

# Metode određivanja tiabendazola

---

**Kopf, Doris**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:624423>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Doris Kopf

**Metode određivanja tiabendazola**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Doris Kopf

**Metode određivanja tiabendazola**

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Komentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

## **Metode određivanja tiabendazola**

Doris Kopf

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentorica:** izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

**Komentor:** doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

### **Sažetak**

Tiabendazol (TBZ) je vrlo korisno antihelmintičko i fungicidno sredstvo koje je našlo široku primjenu. Kao antihelmintik, tiabendazol može djelovati na dva načina: može inhibirati enzim fumarat reduktazu ili nastanak mikrotubula tijekom mitoze. Ako se koristi kao fungicid, u gljivicama može inhibirati sustav prijenosa elektrona ili mitozu hifa. Budući da se zbog svojih učinkovitih svojstava sve učestalije koristi kao fungicid, moguće je da tiabendazol zaostaje na usjevima pa je zbog toga određena maksimalna dopuštena koncentracija pri kojoj tiabendazol ne šteti. Međutim, zbog mogućih štetnih posljedica na endokrini sustav pri višim koncentracijama, potrebno ga je određivati i pratiti u uzorcima voća, povrća, tla i vode. Tiabendazol se uspješno može odrediti raznim spektroskopskim, kromatografskim, elektroanalitičkim te biološkim i imunokemijskim metodama. Najčešće korištene metode su spektrofluorimetrija, spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

**Diplomski rad obuhvaća:** 61 stranicu, 25 slika, 2 tablice i 82 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** tiabendazol, antihelmintik, fungicid, spektroskopija, kromatografija

**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Olivera Galović
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjenski član povjerenstva

**Rad prihvaćen:**

**Rad je pohranjen:** u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate University Study of Chemistry; Research study

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

### **Methods for thiabendazole detection**

Doris Kopf

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Mirela Samardžić, PhD, associate prof.

**Cosupervisor:** Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.

#### **Abstract**

Thiabendazole (TBZ) is a very useful anthelmintic drug and fungicide that has a broad spectrum of application. As anthelmintic, thiabendazole has two possible mechanisms of action: it can inhibit fumarate reductase or formation of microtubule during mitosis. If used as a fungicide, it can inhibit electron transfer system or mitosis of hypha in fungus. Since it has been used more often as fungicide, because of its effective properties, it is possible that thiabendazole can leave residues on crops and for this reason the maximum residue levels have been determined, at which thiabendazole is not harmful. However, due to the possible harmful effects on the endocrine system at higher levels, it should be determined and monitored in samples of fruits, vegetables, soil and water. Thiabendazole can be successfully determined by various spectroscopic, chromatographic, electroanalytical, bio- and immunochemical methods. The most commonly used methods are spectrofluorimetry, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Thesis includes:** 61 pages, 25 figures, 2 tables and 82 references

**Original in:** Croatian

**Keywords:** thiabendazole, anthelmintic, fungicide, spectroscopy, chromatography

**Reviewers:**

1. Mirela Samardžić, PhD, associate prof.
2. Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.
3. Olivera Galović, PhD, assistant prof.
4. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, assistant prof., alternate member of the committee

**Thesis accepted:**

**Thesis deposited:** at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TIABENDAZOL .....	2
2.1. Dobivanje tiabendazola.....	2
2.2. Antihelmintička svojstva tiabendazola.....	5
2.3. Antifungalna svojstva tiabendazola .....	7
2.4. Važnost određivanja tiabendazola.....	8
3. METODE ODREĐIVANJA TIABENDAZOLA.....	9
3.1. SPEKTROSKOPSKE METODE.....	9
3.1.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija.....	10
3.1.2. Spektrofluorimetrija.....	13
3.1.3. Fosforimetrija .....	19
3.1.4. Ramanova spektroskopija.....	21
3.2. KROMATOGRFSKE METODE.....	27
3.2.1. Plinska kromatografija.....	31
3.2.2. Tekućinska kromatografija .....	33
3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	35
3.2.4. Micelarna tekućinska kromatografija .....	40
3.2.5. Kapilarna elektrokromatografija.....	41
3.3. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	44
3.3.1. Direktna potenciometrija .....	44
3.4. BIOLOŠKE I IMUNOKEMIJSKE METODE .....	46
3.4.1. Biološki testovi .....	47
3.4.2. Imunološki testovi .....	49
4. USPOREDBA ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE TIABENDAZOLA .....	53
5. ZAKLJUČAK.....	56
6. LITERATURA .....	57



# 1. UVOD

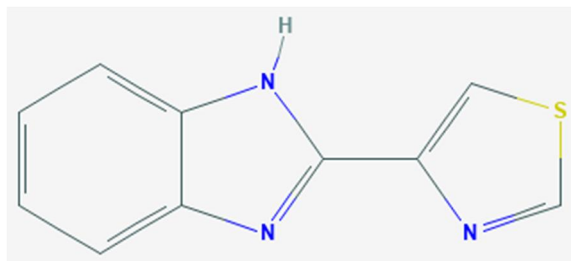
Tiabendazol je derivat benzimidazola koji ima širok spektar djelovanja kao antihelmintičko i antifungalno sredstvo. Kao antihelmintik koristi se za uklanjanje helminta iz organizma, iako su ga u zadnje vrijeme zbog čestih štetnih nuspojava zamijenili drugi lijekovi, poput ivermektina i mebendazola. Kao fungicid pokazao se vrlo korisnim pri tretiranju raznog voća i povrća radi suzbijanja plijesni, štetočina i truljenja. U nekim državama se tiabendazol čak koristi i kao konzervans prilikom transporta i dugog skladištenja svježih proizvoda. Iako nije toksičan za ljude, zbog svog širokog spektra korištenja, tiabendazol je potrebno pratiti u okolišu jer pokazuje štetne endokrine posljedice pri visokim koncentracijama (remeti rad hormona štitnjače).

Metode kojima se tiabendazol određuje u realnim uzorcima mogu se podijeliti u četiri velike skupine. Spektroskopske metode koje se koriste su UV/Vis spektroskopija, spektrofluorimetrija, fosforimetrija i SERS spektroskopija. Od kromatografskih metoda, najčešće se koristi HPLC metoda, ali se također koriste i plinska, tekućinska i micelarna tekućinska kromatografija te kapilarna elektrokromatografija. Od elektroanalitičkih metoda koristi se direktna potencijometrija. Biološki testovi su predstavnici bioloških metoda, a imunološki testovi, posebice ELISA-test, predstavnici su imunokemijskih metoda.

Cilj ovog Diplomskog rada je predstaviti svojstva tiabendazola i dati pregled analitičkih metoda kojima se tiabendazol određuje i prati u okolišu na temelju analiza vode i tla te u uzorcima voća i povrća.

## 2. TIABENDAZOL

Tiabendazol (TBZ) je organska molekula čije IUPAC ime glasi 4-(1*H*-1,3-benzodiazol-2-il)-1,3-tiazol. Tiabendazol ima molekulsku formulu  $C_{10}H_7N_3S$ , a njegova struktura prikazana je na Slici 1 [1].



Slika 1. Struktura molekule tiabendazola [1].

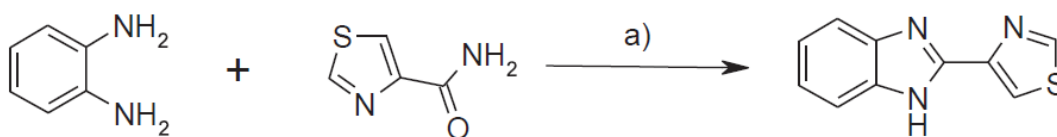
Tiabendazol je bijela kristalna tvar koja se tali pri 304-305 °C. Tvori i kisele i bazične derivate. Slabo je topljiv u vodi pri neutralnom pH, a veću topljivost ima u razrijeđenim kiselinama i lužinama (najveću topljivost ima u klorovodičnoj kiselini pri pH vrijednosti od 2,5). Stabilan je i u čvrstom stanju i kao otopina. Molekula tiabendazola tvori obojene komplekse s metalima, npr. željezom [2]. S obzirom da u svojoj strukturi sadrži tri atoma dušika i jedan atom sumpora koji mogu služiti kao koordinacijski centri, tiabendazol je dobar kelirajući agens, što ukazuje na mogućnosti upotrebe u medicini kod trovanja metalima, npr. olovom, živom ili antimonom. Osim ovih svojstava, nedavno su Tabanez i suradnici [3] opisali molekulska, kristalografska i spektroskopska svojstva tiabendazola koja će zasigurno pomoći u daljnim istraživanjima o mogućem korištenju ovog lijeka.

### 2.1. Dobivanje tiabendazola

Tiabendazol je derivat benzimidazola, spoja koji u svojoj strukturi sadrži benzenski prsten spojen na imidazolni prsten. Benzimidazol je biciklička, planarna i aromatska molekula.

Najznačajnije sinteze benzimidazola su sinteze iz *o*-fenilendiamina kao polaznog spoja, u kombinaciji s raznim reagensima, npr. s octenom kiselinom, aldehidima, ketonima, esterima i sl. [4]. Međutim, prvi benzimidazol je pripremljen 1872. godine, kada je Hoebrecker reducirao 2-nitro-4-metilacetanilid i dobio 2,6-dimetilbenzimidazol [5].

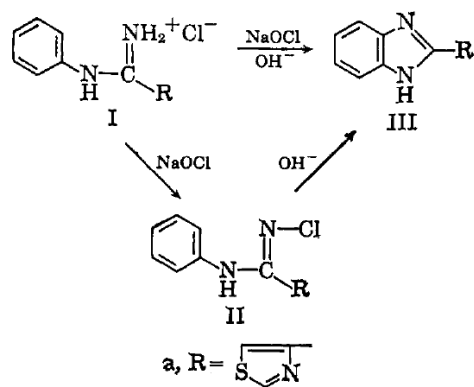
Brown [6] je 1961. godine prvi predstavio tiabendazol kao novu vrstu spojeva koji imaju izvrsna antihelmintička svojstva. On je tiabendazol pripremio reakcijom 4-tiazolkarboksamida s *o*-fenilendiaminom, uz polifosfornu kiselinu kao katalizator, pri 250 °C tijekom 3 sata te je dobio konačni produkt uz iskorištenje reakcije od 64 %. Kemijska reakcija sinteze tiabendazola prikazna je na Slici 2. Osim samog tiabendazola, također je sintetizirao i njegove različito supstituirane derivate koje je koristio u ispitivanjima antihelmintičkih svojstava, ali je čisti tiabendazol pokazao najveći potencijal kao antihelmintik.



Slika 2. Kemijska reakcija sinteze tiabendazola iz *o*-fenilendiamina i 4-tiazolkarboksamida uz polifosfornu kiselinu (a) [7].

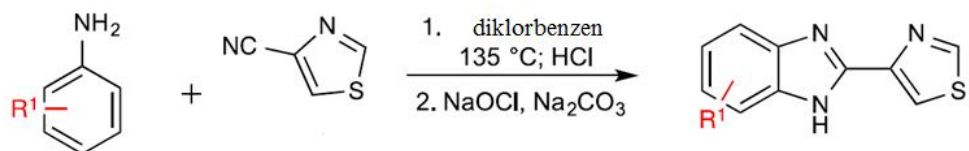
Iduću sintezu predložili su Grenda i suradnici [8]. Oni su predložili sintezu iz drugačijih polaznih spojeva, a to su N-arilamidini i natrijev hipoklorit. Osim tiabendazola, sintetizirali su i druge spojeve te dokazali kako se, uz natrijev hipoklorit i bazu, iz N-arilamidin hidroklorida mogu dobiti razni spojevi iz skupine benzimidazola. Za samu sintezu tiabendazola, pri sobnoj temperaturi i uz miješanje, otopini N-fenil-4-tiazolkarboksamidin hidroklorida i metanola, dodali su natrijev hipoklorit te je došlo do nastanka međuprodukta N-kloro-N'-fenil-4-tiazolkarboksamidina. Nakon refluksiranja i filtriranja te na kraju i pročišćavanja, dobiven je konačni produkt uz iskorištenje reakcije od 93 %. Koraci kemijske reakcije sinteze prikazani su na Slici 3. Osim ovog načina sinteze također su pokazali da se tiabendazol uz veće iskorištenje

reakcije, od čak 95 %, može sintetizirati i ako je međuprodukt nastao uz drugačije uvjete reakcije (adicijom hipoklorita na amidin hidroklorid u otopini vode i metilen-klorida).



Slika 3. Kemijska reakcija sinteze tiabendazola (IIIa) iz N-fenil-4-tiazolkarboksamidin hidroklorida (Ia) uz prisutnost NaOCl i baze [8].

Osim sinteze čistog tiabendazola, također su poznate i sinteze supstituiranih tiabendazola zbog njihove široke biološke aktivnosti. Patil i suradnici [9] predložili su niz jednostavnih sinteza za koje su koristili lako dostupne i jeftine polazne reagense. Njihove sinteze su temeljene na anilinu kao reaktantu. Osim anilina, sinteze su provodili i na anilinima s atomom klora u *orto*, *para* i *meta* položaju, koji reagiraju s 4-cijanotiazolom u dva koraka. Prvi korak se odvijao pri temperaturi od 135 °C uz diklorbenzen kao otapalo te u atmosferi suhog klorovodika. Pri tome su kao međuprodukti nastali odgovarajući amidin hidrokloridi. Zatim se drugi korak odvijao uz prisutnost natrijevog hipoklorita te natrijevog karbonata i dobiveni su supstituirani tiabendazoli kao konačni produkti uz iskorištenja reakcija između 40 % i 69 %.



Slika 4. Općenita kemijska reakcija sinteze tiabendazola iz anilina i 4-cijanotiazola [9].

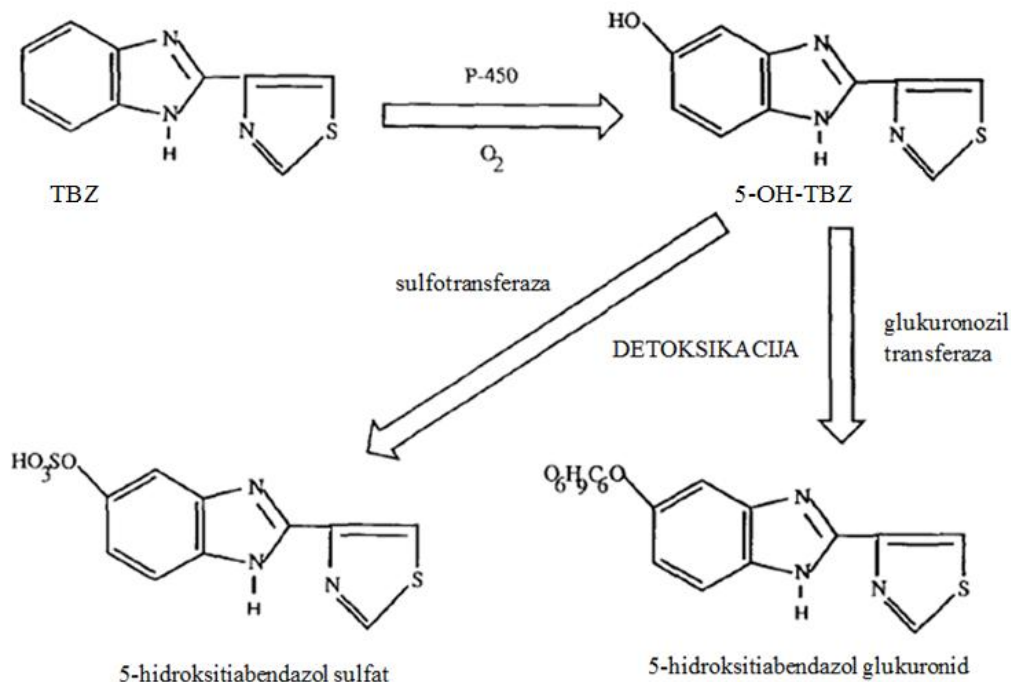
## 2.2. Antihelmintička svojstva tiabendazola

Tiabendazol je prvi puta spomenut kao izvrstan antihelmintik širokog spektra 1961. godine kada je njegova svojstva opisao Brown [6]. Helmiti su parazitski višestanični organizmi koji mogu biti unutarnju ili vanjski nametnici na čovjeku, životinjama ili biljkama. Njima pripadaju brojni parazitski oblici, kao što su metilji, trakavice, virnjaci, oblići, strunaši i kukaši [10]. Općenito, antihelmintici su lijekovi koji se koriste za uklanjanje helminta koji žive u ljudskom tijelu (najčešće u probavnom sustavu), domaćim i drugim životinjama ili biljkama. Oni uspješno djeluju jer uklanjaju neželjene parazite bez ostavljanja štetnih posljedica u organizmu domaćina. Antihelmintici se mogu podijeliti u tri skupine, ovisno o vrsti parazita na kojeg djeluju: nematocidi djeluju na oblice (nematode), trematocidi djeluju na metilje (trematode) i cestodicidi djeluju na trakavice (cestode) [11]. Osim tiabendazola, koji pripada skupini nematocida, Brown je analizirao i antihelmintička svojstva njegovih derivata, ali se čisti tiabendazol pokazao najuspješniji kod uklanjanja gastrointestinalnih parazita kod ovaca, koza, konja, pasa, peradi, stoke i svinja [6].

Mehanizam djelovanja tiabendazola kao antihelmintika nije u potpunosti razjašnjen, ali istraživanja pokazuju dva moguća načina. Prvi je inhibicija enzima fumarat reduktaze kojega je predstavio Prichard [12]. Inhibicijom fumarat reduktaze, specifičnog mitohondrijskog enzima helminta, tiabendazol inhibira ciklus limunske kiseline i mitohondrijsko disanje što dovodi do nemogućnosti stvaranja ATP-a, odnosno smrti parazita. Druga istraživanja pokazuju kako posjeduje antimitotička svojstva. Predloženo je da se tiabendazol veže na tubulin što uzrokuje inhibiciju nastanka mikrotubula, a to rezultira remećenjem procesa mitoze. Istraživanja su čak pokazala da je kod nekih vrsta parazita potrebna veća koncentracija lijeka kako bi se inhibirala fumarat reduktaza, nego što je potrebna za inhibiciju polimerizacije tubulina [13]. McKellar i Scott su, uzimajući u obzir oba načina djelovanja, napravili pregled istraživanja u kojima se navode i ostali mogući razlozi zašto je tiabendazol učinkovit u uklanjanju parazita. Neki od njih su inhibicija citoplazmatskog i mitohondrijskog enzima malat dehidrogenaze kod vrsta *A. suum*, *F. hepatica* i *M. expansa*, inhibicija fumarat reduktaze kod *H. contortus*, a osim uklanjanja odraslih parazita, tiabendazol je inhibirao i rast jajašaca čime se spriječila daljna infekcija domaćina [13].

Strongiloidoza je crijevna zaraza sisavaca i ptica uzrokovana oblicima iz roda *Strongyloides stercoralis*. Na svijetu je to cetvrta najcesca crijevna zaraza nematodama i prisutna je na cak pet kontinenata, ali najvise se javlja u vlaznim tropskim krajevima [14]. Iako je jedna od crijevnih zaraza koja je najmanje podložna terapiji antihelminthicima, može se liječiti ivermektinom, albendazolom i tiabendazolom, koji prevladava kao lijek bez obzira na neke toksične nuspojave. Istraživanja su pokazala da su nakon šest mjeseci liječenja tiabendazolom odrasli paraziti bili i dalje prisutni kod 7 % ispitanika, a jajašca kod 3 od ukupno 42 osobe [15]. U novijem istraživanju, Igual-Adell i suradnici [16] ispitivali su 88 osoba te uspoređivali učinkovitost tiabendazola i ivermektina. Od ukupnog broja ispitanika 35 % ljudi je primalo tiabendazol (25 mg/kg/12 h 3 dana za redom) i njih 25 (78 %) je bilo izliječeno, dok ih je 16 % imalo štetne nuspojave. U ovom radu je ivermektin pokazao bolju učinkovitost i manje slučajeva sa štetnim posljedicama.

