar predstavlja nagib pravca, odnosno parametar koji ukazuje na osjetljivost metode, parametar b predstavlja odsječak pravca koji ukazuje na sustavnu pogrešku. Uvjet koji je potrebno zadovoljiti kako bi mogli utvrditi da je metoda linearna, naziva se koeficijent korelacije (k), čija vrijednost mora biti $k \geq 0,995$ (Lazarić, 2012).

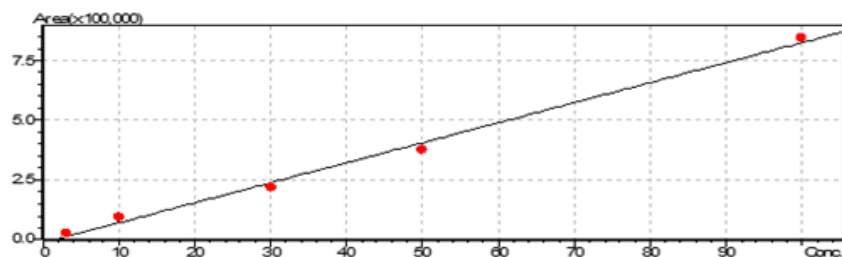
Iz certificiranog referentnog materijala razrjeđenjem u MTBE pripremaju se radni kalibracijski standardi, koji sadrže 6 metil estera halooctenih kiselina. Linearnost metode ispitana je uzastopnim injektiranjem ($n=3$) radne otopine metil estera halooctenih kiselina, u 5 različitim koncentracijskih razina 3 ng/mL (GK), 10 ng/mL, 30 ng/mL, 50 ng/mL i 100 ng/mL (0,45 $\mu\text{g/L}$ (GK), 3 $\mu\text{g/L}$, 7,5 $\mu\text{g/L}$ i 15 $\mu\text{g/L}$). Najniža kalibracijska točka nalazi se na granici kvantifikacije (GK). Grafički prikaz kalibracijskih krivulja, izračunata jednadžba pravca i koeficijent korelacije (k) za svaki određivani metil ester za 5HAA je prikazan na **Slici 7**, **Slici 8**, **Slici 9**, **Slici 10** i **Slici 11**.

METIL-KLORACETAT



Slika 7 Grafički prikaz određivanja linearnosti za metil-kloroacetat

METIL-TRIKLORACETAT

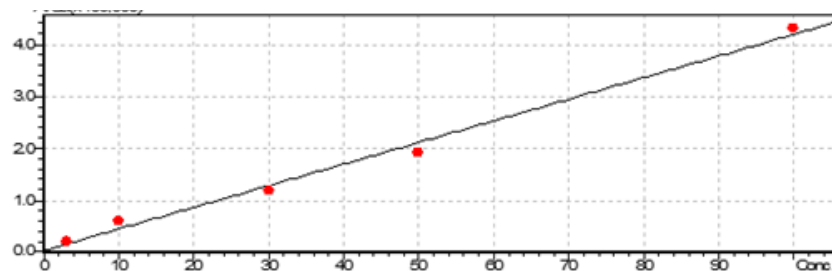


$$Y = 8401.047X + -13210.61$$

$$k = 0.9971514$$

Slika 8 Grafički prikaz određivanja linearnosti za metil-trikloroacetat

METIL-BROMACETAT

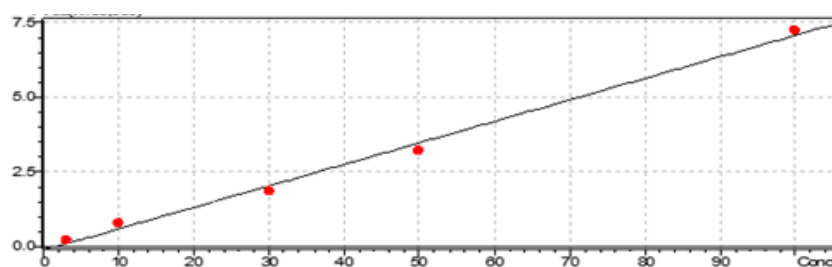


$$Y = 4161.835X + 3622.89$$

$$k = 0.9957469$$

Slika 9 Grafički prikaz određivanja linearnosti za metil-bromoacetat

METIL-DIBROMACETAT

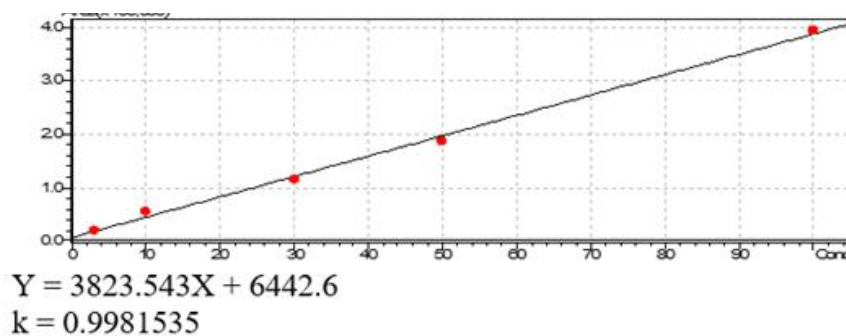


$$Y = 7174.245X + -10414.18$$

$$k = 0.9973106$$

Slika 10 Grafički prikaz određivanja linearnosti za metil-dibromoacetat

METIL-DIKLORACETAT



Slika 11 Grafički prikaz određivanja linearnosti za metil-dikloroacetat

4.1.2. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (GK) metode predstavlja najmanju količinu analita koja se može kvantificirati uz određenu točnost i preciznost (Lazarić, 2012). Iskorištenje (R) na granici kvantifikacije mora zadovoljiti uvjet $50 \% \leq R \leq 150 \%$, vrijednost za relativnu standardnu devijaciju (RSD %), odnosno vrijednost ponovljenih analiza uzoraka, mora biti manja od 20 % ($RSD \% < 20 \%$) (US EPA, 2003b).

Granica kvantifikacije metode ispitana je višestrukim razrjeđivanjem otopina haloctenih kiselina, te uzastopnim injektiranjem ($n=6$) radnih otopina koja odgovara granici kvantifikacije $0,45 \mu\text{g/L}$. U **Tablici 3** rezultat je izražen za svaku pojedinu haloctenu kiselinu, prikazana su vrijednosti za iskorištenje (R) i vrijednost relativne standardne devijacije (RDS %).

Tablica 3 Rezultati određivanja granice kvantifikacije (GK) metode

GRANICA KVANTIFIKACIJE METODE									
Broj paralelno pripremljenih standardnih otopina koncentracije 0,45 µg/L	1	2	3	4	5	6	Ā	STdev	RSD%
Dodana koncentracija pojedinih haloctenih kiselina (µg/L)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45			
MONOKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	0,37	0,42	0,41	0,36	0,44	0,41	0,40	0,03	8%
Iskorištenje (R)	82%	93%	92%	79%	99%	90%	89%	7%	8%
MONOBROMOCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	0,58	0,57	0,58	0,55	0,57	0,56	0,57	0,01	2%
Iskorištenje (R)	128%	126%	129%	123%	126%	125%	126%	2%	2%
DIKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	0,44	0,45	0,47	0,43	0,45	0,45	0,45	0,01	3%
Iskorištenje (R)	97%	99%	104%	96%	100%	101%	99%	3%	3%
TRIKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	0,66	0,68	0,68	0,67	0,67	0,67	0,67	0,01	1%
Iskorištenje (R)	147%	150%	150%	150%	149%	149%	149%	1%	1%
DIBROMOCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	0,65	0,66	0,65	0,67	0,67	0,67	0,66	0,01	1%
Iskorištenje (R)	144%	146%	144%	148%	148%	148%	146%	2%	1%

Ā=aritmetička sredina

STdev =standardna devijacija

4.1.3. Preciznost

Preciznost metode definira se kao stupanj slaganja između niza nezavisnih mjerenja, pod unaprijed određenim propisanim uvjetima, iz istog homogenog uzorka (Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, NN 2/2005). Preciznost metode razlikuje se ovisno o uvjetima u kojima se određuje:

- ponovljivost ili preciznost pod uvjetima ponovljivosti provodi se pod uvjetima gdje pripremu uzorka provodi isti analitičar, korištenjem istu laboratorijsku opremu i istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima, u kratkom vremenskom razdoblju i
- međupreciznost, koja se definira kao preciznost ostvarena unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju (Lazarić, 2012).

Koristeći dobivene rezultate pojedinih mjerenja, izračunava se standardna devijacija (STdev) i relativna standardna devijacija (RSD %) za svaku pojedinu od 5HAA. US EPA (2003b) propisuje da RSD % za svaku određivanu haloocetenu kiselinu, mora biti manja od 20 % kako bi metoda bila precizna. Ako je $RSD \% \geq 20 \%$ tada se smatra da je metoda neprecizna.

4.1.3.1. Ponovljivost (Repetibilnost)

Preciznost metode pod uvjetima ponovljivosti provedena je u kraćem vremenskom razdoblju, mjerenjem otopina poznate koncentracije pojedinih haloocetnih kiselina. Pripremljeno je 6 otopina koncentracije 15 $\mu\text{g/L}$ te su njihove izmjerene koncentracije za pojedine haloocetene kiseline dane u **Tablici 4** te su prikazana i iskorištenja. Iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija i iskorištenja, standardna devijacija (STdev) i relativna standardna devijacija (RSD %) za svaku određivanu HAA.

Tablica 4 Rezultati ponovljivosti metode otopinom 5HAA poznate koncentracije 15 µg/L u kraćem vremenskom razdoblju

HALOOCETENE KISELINE	Broj mjerjenja	1	2	3	4	5	6	Ā	STdev	RSD%
MONOKOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	12,70	12,10	11,06	10,71	11,49	11,98	11,67	0,67	6%
	Iskorištenje (%)	85%	81%	74%	71%	77%	80%	78%	4%	6%
MONOBROMOCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	14,18	12,52	12,15	12,49	13,33	11,65	12,72	0,82	6%
	Iskorištenje (%)	95%	83%	81%	83%	89%	78%	85%	5%	6%
DIKLOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	17,68	15,87	15,43	14,71	15,36	16,24	15,88	0,93	6%
	Iskorištenje (%)	118%	106%	103%	98%	102%	108%	106%	6%	6%
TRIKLOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	13,96	14,85	14,46	14,74	14,99	16,19	14,87	0,68	5%
	Iskorištenje (%)	93%	99%	96%	98%	100%	108%	99%	5%	5%
DIBROMOCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	18,26	18,04	17,82	18,03	17,25	18,38	17,96	0,36	2%
	Iskorištenje (%)	122%	120%	119%	120%	115%	123%	120%	2%	2%

Ā=aritmetička sredina

STdev =standardna devijacija

4.1.3.2. Međupreciznost

Intermedijarna preciznost ili međupreciznost metode određena je mjerenjem (n=6) otopine haloctenenih kiselina poznate koncentracije 7,5 µg/L, kroz duže vremensko razdoblje (unutar mjesec dana). Iz dobivenih rezultata mjerenja izračunata je srednja vrijednost izmjerenih koncentracija i iskorištenja, standardna devijacija (STdev) i relativna standardna devijacija (RSD %) za svaku od 5HAA. U **Tablici 5.** prikazani su rezultati mjerenja međupreciznosti metode za određivanje haloctenih kiselina u vodi.

Tablica 5 Određivanje međupreciznosti metode otopinom 5HAA poznate koncentracije 7,5 µg/L kroz duže vremensko razdoblje

DATUM PROVEDENE ANALIZE (GODINA 2023.)		7.3.	9.3.	10.3.	28.3.	29.3.	3.4.	Ā	STdev	RSD%
HALOOCETENE KISELINE	Broj mjerenja	1	2	3	4	5	6			
MONOKOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	5,51	7,20	7,29	6,98	6,72	6,97	6,78	0,60	9%
	Iskorištenje (%)	73%	96%	97%	93%	90%	93%	90%	8%	9%
MONOBROMOCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	7,25	7,41	7,42	7,19	6,73	6,96	7,16	0,25	3%
	Iskorištenje (%)	97%	99%	99%	96%	90%	93%	7,16	3%	3%
DIKLOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	7,75	9,60	9,28	8,45	8,52	8,66	8,71	0,60	7%
	Iskorištenje (%)	103%	128%	124%	113%	114%	115%	116%	8%	7%
TRIKLOROCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	5,61	8,63	8,14	7,47	8,14	8,76	7,79	1,06	14%
	Iskorištenje (%)	75%	115%	108%	100%	109%	117%	104%	14%	14%
DIBROMOCTENA KISELINA	Izmjerena koncentracija (µg/L)	6,72	8,40	9,46	8,62	5,72	8,34	7,88	1,26	16%
	Iskorištenje (%)	90%	112%	126%	115%	76%	111%	105%	17%	16%

Ā=aritmetička sredina

STdev =standardna devijacija

4.1.4. Točnost

Točnost metode predstavlja stupanj podudaranja između rezultata stvarne referentne vrijednosti i srednje vrijednosti rezultata dobivenog ponavljanjem određen broj puta (n) (Lazarić, 2012). Uvjet točnosti metode podrazumijeva da je iskorištenje (R) $\pm 30\%$, odnosno metoda je točna ako je $70\% \leq R \leq 130\%$ (US EPA, 2003b).

Točnost metode provedena ponavljanjem mjerenja pripremljenih ekstrakta standardne otopine u više različitih koncentracija 3 $\mu\text{g/L}$, 7,5 $\mu\text{g/L}$ i 15 $\mu\text{g/L}$ (za svaku koncentraciju pripremljene su tri otopine 5HAA poznate koncentracije). U **Tablici 6** prikazane su vrijednosti izmjerene koncentracije standardnih otopina i njihova iskorištenja, za svaku određivanu haloctenu kiselinu.

Također, točnost metode provedena je analizom pripremljenih ekstrakta 6 standardnih otopina, u koju je dodana poznata koncentracija 3 $\mu\text{g/L}$ za svaku od 5HAA. Rezultati mjerenja za svaku pojedinu haloctenu kiselinu prikazani su u **Tablici 7**.