Tiabendazol se brzo apsorbira kroz crijeva, ali se može apsorbirati i preko kože. Preporučena doza uzimanja ovisi o težini domaćina, dok ga djeca ispod 10 godina starosti ne bi trebala uzimati. Tiabendazol se najčešće metabolizira u jetri do 5-hidroksitiabendazola (5-OH-TBZ) prije nego se eliminira iz organizma u obliku glukuronida ili sulfatnog konjugata [17]. Na Slici 5. prikazani su mogući metaboliti tiabendazola. U zadnje vrijeme uporaba tiabendazola je postala ograničena zbog sve češćih slučajeva sa štetnim nuspojavama u usporedbi s drugim sličnim lijekovima, kao što su mebendazol ili ivermektin. Najučestalije nuspojave koje se javljaju su mučnina, vrtoglavica, glavobolja i pospanost, a kako bi se izbjegle ili smanjile gastrointestinalne smetnje, preporučuje se uzimati lijek poslije jela [18].



Slika 5. Metaboliti tiabendazola [17].

### 2.3. Antifungalna svojstva tiabendazola

Osim antihelmintičkih svojstava, istraživanja su pokazala da tiabendazol ima i antifungalna svojstva te ga je tvrtka Merck registrirala kao fungicid u SAD-u 1969. godine. Kao fungicid koristi se na raznom voću i povrću za uklanjanje plijesni, protiv štetočina, truljenja i protiv raznih vrsti gljivica. Može se primijeniti špricanjem, uranjanjem u otopinu ili se nanosi tijekom premazivanja voća i povrća voskom [19]. *In vitro* istraživanja pokazala su da je tiabendazol učinkovit protiv raznih vrsta saprofitskih i patogenih sojeva gljiva. Posebno je učinkovit protiv roda *Trichophyton* i *Microsporum* te inhibira rast kultura koje proizvode mikotoksine [20].

Allen i Gottlieb [21] prikazali su kako tiabendazol djeluje na razne stanične procese kao fungicid te ustanovili kako bi primarno mjesto djelovanja mogla biti inhibicija sustava prijenosa elektrona, a smanjenje ostalih metaboličkih funkcija su sekundarna mjesta djelovanja zbog nedovoljne količine potrebne energije. Istraživanje su provodili na *Penicillium atrovenetum* čiji

je rast tiabendazol inhibirao 45 % pri koncentraciji od 0.5 µg/mL, 90 % pri koncentraciji od 8.0 µg/mL te 100 % pri koncentraciji od 10 µg/mL. Osim na rast, tiabendazol je utjecao i na stanično disanje te stanični metabolizam, dok se utjecaj na sintezu proteina nije mogao utvrditi. Međutim, smatra se kako je zbog smanjenog rasta od čak 90 % pri koncentraciji od 8 µg/mL sinteza proteina, nukleinskih kiselina, lipida i ugljikohidrata vrlo niska. S druge strane, Davidse i Flach [22] prikazali su drugi način djelovanja tiabendazola kao fungicida te opisali njegova antimitotička svojstva. U svom istraživanju prikazali su kako tiabendazol pri koncentraciji od 80 µmol/L potpuno inhibira mitozu hifa *Aspergillus nidulans*, dok su DNK i RNK sinteza te rast micelija bili samo djelomično inhibirani pri istoj koncentraciji. Kod *Penicillium expansum* pokazali su kako tiabendazol kompetitivno inhibira [<sup>14</sup>C]karbendazim tako što se veže na tubulin i interferira prilikom nastanka mikrotubula.

## 2.4. Važnost određivanja tiabendazola

Osim prethodno navedenih svojstava, tiabendazol se koristi i kao površinski konzervans u SAD-u (ima oznaku E-233) kako bi se spriječio nastanak plijesni tijekom dugog skladištenja i transporta, dok u Europskoj uniji, Australiji i Novom Zelandu nije dopušten za korištenje kao aditiv u hrani [23]. Zbog njegovih raznih primjena, provedena su brojna istraživanja povezana s toksičnosti tiabendazola. Općenito, tiabendazol ima nisku akutnu toksičnost za ljude, međutim klasificiran je kao potencijalni kancerogen budući da pri višim dozama uzrokuje smetnje u ravnoteži hormona štitnjače. Rizik od pretjerane izloženosti tiabendazolu za ljude je vrlo nizak, te je za ptice i sisavce skoro netoksičan. Međutim, tiabendazol je izrazito toksičan za slatkovodne ribe i beskralježnjake koji žive u estuarijima [19]. Zbog toga, važno je određivati tiabendazol i njegove metabolite u tlu i vodi kako ne bi došlo do većeg zagađenja ili do štetnih učinaka na okoliš. Europska komisija je 2017. godine donijela odluku o produljenju odobrenja korištenja tiabendazola kao fungicida sve do 2032. godine, uz uvjet da države članice Europske unije zaštite podzemne vode i potrošače te da kontroliraju otpadne vode nakon posliježetvene uporabe zbog mogućih endokrinih učinaka tiabendazola [24]. U nastavku slijedi pregled analitičkih metoda kojima se tiabendazol učinkovito može odrediti u voću i povrću te uzorcima vode i tla.



### **3. METODE ODREĐIVANJA TIABENDAZOLA**

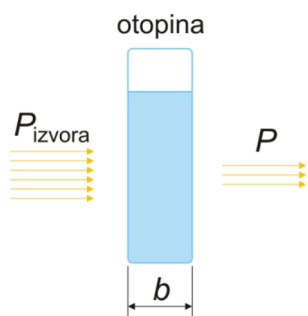
Općenito, metode kemijske analize dijele se na klasične i instrumentalne metode. Klasične metode kemijske analize temelje se na interakciji kemijske energije s uzorkom što dovodi do spontane kemijske reakcije, a analit se određuje izravno iz mase uzorka ili obujma standardne otopine ili plina. Neke od klasičnih metoda su titrimetrija, gravimetrija, destilacija, ekstrakcija, filtracija i dr. Instrumentalne metode kemijske analize su metode koje se temelje na interakciji energije i uzorka što dovodi do nastanka analitičkog signala kojeg instrumenti pretvaraju u signal koji se može izmjeriti. Instrumentalne metode su brze, osjetljive, reproducibilne, selektivne te ne zahtijevaju veliku količinu uzorka [25]. Za određivanje tiabendazola većinom se koriste instrumentalne metode. Najčešće metode određivanja tiabendazola mogu se svrstati u četiri skupine: spektroskopske, kromatografske, elektroanalitičke te biološke i imunokemijske metode.

#### **3.1. SPEKTROSKOPSKE METODE**

Spektroskopija je znanstvena grana analitičke kemije koja se bavi proučavanjem elektromagnetskog zračenja, odnosno proučavanjem spektara nastalih interakcijom elektromagnetskog zračenja i tvari u uzorku. Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja se prenosi kroz prostor najvećom mogućom brzinom. Njegova svojstva su dvojna i mogu se opisati valnim modelom (pri širenju kroz prostor) jer sadrži parametre kao što su valna duljina, frekvencija, amplituda i brzina te čestičnom teorijom (pri interakciji s tvari) gdje se elektromagnetsko zračenje promatra kao čestica energije, odnosno foton. Interakcija zračenja i tvari dovodi do prijelaza atoma ili molekula između energijskih stanja što rezultira trima glavnim procesima: apsorpcijom, emisijom i fluorescencijom [26, 27].

### 3.1.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija

Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija je kvantitativna analitička tehnika koja proučava apsorpciju bliskog ultraljubičastog zračenja valne duljine 180-390 nm i/ili vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja valne duljine 390-780 nm. Dio elektromagnetskog spektra koji obuhvaća područje tih valnih duljina ima energiju dovoljnu za elektronske prijelaze između energijskih stanja [28]. Apsorpcija je proces u kojem tvar prisutna u propusnoj sredini selektivno smanjuje intenzitet određene frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prilikom apsorpcije tvar prima dovoljnu količinu energije u obliku fotona i dolazi do elektronskog prijelaza iz osnovnog stanja (stanja najniže energije) do pobuđenog stanja (više energetske stanje). Ubrzo nakon toga, dolazi do relaksacije, odnosno do povratka elektrona u niže energijsko stanje pri čemu se višak energije rasipa u okolinu u obliku topline ili uzrokuje vibraciju tvari koje okružuju pobuđenu česticu [27].



Slika 6. Prikaz apsorpcije zračenja i smanjenja intenziteta zračenja [29].

Na Slici 6. prikazan je snop zračenja prije i poslije prolaska kroz uzorak. Zbog interakcije zračenja izvora ( $P_0$ ) i čestica u uzorku koje apsorbiraju dolazi do smanjenja intenziteta zračenja ( $P$ ). Transmitancija,  $T$ , je udio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu, najčešće se izražava u postocima, a definira se kao:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1).$$

Osim transmitancije, također se može definirati i apsorbanacija,  $A$ . Ona je mjera količine apsorbiranog zračenja i povećava se smanjenjem intenziteta zračenja te se izražava kao:

$$A = -\log T = \log \frac{P}{P_0} \quad (2).$$

Poveznicu između apsorbanacije i koncentracije uzorka, koja se određuje ovom metodom, čini Beer-Lambertov zakon, koji glasi:

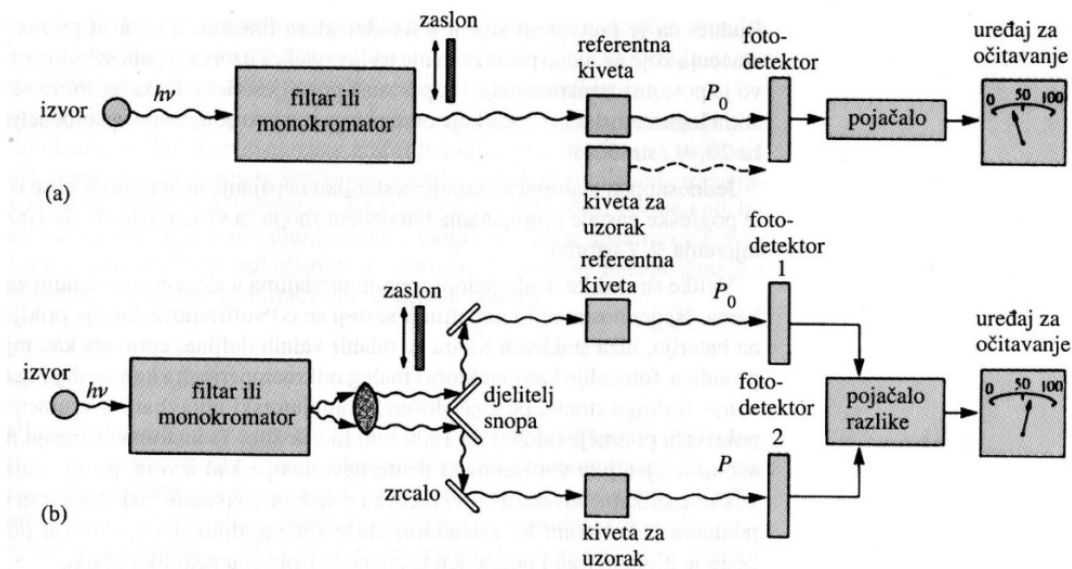
$$A = \epsilon bc \quad (3)$$

gdje je  $A$  oznaka za apsorbanaciju koja se mjeri instrumentima i nema mjernu jedinicu,  $\epsilon$  je konstanta proporcionalnosti odnosno molarni apsorpcijski koeficijent koji se izražava u  $\text{dm}^3 \text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ,  $b$  je duljina puta zračenja kroz uzorak odnosno debljina kivete, a  $c$  je koncentracija uzorka koja se određuje [27].

Osnovni instrument koji se koristi pri određivanju zove se spektrometar. Spektrometar se sastoji od izvora zračenja, selektora valnih duljina, prostora za uzorak, detektora i uređaja za očitavanje signala. Apсорpcijska spektroskopija zahtijeva da izvor zračenja bude odvojen od spremnika uzorka. Najčešće korišteni izvori zračenja za ultraljubičasto područje su vodikova ili deuterijeva žarulja, dok su za vidljivo područje najčešće korištene žarulja s volframovom niti ili kvarcna volfram/halogen žarulja. Selektori valnih duljina služe kako bi se iz polikromatskog zračenja izdvojila određena valna duljina pri kojoj se vrši mjerenje. Mogu se podijeliti u dvije skupine: monokromatori i optički filtri. Monokromatori se sastoje od pukotina, leća, zrcala, prozora i disperznog sredstva, a najčešći su prizma i difrakcijska rešetka. Optički filtri se dijele na apсорpcijske i interferencijske. Uzorci se nalaze u kivetama koje su kvarcne (za mjerenje u bliskom ultraljubičastom području), odnosno staklene ili plastične (za mjerenje u vidljivom području). Detektori koji se koriste u ovom mjernom području su fotocijev, fotomultiplikator, silicijska fotodioda i fotonaponski članak. Zadnji dio mjernog instrumenta čine procesor signala i uređaj za očitavanje signala koji su u izravnoj vezi s analitičarom jer mu daju razumljive mjerne podatke [26, 27].

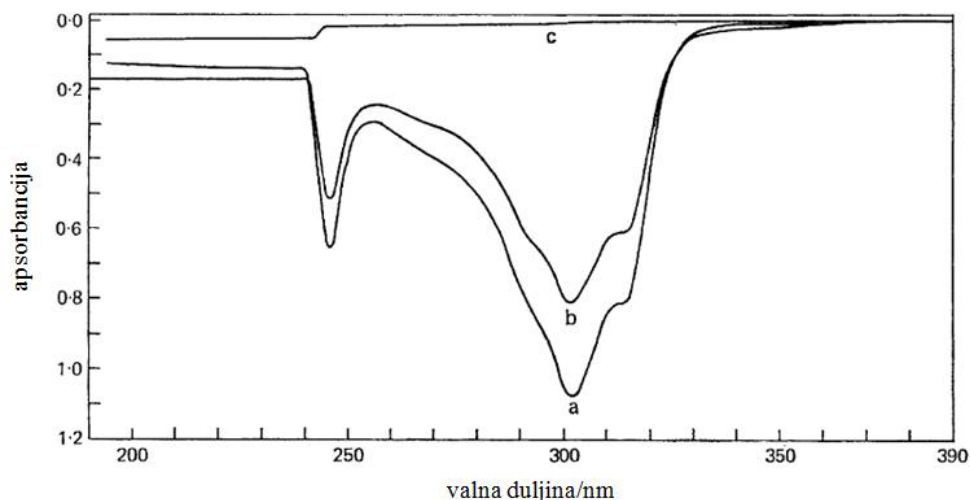
Dvije su najčešće vrste spektrometara: jednosnopni i dvosnopni. Na Slici 7. shematski su prikazani jednosnopni i dvosnopni spektrometar. Glavna razlika između ta dva spektrometra je što se zračenje u dvosnopnom spektrometru dijeli na dva snopa pomoću zrcala u obliku slova V i

omogućava prolazak zračenja istovremeno kroz referentnu kivetu i kivetu s uzorkom čija koncentracija se određuje [26, 27].



Slika 7. Shematski prikaz jednosnognog spektrometra (a) i dvosnognog spektrometra (b) [27].

Rajzman [30] je prikazala istraživanje o određivanju tiabendazola u citrusima ultraljubičastom spektroskopijom. Točnije, uzorci su bili kore i/ili pulpa citrusnog voća (limun, grejp i Shamouti naranča) iz kojih je tiabendazol ekstrahiran kloroformom i odredivan mjerenjem apsorpcije pri 302 i 303 nm. Kao rezultat dobiven je spektar prikazan na Slici 8. Ovom metodom tiabendazol je određen u koncentracijama od 0,10 ppm u 100 g kore ili pulpe voća te 0,03 ppm u cijelom voću. Također su određivali točnost metodom standardnog dodatka pri čemu je iskorištenje bilo u rasponu od 94,1 % do 103 % ovisno o uzorku voća.



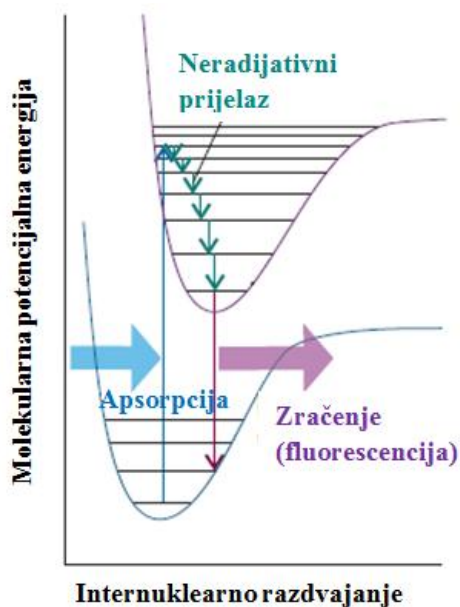
Slika 8. Ultraljubičasti spektar snimljen u kivetama sa svjetlosnim putem od 10 mm: a) tiabendazola u otopini kloroforma; b) uzorka voća tretiranog tiabendazolom; c) uzorka voća netretiranog tiabendazolom [30].

### 3.1.2. Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija je analitička metoda koja se temelji na mjerenju fluorescencije. Kada se atom ili molekula pobude i prijeđu iz osnovnog energijskog stanja u pobuđeno energijsko stanje (stanje više energije), postoji nekoliko načina kojima se oni mogu vratiti natrag u osnovno stanje. Jedan od načina je da se višak energije emitira kao foton. Češći način je neradijativni prijelaz u kojem se višak energije prenosi na tvari koje okružuju pobuđeni atom ili molekulu što rezultira njihovom vibracijom, rotacijom ili translacijom.

Kod fluorescencije dolazi do spontane emisije zračenja unutar nekoliko nanosekundi nakon prestanka pobuđivanja, a koraci koji dovode do njene pojave prikazani su na Slici 9. Nakon početne pobude i prijelaza tvari iz osnovnog u pobuđeno energijsko stanje, dolazi do sudara između susjednih čestica te jedan dio energije neradijativno prelazi na molekule koje se nalaze u okruženju, a molekula se spušta u najniže vibracijsko stanje. Međutim, susjedne molekule ne mogu uvijek primiti svu energiju pa se višak energije može spontano emitirati sve dok se tvar ne vrati u osnovno stanje, odnosno u stanje najniže energije. Upravo zbog toga što se

fluorescencija odvija nakon što je dio energije prešao na susjedne molekule, ona se javlja pri višim valnim duljinama odnosno pri nižim frekvencijama od izvora zračenja [31].



Slika 9. Koraci koji vode do fluorescencije [31].

Osnovni dijelovi spektrofluorimetara, instrumenata za mjerenje fluorescencije, istovjetni su dijelovima spektrometara za ultraljubičastu i vidljivu spektroskopiju te su najčešće dvosnopni. Fluorescencijske metode su od 10 do 1000 puta više osjetljive nego apsorpcijske metode budući da se njihova osjetljivost može povećati pojačanjem detektorskog signala ili pojačanjem pobudnog snopa zračenja. Iako je fluorescencija jedan od načina povratka tvari iz pobuđenog u osnovno stanje, mogućnost fluoresciranja ovisi o strukturi molekule. Najintenzivnije fluorescencijske emisije imaju aromatski spojevi pa se oni najčešće analiziraju metodom fluorescentne spektrometrije ili spektrofluorimetrije [27], a tiabendazol je jedan od njih jer u svojoj strukturi sadrži benzenski, imidazolni i tiazolni prsten.

Mnogi autori opisali su primjenu spektrofluorimetrije pri određivanju tiabendazola. Capitán i suradnici [32], prikazali su emisijski spektar tiabendazola i utvrdili da ima maksimum emisije pri 350 nm, a maksimum apsorpcije pri 303 nm. Uzorak je pripremljen tako što su u 500

mL vode, koja sadrži tiabendazol (od 1,0 ng/mL do 10 ng/mL), dodani acetatni pufer (pH 4,70) i Sephadex G-15 gel. U rezultatima su naveli nekoliko promatranih parametara metode te kako se oni mijenjaju ovisno o volumenu uzorka, što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Analitički parametri za određivanje tiabendazola spektrofluorimetrijom [32].