Tablica 6 Određivanje točnosti metode za određivanje haloocetnih kiselina u vodi poznate koncentracije 3 µg/L, 7,5 µg/L i 15 µg/L

Broj pripremljenih standardnih otopina	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dodana koncentracija pojedinih haloocetnih kiselina (µg/L)	3	3	3	7,5	7,5	7,5	15	15	15
MONOKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,25	2,89	3,26	6,98	6,72	6,97	12,70	12,10	11,06
Iskorištenje (R)	108%	96%	109%	93%	90%	93%	85%	81%	74%
MONOBROMOCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	2,70	2,64	2,86	7,19	6,73	6,96	14,18	12,52	12,15
Iskorištenje (R)	90%	88%	95%	96%	90%	93%	95%	83%	81%
DIKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,55	3,18	3,77	8,45	8,52	8,66	17,68	15,87	15,43
Iskorištenje (R)	118%	106%	126%	113%	114%	115%	118%	106%	103%
TRIKLOROCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,16	3,12	3,42	7,47	8,14	8,75	13,96	14,85	14,46
Iskorištenje (R)	105%	104%	114%	100%	109%	117%	93%	99%	96%
DIBROMOCTENA KISELINA									
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,53	3,62	3,68	8,62	5,72	8,34	18,26	18,04	17,82
Iskorištenje (R)	118%	121%	123%	115%	76%	111%	122%	120%	119%

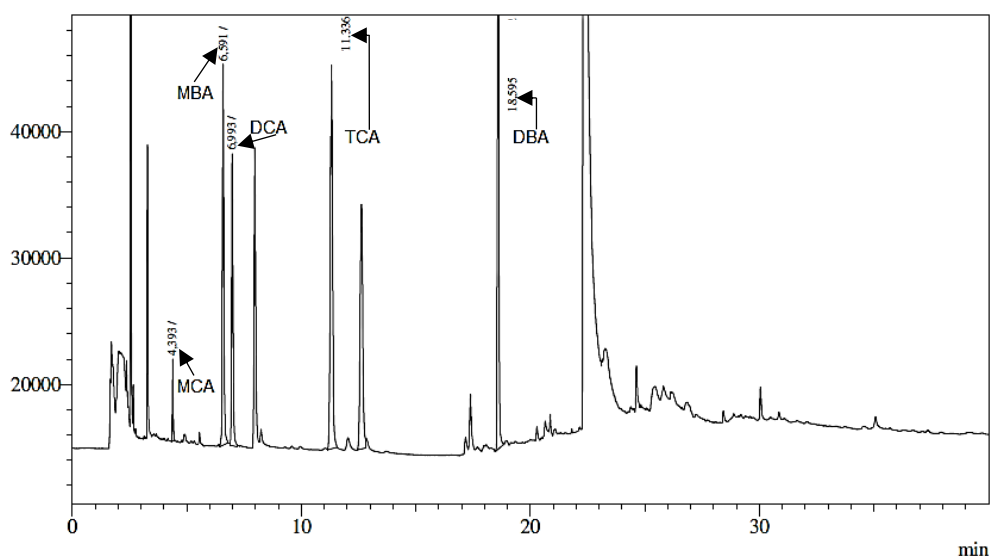
Tablica 7 Određivanje točnosti metode za određivanje haloctenih kiselina u vodi poznate koncentracije 3 µg/L

Broj pripremljenih standardnih otopina	1	2	3	4	5	6
Dodana koncentracija pojedinih haloctenih kiselina (µg/L)	3	3	3	3	3	3
MONOKLOROCTENA KISELINA						
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,11	2,63	3,41	3,27	3,10	3,50
Iskorištenje (R)	104%	88%	114%	109%	103%	117%
MONOBROMOCTENA KISELINA						
Izmjerena koncentracija (µg/L)	2,93	2,33	2,78	2,45	2,72	2,96
Iskorištenje (R)	98%	78%	93%	82%	91%	99%
DIKLOROCTENA KISELINA						
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,05	3,33	3,44	3,04	3,19	2,91
Iskorištenje (R)	102%	111%	115%	101%	106%	97%
DIBROMOCTENA KISELINA						
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,01	2,90	2,92	3,24	3,45	3,50
Iskorištenje (R)	100%	97%	97%	108%	115%	117%
TRIKLOROCTENA KISELINA						
Izmjerena koncentracija (µg/L)	3,06	3,29	3,52	2,94	2,97	3,26
Iskorištenje (R)	102%	110%	117%	98%	99%	109%

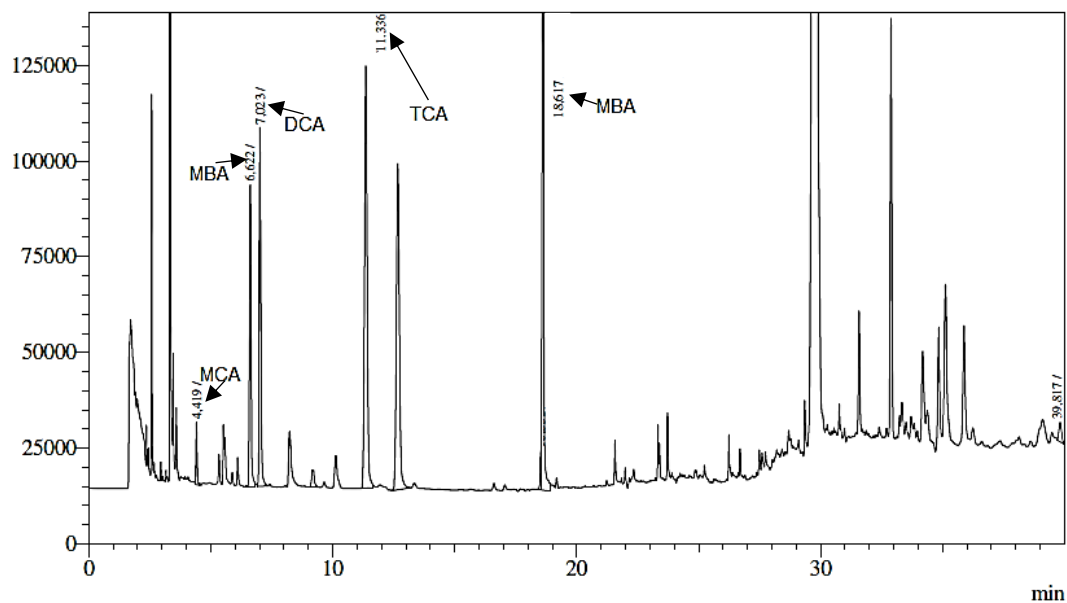
4.1.5. Selektivnost

Svojstvo metode da odredi željeni analit točno i specifično u prisutnosti drugih komponenta u matrici uzorka naziva se selektivnost. Selektivna metoda je ona metoda kojom se može odrediti više željenih analita, pod uvjetom da ti analiti prilikom određivanja ne smetaju jedna drugoj. Kod kromatografskih metoda selektivnost se dokazuje usporedbom odziva metode, preko vremena zadržavanja za pojedini analit (Lazarić, 2012).

Način utvrđivanja selektivnosti metode provedena je usporedbom tri kromatograma metil estera 5HAA i tri standardne otopine 5HAA poznate koncentracije. Iz kromatograma se očitava vrijeme zadržavanja (RT) za svaku pojedinu HAA koja se određuje. Kada je RT vrijeme za određeni analit u uspoređenim kromatograma približno jednako tada možemo reći da je metoda selektivna za određivanje pojedinih HAA u uzorcima vode. **Slika 12** i **Slika 13** prikazuju kromatograme i vrijeme zadržavanja za svaku određivanu HAA. U **Tablici 8** uspoređena su RT za pojedinu HAA i utvrđeno je njihovo standardno odstupanje koje je neznatno i najvećem slučaju iznosi 0,02.