Parametar	Volumen uzorka (mL)			
	50	100	200	500
Raspon linearnosti (ng/mL)	2,0 – 120,0	2,0 – 100,0	1,5 – 60,0	1,5 – 10,0
Granica detekcije (ng/mL)	1,3	0,6	0,3	0,1
Koeficijent korelacije ( $R^2$ )	0,9961	0,9996	0,9980	0,9979
Granica kvantifikacije (ng/mL)	3,8	2,0	1,0	0,4
RSD (%)	1,3	1,4	1,4	1,4
Osjetljivost (ng/mL)	0,4	0,2	0,1	0,04

Ovisnost intenziteta fluorescencije i koncentracije tiabendazola ima najveći raspon linearnosti u uzorku od 50 mL, a povećanjem volumena taj raspon se smanjuje. Granica detekcije, granica kvantifikacije, ali i osjetljivost metode, smanjuju se povećanjem volumena uzorka, dok je relativna standardna devijacija (RSD) ista u svim mjerenjima. Uzorci vode iz slavine, sirove, morske, mineralne i otpadne vode, koje su uzorkovali na području Španjolske, filtrirani su kroz filter papir s porama veličine 0,45  $\mu\text{m}$  i spremljeni u polietilenske boce pažljivo očišćene s dušičnom kiselinom. Zatim su ti uzorci bili pripremljeni na isti način kao i standardne otopine uz dodatak 0,01 mol/L dinatrijeva etilendiamintetraacetata ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) zbog uklanjanja interferenata (iona  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ ). Određivanjem tiabendazola ovom metodom, prikazali su da nijedan uzorak nije sadržavao visoke koncentracije tiabendazola, što znači da nije došlo do onečišćenja. Metodom standardnog dodatka određivala se i točnost te su iskorištenja bila u rasponu od 98,6 % do 101 % [32].

Rodríguez-Cuesta i suradnici [33] su osim tiabendazola određivali još i karbendazim te fuberidazol, ali i pesticide u kojima je moguća prisutnost ovih spojeva. Za određivanje je pripremljeno 12 smjesa pesticida te tri uzorka čistih pesticida (tiabendazol, karbendazim i fuberidazol) otapanjem u metanolu. U uzorcima pesticida, tiabendazol je bio prisutan u 11 od 12 uzoraka, a koncentracija je bila u rasponu od 15 ng/mL do 40 ng/mL. Granica detekcije tiabendazola iznosila je 4,7 ng/mL, uz preciznost metode od 2 % i koeficijent korelacije od 0,9990.

García-Reyes i suradnici [34] određivali su tiabendazol u ostatcima citrusnog voća, točnije u uzorcima limuna i naranče. Tiabendazol je iz uzoraka voća izdvojen ekstrakcijom tekuće-tekuće s acetonitrilom te je uzorak zatim bio pročišćen korištenjem smjese primarnih i sekundarnih amina. Nakon mjerenja fluorescentnog signala, rezultati su pokazali da fluorescencijski signal pokazuje linearnost u ovisnosti o koncentraciji u rasponu od 0,3 mg/kg do 10 mg/kg, granicu detekcije od 0,09 mg/kg, granicu kvantifikacije od 0,3 mg/kg te vrijednost relativne standardne devijacije manju od 2 % za obje vrste uzoraka. Osim toga, metodom standardnog dodatka određivala se i točnost metode. U uzorcima limuna iskorištenja su bila u rasponu od 87,1 % do 97,8 %, a u uzorcima naranče od 91,8 % do 108,9 %.

Huang i suradnici [35] su u svom istraživanju kompleksirali molekulu tiabendazola s kukurbit[6]urilom (Q[6]), kukurbit[7]urilom (Q[7]) i simetričnim tetrametil-kukurbit[6]urilom (TMeQ[6]) u vodenim otopinama kako bi poboljšali fluorescenciju. Mjerenja standardnih otopina tiabendazola za kalibraciju, ali i mjerenja realnih uzoraka mineralne, riječne vode i vode iz slavine vršena su pri pH 6,5 i temperaturi od 25 °C. Fluorescencijski intenzitet je pokazivao linearnost u ovisnosti o koncentraciji u rasponu od  $6,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L do  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L, a kalibracijska krivulja imala je dobar koeficijent korelacije 0,9998. Granice detekcije za Q[6]-TBZ, Q[7]-TBZ i TMeQ[6]-TBZ su redom iznosile  $7,13 \pm 0,02 \cdot 10^{-9}$  mol/L,  $5,51 \pm 0,01 \cdot 10^{-9}$  mol/L i  $8,85 \pm 0,02 \cdot 10^{-9}$  mol/L. Točnost se određivala metodom standardnog dodatka pri čemu su iskorištenja bila u rasponu od 91,87 % do 103,61 %. Interferencije između iona su bile vrlo male pa su autori predložili ovu metodu za praćenje koncentracije tiabendazola u okolišu, a osim dobrih analitičkih parametara, kao prednosti ove metode naveli su kako se tijekom pripreme uzoraka ne koriste štetna organska otapala niti dugotrajni procesi ekstrakcije.



Dosad navedena istraživanja o primjeni spektrofluorimetrije prikazivala su određivanje tiabendazola u uzorcima voća i vode, pa su zato Llorent-Martínez i suradnici [36] predložili korištenje automatizirane sekvencijske injekcijske analize (engl. *sequential injection analysis*, SIA) s fluorescencijskom detekcijom kao metode za određivanje tiabendazola u gljivama. Istraživanje je provedeno na šest različitih vrsta gljiva, svježih ili konzerviranih, iz kojih je tiabendazol ekstrahiran s acetonitriplom ekstrakcijom u čvrstoj fazi te pročišćen smjesom primarnog i sekundarnog amina. Za ovu metodu rezultati su bili sljedeći: za uzorak volumena 500  $\mu\text{L}$  linearnost je bila u rasponu od 1,6 mg/kg do 40 mg/kg, koeficijent korelacije je bio 0,9992, granica detekcije je iznosila 0,5 mg/kg, a granica kvantifikacije 1,6 mg/kg. Ovim istraživanjem autori su potvrdili kako je metoda učinkovita i korisna te da može biti dobra zamjena kromatografskim tehnikama. Točnost metode određivali su metodom standardnog dodatka tako što su uzorcima gljiva dodavali otopine tiabendazola različitih koncentracija i opet vršili mjerenja te pri tome dobili iskorištenja u rasponu od 93 % do 110 %. Također su potvrdili kako koncentracije tiabendazola u gljivama ne prelaze maksimalne dopuštene vrijednosti od 60 mg/kg.

S namjerom pojačanja intenziteta fluorescencije, Chen i suradnici [37] proučavali su tiabendazol kao kompleks s terbijem ( $\text{Tb}^{3+}$ ) gdje je  $\text{Tb}^{3+}$  bio centralni ion, a tiabendazol ligand. Prvenstveno su napravili senzor za određivanje terbija kojeg su testirali na uzorcima vode iz rijeke Minjiang (Fujian, Kina). Standardnu otopinu  $\text{Tb}^{3+}$  iona (0,1 mol/L) priredili su otapanjem  $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  u vodi, a standardnu otopinu tiabendazola (10,0  $\mu\text{mol/L}$ ) priredili su otapanjem tiabendazola u acetonitrilu. Zatim su mjerili fluorescencijski intenzitet smjese tih dviju otopina u različitim otapalima (dimetil sulfoksid, octena kiselina, metanol, PBS pufer, Tris-HCl pufer i acetonitril), od kojih se acetonitril pokazao najbolji jer je tada fluorescencijski intenzitet bio najjači. Također se pokazalo da se intenzitet fluorescencije povećava i povećanjem koncentracije  $\text{Tb}^{3+}$ , te da u ovisnosti o koncentraciji  $\text{Tb}^{3+}$  pokazuje linearnost u rasponu od  $5,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L do  $3,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Senzor su zatim primijenili na uzorke soka naranče kako bi odredili koncentraciju tiabendazola. U tom slučaju intenzitet fluorescencije je pokazao linearnost u ovisnosti o koncentraciji tiabendazola u rasponu od  $8,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L do  $4,0 \cdot 10^{-5}$  mol/L, uz koeficijent korelacije 0,9990. Prilikom određivanja točnosti metode iskorištenja su bila u rasponu od 101,1 % do 104,6 %. Predložena metoda je uspoređena s ICP-MS metodom te je vrijednost

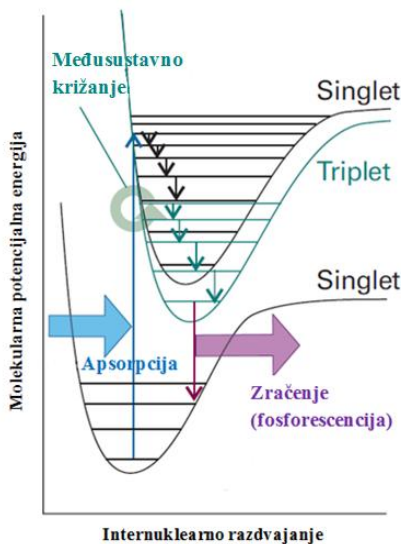
RSD iznosila 1,6-2,5 % čime se pokazala učinkovitom metodom za određivanje tiabendazola, ali i terbija u okolišu.

Ionske tekućine (engl. *ionic liquids*, IL) su spojevi koji se sastoje od velikih organskih kationa i aniona te se tale pri temperaturama nižim od 100 °C. One su dio nove generacije otapala, tzv. “zelenih” otapala, koji se sve više koriste u kemijskim procesima kao zamjena otrovnim, zapaljivim, hlapivim i nagrizajućim otapalima zbog očuvanja okoliša. Upravo su Kaur i suradnici [38] razvili senzor za određivanje tiabendazola, koji se temelji na vezanju nanoštapića (engl. *nanorods*) ZnO i tri vrste ionskih tekućina (IL 1/ZnO, IL 2/ZnO i IL 3/ZnO). Snimljeni su fluorescentni spektri svih triju ionskih tekućina, a zatim i spektri s dodatkom pet različitih lijekova, među kojima je bio i tiabendazol. Od svih ispitanih lijekova, jedino je tiabendazol uzrokovao povećanje intenziteta fluorescencije kod sve tri vrste ionskih tekućina. Senzor s IL 3/ZnO pokazao je najbolji linearni odnos fluorescentnog intenziteta u ovisnosti o koncentraciji tiabendazola i to u rasponu od 10 µmol/L do 80 µmol/L, a izračunato je kako senzor s IL 1/ZnO ima najbolju granicu detekcije tiabendazola od 12 nmol/L. Budući da je fluorescentni senzor za određivanje tiabendazola imao granicu detekcije u nanomolarnom rasponu, autori su zaključili kako se ovakva vrsta “zelenih” senzora treba i dalje razvijati te poboljšavati.

Osim ionskih tekućina, postoje brojni načini kako učiniti kemijske sinteze “zelenima” te tako pomoći u očuvanju i zaštiti okoliša. Tako su Kazemifard i suradnici [39] u svom radu opisali novu ekološki prihvatljivu metodu za razvijanje senzora za određivanje tiabendazola u soku jabuke, naranče i rajčice. Optički senzor koji su razvili sastojao se od ugljikovih nanokuglica (engl. *carbon dots*, CDs) sintetiziranih iz ružmarina koje su bile modificirane s molekulski tiskanim polimerima (engl. *molecularly imprinted polymers*, MIPs) kako bi se povećala selektivnost. Fluorescencijski intenzitet je pokazao linearnost u ovisnosti o koncentraciji tiabendazola u rasponu od 0,03 µg/mL do 1,73 µg/mL i granicu detekcije od 8,0 ng/mL. Pri analizi u realnim uzorcima linearnost je bila u rasponu koncentracija od 0,04 µg/mL do 1,7 µg/mL, a vrijednost RSD je bila u rasponu od 2,6-5,5 %.

### 3.1.3. Fosforimetrija

Fosforimetrija je analitička metoda koja se temelji na mjerenju fosforescencije. Fosforescencija je jedan oblik emisije zračenja, kao i fluorescencija, ali te dvije pojave se razlikuju po tome što fosforescencija duže traje jer dolazi do pohranjivanja energije koja se zatim polako otpušta. Na Slici 10. prikazani su koraci koji dovode do pojave fosforescencije kod molekula koje imaju singletno osnovno stanje. Nakon početne pobude molekule i apsorpcije zračenja, molekula prelazi is osnovnog u pobuđeno stanje. Prisutnost tripletnog pobuđenog stanja ima odlučujuću ulogu jer pri višim energijama, singletno i tripletno stanje imaju sličnu geometriju te zbog toga, dolazi do međusustavnog križanja (engl. *intersystem crossing*). Međusustavno križanje je neradijativni prijelaz između dva stanja različitog multipliciteta, a iste energije. Takav prijelaz može biti iz singletnog u tripletno stanje ili obrnuto. Kada pobuđena molekula prijeđe u tripletno stanje, ona nastavlja pohranjivati energiju u susjedne molekule koje ju okružuju, ali silaženjem u niža energijska stanja dolazi do najnižeg vibracijskog stanja koji prema energiji ne odgovara energiji singletnog stanja pa je neradijativni prijelaz zabranjen. Međutim, radijativni prijelaz nije zabranjen pa molekule emitiraju višak energije prilikom povratka u osnovno stanje dugo nakon početne pobude što se detektira kao fosforescencija [31].



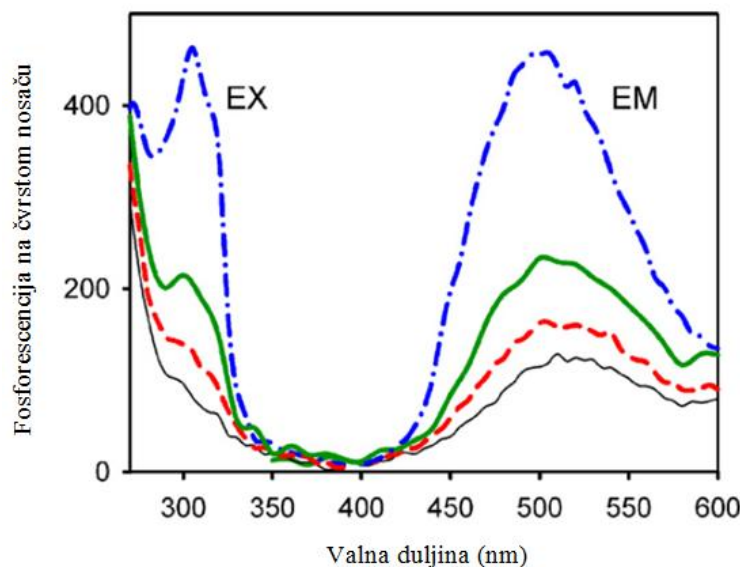
Slika 10. Koraci koji vode do fosforescencije kod molekule koja ima singletno osnovno stanje [31].

Nekoliko istraživanja pokazalo je da polarne ili ionske molekule imaju sposobnost fosforesciranja pri sobnoj temperaturi kada su adsorbirane na prikladne materijale kao što su silicij, aluminij ili celuloza. Takav fenomen je dobio službeni naziv fosforescencija pri sobnoj temperaturi (engl. *room temperature phosphorescence*, r.t.p.), odnosno kao analitička tehnika fosforimetrija pri sobnoj temperaturi te se odnosi isključivo na mjerenje fosforescencije organskih molekula adsorbiranih na čvrste nosače [40]. Parker je sa svojim suradnicima [41] ispitao tu metodu na velikom broju spojeva te opisao njene parametre. Priprema uzorka je jednostavan postupak u kojem se otopina sa željenim analitom nanosi na čvrsti nosač, kao kod tankoslojne kromatografije, uzorak se suši i zatim se vrši mjerenje spektrofosforimetrom. Prednosti fosforimetrije pri sobnoj temperaturi su brojne. Visoka selektivnost odlikuje ovu metodu jer mali broj spojeva pokazuje potencijal za ovu vrstu luminiscencije. Osim toga, metoda je vrlo precizna i osjetljiva jer se kvantitativna analiza vrši pri nanogramskim količinama, ima dobar raspon linearnosti te zahtijeva malu količinu uzorka u rasponu volumena od 3  $\mu\text{L}$  do 5  $\mu\text{L}$ .

Correa i Escandar [42] su predstavili fosforescenciju pri sobnoj temperaturi kao metodu za određivanje tiabendazola. Čvrsti nosač je bio načinjen od sintetičke tkanine (najlona) koja je inducirala fosforescenciju tiabendazola, a intenzitet je bio pojačan dodatkom soli teških metala, od kojih se olovov (II) acetat pokazao najučinkovitijim. Granica detekcije za tiabendazol odgovara preporukama IUPAC-a, te iznosi 0,010  $\mu\text{g/mL}$ . Metoda je pokazala linearnost u rasponu od granice kvantifikacije, koja je iznosila 0,031  $\mu\text{g/mL}$ , pa sve do koncentracije od 0,26  $\mu\text{g/mL}$ . Osim u čistim uzorcima, metodu su ispitali na realnim uzorcima riječne, mineralne vode i vode iz slavine na području Argentine (rijeka Paraná, gradovi Rosario i Mendoza). Međutim, realni uzorci su sadržavali premalu koncentraciju tiabendazola, ispod granice detekcije, pa su uzorcima dodali tiabendazol i odredili iskorištenja koja su bila u rasponu od 93 % do 118 %.

U drugom istraživanju, Piccirilli i Escandar [43] također su koristili metodu fosforimetrije pri sobnoj temperaturi za određivanje tiabendazola, ali u kombinaciji s protočnim optosenzorom. I u ovom istraživanju, čvrsti nosač za tiabendazol bio je najlon, a fosforescencija je bila pojačana dodatkom kalijevog jodida (KI) i natrijevog sulfita ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), što se vidi na Slici 11. Na oglednom uzorku od 2000  $\mu\text{L}$ , metoda je pokazivala linearnost u rasponu koncentracija od 12,9  $\text{ng/mL}$  do 110  $\text{ng/mL}$ , granicu detekcije od 4,5  $\text{ng/mL}$ , granicu kvantifikacije od 12,9  $\text{ng/mL}$  i vrijednost RSD od 3,2 %. Koeficijent korelacije iznosio je 0,9985. Realni uzorci

mineralne, podzemne, riječne vode i vode iz slavine nisu sadržavali tiabendazol pa se provela metoda standardnog dodatka kojom su dobivena odlična iskorištenja (97 – 110 %).

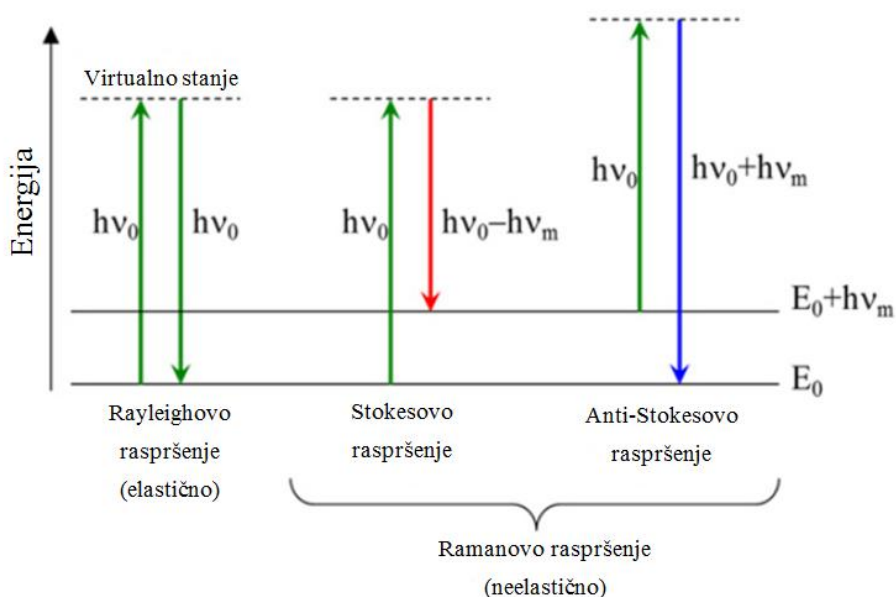


Slika 11. Ekscitacijski (EX) i emisijski (EM) spektar fosforescencije tiabendazola imobiliziranog na najlonu (crvena isprekidana linija), u prisutnosti KI (zeleno) te u prisutnosti KI i Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (crna linija su pozadinski signali) [43].