Slika 12 Kromatogram ekstrakta metil estera pet haloctenih kiselina



Slika 13 Kromatogram ekstrakta standardne otopine pet haloacetičnih kiselin

Tablica 8 Rezultati usporedbe vremena zadržavanja šest kromatograma pet haloacetičnih kiselin

HALOACETIC ACIDS	MCA	MBA	DCA	TCA	DBA
RT - EKSTRAKTA ESTERA_1 (MIN)	4,39	6,59	6,99	11,34	18,60
RT - EKSTRAKTA ESTERA_2 (MIN)	4,39	6,59	6,99	11,31	18,60
RT - EKSTRAKTA ESTERA_3 (MIN)	4,39	6,58	6,99	11,31	18,60
RT - STANDARDNE OTOPINE_1 (MIN)	4,41	6,61	7,01	11,33	18,61
RT - STANDARDNE OTOPINE_2 (MIN)	4,39	6,59	6,99	11,32	18,60
RT - STANDARDNE OTOPINE_3 (MIN)	4,42	6,62	7,02	11,35	18,62
\bar{A}	4,40	6,59	7,00	11,32	18,60
STDEV	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
%RSD	0,26%	0,26%	0,16%	0,13%	0,04%

\bar{A} =aritmetička sredina

STdev =standardna devijacija

4.1.6. Područje primjene metode

Područje primjene metode predstavlja raspon koncentracija između gornje i donje granice analita koji se mogu kvantificirati uz određenu točnost, linearnost i preciznost. Raspon za danu metodu određivanja halooctenih kiselina u vodi je 0,45 µg/L (GK) kao donja granica do 15 µg/L kao gornja granica za svih pet halooctenih kiselina.

4.1.7. Sažetak rezultata validacijskih parametara

Sažeti prikaz rezultata validacijskih parametara metode je prikazano u **Tablici 9** iz koje se može zaključiti da je metoda primjenjiva za određivanje 5 halooctenih kiselina u vodi.

Tablica 9 Rezultati validacijskih parametara metode za određivanje halooctenih kiselina u vodi

PARAMETRI VALIDACIJE	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI	HAA	REZULTAT	ZADOVOLJAVA KRITERIJ (DA / NE)
Linearnost				
Koeficijent korelacije	$k \geq 0,995$	MCA	$k = 0,9981$	DA
		MBA	$k = 0,9957$	DA
		DCA	$k = 0,9982$	DA
		TCA	$k = 0,9972$	DA
		DBA	$k = 0,9973$	DA
Granica kvantifikacije				
GK	$50\% \leq R \leq 150\%$ $RSD\% < 20\%$	MCA	$R = 79 - 99\%$ $RSD\% = 8\%$	DA
		MBA	$R = 129 - 123\%$ $RSD\% = 2\%$	DA
		DCA	$R = 96 - 104\%$ $RSD\% = 3\%$	DA
		TCA	$R = 147 - 150\%$ $RSD\% = 1\%$	DA
		DBA	$R = 144 - 148\%$	DA

4. Rezultati

			RSD% = 1%	
Preciznost				
Ponovljivost	RSD% < 20%	MCA	RSD% = 6%	DA
		MBA	RSD% = 6%	DA
		DCA	RSD% = 6%	DA
		TCA	RSD% = 5%	DA
		DBA	RSD% = 2%	DA
Međupreciznost	RSD% < 20%	MCA	RSD% = 9%	DA
		MBA	RSD% = 3%	DA
		DCA	RSD% = 7%	DA
		TCA	RSD% = 14%	DA
		DBA	RSD% 16%	DA
Točnost				
Iskorištenje ponavljanje mjerenja različitih koncentracija 3 µg/L, 7,5 µg/L i 15 µg/L (n=9)	70% ≤ R ≤ 130%	MCA	R= 81 – 109 %	DA
		MBA	R= 81 – 96 %	DA
		DCA	R= 103 – 126 %	DA
		TCA	R= 96 – 114 %	DA
		DBA	R= 76 – 123 %	DA
Iskorištene ponovljenog mjerenja iste koncentracije 3 µg/L (n=6)	70% ≤ R ≤ 130%	MCA	R= 88 – 117 %	DA
		MBA	R= 78 – 99 %	DA
		DCA	R= 97 -115 %	DA
		TCA	R= 98 – 117 %	DA
		DBA	R= 97 – 117 %	DA
Selektivnost				
Metoda je selektivna za MCA, MBA, DCA, TCA i DBA.				
Područje primjene				
0,45 µg/L – 15 µg/L				

4.2. Rezultati uzoraka vode

Razvijenom i validiranom metodom za analizu halooctenih kiselina provedena je analiza vodovodne vode na područjima Osječko-baranjske županije i grada Zagreba. Uzorci vodovodne vode prikupljeni su u mjestima Beli Manastir, Belišće, Đakovo, Đurđenovac, Našice, Valpovo i Zagreb. Uzorkovanje je provedeno prema navedenim naputcima opisanim pod podnaslovom 3.4. Uzorkovanje. Kod uzoraka Beli Manastir i Đurđenovac nije utvrđena prisutnost niti jedne od određivanih halooctenih kiselina. U uzorku vode iz Našica utvrđena je prisutnost svih 5 HAA, no utvrđena koncentracija MBA i TCA u uzorku je ispod granica kvantifikacije (GK). U **Tablici 10** prikazane su izmjerene koncentracije za svaku pojedinačnu HAA i njihov zbroj.

Tablica 10 Koncentracije halooctenih kiselina u uzorcima vode

PODRIJETLO UZORAKA	BELI MANASTIR	BELIŠĆE	ĐAKOVO	ĐURĐENOVAC	NAŠICE	VALPOVO	ZAGREB
MONOKLOROCTENA KISELINA (µg/L)	0,00	1,08	1,36	0,00	1,44	1,92	1,11
MONOBROMOCTENA KISELINA (µg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	<GK	0,62	0,00
DIKLOROCTENA KISELINA (µg/L)	0,00	0,00	1,86	0,00	0,59	9,47	0,00
TRIKLOROCTENA KISELINA (µg/L)	0,00	0,00	6,64	0,00	<GK	8,97	0,00
DIBROMOCTENA KISELINA (µg/L)	0,00	0,69	0,00	0,00	1,40	0,51	0,48
UKUPNI UDIO 5HAA (µg/L)	0,00	1,77	9,87	0,00	3,43	21,50	1,59

<GK- manje od granice kvantifikacije

5. RASPRAVA

Postavljena metoda za određivanje haloctenih kiselina u vodi validirana je za svaku pojedinu haloctenu kiselinu kroz parametre validacije.

Linearnost metode je ispitana uzastopnim injektiranjem radne otopine metilnih estera haloctenih kiselina u pet različitih koncentracijskih razina. Najniža koncentracijska razina nalazi se na utvrđenoj granici kvantifikacije (0,45 µg/L) za svih pet određivanih haloctenih kiselina. Iz dobivenih rezultata izračunate su jednadžbe pravca za svaku haloctenu kiselinu i njihov koeficijent korelacije. Koeficijent korelacije za monokloroctenu kiselinu iznosio je $k=0,998$, za dikloroctenu kiselinu $k=0,998$, za monobromoctenu kiselinu $k=0,995$, za trikloroctenu kiselinu $k=0,997$ i za dibromoctenu kiselinu $k=0,997$. Iz dobivenih podataka zaključuje se da je razvijena metoda linearna za svaki pojedini metilni ester, odnosno za svaku određivanu haloctenu kiselinu i da zadovoljava kriterij linearnosti ($k \geq 0,995$) (Lazarić, 2012), također dobiveni podatci za koeficijent korelacije usporedivi su s rezultatima koji su dobili Liu i sur. (2013) gdje je koeficijent korelacije u rasponu od 0,999 do 0,998 i Nikolaou i sur. (2002) gdje je dobiven koeficijent korelacije u rasponu od 0,990 do 0,997.