### 3.1.4. Ramanova spektroskopija

U fizici, raspršenje svjetlosti znači promjenu kretanja čestica kada naiđu na zapreku. Jedan dio upadnog snopa svjetlosti se zaustavi ili se apsorbira, a drugi dio se nastavi kretati u istom ili promijenjenom smjeru. Na Slici 12. prikazan je dio Jablonskog dijagrama koji opisuje na koje se načine svjetlost može raspršiti. Kada se molekula pobudi izvorom zračenja i prijeđe iz osnovnog u pobuđeno stanje, postoje tri moguća ishoda. Prvi način je elastično raspršenje pod nazivom Rayleighovo raspršenje. Ono nastaje kada se elektromagnetski val sudari s česticama manjim od valne duljine vala te se molekula vraća u osnovno stanje emitirajući fotone iste energije kao prvotno zračenje. Druga dva načina su neelastično raspršenje te pripadaju Ramanovom raspršenju. Ako se molekula vraća u osnovno stanje emitirajući fotone manje

energije od prvotnog zračenja dolazi do pomaka prema većim valnim duljinama, tzv. Stokesovog pomaka. Kao zadnji na Slici 12., prikazan je anti-Stokesov pomak. Ako se molekula već nalazi u pobuđenom stanju te se ekscitira do stanja više energije, kada se vraća natrag u osnovno stanje otpušta fotone s višom energijom nego što je to bilo tijekom prvotnog pobuđivanja pa dolazi do pomaka prema manjim valnim duljinama. Treći način je najmanje vjerojatan jer se većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom energijskom stanju i tada su najstabilnije [44].



Slika 12. Jablonski dijagram energijskih prijelaza za Rayleighovo i Ramanovo raspršenje [44].

Ramanova spektroskopija je analitička metoda koja se bavi promatranjem neelastičnog raspršenja svjetlosti te proučava vibracijska stanja molekule čime pripada skupini metoda vibracijske spektroskopije. U usporedbi s drugim tehnikama, kao što su FTIR (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*) i NIR (engl. *near-infrared spectroscopy*), prednost Ramanove spektroskopije je u tome što ona promatra raspršeno, a ne apsorbirano zračenje te zbog toga zahtijeva kratku ili nikakvu pripremu uzorka, što znači da se uzorak može nalaziti u bilo kojem agregacijskom stanju. Također, molekule koje se promatraju ne trebaju imati trajni dipolni

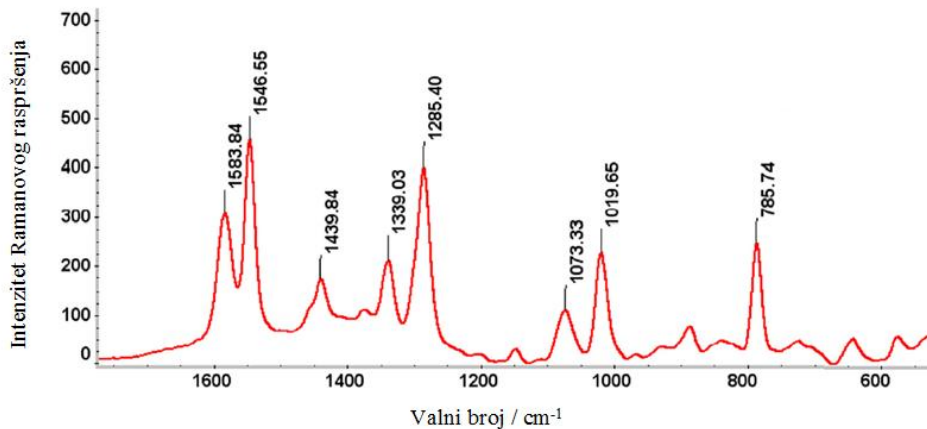
moment i voda se može koristiti kao otapalo jer ova metoda nije osjetljiva na apsorpcijske vrpce vode [44].

Postoji nekoliko vrsta Ramanove spektroskopije, ali metoda koja se najčešće koristi pri određivanju tiabendazola je spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS). Kao što joj samo ime kaže, SERS spektroskopija je površinski osjetljiva tehnika koja se zasniva na pojačanju Ramanovog raspršenja od strane molekula adsorbiranih na grube metalne površine. Pojačanje može biti elektromagnetskim ili kemijskim mehanizmom. Dominantni mehanizam je elektromagnetski koji teoretski može doseći faktore pojačanja od  $10^{10}$  do  $10^{11}$ . Elektromagnetski mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja zasniva se na rezonanciji titranja valentnih elektrona metalnih nanočestica, najčešće zlata i srebra, s frekvencijom pobudnog zračenja čime nastaju lokalizirani površinski plazmoni koji pojačavaju elektromagnetsko polje u blizini površine materijala te tako pojačavaju i sami intenzitet Ramanovog raspršenja. Drugo pojačanje promatranog raspršenja je kemijsko, a zasniva se na mehanizmu prijenosa naboja u kojem se analit mora vezati za metalni supstrat. Kada pobudno zračenje reagira s metalom, nastaje par elektron-šupljina iz kojega elektron prelazi u molekulu analita, a nakon pobude prelazi natrag u metal pri čemu se zračenje raspršuje [45, 46].

Müller i suradnici [47] prvo su karakterizirali vibracijski spektar tiabendazola koristeći SERS tehniku sa srebrovim nanočesticama, a zatim proveli istraživanje u kojem su određivali tiabendazol prijenosnim mini-Raman spektrometrom na voću s rumunjske tržnice. Spektar tiabendazola dobiven SERS tehnikom pokazuje povećanje intenziteta signala u usporedbi sa spektrom običnog Ramanovog raspršenja za tiabendazol u vodenoj otopini pri pH 7. Voće (naranča, limun, banana, grejp i bio limun) je slučajnim odabirom kupljeno na tržnici i oprano vodom iz slavine. Uzorak je pripremljen tako što je komadić kore uronjen u 100 mL destilirane vode tijekom 24 h, a zatim je uzet alikvot od 10  $\mu$ L za mjerenje. Već nakon 8 sekundi mjerenja, dobiveni su rezultati, odnosno u tako kratkom vremenu tiabendazol je bio određen. SERS spektar uzroka snimljen je u rasponu valnih brojeva od  $200\text{ cm}^{-1}$  do  $3400\text{ cm}^{-1}$ , s time da je osjetljivost prijenosne opreme bila najbolja u rasponu valnih brojeva od  $400\text{ cm}^{-1}$  do  $2000\text{ cm}^{-1}$ . Ako se određuje u vodenoj otopini, granica detekcije za tiabendazol iznosi  $1,96 \cdot 10^{-11}$  mol/L. Ako se tiabendazol otopi u etanolu, granica detekcije može biti niža i do tri reda veličine. Rezultati su

pokazali da svi uzorci voća, osim banana, sadrže 13 puta višu koncentraciju tiabendazola od dopuštene vrijednosti.

Također, koristeći srebrove nanočestice za pojačanje Ramanovog raspršenja, odnosno SERS metodu, He i suradnici [48] određivali su tiabendazol na površini jabuka. U istraživanju su prikazali SERS spektar tiabendazola u metanolu (Slika 13.) na kojem je vidljiv „otisak prsta“ molekule tiabendazola, ali i tri najviša pika koji odgovaraju rastezanju C=N veze (pri  $1547\text{ cm}^{-1}$ ), rastezanju prstena ( $1285\text{ cm}^{-1}$ ) i savijanju C-H veze ( $785\text{ cm}^{-1}$ ). Odredili su da je granica detekcije ove metode  $0,01\text{ }\mu\text{g/mL}$ , što ju čini dovoljno osjetljivom za određivanje maksimalno dopuštenih koncentracija tiabendazola za jabuke ( $5\text{ }\mu\text{g/g}$ ). Koeficijent korelacije iznosio je  $0,977$ . Točnost metode određivana je metodom standardnog dodatka čime su dobivena iskorištenja od  $89,2\%$  do  $115,4\%$ . Vremensko trajanje ove metode, uključujući pripremu uzorka i detekciju, bilo je 10 minuta što čini ovu metodu brzom i jednostavnom te joj daje mogućnost za uporabu na samom mjestu uzorkovanja.



Slika 13. SERS spektar  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  tiabendazola u metanolu [48].

Feng i suradnici [49] sintetizirali su molekularni tiskane polimere sa selektivnim afinitetom za tiabendazol te ih koristili kao sorbens za ekstrakciju čvrstom fazom kako bi izdvojili tiabendazol iz uzoraka soka naranče. Zatim su dodali srebrove koloidne nanočestice za SERS analizu i pokazali kako takav sustav tvori jedinstveni kemosenzor za brzo i osjetljivo



određivanje tiabendazola u soku naranče. Granica detekcije iznosila je 4 ppm, što je ispod maksimalno dopuštenih vrijednosti, a granica kvantifikacije iznosila je 13 ppm. Metodom standardnog dodatka određivali su točnost metode i dobili iskorištenja od 87,25 % do 108,81 %.

Još jedan primjer primjene ove metode sa srebrovim koloidnim nanočesticama prikazali su Oliveira i suradnici [50] u svom istraživanju. Rezultati su pokazali kako se smanjenjem koncentracije tiabendazola u uzorku smanjuje i SERS intenzitet. Snimanje spektara se vršilo u rasponu valnih brojeva od  $150\text{ cm}^{-1}$  do  $1800\text{ cm}^{-1}$ , što odgovara koncentraciji tiabendazola od  $8,0 \cdot 10^{-8}\text{ mol/L}$  do  $1,6 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$ , međutim metoda je pokazala linearnost samo u rasponu koncentracija tiabendazola od  $8,0 \cdot 10^{-8}\text{ mol/L}$  do  $1,6 \cdot 10^{-7}\text{ mol/L}$ . Određena je i granica detekcije od 13,8 ppb, koja je ispod maksimalne dopuštene vrijednosti od strane brazilske regulatorne agencije ANVISA (10 ppm za citruse).

Sljedećih nekoliko istraživanja također prikazuju primjenu SERS tehnike za određivanje tiabendazola, ali se u ovim istraživanjima koriste zlatne nanočestice umjesto srebrovih. Luo i suradnici [51] koristili su SERS metodu sa zlatnim nanočesticama za određivanje fosmeta i tiabendazola u jabukama. Rezultati su pokazali kako je najbolji SERS intenzitet tiabendazol pokazivao pri veličini nanočestica od 102 nm. Mjerenje SERS spektra vršilo se pri rasponu valnih brojeva od  $550\text{ cm}^{-1}$  do  $2000\text{ cm}^{-1}$ . Najistaknutiji pik molekule tiabendazola vidi se pri  $1557\text{ cm}^{-1}$  na običnom Raman spektru, što odgovara rastezanju C-C i N=C veza na drugom prstenu, rastezanju C=C i C-C veza na trećem prstenu i savijanju C-H i C-N-H veza na drugom prstenu. Na SERS spektru taj pik se pojačava na  $1593\text{ cm}^{-1}$  i prema tim spektralnim karakteristikama, tiabendazol se mogao vizualno odrediti već pri koncentraciji od  $0,02\text{ }\mu\text{g/mL}$ , a i koeficijent korelacije je pri tom piku bio najbolji i iznosio je 0,996. Stvarna granica detekcije za tiabendazol u uzorcima jabuka iznosila je  $0,1\text{ }\mu\text{g/g}$ , što je pokazalo da je metoda manje osjetljiva u realnim uzorcima zbog potencijalnih interferenata.

Alsammarraie i suradnici [52] određivali su tiabendazol u soku limuna, mrkve i manga, također SERS metodom uz zlatne nanočestice. Intenzitet pikova na spektru tiabendazola pojačavao se povećanjem koncentracije tiabendazola u rasponu od  $0\text{ }\mu\text{g/L}$  do  $1000\text{ }\mu\text{g/L}$  za sve uzorke. Granice detekcije su iznosile  $149\text{ }\mu\text{g/L}$  za limun,  $216\text{ }\mu\text{g/L}$  za mrkvu i  $179\text{ }\mu\text{g/L}$  za mango. U realnim uzorcima sva tri uzorka soka, koncentracija tiabendazola bila je  $50\text{ }\mu\text{g/L}$ , što je ispod maksimalno dopuštene koncentracije od  $10\text{ mg/L}$ . Korelacijski koeficijenti su za uzorke

soka limuna, soka mrkve i soka manga iznosili redom 0,99, 0,98 i 0,99. Također su određivali i točnost ove metode dodatkom tiabendazola u sok limuna, mrkve i manga te u aceton (čisti pesticid) pri čemu su dobili iskorištenja kako slijedi: 96 – 98 %, 97 – 99 %, 96 % i 98 – 99 %.

Tiabendazol u jabukama su SERS metodom određivali Fu i suradnici [53]. Za pojačavanje Ramanovog raspršenja koristili su zlatne nanocjevčice. Rezultati su pokazali logaritamsku korelaciju između koncentracije tiabendazola i intenziteta Ramanovog raspršenja. U uzorcima tiabendazola koji je bio otopljen u metanolu, koeficijent korelacije ( $R^2$ ) iznosio je 0,991, a granica detekcije bila je 0,037 mg/L. U realnim uzorcima jabuke koeficijent korelacije iznosio je 0,980 te je granica detekcije bila 0,06 ppm. Točnost metode je određena metodom standardnog dodatka pri  $1593\text{ cm}^{-1}$ , a iskorištenja su bila u rasponu od 76 % do 106 %. Osim određivanja tiabendazola, autori su u radu također pokazali kako se zlatne nanocjevčice mogu nakon mjerenja očistiti plazmom pri niskoj temperaturi tijekom 1 minute te ponovno iskoristiti za nova mjerenja.

Teixeira i Poppi [54] određivali su tiabendazol u uzorcima kore manga. Zlatne nanočestice su taložili na običan papir koristeći voštani pisač te su tako površinski pojačali intenzitet Ramanovog raspršenja. Za normaliziranje signala koristili su unutarnji standard natrijev tiocijanat (NaSCN), koji je relativno standardno odstupanje (RSD) smanjio s 10,0 % na 2,3 %. Pripremili su niz standardnih otopina tiabendazola u rasponu koncentracija od 0,030 ppm do 10 ppm te snimili SERS spektre. Nakon mjerenja uočili su da dolazi do vrlo dobrog razlikovanja onih otopina koje sadrže manju koncentraciju tiabendazola od 2 ppm i onih otopina koje sadrže višu koncentraciju tiabendazola. Koncentracija od 2 ppm je najveća dopuštena koncentracija tiabendazola koja smije zaostati nakon korištenja, koju je odredila brazilska Zdravstvena regulatorna agencija. Metoda je na realnim uzorcima manga pokazala osjetljivost od 92 % te selektivnost od 94 %, čak i u prisutnosti drugih pesticida te se pokazala vrlo dobrom za određivanje tiabendazola.

U novijem istraživanju, Xuan i suradnici [55] izradili su supstrat Ag-Au-IP6-Mil-101(Fe) za SERS metodu tako što su *in-situ* reducirali srebrove i zlatne nanočestice na metalno-organski okvir (engl. *metal-organic framework*, MOF), načinjen od tereftalne kiseline i  $\text{Fe}^{3+}$  pod nazivom Mil-101(Fe), koji je modificiran s inozitol heksafosfatom (IP<sub>6</sub>). Metalno-organski okviri su spojevi pripremljeni iz metalnih iona i organskih molekula te čine posebnu klasu spužvastih

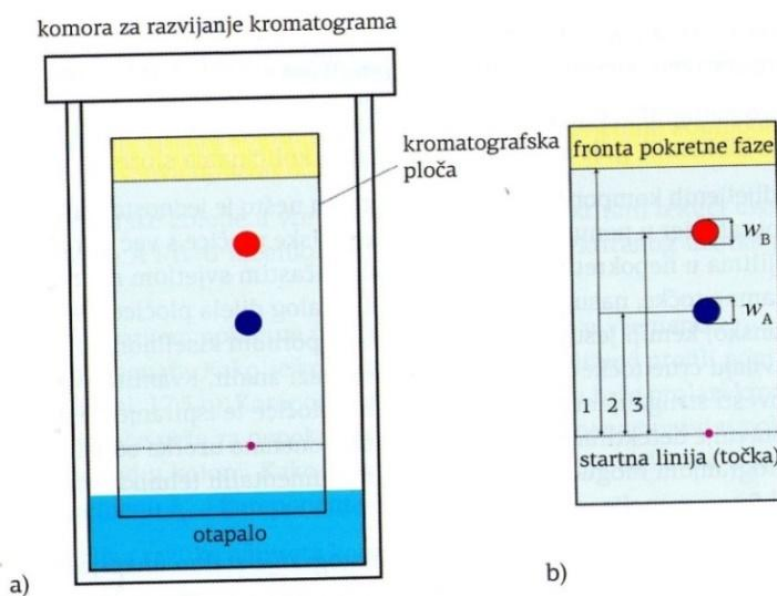
materijala s porama u nano veličinama. Zatim su određivali tiabendazol u uzorcima soka breskve. SERS metoda pokazala je linearnost u rasponu koncentracija od 1,5 ppm do 75 ppm uz koeficijent korelacije 0,986, a granica detekcije za tiabendazol iznosila je 50 ppb, što zadovoljava zahtjeve kineskog nacionalnog standarda. Također, autori su odredili točnost metodom standardnog dodatka i dobili iskorištenja u rasponu od 84,32 % do 113,12 %.

## 3.2. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) [56]. Ona je najčešće korištena separacijska tehnika u laboratorijima jer se koristi za analizu, izolaciju i pročišćavanje uzoraka. Postoji nekoliko podjela kromatografskih metoda. Prema načinu ostvarivanja kontakta između nepokretne i pokretne faze razlikuju se dvije metode: plošna i kolonska kromatografija.

Za izvedbu plošne kromatografije nepokretna faza se nanosi na ravnu plohu ili u pore papira, a pokretna faza zatim prolazi kroz nju pod utjecajem kapilarnih sila, gravitacije ili električnog potencijala. Razlikujemo tri vrste plošne kromatografije, a to su tankoslojna, papirna i elektrokromatografija. Kod papirne kromatografije nepokretna faza je najčešće celuloza iz papira, ali danas se rabe i modificirani oblici papira, npr. impregnirani ionskom smolom, silika-gelom, aluminijevim oksidom i dr. Kod tankoslojne kromatografije odjeljivanje se najčešće vrši na inertnoj podlozi (staklo, inertni polimerni materijal ili aluminijska folija) na koju se kao tanki homogeni sloj nanosi nepokretna faza, koja se sastoji od usitnjenog praha (zrnca dimenzije od 5  $\mu\text{m}$  do 50  $\mu\text{m}$ ). Treća vrsta plošne kromatografije, elektrokromatografija, bit će naknadno detaljnije opisana jer uz nekoliko modifikacija može biti i vrsta kolonske kromatografije. Princip rada svih vrsta plošne kromatografije je sličan uz male izmjene. Mali volumen uzorka nanosi se na nepokretnu fazu, na točno označenom mjestu. Pločica ili papir se zatim uroni u komoru za razvijanje kromatograma na čijem se dnu, ispod linije na koju je nanesen uzorak, nalazi otapalo koje je pokretna faza. Pod djelovanjem kapilarnih sila otapalo putuje nepokretnom fazom i sa sobom nosi sve komponente uzorka. Taj dio kromatografske analize naziva se razvijanje

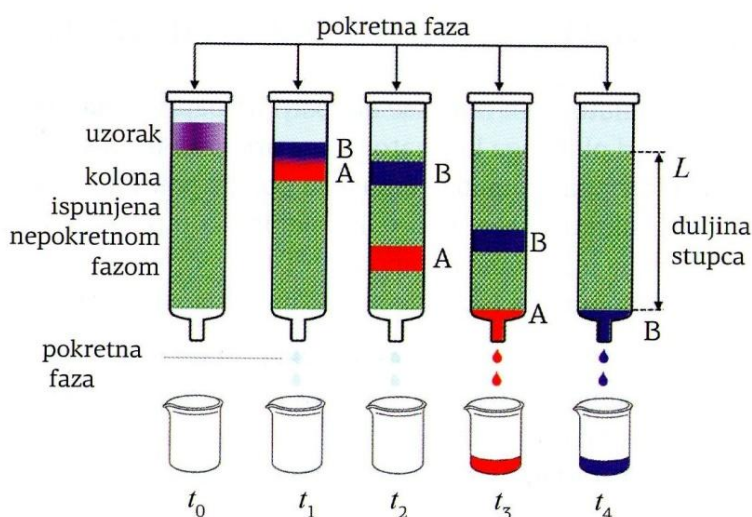
kromatograma i shematski je prikazano na Slici 14.a. Na kraju se kromatografska ploča vadi iz komore i suši. Na plošnom kromatogramu (Slika 14.b) može se iščitati nekoliko veličina, a to su pomak pokretne faze, što označava udaljenost od startne linije do fronte otapala, odnosno pokretne faze te pomak pojedine komponente, što predstavlja udaljenost od startne linije do sredine mrlje komponente. Faktor zaostajanja,  $R_F$ , temeljni je parametar u plošnoj kromatografiji i koristi se za karakterizaciju položaja komponente uzorka. On predstavlja omjer puta komponente i puta otapala, a njegova vrijednost se kreće od 0 do 1, gdje 0 predstavlja startnu liniju, a 1 frontu pokretne faze [27, 56].



Slika 14. Shematski prikaz plošne kromatografije: a) prikaz komore za razvijanje kromatograma, kromatografske ploče s nanesenim uzorkom, otapala i dvije komponente (plava i crvena točka); b) prikaz razvijenog kromatograma: 1 - pomak pokretne faze, 2 - pomak komponente A, 3 - pomak komponente B,  $w_A$  - širina mrlje komponente A,  $w_B$  - širina mrlje komponente B [56].

Kod kolonske kromatografije ili kromatografije na stupcu, nepokretna se faza nalazi u koloni ili stupcu. Kroz kolonu pokretna faza prolazi pod utjecajem primijenjenog tlaka ili djelovanjem gravitacije. Tijekom cijelog trajanja kromatografske analize, odnosno odjeljivanja komponenti uzorka, potrebno je dodavati nove količine otapala, odnosno pokretne faze.

Tekućina ili otapalo koje se dodaje na ulaz u kolonu zove se eluens, a na izlasku iz kolone naziva se eluat. Sam proces prolaska tekućine ili plina (pokretne faze) kroz kolonu zove se eluiranje pa se ova tehnika još naziva i elucijska kromatografija. Na Slici 15. prikazana je shema kolonske kromatografije. Na početku (vrijeme  $t_0$ ) se uzorak, koji može biti u tekućem ili čvrstom stanju, nanosi na vrh kolone. U ovom slučaju, uzorak sadržava komponente A i B. Zatim se dodaje pokretna faza tijekom cijele analize, a brzina kojom raznosi pojedine komponente uzorka se razlikuje. Komponenta A brže prolazi kroz kolonu, odnosno manje se zadržava u nepokretnoj fazi i detektor ju očitava u vremenu  $t_3$ . Komponenta B jače se veže za nepokretnu fazu, manje vremena boravi u pokretnoj fazi pa ju detektor očitava kasnije, u vremenu  $t_4$ . Što je razlika u vremenima zadržavanja komponenata veća, to je bolje njihovo odjeljivanje [27, 56].



Slika 15. Shematski prikaz kolonske kromatografije [56].

Kromatogram kod kolonske kromatografije je grafički prikaz odziva detektora, odnosno prikaz ovisnosti koncentracije analita o volumenu ili vremenu te se može koristiti i za kvalitativnu (položaj pika) i za kvantitativnu analizu (površina ispod pika). Za komponentu A iz uzorka raspodjela između pokretne i nepokretne faze prikazana je sljedećom ravnotežom:

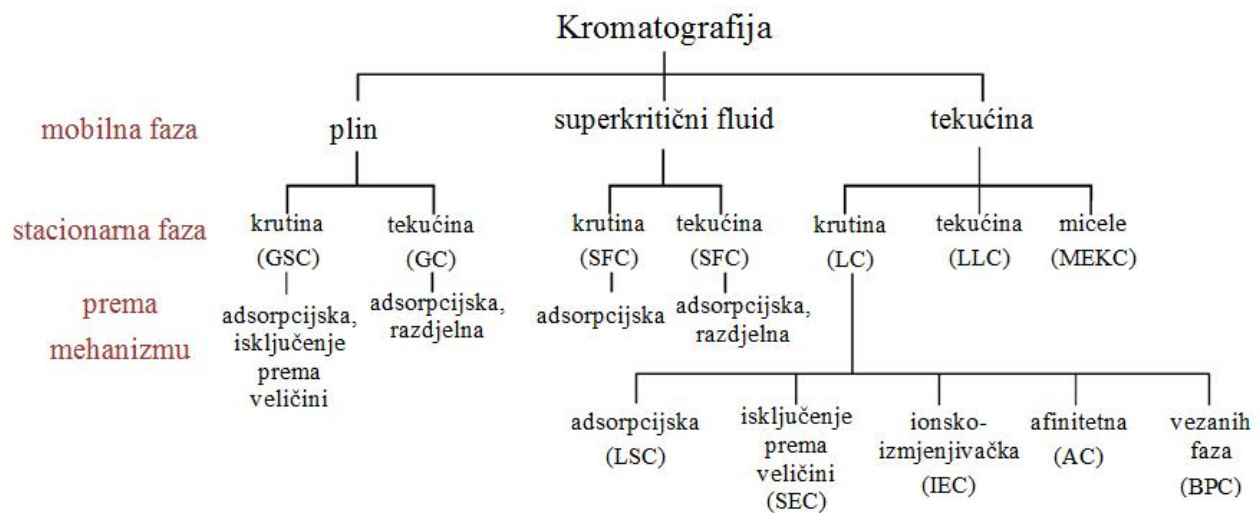


Konstanta ravnoteže,  $K$ , toga procesa je omjer ili koeficijent raspodjele i definiira se kao:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (5)$$

gdje je  $c_S$  koncentracija sastojka u nepokretnoj fazi, a  $c_M$  koncentracija u pokretnoj fazi [27, 56].

Na Slici 16. prikazana je podjela kromatografskih metoda ovisno o vrsti pokretne i nepokretne faze te na temelju mehanizma razdjeljivanja sastojaka u uzorku.

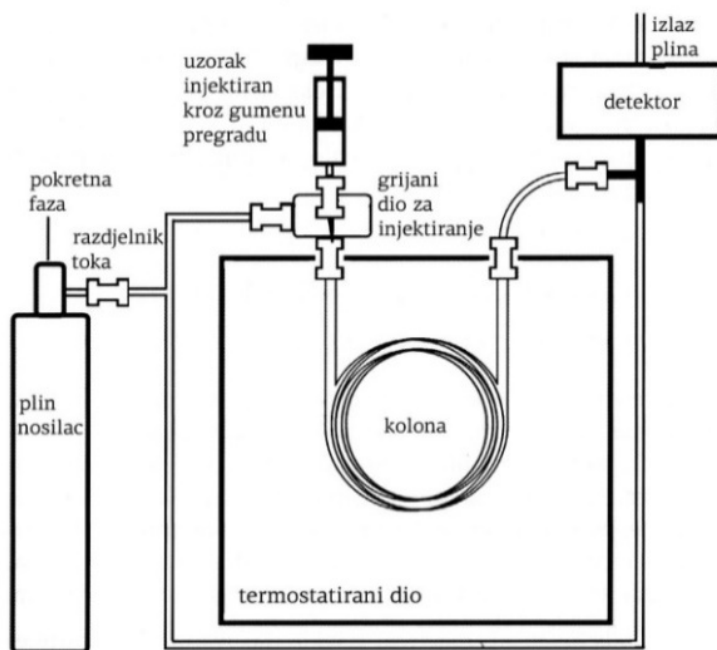


Slika 16. Podjela kromatografskih metoda [57].

Istraživanja pokazuju da se za određivanje tiabendazola najčešće koriste plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC), micelarna tekućinska kromatografija (MLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i kapilarna elektrokromatografija pa će te metode u nastavku biti detaljnije objašnjene i prikazat će se rezultati analiza određivanja tiabendazola u realnim uzorcima.

### 3.2.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je metoda odjeljivanja lako hlapivih organskih spojeva u kojoj je pokretna faza inertni plin (argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid), a nepokretna faza mogu biti krutina ili tekućina, ovisno o kakvom analitu se radi. Za odjeljivanje komponenti male molekulske mase koristi se krutina velike specifične površine na koju se adsorbiraju analizirane komponente, a ako se odjeljuju komponente velike molekulske mase onda se koristi tekućina nanescena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Kod plinske kromatografije, uzorak mora biti u plinovitom stanju, a ako već nije, onda ga se treba prevesti u plinovito stanje. Na Slici 17. shematski je prikazan plinski kromatograf [25, 27, 56].



Slika 17. Shematski prikaz plinskog kromatografa [56].

Četiri su koraka analize: unošenje uzorka na vrh kolone, prijenos uzorka kroz kolonu pokretnom fazom, adsorpcija sastojaka u nepokretnoj fazi i na kraju detekcija sastojaka. Na

početku, u kolonu se unosi mala količina uzorka (plinoviti uzorak:  $V = 1-10$  mL; tekući uzorak:  $V = 0,1-1$   $\mu$ L) kroz gumenu ili silikonsku pregradu. Uzorak se može unijeti ručno ili automatskim injektorom iz parne faze ili otopine. Kolone mogu biti punjene ili kapilarne. Punjene kolone izrađene su od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi, duljine su od 2 m do 3 m, a u njih se jednoliko stavlja sitno zrnasto punilo ili čvrsti nosač na kojeg se nanosi nepokretna faza. Kapilarne kolone mogu imati nepokretnu fazu nanosenu direktno na unutarnju stijenkicu ili mogu sadržavati nosač na kojeg se nanosi nepokretna faza. Mjesto za unošenje uzorka, kolona i detektor nalaze se u termostatiranom prostoru, koji omogućuje plinovito stanje uzorka. Dodatno, mjesto za unošenje uzorka i detektor zagrijavani su na temperaturu otprilike  $50$  °C iznad temperature vrelišta najmanje hlapivog sastojka, kako bi se osiguralo brzo uplinjavanje uzorka pri unosu te spriječila kondenzacija prilikom dolaska na detektor. Ako se analizira uzorak širokog raspona vrelišta, tada je potrebno vršiti analizu uz temperaturno programiranje. Temperaturno programiranje je tehnika pri kojoj se temperatura kromatografske kolone kontinuirano ili skokovito povisuje u određenom rasponu tijekom odjeljivanja. Uređaji za detekciju trebaju biti stabilni i selektivni te imati linearan odziv. Detektori koji se najčešće koriste pri plinskoj kromatografiji su plameno-ionizacijski detektor, plameni fotometar, spektrometar masa, FTIR spektrometar ili detektor zahvata elektrona. Prednosti plinske kromatografije su automatsko bilježenje signala na spregnutom detektoru, potreban je mali volumen uzorka, mogu se odjeljivati vrlo složene smjese s više od 100 sastojaka te kratko vrijeme analize, jer se plin kao pokretna faza vrlo brzo kreće kroz kolonu [25, 27, 56].

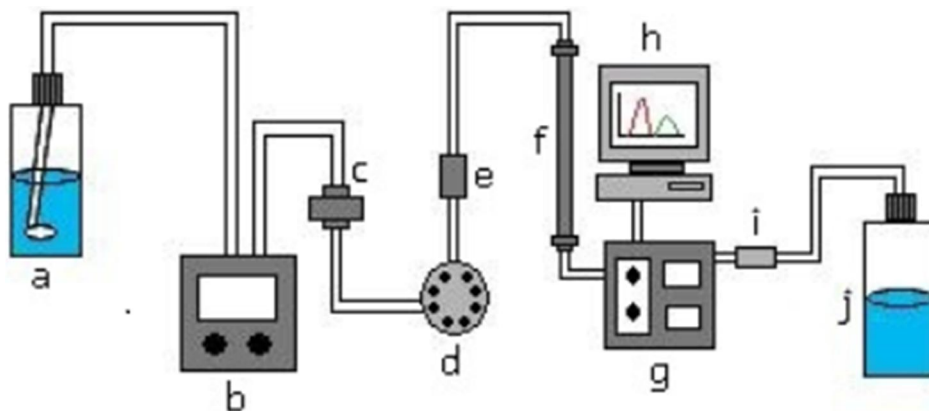
Maštovská i suradnici [58] uspoređivali su konvencionalnu metodu plinske kromatografije spregnutu s masenim spektrometrom kao detektorom (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) i istu tu metodu s niskim tlakom oko kolone (engl. *low-pressure gas chromatography-mass spectrometry*, LP-GC-MS) na 20 različitih pesticida u ekstraktu mrkve, uključujući i tiabendazol. Kao pokretnu fazu koristili su inertni plin helij. Rezultati su pokazali kako su se korištenjem LP-GC-MS metode dobili bolji pikovi za tiabendazol u odnosu na GC-MS metodu, ali je utjecaj interferenata bio veći i granica detekcije se povećala s 3 ng/g kod GC-MS metode na 11 ng/g kod LP-GC-MS metode.



### 3.2.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC) je metoda odjeljivanja u kojoj je pokretna faza tekućina, a nepokretna faza je najčešće krutina ili tekućina. Primjena tekućinske kromatografije je važna zato što se velik broj spojeva ne može prevesti u plinoviti oblik pa to onemogućuje njihovo odjeljivanje plinskom kromatografijom. Tekućinska kromatografija temelji se na korištenju kolona relativno velikih promjera, za prolazak pokretne faze kroz kolonu koristi se samo gravitacija ili malo povišeni tlak, a brzina raspodjele sastojaka između pokretne i nepokretne faze je kontrolirana difuzijom. Izbor nepokretne faze ovisi o veličini čestica te o njenoj aktivnosti s otopljenom tvari u uzorku. Najčešće se koriste silika gel i glinica jer su bezvodni pa su stoga dobri adsorbensi. Pokretna faza se bira s obzirom na polarnost prema uzorku i nepokretnoj fazi kako ne bi došlo do adsorbiranja pokretne faze na nepokretnu i samim time lošeg odjeljivanja komponenata uzorka. S obzirom na polarnost pokretne i nepokretne faze razlikuju se dvije vrste kromatografije. Kromatografija normalnih faza je ona kod koje je nepokretna faza polarna, a pokretna faza nepolarna, čime se postiže da se prvo odjeljuju nepolarne ili manje polarne komponente, a kasnije polarne komponente jer se one bolje adsorbiraju na nepokretnoj fazi i ostaju duže u koloni. Također, mogu se koristiti pokretne faze različite polarnosti tako da se kolona prvo eluira s manje polarnim otapalima, a kasnije se polarnost otapala povećava. Taj postupak zove se gradijentno eluiranje. S druge strane, kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza je nepolarna, a pokretna faza je polarna. Ako se provodi gradijentno eluiranje, onda se kolona prvo eluira s polarnim otapalima, a kasnije se njihova polarnost smanjuje kako bi se bolje odjelile nepolarne komponente koje se adsorbiraju na nepolarnu fazu [27, 56, 59].

Na Slici 18. shematski je prikazana instrumentacija za tekućinsku kromatografiju. Pokretna faza iz spremnika dolazi do pumpe i prolazi kroz filter do sustava za unos uzorka gdje se uzorak i pokretna faza miješaju. Zatim zajedno prolaze kroz filter ili pretkolonu do kromatografske kolone gdje se odvija odjeljivanje sastojaka. Komponente dolaze do detektora, a signal se bilježi na računalu u obliku kromatograma. Na kraju uzorak prolazi kroz još jedan filter i odlazi u spremnik za otpad [59].



Slika 18. Shematski prikaz sustava za tekućinsku kromatografiju: a) sustav za unos pokretne faze, b) pumpa, c) filter za otapalo, d) sustav za unos uzorka, e) pretkolonski filter (pretkolona), f) kolona, g) detektor, h) računalo, i) filter, j) spremnik za otpad [59].

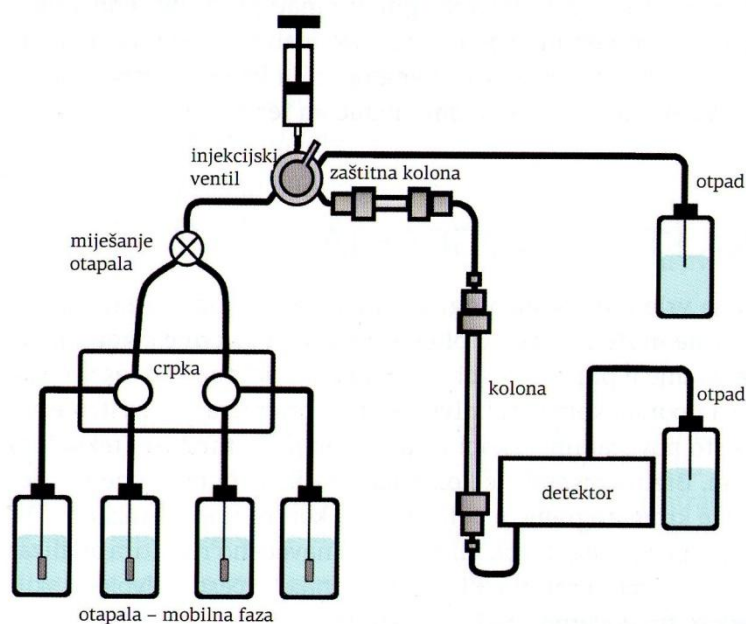
Pous i suradnici [60] su uz tiabendazol određivali još 4 druga spoja u uzorcima jagoda, naranče, krumpira, krušaka i dinja koristeći metodu tekućinske kromatografije spregnutu s masenim spektrometrom (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). Nepokretna faza je bila silicijev dioksid sa slojem C<sub>18</sub>, a pokretna faza bio je metanol-amonijev formijat. Granica detekcije za tiabendazol iznosila je 0,01 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,04 mg/kg. Prema zakonima Europske Unije, dopuštena količina tiabendazola koja smije ostati nakon tretiranja voća i povrća kreće se u rasponu od 0,1 mg/kg do 6 mg/kg. U realnim uzorcima, tiabendazol je pronađen u dva uzorka naranče (1,40 mg/kg i 0,75 mg/kg), u dva uzorka jagode (0,45 mg/kg i 0,6 mg/kg) i jednom uzorku dinje (0,08 mg/kg), što je manje od maksimalno dopuštenih vrijednosti. Točnost metode se određivala dodatkom tiabendazola u uzorke naranče pri čemu su iskorištenja bila u rasponu od 58 % do 68 %.

Također koristeći LC-MS tehniku, Yoshioka, Akiyama i Teranishi [61] određivali su nekoliko različitih pesticida: *o*-fenilfenol, difenil, imazalil i tiabendazol u citrusnom voću (limun, grejp i naranča). Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom s dietil-eterom, nakon čega je dodan metanol te se uzorak sušio kako bi dietil-eter ispario. Pokretna faza bila je smjesa metanola i vode čiji se omjer tijekom vremena mijenjao (od 60 % metanola do 100 % metanola u 10 min). Granica detekcije za tiabendazol iznosila je 0,01 µg/g, a od 20 uzoraka tiabendazol je detektiran

u njih 11 u rasponu koncentracija od 0,01  $\mu\text{g/g}$  do 2,88  $\mu\text{g/g}$ . Autori su određivali i točnost metodom standardnog dodatka i dobili iskorištenja u rasponu od 82 % do 100 %.

### 3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Iako je tekućinska kromatografija učinkovita, jednostavna i relativno jeftina metoda, odjeljivanje sastojaka tom tehnikom zahtijeva mnogo vremena, što je dovelo do razvoja brže metode pod nazivom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Do poboljšanja metode dolazi zbog korištenja vrlo sitnih čestica nepokretne faze te visokih tlakova otapala, odnosno pokretne faze. Nepokretna faza kojom se puni kolona je najčešće silika gel visoke čistoće u kojem čestice imaju promjer  $< 10 \mu\text{m}$ , a nekad čak i  $< 2 \mu\text{m}$ . Međutim, mogu se koristiti i glinica (promjera čestica  $5 \mu\text{m}$ ), cirkonijev oksid (promjera čestica  $< 2 \mu\text{m}$ ) te titanijev oksid (promjera čestica  $3 \mu\text{m}$ ) Zbog tih modifikacija, ova metoda zahtijeva primjenu složenije instrumentacije (Slika 19.) koja se sastoji od četiri osnovna dijela [27, 56].