Granica kvantifikacije za svaku haloctenu kiselinu izračunata je uzastopnim injektiranjem radnih otopina haloctenih kiselina koncentracije koja odgovara granici kvantifikacije. Granica kvantifikacije za svaku haloctenu kiselinu iznosi 0,45 µg/L. Iskorištenje (R) na granici kvantifikacije mora zadovoljiti uvjet $50 \% \leq R \leq 150 \%$ i vrijednost za relativnu standardnu devijaciju mora biti manje od 20 % (US EPA, 2003b). Dobiveni rezultati mjerenja iskorištenja i RSD % za monokloroctenu iznosi $R=79 - 99 \%$; $RSD \% = 8 \%$, za monobromoctenu kiselinu $R=129 - 123 \%$; $RSD \% = 2 \%$, za dikloroctenu kiselinu $R=96 - 104 \%$; $RSD \% = 3 \%$, za trikloroctenu kiselinu $R=147 - 150 \%$; $RSD \% = 1 \%$ i za dibromoctenu kiselinu $R=144 - 148 \%$; $RSD \% = 1 \%$.

Na temelju dobivenih podataka za granicu kvantifikacije može se zaključiti da određena granica kvantifikacije metode, zadovoljava uvjete točnosti i preciznosti za svaku od pet haloctenih kiselina. Dobivena granica kvantifikacije je usporediva s granicom kvantifikacije koja je određena u istraživanju Kurajica i sur. (2019b) koja iznosi za dikloroctenu kiselinu, trikloroctenu kiselinu, monobromoctenu kiselinu i dibromoctenu kiselinu 0,1 µg/L i za monokloroctenu kiselinu 0,5 µg/L.

Mjerenje preciznosti metode pri uvjetima ponovljivosti u kraćem vremenskom razdoblju provedena je mjerenjem koncentracije pet haloctenih kiselina u pripremljenim ekstraktima standardnih otopina poznate koncentracije. Ponovljivost metode za određivanje monokloroctenu kiselinu iznosi $RSD \% = 6 \%$, za monobromoctenu kiselinu $RSD \% = 6 \%$, za dikloroctenu kiselinu $RSD \% = 6 \%$, za trikloroctenu kiselinu $RSD \% = 5 \%$ i za dibromoctenu kiselinu $RSD \% = 2 \%$. Što zadovoljava kriterij preciznosti pod ponovljivim uvjetima ($RSD \% \leq$

20 %) (US EPA, 2003b), a dobiveni rezultati su usporediv s rezultatima u provedenom istraživanju Liu i sur. (2013) (vrijednost za preciznost u kraćem vremenskom razdoblju za monokloroctenu kiselinu iznosi RSD% = 5,6 %, za monobromoctenu kiselinu RSD% = 4,7 %, za dikloroctenu kiselinu RSD% = 3,4 %, za trikloroctenu kiselinu RSD% = 4,2 % i za dibromoctenu kiselinu RSD% = 7%).

Međupreciznost metode određena je mjerenjem koncentracije pet haloctenih kiselina u ekstraktu standardnih otopina poznate koncentracije kroz duže vremensko razdoblje. Izmjereno relativno standardno odstupanje za monokloroctenu kiselinu iznosi RSD % = 9 %, za monobromoctenu kiselinu RSD% = 3 %, za dikloroctenu kiselinu RSD% = 7 %, za trikloroctenu kiselinu RSD% = 14 % i za dibromoctenu kiselinu RSD% = 16 %. Navedeno zadovoljava kriterij preciznosti, odnosno međupreciznosti (RSD% ≤ 20%) (US EPA, 2003b). Dobivene vrijednosti međupreciznosti u istraživanju koji su proveli Liu i sur. (2013) (vrijednosti međupreciznost za monokloroctenu kiselinu iznosi RSD% = 7 %, za monobromoctenu kiselinu RSD% = 3,5 %, za dikloroctenu kiselinu RSD% = 5,2 %, za trikloroctenu kiselinu RSD% = 7 % i za dibromoctenu kiselinu RSD% = 6,1 %), usporedivi su s dobivenim rezultatima međupreciznosti u ovom radu. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je metoda za određivanje haloctenih kiselina u vodi za ljudsku potrošnju precizna.

Točnost metode provedena analizom mjerenja pripremljenih ekstrakta standardne otopine u više različitih koncentracija (za svaku koncentraciju pripremljene su tri otopine 5HAA poznate koncentracije) i analizom ekstrakta standardnih otopina iste poznate koncentracije. Uvjet točnosti metode podrazumijeva da je iskorištenje (R) ±30 %, odnosno metoda je točna ako je $70 \% \leq R \leq 130 \%$ (US EPA, 2003b). Dobivena iskorištenja za monokloroctenu R= 81 - 117 %, za monobromoctenu kiselinu R= 78 – 99 %, za dikloroctenu kiselinu R= 97 - 126 %, za trikloroctenu kiselinu R=96 - 117% i za dibromoctenu kiselinu R= 76 - 123%. Iz dobivenih rezultata za iskorištenje može se zaključiti da je metoda za određivanje haloctenih kiselina u vodi točna, jer zadovoljava postavljeni kriterij točnosti (R= ±30%) za svaku pojedinu haloctenu kiselinu. Dobiveni rezultati za točnost usporedivi su s točnosti koja je dobivena u istraživanju Liu i sur. (2013) (iskorištenja za monokloroctenu R= 86,6 - 106,3 %, za monobromoctenu kiselinu R= 96,5 – 101 %, za dikloroctenu kiselinu R= 99,1 - 99,2 %, za trikloroctenu kiselinu R= 96,3 - 104,2 % i za dibromoctenu kiselinu R= 100 - 100,4 %).

Selektivnost metode utvrđena je usporedbom kromatograma otopine metilnih estera haloctenih kiselina i kromatograma ekstrakta standardne otopine poznate koncentracije. Vizualno možemo zaključiti da se svaki pojedini analit odnosno haloctena kiselina mogu odrediti bez da smetaju jedna drugoj. Iz usporedbe vremena zadržavanja za pojedine haloctene kiseline iz kromatograma metil estera haloctenih kiselina i kromatograma ekstrakta standardne otopine poznate koncentracije vidljivo je da su vremena zadržavanja

približno jednako za svaku određivanu haloocetenu kiselinu i utvrđeno je njihovo standardno odstupanje koje je neznatno i najvećem slučaju iznosi 0,02. Može se zaključiti da je metoda određivanja haloocetnih kiselina selektivna.

Područje primjene metode predstavlja raspon koncentracija između gornje i donje granice analita koji se mogu kvantificirati uz određenu točnost, linearnost i preciznost. Raspon za danu metodu određivanja haloocetnih kiselina u vodi je 0,45 µg/L (GK) kao donja granica do 15 µg/L kao gornja granica za svih pet haloocetnih kiselina.

U uzorcima vode uzetim na području Belog Manastira i Đurđenovca nije utvrđena prisutnost ni jedne od pet haloocetnih kiselina. Takav rezultat za grad Beli Manastir i općinu Đurđenovac je očekivan, jer se voda za te vodoopskrbne sustave crpi iz bunara podzemnih voda čiji je udio prisutnih organskih tvari minimalan ili ih nema te se očekuje da se nusprodukti dezinfekcije neće formirati (Hrvatske vode, 2009).

U uzorku vode koja je izuzeta u Zagrebu utvrđena je prisutnost monokloroacetene kiseline u koncentraciji 1,11 µg/L i dibromoacetene kiseline u koncentraciji 0,48 µg/L. Ostale haloacetene kiseline nisu pronađene u uzorku, a ukupni udio pet haloocetnih kiselina je bio 1,59 µg/L. Grad Zagreb koristi također podzemne vode s niskim sadržajem organske tvari te niske koncentracije haloocetnih kiselina ne iznenađuju.

Uzorak vode uzorkovan u Belišću sadržavao je monokloroacetenu u koncentraciji 1,08 µg/L i dibromoacetenu u koncentraciji 0,69 µg/L. Ostale haloacetene kiseline nisu pronađene, a koncentracija zbroja pet haloocetnih kiselina u uzorku vode iz Belišća iznosi 1,77 µg/L.

U uzorku vode koje je uzeto iz Našica utvrđena je prisutnost svih pet haloocetnih kiselina no koncentracija monokloroacetene kiseline i trikloroacetene kiseline nalaze se ispod granice kvantifikacije te njihov udio u zbroju koncentracija pet haloocetnih kiselina nije uzet u obzir. U Našicama je utvrđeno monokloroacetena kiselina u koncentraciji od 1,44 µg/L, dikloroacetena kiselina u koncentraciji od 0,59 µg/L i dibromoacetena kiselina u koncentraciji od 1,40 µg/L. Zbroj koncentracije svih pet haloocetnih kiselina u uzorku vode iznosi 3,34 µg/L.

U Đakovu je zbroj pet haloocetnih kiselina iznosio 9,87 µg/L, a utvrđene su koncentracije za monokloroacetenu kiselinu 1,36 µg/L, dikloroacetenu kiselinu 1,86 µg/L i trikloroacetenu kiselinu 6,64 µg/L. Haloacetene kiseline koje u svom sastavu sadrže brom nisu utvrđene u uzorku vode iz Đakova.

Uzorak vode iz Valpova sadržavao je svih pet haloocetnih kiselina čiji je zbroj koncentracija iznosio 21,50 µg/L. Utvrđene koncentracije za monokloroacetenu kiselinu iznosila je 1,92 µg/L, za monobromoacetenu kiselinu 0,62 µg/L, za dikloroacetenu kiselinu 9,47 µg/L za tribromoacetenu kiselinu 8,97 µg/L, i za dibromoacetenu kiselinu 0,48 µg/L. Grad Valpovo vodom se snabdjeva s

crpilišta podzemne vode čija voda ima povišene koncentracije prirodnih organskih tvari, kao i udio mangana, željeza, arsena, nitrata i nitrita te kao takva se podliježe temeljitoj obradi vode (Hrvatske vode, 2019). Zbog čega je formiranje nusprodukata dezinfekcije povećano pri obradi sirove vode a time i halooctenih kiselina. Uzorak iz Valpova sadržavao je najveću koncentraciju halooctenih kiselina od svih 7 uzoraka vode. Najčešće prisutna haloocтена kiselina u uzorcima vode bila je monoklorooctena kiselina, koja je bila prisutna u svim uzorcima u kojima se prisutnost halooctenih kiselina utvrdio. Iz navedenih rezultata, može se zaključiti da je zbroj koncentracija pet halooctenih kiselina u uzorcima ispod vrijednosti od 60 µg/L, odnosno u granicama je regulirana EU Direktivom 2020/2184 i Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/2023). Iznimno veći udio pet halooctenih kiselina nalazi se u Valpovu (21,50 µg/L) koje je i dalje ispod vrijednosti dopuštene koncentracije i stoga zdravstveno ispravna.

Kurajica i sur. (2019a) proveli su određivanje udjela halooctenih kiselina na području grada Zagreba te utvrdili da je ukupni udio pet halooctenih kiselina iznosio 5,7 µg/L. Izmjerene su najveće koncentracije monobromooctene kiseline (4,5 µg/L) a monoklorooctena je detektirana ispod postavljene granice kvantifikacije. Također, Kurajica i sur. (2019b) odredili su udio halooctenih kiselina u vodi za ljudsku potrošnju na području Republike Hrvatske gdje su uzeti uzorci s 48 lokacija na području RH. Najveći utvrđeni udio 5HAA bio je iz Daruvara (17,3 µg/L), Novalje (16,4 µg/L) i Pakraca (14,9 µg/L). U Belom Manastiru nije utvrđena prisutnost halooctenih kiselina (Kurajica i sur., 2016).

Na području Europske unije provedena su slična istraživanja te je na području Ujedinjenog Kraljevstva udio 5HAA iznosio od 31 µg/L do 59 µg/L (Malliarou i sur., 2005). U Finskoj su Nissinen i sur. (2002) utvrdili da je srednja koncentracija 5HAA iznosila 40 µg/L. Dok je na Tajvanu određen udio 5HAA u različitim godišnjim dobima gdje je u zimi utvrđena manja koncentracija 5HAA (99,4 µg/L) nego po ljeti (133,2 µg/L) (Chang i sur., 2010).

6. ZAKLJUČAK

Halooctene kiseline nehlapljivi su nusprodukti dezinfekcije vode, a nastaju reakcijom između dezinfekcijskog sredstva klora i prirodno prisutne organske tvari u vodi. Maksimalna dopuštena koncentracija halooctene kiseline u vodi za ljudsku potrošnju u Republici Hrvatskoj propisana je Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23) i na razini Europske unije Direktivom 2020/2184 o kvaliteti vode namijenjenoj za ljudsku potrošnju.

U ovom radu opisana je razvijena modificirana metoda za određivanje halooctenih kiselina u vodi. Razvijena metoda je modificirana kroz parametre validacije i utvrđeno je da je metoda primjenjiva na stvarnim uzorcima vode.

Određivanje halooctenih kiselina u vodi pomoću postavljene metode provedena je na uzorcima vode za ljudsku potrošnju s područja Osječko-baranjske županije i grada Zagreba.

Temeljem provedenog istraživanja i na osnovi dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Modificirana US EPA Metoda 552.3 primjenjiva je analitička metoda za određivanje halooctenih kiselina u vodi.
- Razvijena metoda linearna za svaki pojedini metil ester, odnosno za svaku određivanu halooctenu kiselinu jer zadovoljava kriterij linearnosti ($k \geq 0,995$).
- Određena granica kvantifikacije metode ($0,45 \mu\text{g/L}$) za svaku od pet halooctenih kiselina zadovoljava uvjete točnosti i preciznosti.
- Postavljena metode zadovoljava kriterij preciznosti pod ponovljivim uvjetima i međupreciznost ($\text{RSD } \% \leq 20 \%$) za svaku određivanu halooctenu kiselinu te potvrđuje da je metoda precizna.
- Metoda za određivanje halooctenih kiselina u vodi je točna jer zadovoljava postavljeni kriterij točnosti ($R = \pm 30 \%$) za svaku pojedinu halooctenu kiselinu.
- Vremena zadržavanja pet analiziranih halooctenih kiselina u kromatogramu standardne otopine i kromatogramu realnog uzorka vode se podudaraju, a standardna devijacija rezultata je u najgorem slučaju 0,02 te se može zaključiti kako je metoda selektivna za svaku određivanu halooctenu kiselinu.
- Provedena validacija metode kroz validacijske parametre za svaku pojedinu halooctenu kiselinu potvrdila je da je postavljena metoda prikladna za korištenje u svrhu određivanja halooctenih kiselina u vodi.
- Utvrđene koncentracije halooctenih kiselina u analiziranim uzorcima postavljenom analitičkom metodom, na području Osječko-baranjske županije i grada Zagreba, ne prelaze granice propisane EU Direktivom 2020/2184 i Pravilnika NN 64/23.

7. LITERATURA

Bhat HK, Kanz MF, Campbell GA, Ansari GA: Ninety day toxicity study of chloroacetic acids in rats. *Fundamental and applied toxicology* 17(2): 240-253, 1991.

Bodensteiner KJ, Sawyer HR, Moeller CL, Kane CM, Pau KY, Klinefelter GR, Veeramachaneni DN: Chronic exposure to dibromoacetic acid, a water disinfection byproduct, diminishes primordial follicle populations in the rabbit. *Toxicological sciences* 80(1) :83-91, 2004.