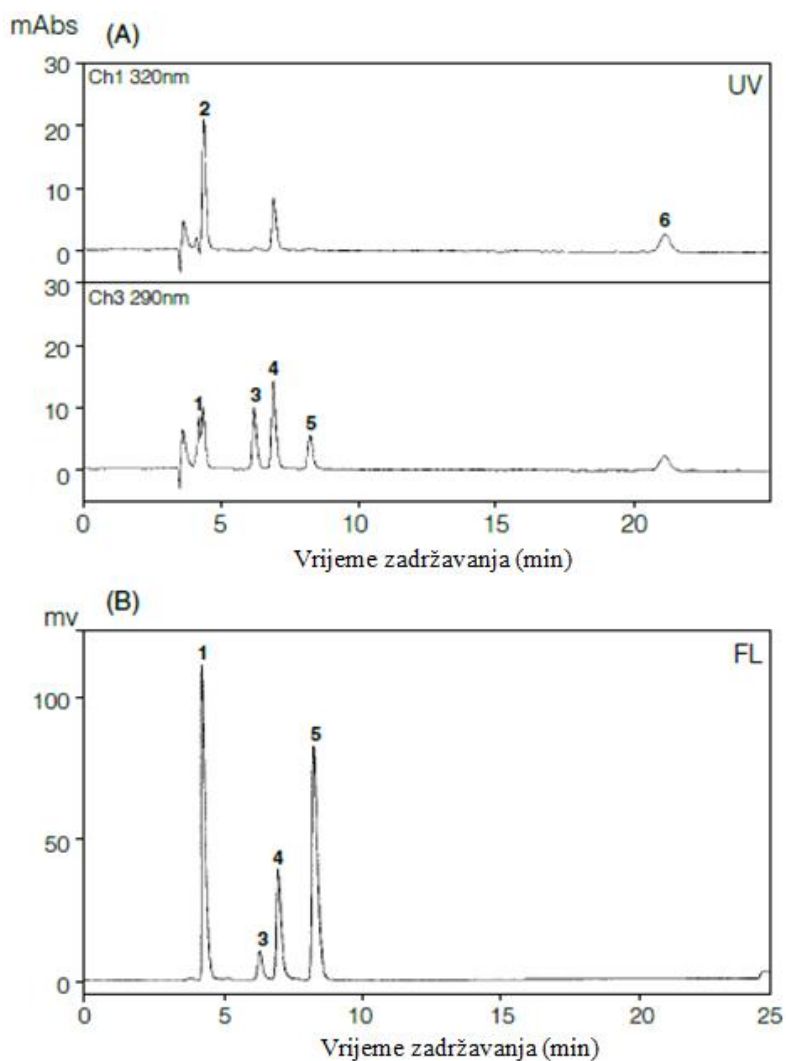
Slika 19. Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti [56].

Prvi dio čini sustav za opskrbu pokretnom fazom sa crpkom koja omogućuje postizanje visokog tlaka. Također je u tom dijelu prisutan i sustav koji omogućuje miješanje otapala jer se kod ove metode također može koristiti izokratno (korištenje samo jednog otapala) ili gradijentno eluiranje (korištenje otapala različitih polarnosti). Otapala, odnosno pokretne faze, koje se koriste moraju biti visoke čistoće i ne smiju sadržavati mjehuriće plina. Zatim dolazi sustav za precizan unos tekućeg uzorka točno određenog volumena, koji se može kretati od 0,5  $\mu\text{L}$  do 5,0 mL. U sustav je prije kromatografske kolone postavljena kraća kolona istog punila, koja se zove pretkolona. Ona je jeftinija te se lakše i češće može mijenjati pa se zbog toga koristi kao zaštita za kromatografsku kolonu. Zadnji osnovni dio instrumentacije za HPLC metodu je sustav za detekciju koji ovisi o prirodi uzorka. Detektori koji se najčešće koriste su detektori UV/Vis zračenja, fluorescencijski detektori te detektori indeksa loma. Najveća prednost HPLC metode, osim osjetljivosti i prilagodljivosti, je ta što može analizirati široki spektar uzoraka različitih svojstava (nukleinske kiseline, pesticidi, anorganske tvari, organometalni spojevi), čak i lako hlapive te termički nestabilne spojeve pa se zato primjenjuje u raznim granama znanosti i industrije [27, 56].

Kawasaki i suradnici [62] određivali su tiabendazol i njegov metabolit 5-hidroksitiabendazol HPLC metodom u uzorcima svinjskog mišića, jetre i masti te kravljeg mlijeka koje su nabavili na tržnici u Japanu. Pokretna faza je bila smjesa 25 mmol/L bezvodnog natrijevog dihidrogenfosfata i acetonitrila (4:1), temperatura kolone je bila 40 °C, a za detekciju su koristili UV detektor. Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija tiabendazola od 0,01  $\mu\text{g/mL}$  do 1  $\mu\text{g/mL}$ , a granica detekcije je iznosila 0,01  $\mu\text{g/mL}$ . Ni u jednom od realnih uzoraka nije bio prisutan niti tiabendazol niti njegov glavni metabolit 5-hidroksitiabendazol.

Autor Su i suradnici [63] određivali su uz tiabendazol još pet drugih benzimidazolnih spojeva i njihove derivate koristeći HPLC metodu uz detektor s nizom fotodioda (engl. *photodiode array detector*, PDA) i fluorescentni detektor. Kromatografsku kolonu su gradijentno eluirali i pri tome koristili acetonitril i 0,02 mol/L natrijev dihidrogenfosfat (pH 3,3). Kao uzorke koristili su svinjsko meso, svinjsku jetru, goveđe meso, janjeće meso te goveđe i kozje mlijeko kupljeno na tržnici u Taipeiju. Ova metoda pokazala je linearnost u rasponu koncentracija od 0,05  $\mu\text{g/mL}$  do 2,50  $\mu\text{g/mL}$  s koeficijentom korelacije 1,0000. Pri korištenju UV detektora (PDA) granica detekcije je iznosila 0,020 ppm, a pri korištenju fluorescentnog detektora granica

detekcije iznosila je 0,005 ppm. Na Slici 20. prikazani su kromatogrami s obje vrste detektora uz iste kromatografske uvjete. Metodom standardnog dodatka određivali su i točnost metode te dobili iskorištenja u rasponu od 84,5 % do 97,6 %. Od 30 ispitanih realnih uzoraka, niti jedan nije sadržavao benzimidazolne spojeve pa tako ni tiabendazol, međutim HPLC metoda se pokazala vrlo korisnom jer je pružila mogućnost istovremenog određivanja šest različitih benzimidazolnih spojeva.



Slika 20. Prikaz HPLC kromatograma šest benzimidazolnih spojeva snimljenih detektorom s nizom fotodioda (A) i fluorescentnim detektorom (B) pri unosu 25 ng svakog spoja: (1) albendazol 2-aminosulfon, (2) 5-hidroksitiabendazol, (3) albendazol sulfoksid, (4) tiabendazol, (5) albendazol sulfon, (6) mebendazol [63].

Veneziano i suradnici [64] su u svom radu određivali tiabendazol, karbendazim i tiofanatmetil u ukupno 50 uzoraka banana uvezenih iz Ekvadora (32), Paname (10) i Kostarike (8) u Italiju. Pokretna faza tijekom odjeljivanja HPLC metodom bila je smjesa metanol/voda i 0,6 % NH<sub>3</sub> (50:50) te je korišten detektor s nizom fotodioda. Granica detekcije je izračunata i bila je u rasponu od 0,001 mg/kg do 0,02 mg/kg. U 11 uzoraka pronađen je tiabendazol u koncentracijama od 0,050 mg/kg do 2,510 mg/kg što je niže od maksimalno dopuštenih vrijednosti u Italiji, odnosno Europi, koja iznosi 5 mg/kg. Metodom standardnog dodatka određena je točnost ove metode uz iskorištenja u rasponu od 81,0 % do 96,0 %. Također, provedena je i dodatna analiza GC-MS metodom koja je potvrdila sve rezultate dobivene HPLC metodom.

U uzorcima limuna Prousalis i suradnici [65] određivali su tiabendazol, karbendazim i *o*-fenilfenol u limunu koristeći HPLC metodu obrnutih faza. Tijekom analize kromatografska kolona je izokratno bila eluirana pokretnom fazom koju je činila smjesa acetonitrila, vode i 30%-tnog amonijaka (39:60,5:0,5), a detekcija se vršila UV detektorom pri 254 nm. Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija od 0,1 µg/mL do 40,0 µg/mL uz koeficijent korelacije 0,999. Također su se promatrali i ostali parametri te su rezultati pokazali da je metoda ponovljiva (uz RSD vrijednost u rasponu 0,1-2,0 %) i reproducibilna (uz RSD vrijednost 1,2-3,8 %). Granica detekcije za tiabendazol iznosila je 0,27 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,91 mg/kg. Zbog niskih granica detekcije i kvantifikacije, ova metoda je pogodna za određivanje niskih koncentracija tiabendazola, ali i drugih pesticida karbendazima i *o*-fenilfenola, u razinama nižim od maksimalno dopuštenih vrijednosti u Europi.

Turiel i suradnici [66] određivali su tiabendazol u uzorcima naranče, limuna, grožđa i jagode. Prvo su sintetizirali molekulski tiskani polimer (MIP) koristeći molekulu tiabendazola kao predložak te tako dobili vrlo selektivnu nepokretnu fazu veličine čestica ~ 3,5 µm kojom su punili HPLC kolonu. Tijekom analize koristili su dvije pokretne faze koje su izmjenjivali, a to su bile 100 %-tni metanol te smjesa metanola i octene kiseline (80:20). Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija 0,1 mg/L do 5 mg/L s koeficijentom korelacije 0,999. Granica detekcije iznosila je 0,03 µg/L, a može se još i sniziti unosom većeg volumena uzorka. Točnost ove metode autori su odredili metodom standardnog dodatka i dobili iskorištenja u rasponu od

88,7 % do 102,4 %. U realnim uzorcima tiabendazol je pronađen u uzorcima jagoda te u kori naranče i limuna.

Hu i suradnici [67] određivali su karbendazim i tiabendazol u uzorcima jabuka koristeći mikroekstrakciju u čvrstoj fazi te kombinirajući HPLC tehniku s fluorescentnom detekcijom. Linearnost se kretala u rasponu od 0,01 mg/kg do 1 mg/kg uz korelacijski koeficijent 0,9998. Granica detekcije iznosila je 0,003 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,006 mg/kg. Dodatkom otopina tiabendazola koncentracija 0,1 mg/kg i 0,5 mg/kg u uzorke jabuka, autori su ispitivali točnost metode i dobili iskorištenja u rasponu od 91,5 % do 96,1 %. Nakon primjene na realnim uzorcima, ustanovljeno je da RSD vrijednost iznosi 2,9 % te da su koncentracije tiabendazola u jabukama ispod maksimalno dopuštene vrijednosti od 5 mg/kg.

Autor Wu je sa svojim suradnicima [68] također određivao karbendazim i tiabendazol, ali u uzorcima tla i vode (kišnica, bunarska voda i jezerska voda). Uzorci su pripremljeni korištenjem disperzivne mikroekstrakcije tekuće-tekuće te je tiabendazol određivan kombinacijom HPLC metode i fluorescentne detekcije. Za uzorke vode, linearnost je bila u rasponu od 5 ng/mL do 800 ng/mL, korelacijski koeficijent iznosio je 0,9997, granica detekcije je bila 1,0 ng/mL, a granica kvantifikacije 2,0 ng/mL. Primjenom metode standardnog dodatka u uzorcima vode iskorištenja su bila u rasponu od 86 % do 94 %. Za uzorke tla, linearnost je bila u rasponu od 10 ng/g do 1000 ng/g, korelacijski koeficijent iznosio je 0,9994, granica detekcije bila je 1,6 ng/g, a granica kvantifikacije 3,2 ng/g. Primjenom metode standardnog dodatka u uzorcima tla iskorištenja su bila u rasponu od 84 % do 90,8 %.

U novijem istraživanju Zhang, Tian i Rustum [69] predstavili su novu metodu za određivanje tiabendazola, HPLC kromatografiju obrnutih faza i s ionskim parovima, koja se pokazala osjetljivom, točnom, s dobrim linearnim rasponom, preciznom, reproducibilnom, ponovljivom, specifičnom i robustnom što ju čini pogodnom za analize u laboratorijima za kontrolu kvalitete. Za usporedbu su još proveli i mjerenja s drugim metodama kao što su tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) i tekućinska kromatografija kombinirana s masenim spektrometrom (LC-MS). Princip rada UHPLC instrumenata je isti kao kod HPLC metode s nekoliko modifikacija. UHPLC metoda vrši mjerenje pri višem tlaku (do 1000 bara), čime se omogućava bolje razlučivanje komponenata uzorka u kraćem vremenu. Pokretna faza sastojala se od 25 %-

tnog acetonitrila i 75 %-tne vodene otopine natrijeve soli 1-oktansulfonske kiseline (koja je sadržavala 0,1 % metansulfonsku kiselinu). Brzina protoka bila je 1,5 mL/min, temperatura kolone je bila 35 °C, a cjelokupno trajanje analize s UV detekcijom pri 300 nm bilo je 4 minute. Granica detekcije za tiabendazol iznosila je 0,1 µg/mL za standardnu otopinu što je ekvivalentno analitičkoj koncentraciji od 0,1 mg/mL. Mjerno područje metode je u rasponu koncentracija od 0,1 µg/mL do 120 µg/mL. Korelacijski koeficijent za kalibracijsku krivulju iznosio je 1,000, a točnost metode se određivala metodom standardnog dodatka i dobivena su iskorištenja u rasponu od 94,6 % do 99,5 %.

### 3.2.4. Micelarna tekućinska kromatografija

Micelarna tekućinska kromatografija (engl. *micellar liquid chromatography*, MLC) je vrsta kromatografije u kojoj nastaje pseudo faza koja se sastoji od micela. Ova metoda odjeljivanja razvila se iz potrebe za odvajanjem neutralnih molekula iz smjese uzorka, budući da se električki nabijene molekule mogu odvojiti metodom kapilarne elektroforeze. Iako se gibanje molekula u ovoj metodi vrši djelovanjem električnog polja, odjeljivanje molekula se temelji na kromatografskom principu razdjeljivanja (prema hidrofilnosti, odnosno polarnosti). Kada se električki nabijene molekule površinski aktivnih tvari, npr. natrijeva dodecilsulfata, nalaze u otopini u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije dolazi do njihovog udruživanja i nastanka micela. Micele predstavljaju sferičnu strukturu u kojoj su hidrofobni lanci međusobno povezani u unutrašnjosti, dok su hidrofilne, odnosno polarne skupine okrenute prema otapalu. Neutralne molekule se iz uzorka odvajaju od hidrofilnih molekula tako što se smještaju u hidrofobnu unutrašnjost micela. U primjeni, micele mogu biti dio pokretne faze i zamijeniti skupa i toksična organska otapala koja se inače koriste kao pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti, ali se mogu i adsorbirati na površinu stacionarne faze unutar kromatografske kolone [26, 70].

Peris-Vicente i suradnici [71] razvili su metodu micelarne tekućinske kromatografije za istovremeno praćenje četiri pesticida (tiabendazol, pirimetanil, *o*-fenilfenol i imazalil) u uzorcima otpadne vode. Mobilna faza je sadržavala 0,07 mol/L 5 %-tnog natrijevog dodecil



sulfata i 1-pentanol puferiran pri pH 3. Mobilna faza se kretala kroz C18 kolonu s protokom 1 mL/min pri sobnoj temperaturi. Koristili su UV/Vis detektor, a tiabendazol su određivali pri 305 nm. Za tiabendazol koeficijent korelacije ( $R^2$ ) iznosio je 0,99990, granica detekcije je bila 0,18  $\mu\text{g/mL}$ , a granica kvantifikacije 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Ova metoda je pokazala vrlo dobru točnost s iskorištenjima u rasponu od 93,9 % do 103,7 %. Također su utvrdili da se fungicidi zadržavaju u površinskim vodama do 8 dana nakon primjene.

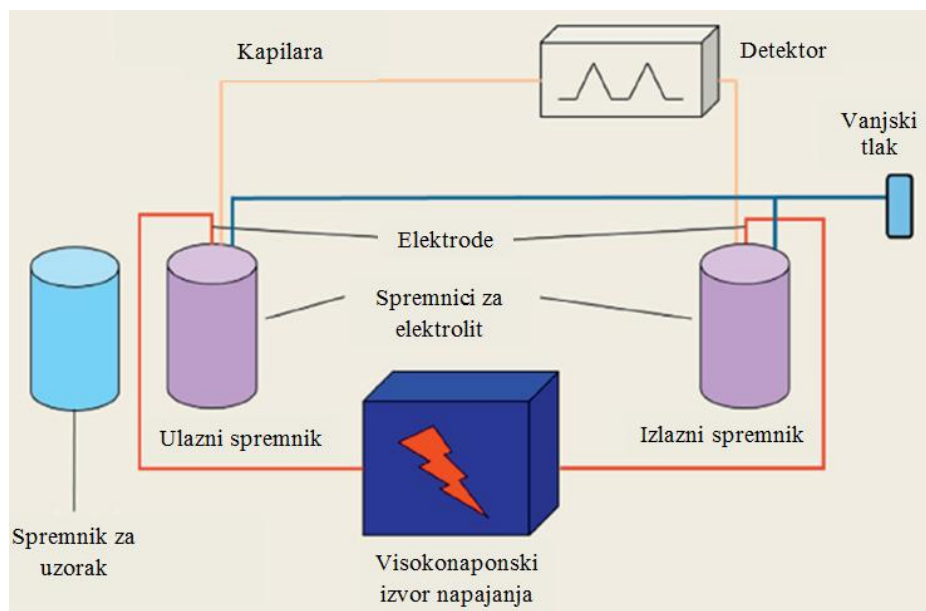
U još jednom istraživanju, za određivanje tiabendazola u otpadnim vodama, Peris-Vicente i suradnici [72] koristili su micelarnu tekućinsku kromatografiju s fluorescencijskom detekcijom. Hibridna micelarna pokretna faza sadržavala je 0,10 mol/L natrijeva dodecilsulfata i 6 %-tni 1-pentanol pri pH 3 (pH namješten korištenjem fosfatnog pufera). Brzina protoka bila je 1 min/mL u C18 koloni. Kao uzorke koristili su otpadne vode iz postrojenja za pakiranje citrusnog voća, poljoprivrednih oluka, gradske kanalizacije te ulazne i izlazne vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Rezultati su pokazali da granica detekcije za tiabendazol iznosi 0,005 mg/L te da je mjerno područje u rasponu od 0,01 mg/L do 2 mg/L uz koeficijent korelacije 0,9995. Maksimalna dopuštena koncentracija tiabendazola u tom području (Villareal, Španjolska) iznosi 0,1 mg/L. Rezultati analize pokazali su kako je u svim uzorcima koncentracija tiabendazola bila iznad dopuštene vrijednosti, osim u uzorcima izlazne vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda jer je ta voda pročišćena i spremna za ispuštanje u okoliš.

### **3.2.5. Kapilarna elektrokromatografija**

Općenito, elektrokromatografija je analitička tehnika odjeljivanja koja kombinira dvije metode: elektroforezu na gelu i kromatografiju isključenjem prema veličini čestica. Elektroforeza na gelu je metoda odjeljivanja u kojoj se električki nabijene čestice gibaju kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja, a gel se koristi kao nosač elektrolitne otopine. Kromatografija isključenjem prema veličini čestica je vrsta kromatografske metode u kojoj se molekule odvajaju prema svojoj veličini, odnosno mogućnosti ulaska u poroznu strukturu nepokretne faze i duljeg zadržavanja u njoj [26].

Kapilarna elektrokromatografija (engl. *capillary electrochromatography*, CEC) je kombinacija kapilarne elektroforeze i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kapilarna elektroforeza je vrsta elektroforeze u kojoj se gibanje čestica odvija kroz kapilarnu cijev. Budući da se odjeljivanje komponenata odvija u kapilarnoj koloni, a ne na gelu, ova metoda pripada skupini kolonske kromatografije. Kod CEC metode, kapilara je najčešće ispunjena česticama nepokretne faze promjera  $\leq 3 \mu\text{m}$ , što je prikladno za kromatografiju obrnutih faza. Protok kroz kapilaru je ostvaren elektroosmozom, a ne tlakom, iako se sustav može staviti pod visoki tlak za bolju i kraću izvedbu. U usporedbi s tekućinskom kromatografijom, CEC metoda ostvaruje puno veću učinkovitost odjeljivanja komponenata. Kada su uzorci neutralne molekule, odjeljivanje se vrši isključivo prema interakciji komponenata uzorka s nepokretnom fazom, dok se kod uzoraka s električki nabijenim česticama odjeljivanje vrši i prema interakciji s nepokretnom fazom i prema elektroforetskoj mobilnosti komponente. Selektivnost odjeljivanja može se kontrolirati dobrim izborom nepokretne faze te izborom dobrog materijala i dimenzija kapilare [26, 73].