Bull RJ, Orner GA, Cheng RS, Stillwell L, Stauber AJ, Sasser LB, Lingohr MK, Thrall BD: Contribution of dichloroacetate and trichloroacetate to liver tumor induction in mice by trichloroethylene. *Toxicology and applied pharmacology vol. 182*:155-165, 2002.

Bull RJ, Sanchez IM, Nelson MA, Larson JL, Lansing AJ: Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology vol. 63*,3: 341-59, 1990.

Cardador MJ i Gallego M: Control of disinfection by-products in canned vegetables caused by water used in their processing *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment vol. 34*,1:10-23, 2017.

Cardador MJ i Gallego M: Haloacetic acids in swimming pools: Swimmer and worker exposure. *Environmental science & technology vol. 45*,13: 5783-5790, 2011.

Cardador MJ, Gallego M: Haloacetic acids content of fruit juices and soft drinks. *Food chemistry vol. 173*: 685-693, 2015.

Chang HH, Tung HH, Chao CC, Wang GS: Occurrence of haloacetic acids (HAAs) and trihalomethanes (THMs) in drinking water of Taiwan. *Environmental monitoring and assessment vol. 162*,1-4: 237-250, 2010.

Chang LW, Daniel FB, DeAngelo AB: Analysis of DNA strand breaks induced in rodent liver in vivo, hepatocytes in primary culture, and a human cell line by chlorinated acetic acids and chlorinated acetaldehydes. *Environmental and molecular mutagenesis vol. 20*: 4277-4288, 1992.

Chapman T, Mahadevan D, Mahajan A, Perez-Temprano A, McDiarmid J: Iatrogenic full-thickness chemical burns from monochloroacetic acid. *Journal of burn care & research vol.27*,4: 545-547, 2006.

Chen CY, Chang SN, Wang GS: Determination of ten haloacetic acids in drinking water using high-performance and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatographic science vol. 47*: 167-174, 2009.

Chowdhury S, Alhooshani K, Karanfil T: Disinfection byproducts in swimming pool: occurrences, implications and future needs. *Water research vol. 53*: 68-109, 2014.

- Cicmanec JL, Condie LW, Olson GR, Wang SR: 90-Day toxicity study of dichloroacetate in dogs. *Fundamental and applied toxicology* vol. 17,2: 376-389, 1991.
- Clark RM, Adams JQ, Kyjins BW: DBP control in drinking water: cost and performance. *Journal of Environmental Engineering* vol. 120,4: 759-771, 1994.
- Daniel FB, DeAngelo AB, Stober JA, Olson GR, Page NP: Hepatocarcinogenicity of chloral hydrate, 2-chloroacetaldehyde, and dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundamental and Applied Toxicology* vol.19,2: 159-168, 1992.
- Daniel FB, Robinson M, Stober JA, Page NP, Olson GR: Ninety-day toxicity study of sodium monochloroacetate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* vol.67,2: 171-185, 1991.
- DeAngelo AB, Daniel FB, Most BM, Olson GR: Failure of monochloroacetic acid and trichloroacetic acid administered in the drinking water to produce liver cancer in male F344/N rats. *Journal of toxicology and environmental health* vol. 52,5: 425-445, 1997.
- DeAngelo AB, Daniel FB, Stober JA, Olson GR: The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundamental and Applied Toxicology* vol.16,2: 337-347, 1991.
- DeAngelo AB, Daniel FB, Wong DM, George MH: The induction of hepatocellular neoplasia by trichloroacetic acid administered in the drinking water of the male B6C3F1 mouse. *Journal of toxicology and environmental health* Dio A vol.71,16: 1056-1068, 2008.
- DeAngelo AB, George MH, House DE: Hepatocarcinogenicity in the male B6C3F1 mouse following a lifetime exposure to dichloroacetic acid in the drinking water: dose-response determination and modes of action. *ournal of toxicology and environmental health Dio A* vol. 58,8: 485-507, 1999.
- Direktiva (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća: Direktiva o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju, 2020. <http://data.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj> [28.8.2023].
- Giller S, Le Curieux F, Erb F, Marzin D: Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. *Mutagenesis* vol.12,5: 321-328, 1997.
- Guha N, Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Mattock H, Straif K: International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group: Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites. *The Lancet. Oncology* vol. 13,12: 1192-1193, 2012.

Harrington-Brock K, Doerr CL, Moore MM: Mutagenicity of three disinfection by-products: di- and trichloroacetic acid and chloral hydrate in L5178Y/TK+/- 3.7. 2C mouse lymphoma cells. *Mutation research* vol. 413,3: 265-276, 1998.

Hassoun E, Cearfoss J, Mamada S, Al-Hassan N, Brown M, Heimberger K, Liu MC: The effects of mixtures of dichloroacetate and trichloroacetate on induction of oxidative stress in livers of mice after subchronic exposure. *Journal of toxicology and environmental health. Dio A* vol. 77,6: 313-323, 2014.

Hassoun EA, Dey S: Dichloroacetate- and trichloroacetate-induced phagocytic activation and production of oxidative stress in the hepatic tissues of mice after acute exposure. *Journal of biochemical and molecular toxicology* vol. 22,1: 27-34, 2008.

Hassoun EA, Spildener J, Cearfoss J: The induction of tumor necrosis factor-alpha, superoxide anion, myeloperoxidase, and superoxide dismutase in the peritoneal lavage cells of mice after prolonged exposure to dichloroacetate and trichloroacetate. *Journal of biochemical and molecular toxicology* vol. 24,2: 136-144, 2010.

Herbert V, Gardner A, Colman N: Mutagenicity of dichloroacetate, an ingredient of some formulations of pangamic acid (trade-named "vitamin B15"). *The American Journal of Clinical Nutrition* vol.33,6: 1179-1182, 1980.

Herren-Freund SL, Pereira MA, Khoury MD, Olson G: The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, in mouse liver. *Toxicology and applied pharmacology* vol. 90,2: 183-189, 1987.

Hrvatske vode: Novelacije plana razvitka vodoopskrbe Osiječko–baranjske županije. Osijek, 2009.

Hu Y, Tan L, Zhang SH, Zuo YT, Han X, Liu N, Lu WQ, Liu AL: Detection of genotoxic effects of drinking water disinfection by-products using *Vicia faba* bioassay. *Environmental science and pollution research international* vol. 24,2: 1509-1517, 2017.

IPCS, International Programme on Chemical Safety: Disinfectants and disinfectant by-products. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Environmental Health Criteria 216, 2000.

Kargalioglu Y, McMillan BJ, Minear RA, Plewa MJ: Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in *Salmonella typhimurium*. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* vol. 22,2: 113-128, 2002.

Kurajica L, Ujević Bošnjak M, Štiglić J, Novak Stankov M; Određivanje reguliranih i nereguliranih nusprodukata dezinfekcije u vodi za piće u gradu Zagrebu. *Voda i javna vodoopskrba*, 150-157. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Poreč, 2019a.

Kurajica L, Ujević Bošnjak M, Štiglić J: Determination of haloacetic acids in drinking water in Croatia. 26. *Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera*. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Šibenik, 2019b.

Kusch GD, McCarty LP, Lanham JM: Monochloroacetic acid exposure: a case report. *Polish journal of occupational medicine* vol. 3,4: 409-414, 1990.

Lazarić K: Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri* 1: 61-64, 2012.

Liu X, Wei X, Zheng W, Jiang S, Templeton MR, He G, Qu W: An optimized analytical method for the simultaneous detection of iodoform, iodoacetic acid, and other trihalomethanes and haloacetic acids in drinking water. *PLoS one* vol. 8,4, e60858, 2013.