Osnovni dijelovi instrumentacije za provedbu CEC analize prikazani su na Slici 21. Ključni dio instrumentacije je kolona, odnosno u ovom slučaju kapilara, u kojoj se odvija odjeljivanje komponenti. Kapilare se općenito mogu podijeliti u dvije skupine: otvorene cjevaste (engl. *open-tubular*) i upakirane (engl. *packed*) kapilare. Kod CEC metode za izbor kapilare važno je da materijal od kojeg su izgrađene i nepokretna faza kojom su ispunjene budu otporni na visoko električno polje koje se koristi tijekom elektroforetskog razdvajanja. Također je važno da je temperatura oko kapilare dobro kontrolirana jer se prilikom odjeljivanja komponenti oslobađa energija u obliku topline, što može dovesti do smanjenja viskoznosti ili isparavanja elektrolitne otopine pri čemu se mogu stvoriti mjehurići pare i omesti proces odjeljivanja, ali i detekcije analita. Za detekciju se najčešće koriste UV/Vis detektori i maseni spektrometri, ali mogu se koristiti i elektrokemijski, fluorescentni ili infracrveni detektori [73].



Slika 21. Shematski prikaz instrumentacije za provedbu kapilarne elektrokromatografije [73].

Cacho i suradnici [74] koristili su kapilarnu elektrokromatografiju za određivanje tiabendazola u uzorcima citrusnog voća, tačnije u kori i pulpi limuna i naranče. Autori su sami izradili molekularski tiskanu kapilarnu kolonu ispunjenu također molekularski tiskanom monolitskom nepokretnom fazom (engl. *molecularly imprinted monolith*, MIM). Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija tiabendazola od 0,05 mg/kg do 20 mg/kg s korelacijskim koeficijentom od 0,9940 do 0,9998 ovisno o uzorku. Za uzorke limuna, i koru i pulpu, granica detekcije iznosila je 0,04 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,14 mg/kg, dok je za uzorke naranče granica detekcije iznosila 0,05 mg/kg za koru te 0,04 mg/kg za pulpu, a granica kvantifikacije iznosila je 0,18 mg/kg za koru te 0,17 mg/kg za pulpu. Točnost metode autori su odredili metodom standardnog dodatka pri čemu su dobili iskorištenja od 85 % do 105 %. Dodatno su ispitali točnost metode usporedbom s rezultatima analize istih uzoraka HPLC metodom pri čemu rezultati nisu pokazali značajna odstupanja.

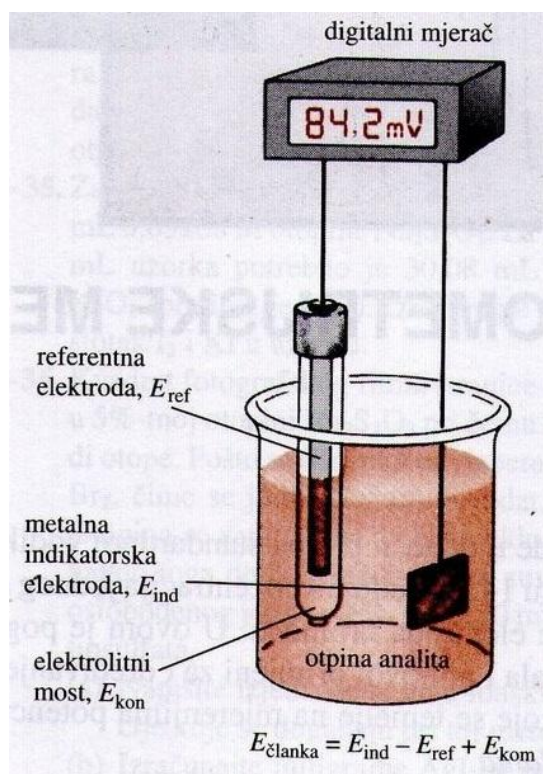
### 3.3. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektrokemija je grana fizikalne kemije koja se bavi proučavanjem povezanosti električnih pojava i kemijskih reakcija. Elektrokemijski procesi dijele se na one koji su izvor električne struje i na one koji su izazvani djelovanjem električne struje. Prema toj podjeli razlikujemo i dvije vrste elektroanalitičkih metoda: elektrolizne i neelektrolizne metode. Potencijometrija, konduktometrija i elektroforeza pripadaju skupini neelektroliznih metoda, a voltometrija, amperometrija, kulometrija i elektrogravimetrija pripadaju skupini elektroliznih metoda. Mjerenje u elektroanalitičkim metodama vrši se u elektrokemijskoj ćeliji koja može sadržavati dvije elektrode (indikatorsku i referentnu) ili tri elektrode (indikatorska, pomoćna i referentna). Na indikatorskoj elektrodi odvija se elektrokemijska reakcija, odnosno pobudni signal ili prisutnost određene molekulske vrste u otopini uzrokuje nastanak odzivnog signala koji se detektira elektrokemijskim senzorom [27].

#### 3.3.1. Direktna potencijometrija

Potencijometrijske metode su elektroanalitičke metode koje se temelje na mjerenju razlike potencijala između elektroda. Potencijometrijska mjerenja se provode u elektrokemijskoj ćeliji koja se sastoji od dvije elektrode (referentna i indikatorska) povezane elektrolitnim mostom. Referentna elektroda je polučlanak s točno poznatim elektrodnom potencijalom koji ne ovisi o koncentraciji aktivnih molekulskih vrsta u potencijometrijskoj ćeliji pa zbog toga tijekom mjerenja ostaje stalan. Najčešće korištene referentne elektrode su standardna vodikova elektroda (engl. *standard hydrogen electrode*, SHE), kalomel elektroda ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) i elektroda srebro/srebrov klorid ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). Druga elektroda je indikatorska elektroda i, za razliku od referentne, njezin elektrodni potencijal ovisi o koncentraciji jedne ili više aktivnih molekulskih vrsta. Poželjna svojstva indikatorske elektrode su da daje brz i reproducibilan odziv na male promjene u koncentraciji aktivnih vrsta. Dvije su osnovne vrste indikatorskih elektroda: metalne i membranske. Kod metalnih elektroda razlika potencijala je posljedica redukcijско-oksidacijskog procesa na elektrodi, dok je kod membranskih elektroda ta razlika posljedica

promjene slobodne entalpije reakcije prijelaza iona kroz međusloj između membrane i otopine. Metalne indikatorske elektrode se dijele na elektrode prvog reda (metal uronjen u otopinu s kationima tog istog metala), elektrode drugog reda (metal prekriven teško topivom soli uronjen u otopinu s anionima te soli) i inertne redoks elektrode. Od membranskih elektroda najčešće se koriste staklena pH elektroda te ion-selektivne elektrode s tekućom ili čvrstom membranom. Uređaji koji mjere razliku elektrodnog potencijala su potenciometri ili voltmetri (pH-metri). Primjer jedne elektrokemijske ćelije za potenciometrijsko mjerenje prikazan je na Slici 22. [27, 75].



Slika 22. Elektrokemijska ćelija za potenciometrijsko mjerenje [27].

Potenciometrijsko mjerenje može biti neizravno (potenciometrijska titracija) ili izravno (direktna potenciometrija). Direktna potenciometrija je brza i pogodna metoda za određivanje aktiviteta raznih kemijskih vrsta. Prednost ove metode je što se uzorak prilikom mjerenja ne uništava i može se upotrijebiti u daljnjim analizama, ako je potrebno. Princip rada direktne

potenciometrije vrlo je jednostvan. Potrebno je prirediti niz otopina različitih koncentracija ispitivanog analita te izmjeriti odgovarajuće vrijednosti elektrodnog potencijala za svaku otopinu. Nakon toga se konstruira baždarni dijagram i odredi se u kojem području je dijagram linearan. Za određivanje nepoznatog aktiviteta koristi se linearni dio baždarnog dijagrama. Tijekom mjerenja, na elektrodni potencijal mogu utjecati interferirajući ioni što čini određivanje aktiviteta ispitivane kemijske vrste zahtjevnim pa zbog toga ova metoda nije često u primjeni [27, 75].

Volnyanska i suradnici [76] određivali su tiabendazol u uzorcima banana. Autori su koristili metodu direktne potenciometrije za određivanje tiabendazola u realnim uzorcima. Ion-selektivna elektroda koju su priredili pokazala je linearnost u rasponu koncentracija tiabendazola od  $10^{-5}$  mol/L do  $10^{-2}$  mol/L. Također su utvrdili kako je kalibracijski graf najpovoljniji pri pH vrijednostima od 3,0 do 4,0, pa su sva mjerenja vršili u otopinama pri pH=4,0. Selektivnost elektrode za organski kation tiabendazola iznosi  $10^{-2}$  u odnosu na interferirajuće ione  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{NH}_4^+$ . Odzivno vrijeme elektrode je za niske koncentracije 2-3 minute, a pri višim koncentracijama tiabendazola ( $10^{-3}$  -  $10^{-2}$  mol/L) vrijeme odziva se smanjuje na 40 do 50 sekundi. U kori banane određena je koncentracija tiabendazola od 5,03 mg na 100 g proizvoda, a u pulpi banane određena je koncentracija od 4,02 mg na 100 g proizvoda.

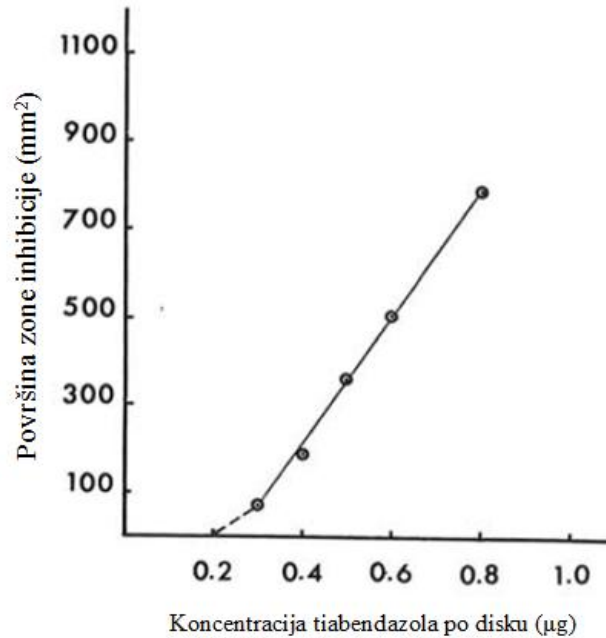
### 3.4. BIOLOŠKE I IMUNOKEMIJSKE METODE

Biološke metode su vrsta analitičkih metoda kojima se određuje koncentracija, prisutnost ili učinak analita na živu stanicu ili tkivo. Analize mogu biti kvalitativne ili kvantitativne te izravne ili neizravne. Najčešće korištena biološka metoda je biološki test. Imunokemijske metode su bioanalitičke metode koje se temelje na specifičnoj reakciji između antigena i protutijela te stvaranja kompleksa Ag-Ab (engl. *antigen-antibody*). Imunokemijskim metodama pripadaju Western-analiza te imunološki testovi (najčešće ELISA-test) [77]. Kod određivanja tiabendazola najčešće korištene tehnike su biološki i imunološki testovi, koji će detaljnije biti objašnjeni u nastavku.

### 3.4.1. Biološki testovi

Biološki testovi (engl. *bioassays*) su metode koje koriste živu tvar (najčešće mikroorganizme) kako bi se odredila prisutnost ili potencijalna toksičnost nekog spoja. Izvršne su za kontrolu zagađenja tla, vode i hrane. Biološki testovi koriste promjenu u broju stanica, brzini rasta ili brojnosti kako bi opisali učinak kemijskog spoja na mikroorganizme. Mikroorganizmi koji se, zbog svojih specifičnih fizioloških svojstava, koriste kao pouzdani pokazatelji određenih značajki tla, vode ili zraka zovu se bioindikatori te se mogu koristiti kao pojedinačni organizmi te organizmi u skupini iste ili različite populacije. Biološki testovi se mogu kombinirati s drugim tehnikama kako bi se ubrzao proces određivanja, a te tehnike su najčešće spektrofotometrija, potenciometrija, bioluminiscencija ili kemoluminiscencija, turbidimetrija i dr. [78].

Erwin i suradnici [79] pratili su kretanje tiabendazola u biljkama pamuka od korijena do lišća nakon što je tlo bilo tretirano tim fungicidom. Svoje istraživanje su potvrdili mjerenjem tiabendazola i spektrofluorimetrijskom metodom. Za izvedbu biološkog testa u kojem su pratili fungicidna svojstva tiabendazola u Petrijeve zdjelice su ulili dekstrozni agar krumpira (engl. *potato-dextrose agar*, PDA), na njega dodali 0,1 mL tiabendazola te nakon 24 sata u istu zdjelicu raspršili spore *Verticillium albo-atrum*, vrste gljivica koja uzrokuje uvenuće biljke pamuka. Tiabendazol se pokazao kao dobar fungicid jer se na mjestu na kojemu je on bio nanesen na agaru vidjela zona inhibicije rasta gljivica.



Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti veličine površine zone inhibicije rasta *Verticillium albo-atrum* o koncentraciji tiabendazola [79].

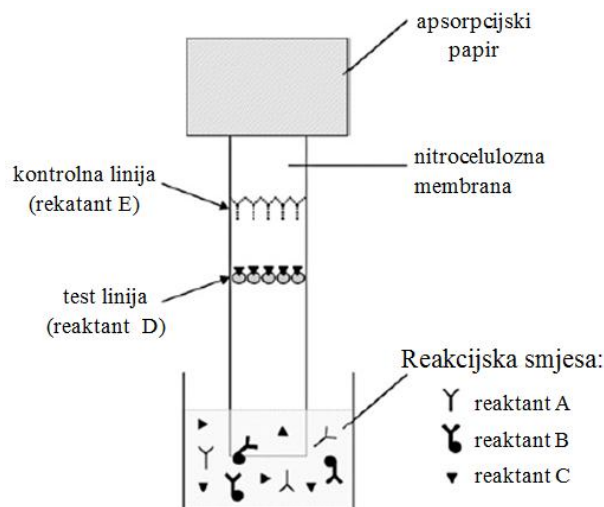
Na Slici 23. grafički je prikazana ovisnost inhibicije rasta gljivica o koncentraciji tiabendazola iz čega se vidi da je taj odnos proporcionalan. To znači da se povećanjem koncentracije tiabendazola više spora inhibiralo. Volumen dodanog tiabendazola u obliku diska uvijek je iznosio 0,1 mL. Najniža koncentracija tiabendazola pri kojoj se mogla detektirati zona inhibicije iznosila je 0,3 µg. Tiabendazol se određivao i u realnim uzorcima na ovaj način. Četiri tretirane biljke i četiri netretirane biljke su podvrgnute biološkom testu prema istom principu. Zona inhibicije u rasponu površina od 113 mm<sup>2</sup> do 452 mm<sup>2</sup> pronađena je na uzorcima stabljika i to na dijelu biljke koji je bliži tlu. Također, zona inhibicije bila je veća na vanjskom dijelu stabljike, a manja na ksilemu (vrsta transportnog tkiva u biljkama) [79].



### 3.4.2. Imunološki testovi

Imunološki testovi su biokemijski testovi kojima se određuje prisutnost ili koncentracija analita pomoću interakcije protutijela i antigena. Protutijelo je ključna komponenta imunološkog testa jer pruža visoku selektivnost i osjetljivost za određivanje analita. Vežanje antigena i protutijela dio je imunosnog odgovora organizma. Protutijelo (najčešće imunoglobulin G, IgG) se veže tako što prepoznaje specifičnu skupinu na antigenu koja se naziva epitop ili antigenska determinanta. Protutijela mogu biti monoklonska ili poliklonska. Monoklonska protutijela su specifična za samo jedan antigen, a poliklonska protutijela predstavljaju heterogenu smjesu protutijela od kojih je svako specifično za različiti epitop na antigenu. Antigeni mogu biti proteini, polisaharidi, nukleinske kiseline ili male molekule vezane na makromolekulski nosač [77, 80]. Za određivanje tiabendazola koristile su se dvije vrste imunoloških testova: *strip-based* imunološki test i ELISA testovi.

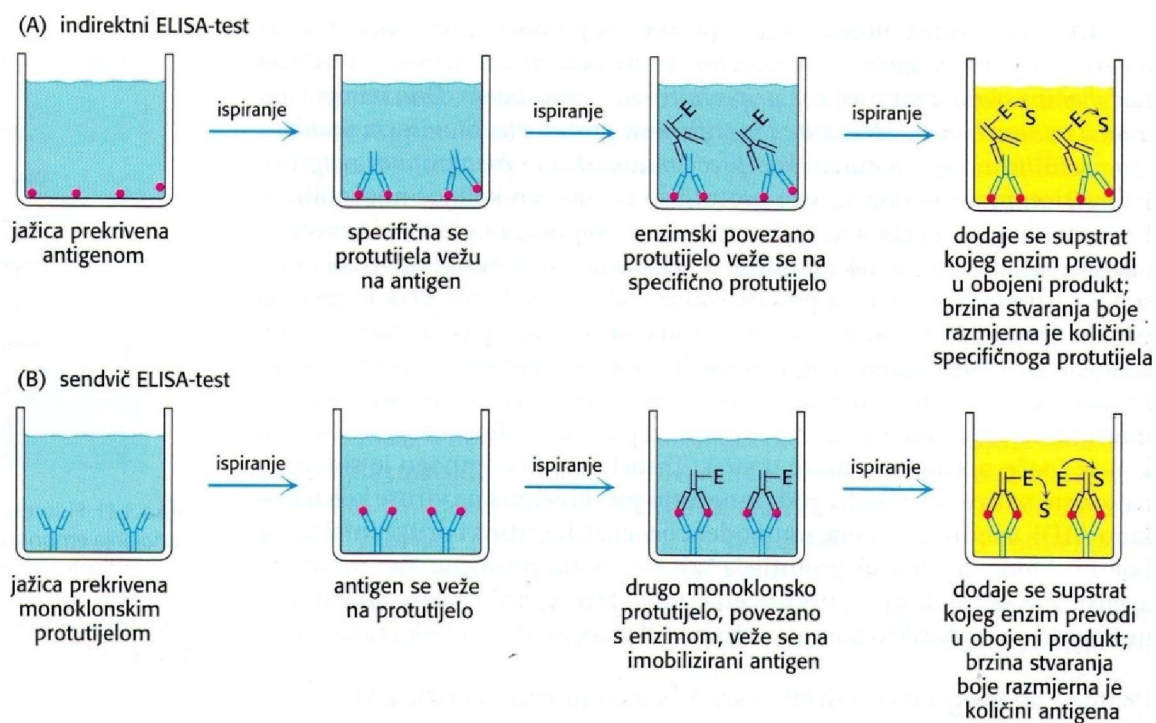
*Strip-based* imunološki test (engl. *strip-based immunoassay*) je vrsta imunološkog testa kojeg su Blažková i suradnici [81] koristili za određivanje tiabendazola u uzorcima sokova raznog voća (jabuka, banana, naranča, kruška). Na Slici 24. prikazana je trakica na kojoj se odvija test i koja se koristila u ovom istraživanju. Nitrocelulozna membrana premazana je konjugatom tiabendazola i proteina u testnoj zoni. Tijekom provođenja testa dolazi do gibanja uzorka i konjugata između protutijela i ugljika (reaktant B) uzduž trakice kapilarnim silama. *Strip-based* imunološki test se temelji na sljedećem principu: kada se trakica stavi u reakcijsku smjesu, reaktant B se veže na anti-tiabendazol protutijelo (reaktant A) te nastaje detekcijski kompleks. Ako tiabendazol nije prisutan u uzorku, dolazi do pojave produkta crne boje najjačeg intenziteta, jer dolazi do vezanja detekcijskog kompleksa na reaktant D. S druge strane, ako je tiabendazol prisutan u uzorku dolazi do neutralizacije anti-tiabendazol protutijela s detekcijskim kompleksom i intenzitet crne boje produkta se smanjuje proporcionalno koncentraciji prisutnog tiabendazola. Intenzitet crne boje na trakici omogućuje semikvantitativnu vizualnu procjenu koncentracije.