Malliarou E, Collins C, Graham N, Nieuwenhuijsen MJ: Haloacetic acids in drinking water in the United Kingdom. *Water research* vol. 39,12:2722-2730, 2005.

Melnick RL, Nyska A, Foster PM, Roycroft JH, Kissling GE: Toxicity and carcinogenicity of the water disinfection byproduct, dibromoacetic acid, in rats and mice. *Toxicology* vol.230,2-3: 126-136, 2007.

Mijatović I, Matošić M : Tehnologija vode (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.

Millischer R, Jouglard J, Vincenti M, Ruty J, Contassot J: Monochloroacetic acid: seven worldwide cases of systemic poisoning resulting from accidental skin contact. *Occupational health in the chemical industry, International Congress on Occupational Health*, 1987.

Nelson MA, Bull RJ: Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo. *Toxicology and applied pharmacology* vol. 94,1: 45-54, 1988.

Nelson MA, Lansing AJ, Sanchez IM, Bull RJ, Springer DL: Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced DNA strand breaks are independent of peroxisome proliferation. *Toxicology* vol.59,3: 239-248, 1989.

Nikolaou AD, Golfinopoulos SK, Kostopoulou MN, Lekkas TD: Determination of haloacetic acids in water by acidic methanol esterification-GC-ECD method. *Water research* vol. 36,4:1089-1094, 2002.

Nissinen TK, Miettinen IT, Martikainen PJ, Vartiainen T: Disinfection by-products in Finnish drinking waters. *Chemosphere* vol. 48,1: 9-20, 2002.

NN 2/05, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH: Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. NN 2/05, 2005.

NN 64/23, Ministarstvo zdravstva RH: Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju. NN 64/23, 2023.

NTP, National Toxicology Program: Report on Carcinogens Monograph on Haloacetic Acids Found as Water Disinfection By-Products: RoC Monograph 12, Research Triangle Park (NC): National Toxicology Program; 2018.

NTP, National Toxicology Program: Toxicology and Carcinogenesis Studies of Monochloroacetic Acid (CAS No. 79-11-8) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program technical report series vol. 396: 1-245, 1992.

NTP, National Toxicology Program: Toxicology and Carcinogenesis Studies of Dibromoacetic Acid (CAS No. 631-64-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Drinking Water Studies). National Toxicology Program technical report series ,537, 2007.

OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment Haloacetic Acids in Drinking Water. Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, 2022.

Omerdić N. Stručni prikaz: Kloriranje vode. *Hrvatske vode vol. 29,116*: 133-138, 2021.

Ono Y, Somiya I, Kawamura M: The evaluation of genotoxicity using DNA repairing test for chemicals produced in chlorination and ozonation processes. *Water science and Technology vol.231-3*: 329-338, 1991.

Pereira MA: Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice. *Fundamental and applied toxicology vol.31,2*: 192-199, 1996.

Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vankerk D, Minear RA, Wagner ED: Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and molecular mutagenesis vol.40,2*: 134-142, 2002.

Plewa MJ, Simmons JE, Richardson SD, Wagner ED: Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of the haloacetic acids, a major class of drinking water disinfection by-products. *Environmental and molecular mutagenesis vol.51,8-9*: 871-878, 2010.

Plewa MJ, Wagner ED, Richardson SD, Thruston AD Jr, Woo YT, McKague AB. Chemical and biological characterization of newly discovered iodoacid drinking water disinfection byproducts. *Environmental science & technology vol. 38,18*: 4713-4722, 2004.

Prochazka E, Escher BI, Plewa MJ, Leusch FD: In Vitro Cytotoxicity and Adaptive Stress Responses to Selected Haloacetic Acid and Halobenzoquinone Water Disinfection Byproducts. *Chemical research in toxicology* vol. 28,10: 2059-2068, 2015.

Quist AJL, Inoue-Choi M, Weyer PJ, Anderson KE, Cantor KP, Krasner S, Freeman LEB, Ward MH, Jones RR: Ingested nitrate and nitrite, disinfection by-products, and pancreatic cancer risk in postmenopausal women. *International journal of cancer* vol. 142,2: 251-261, 2018.

Ratasuk C, Kositanont C, Ratanatamskul C: Removal of haloacetic acids by ozone and biologically active carbon. *ScienceAsia* vol. 34: 293-298, 2008.

Raymer J, Michael LC: Uptake of water disinfection by-products into food. Research Triangle Park, NC: Research Triangle Institute, 2010.

Rogers DR: Accidental fatal monochloroacetic acid poisoning. *The American journal of forensic medicine and pathology* vol. 16,2: 115-116, 1995.

Stalter D, O'Malley E, von Gunten U, Escher BI: Fingerprinting the reactive toxicity pathways of 50 drinking water disinfection by-products.. *Water research* vol. 91: 19-30, 2016.

Sundstrom DW, Klei HE: Wastewater Treatment. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 327-330, 1979.

Šarkanj B: Toksikanti u namirnicama, hrani i vodi dospjeli ili nastali tijekom proizvodnje, obrade ili čuvanja. *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*:137-140. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.

Uredba (EU) 2023/754 Europskog parlamenta i Vijeća: Uredba o izdavanju odobrenja Unije za pojedinačni biocidni proizvod „Arche Chlorine” u skladu s Uredbom (EU) br. 528/2012 Europskog parlamenta i Vijeća, 2023 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/754/oj [12.9.2023.].

US EPA, The Environmental Protection Agency: EPA method 552.3, Determination of Haloacetic Acids and Dalapon in Drinking Water by Liquid-liquid Microextraction, Derivatization, and Gas Chromatography with Electron Capture Detection, 2003b.

US EPA, The Environmental Protection Agency: Nomination Summary for Dichloroacetic acid (N88003), 1998. <https://ntp.niehs.nih.gov/static/getinvolved/nominate/summary/nm-n88003.html> [12.9.2023.].

US EPA, The Environmental Protection Agency: Addendum to Drinking Water Criteria Document for Monochlorinated Acid and Trichloroacetic Acid. Final. *Prepared by Health*

and Ecological Criteria Division, Office of Science and Technology, Office of Water, U.S. EPA, Washington, D.C., 2003a.

Varshney M, Chandra A, Chauhan LK, Goel SK, Micronucleus induction by oxidative metabolites of trichloroethylene in cultured human peripheral blood lymphocytes: a comparative genotoxicity study. *Environmental science and pollution research international* vol. 20,12: 8709-8716, 2013.

Veeramachaneni DN, Palmer JS, Klinefelter GR: Chronic exposure to low levels of dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, adversely affects reproductive function in male rabbits. *Journal of andrology* vol. 28,4: 565-577, 2007.

Wehmas LC, DeAngelo AB, Hester SD, Chorley BN, Carswell G, Olson GR, George MH, Carter JH, Eldridge SR, Fisher A, Vallanat B, Wood CE: Metabolic Disruption Early in Life is Associated With Latent Carcinogenic Activity of Dichloroacetic Acid in Mice. *Toxicological sciences* vol. 159,2: 354-365, 2017.

Wood CE, Hester SD, Chorley BN, Carswell G, George MH, Ward W, Vallanat B, Ren H, Fisher A, Lake AD, Okerberg CV, Gaillard ET, Moore TM, Deangelo AB: Latent carcinogenicity of early-life exposure to dichloroacetic acid in mice *Carcinogenesis* vol. 36,7: 782-91, 2015.

Zhang SH, Miao DY, Liu AL, Zhang L, Wei W, Xie H, Lu WQ: Assessment of the cytotoxicity and genotoxicity of haloacetic acids using microplate-based cytotoxicity test and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Mutation research* vol. 703,2:174-179, 2010.