Slika 24. Shematski prikaz dizajniranog *strip-based* imunološkog testa; reaktant A – mišje anti-tiabendazol protutijelo, reaktant B – konjugat čestice ugljika i svinjskog anti-mišjeg IgG protutijela, reaktant C – tiabendazol, reaktant D – konjugat tiabendazola i ovalbumina (25 µg/mL), reaktant E – zečje anti-svinjsko IgG protutijelo (1 mg/mL) [81].

Uspoređivanjem trakica s poznatim koncentracijama tiabendazola, određeno je da vizualna granica detekcije tiabendazola iznosi 0,25 ng/mL. Također su ustanovili kako se, vizualno, koncentracija tiabendazola viša od 10 ng/mL ne može odrediti jer se ne vidi crna boja na testnoj liniji. Stvarna granica detekcije za tiabendazol (dobivena skenirajućom denzitometrijom) iznosila je  $0,08 \pm 0,03$  ng/mL, linearnost je bila u rasponu koncentracija od 0,11 ng/mL do 4,13 ng/mL, a vrijednost  $IC_{50}$  iznosila je  $0,60 \pm 0,08$  ng/mL.  $IC_{50}$  (engl. *inhibitory concentration*) je ona koncentracija tvari koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju. Autori su metodom standardnog dodatka određivali i točnost ove metode te dobili iskorištenja u rasponu od 81,9 % do 123,6 %. U realnim uzorcima sokova jabuke, naranče, banane i kruške, tiabendazol se mogao vizualno odrediti već pri koncentracijama od 50 ng/mL što je daleko ispod maksimalno dopuštene vrijednosti od 5 mg/kg. Osim *strip-based* imunološkog testa, autori su također proveli i ELISA-test kojim su dobili granicu detekcije za tiabendazol od 0,08 ng/mL, linearnost u rasponu koncentracija od 0,2 ng/mL do 9,7 ng/mL i vrijednost  $IC_{50}$  od 0,4 ng/mL. Određivanjem točnosti ELISA-testa metodom standardnog dodatka dobili su iskorištenja od 81,5 % do 171,4 % [81].

Test enzimski povezane imunosorpcije (engl. *enzyme-linked immunoadsorbent assay*, ELISA) još je jedna od vrsta imunoloških testova, često korištena u raznim analizama. Ova metoda temelji se na reakciji enzima s bezbojnim supstratom, a rezultira obojenim produktom. Enzim se kovalentno veže sa specifičnim protutijelom koje prepoznaje ciljni antigen. Na Slici 25. prikazane su dvije najčešće korištene vrste ELISA-testa, indirektni i direktni, odnosno „sendvič“ ELISA-test [77].



Slika 25. Shematski prikaz principa rada indirektnog (A) i direktnog (B) ELISA-testa [77].

Indirektni ELISA-test (Slika 25.A) se primjenjuje za detekciju prisutnosti protutijela. Dno jažice prekrije se antigenom, a zatim se dodaju specifična protutijela, odnosno uzorak kojeg analiziramo. Nakon toga, dodaju se enzimski povezana protutijela koja se vežu na specifično protutijelo, a dodatak supstrata potiče enzim na katalizu reakcije u kojoj nastaje obojeni produkt. Nasuprot tome, „sendvič“ ELISA-test se primjenjuje za detekciju prisutnosti antigena (Slika 25.B). Prvo se protutijelo adsorbira na dno jažice, a zatim se uzorak dodaje u jažicu pri čemu

dolazi do vezanja protutijela i antigena. Nakon toga, dodaje se sekundarno enzimski povezano protutijelo, koje je različito od primarnog, te dolazi do vezanja za antigen koji je imobiliziran. Na kraju se također dodaje supstrat koji potiče enzim na katalizu reakcije nastajanja obojenog produkta [77].

Osim maloprije spomenutog istraživanja [81] gdje se ELISA-test koristio za usporedbu, autor Bushway i suradnici [82] također su koristili ELISA-test kao potvrdu nakon provedbe analize raznih uzoraka voća i povrća HPLC metodom s fluorescentnim detektorom. Za HPLC metodu, mobilna faza je bila smjesa acetonitrila, vode, metanola i monoetanolamina u raznim omjerima što je ubrzalo eluiranje tiabendazola za 2,2 minute. Za ELISA-test monoklonsko protutijelo 448 vezalo se na dno polistirenske epruvete, konjugat je stvoren između enzima peroksidaze hrena i 5-sukcinoamido-tiabendazola, a supstrat je bio tetrametilbenzidin. Granica kvantifikacije za tiabendazol u realnim uzorcima iznosila je 6 ppb, a korelacijski koeficijent je za 53 uzorka voća i povrća iznosio 0,9837. RSD vrijednost je za sve, osim 2 uzorka, bila manja od 10 %.

## 4. USPOREDBA ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE TIABENDAZOLA

Nakon pregleda analitičkih metoda korištenih za određivanje tiabendazola i primjera istraživanja, slijedi usporedba glavnih analitičkih parametara svake metode. U Tablici 2. nalazi se prikaz svih spomenutih metoda, uzoraka u kojima se određivao tiabendazol, mjernih područja, koeficijena korelacije ( $R^2$ ), granica detekcije, točnosti metoda i literaturnih izvora.

Tablica 2. Usporedba analitičkih metoda korištenih za određivanje tiabendazola.

<b>METODA</b>	<b>UZORAK</b>	<b>MJERNO PODRUČJE</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>GRANICA DETEKCIJE</b>	<b>TOČNOST (%)</b>	<b>IZVOR</b>
UV/Vis spektroskopija	voće	-	-	-	94,1 – 103,0	[30]
Spektrofluorimetrija	voda	$1,5 \cdot 10^{-3} - 0,01 \mu\text{g/mL}$	0,9979	$1 \cdot 10^{-4} \mu\text{g/mL}$	98,6 – 101,0	[32]
	pesticidi	-	0,9990	$4,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	-	[33]
	voće	0,3 – 10 $\mu\text{g/g}$	0,9995	0,09 $\mu\text{g/g}$	87,1 – 108,9	[34]
	voda	0,012 – 1,61 $\mu\text{g/mL}$	0,9998	$1,11 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	91,9 – 103,6	[35]
	gljive	1,6 – 40 $\mu\text{g/g}$	0,9992	0,5 $\mu\text{g/g}$	93,0 – 110,0	[36]
	sok naranče	1,61 – 8,05 $\mu\text{g/mL}$	0,9990	-	101,1 – 104,6	[37]
	otopina tiabendazola	2,013 – 16,11 $\mu\text{g/mL}$	-	$2,42 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	-	[38]
	sok	$4 \cdot 10^{-5} - 1,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	-	$8 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$	-	[39]

<b>METODA</b>	<b>UZORAK</b>	<b>MJERNO PODRUČJE</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>GRANICA DETEKCIJE</b>	<b>TOČNOST (%)</b>	<b>IZVOR</b>
Fosforimetrija	voda	0,031 – 0,26 µg/mL	-	0,010 µg/mL	93,0 – 118,0	[42]
	voda	0,013 – 0,11 µg/mL	0,9985	$4,5 \cdot 10^{-3}$ µg/mL	97,0 – 110,0	[43]
SERS	voće	-	-	$3,94 \cdot 10^{-6}$ µg/mL	-	[47]
	jabuke	-	0,9770	0,01 µg/mL	89,2 – 115,4	[48]
	sok naranče	-	0,9900	4 µg/mL	87,3 – 108,8	[49]
	otopina tiabendazola	$1,61 \cdot 10^{-2}$ – 0,032 µg/mL	-	0,0138 µg/mL	-	[50]
	jabuke	-	0,9960	0,1 µg/g	-	[51]
	sok limuna	-	0,9900	0,149 µg/mL	96,0 – 98,0	[52]
	sok mrkve	-	0,9800	0,216 µg/mL	97,0 – 99,0	[52]
	sok manga	-	0,9900	0,179 µg/mL	96,0	[52]
	jabuke	-	0,9800	0,06 µg/mL	76,0 – 106,0	[53]
	mango	0,03 – 10 µg/mL	-	2 µg/mL	-	[54]
	sok breskve	1,5 – 75 µg/mL	0,9860	0,05 µg/mL	84,3 – 113,1	[55]
GC	ekstrakt mrkve	-	-	$3 \cdot 10^{-3}$ µg/g	-	[58]
LC	voće i povrće	-	-	0,01 µg/g	58,0 – 68,0	[60]
	voće	-	-	$1 \cdot 10^{-5}$ µg/g	82,0 – 100,0	[61]
HPLC	životinjski uzorci	0,01 – 1 µg/mL	-	0,01 µg/mL	-	[62]
	životinjski uzorci	0,05 – 2,50 µg/mL	1,0000	0,005 µg/mL	84,5 – 97,6	[63]
	banane	-	-	0,001 µg/g	81,0 – 96,0	[64]

<b>METODA</b>	<b>UZORAK</b>	<b>MJERNO PODRUČJE</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>GRANICA DETEKCIJE</b>	<b>TOČNOST (%)</b>	<b>IZVOR</b>
HPLC	limun	0,1 – 40 µg/mL	0,9990	0,03 µg/mL	96,7 – 98,3	[65]
	voće	0,1 – 5 µg/mL	0,9990	3 · 10 <sup>-5</sup> µg/mL	88,7 – 102,4	[66]
	jabuke	0,01 – 1 µg/g	0,9998	0,003 µg/g	91,5 – 96,1	[67]
	voda	5 · 10 <sup>-3</sup> – 0,8 µg/mL	0,9997	1 · 10 <sup>-3</sup> µg/mL	86,0 – 94,0	[68]
	tlo	0,01 – 1 µg/g	0,9994	1,6 · 10 <sup>-3</sup> µg/g	84,0 – 90,8	[68]
	otopina tiabendazola	0,1 – 120 µg/mL	1,0000	0,1 µg/mL	94,6 - 99,5	[69]
MLC	voda	-	0,9999	0,18 µg/mL	93,9 – 103,7	[71]
	voda	0,01 – 2,0 µg/mL	0,9995	0,005 µg/mL	92,1 – 104,2	[72]
CEC	limun	0,05 – 20 µg/g	0,9940	0,04 µg/g	87,0 – 103,0	[74]
	naranča	0,05 – 20 µg/g	0,9998	0,045 µg/g	85,0 – 105,0	[74]
Direktna potencimetrija	voće	2,0125 – 2012,5 µg/mL	-	-	-	[76]
Biološki test	biljka pamuka	-	-	3 µg/mL	-	[79]
<i>Strip-based</i> imunološki test	sok	1,1 · 10 <sup>-4</sup> – 4,13 · 10 <sup>-3</sup> µg/mL	-	8 · 10 <sup>-5</sup> µg/mL	81,9 – 123,6	[81]
ELISA-test	sok	2 · 10 <sup>-4</sup> – 9,7 · 10 <sup>-3</sup> µg/mL	-	8 · 10 <sup>-5</sup> µg/mL	81,5 – 171,4	[81]
	voće i povrće	-	0,9837	0,006 µg/mL	-	[82]

## 5. ZAKLJUČAK

Tiabendazol je često korišten antihelmintik i fungicid širokog spektra djelovanja. Iako ima nisku akutnu tosičnost za ljude, smatra se potencijalnim kancerogenom jer pri višim koncentracijama uzrokuje smetnje u ravnoteži hormona štitnjače. Također, vrlo je toksičan za slatkovodne ribe i beskralježnjake koji žive u estuarijima. Zbog toga, postoji niz analitičkih metoda kojima se tiabendazol može određivati u okolišu, ali i koje se dalje razvijaju.

Korištenje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) ima mnogo prednosti pa je to jedna od najčešće korištenih metoda. Njene prednosti su kratko trajanje analize, moguće istovremeno određivanje različitih pesticida i niska granica detekcije za tiabendazol od 0,03 ng/mL.

Sa stajališta zelene kemije, spektrofluorimetrija je naprikladnija metoda za određivanje tiabendazola jer se fluorescencijski intenzitet može pojačati korištenjem ionskih tekućina ili ugljikovih nanokuglica. Osim toga, izbjegava se korištenje raznih organskih otapala kao kod kromatografskih metoda i tiabendazol se može odrediti pri vrlo niskoj granici detekcije od 0,1 ng/mL.

Najviše autora koristilo je spektroskopiju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS). Prednosti ove metode su brza priprema uzorka i kratko trajanje analize. Za pojačanje intenziteta Ramanovog raspršivanja mogu se koristiti srebrove ili zlatne nanočestice, ali tijekom mjerenja treba uzeti u obzir moguće interferencije. Najniža granica detekcije tiabendazola dobivena ovom metodom iznosila je 0,0039 ng/mL, što je ujedno i najmanja granica detekcije u usporedbi s ostalim analitičkim metodama.



## 6. LITERATURA

- [1] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiabendazole> (pristup: 29. srpnja 2020.)
- [2] H. J. Robinson, H. R. Phares, O. E. Graessle, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1 (1978) 471-476
- [3] A. M. Tabanez, B. A. Nogueira, A. Milani, M. E. S. Eusebio, J. A. Paixão, H. N. Kabuk, M. Jajuga, G. O. Ildiz, R. Fausto, *Molecules* 25 (2020) 1-26
- [4] V. J. Ram, A. Sethi, M. Nath, R. Pratap, *The Chemistry of Heterocycles*, 2017.
- [5] J. B. Wright, *Chemical Reviews* 48 (1951) 397-541
- [6] H. D. Brown, A. R. Matzuk, I. R. Ilves, L. H. Peterson, S. A. Harris, L. H. Sarett, J. R. Egerton, J. J. Yakstis, W. C. Campbell, A. C. Cuckler, *Journal of the American Chemical Society* 83 (1961) 1764-1765
- [7] P. Maienfisch, A. J. F. Edmunds, *Advances in Heterocyclic Chemistry* 121 (2017) 24-26
- [8] V. J. Grenda, R. E. Jones, G. Gal, M. Sletzing, *The Journal of Organic Chemistry* 30 (1965) 259-261
- [9] V. Patil, E. Barragan, S. A. Patil, S. A. Patil, A. Bugarin, *Tetrahedron Letters* 58 (2017) 3474-3477
- [10] <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=24884> (pristup: 30. rujna 2020.)
- [11] R. Vardanyan, V. Hruby, *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 1<sup>st</sup> Edition, 2016.
- [12] R. K. Prichard, *International Journal for Parasitology* 3 (1973) 409-417
- [13] Q. A. McKellar, E. W. Scott, *The Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 13 (1990) 223-247
- [14] A. A. Siddiqui, R. M. Genta, I. Maguilnik, S. L. Berk, *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, 3<sup>rd</sup> Edition, 2011.
- [15] D. I. Grove, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (1982) 114-118
- [16] R. Igual-Adell, C. Oltra-Alcaraz, E. Soler-Company, P. Sánchez-Sánchez, J. Matogo-Oyana, D. Rodriguez-Calabuig, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5 (2004) 2615-2619
- [17] D. W. Gottschall, V. J. Theodorides, R. Wang, *Parasitology Today* 6 (1990) 115-124
- [18] J. E. Bennet, R. Dolin, M. J. Blaser, Mandell, Douglas, and Bennetts's *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8<sup>th</sup> Edition, 2015.

- [19] [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-060101\\_1-May-02.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-060101_1-May-02.pdf) (pristup: 2. kolovoza 2020.)
- [20] H. J. Robinson, H. F. Phares, O. E. Graessle, *The Journal of Investigative Dermatology* 42 (1963) 479-482
- [21] P. M. Allen, D. Gottlieb, *Applied Microbiology* 20 (1970) 919-926
- [22] L. C. Davidse, W. Flach, *Biochimica et Biophysica Acta* 543 (1978) 82-90
- [23] <https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers#preservatives> (pristup: 3. kolovoza 2020.)
- [24] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0157&from=EN> (pristup: 3. kolovoza 2020.)
- [25] M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, *Analitika okoliša*, 2013.
- [26] G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K. A. Schug, *Analytical Chemistry*, 7<sup>th</sup> Edition, Wiley, 2013.
- [27] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [28] P. J. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, *Encyclopedia of Analytical Science*, 2<sup>nd</sup> Edition, 2005.
- [29] E. Generalić, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Beerov+zakon> (pristup: 3. kolovoza 2020.)
- [30] A. Rajzman, *Analyst* 99 (1974) 120-127
- [31] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 8th Edition, Oxford University Press, 2006.
- [32] F. Capitán, E. Alonso, R. Avidad, L. F. Capitán-Vallvey, J. L. Vilchez, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 1336-1339
- [33] M. J. Rodríguez-Cuesta, R. Boqué, F. X. Rius, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, A. G. Frenich, *Analytica Chimica Acta* 491 (2003) 47-56
- [34] J. F. García-Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Analytica Chimica Acta* 557 (2006) 95-100
- [35] Y. Huang, J. Wang, S. F. Xue, Z. Tao, Q. J. Zhu, Q. Tang, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 72 (2012) 397-404

- [36] E. J. Llorent-Martínez, M. L. Fernández-de Córdoba, A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, *Talanta* 96 (2012) 190-194
- [37] Q. Chen, J. Zuo, X. He, X. Mo, P. Tong, L. Zhang, *Talanta* 162 (2017) 540-546
- [38] N. Kaur, P. Raj, A. Singh, N. Singh, D. Y. Kim, *Journal of Molecular Liquids* 261 (2018) 137-145
- [39] N. Kazemifard, A. A. Ensafi, B. Rezaei, *Food Chemistry* 310 (2019) 1-26
- [40] R. T. Parker, R. S. Freedlander, R. B. Dunlap, *Analytica Chimica Acta* 119 (1980) 189-205
- [41] R. T. Parker, R. S. Freedlander, R. B. Dunlap, *Analytica Chimica Acta* 120 (1980) 1-17
- [42] R. A. Correa, G. M. Escandar, *Analytica Chimica Acta* 571 (2006) 58-65
- [43] G. N. Piccirilli, G. M. Escandar, *Analytica Chimica Acta* 646 (2009) 90-96
- [44] <https://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering/> (pristup: 10. kolovoza 2020.)
- [45] B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe, R. P. Van Duyne, *Materials Today* 15 (2012) 16-25
- [46] M. Ratkaj, *Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2013.
- [47] C. Müller, L. David, V. Chiş, S. Cintă Pînzaru, *Food Chemistry* 145 (2014) 814-820
- [48] L. He, T. Chen, T. P. Labuza, *Food Chemistry* 148 (2014) 42-46
- [49] J. Feng, Y. Hu, E. Grant, X. Lu, *Food Chemistry* 239 (2018) 816-822
- [50] M. J. S. Oliveira, R. J. G. Rubira, L. N. Furini, A. Batagin-Neto, C. J. L. Constantino, *Applied Surface Science* 517 (2020) 1-29
- [51] H. Luo, Y. Huang, K. Lai, B. A. Rasco, Y. Fan, *Food Control* 68 (2016) 229-235
- [52] F. K. Alsammarraie, M. Lin, A. Mustapha, H. Lin, X. Chen, Y. Chen, H. Wang, M. Huang, *Food Chemistry* 259 (2018) 219-225
- [53] G. Fu, D. Sun, H. Pu, Q. Wei, *Talanta* 195 (2019) 841-849
- [54] C. A. Teixeira, R. J. Poppi, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 229 (2020) 1-6
- [55] T. Xuan, Y. Gao, Y. Cai, X. Guo, Y. Wen, H. Yang, *Sensors and Actuators B: Chemical* 293 (2019) 289-295
- [56] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, 2016.

- [57] I. D. Wilson, C. F. Poole, Encyclopedia of Separation Science, 2000.
- [58] K. Maštovská, S. J. Lehotay, J. Hajšlová, Journal of Chromatography A 926 (2001) 291-308
- [59] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography) (pristup: 20. kolovoza 2020.)
- [60] X. Pous, M. J. Ruíz, Y. Picó, G. Font, Fresenius Journal of Analytical Chemistry 371 (2001) 182-189
- [61] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, Journal of Chromatography A 1022 (2004) 145-150
- [62] M. Kawasaki, T. Ono, M. Murayama, M. Toyoda, S. Uchiyama, Journal of the Food Hygienic Society of Japan 40 (1999) 481-487
- [63] S. Su, C. Chang, P. Chang, S. Chou, Journal of Food and Drug Analysis 11 (2003) 307-319
- [64] A. Veneziano, G. Vacca, S. Arana, F. De Simone, L. Rastrelli, Food Chemistry 87 (2004) 383-386
- [65] K. P. Prousalis, D. A. Polygenis, A. Syrokou, F. N. Lamari, T. Tsegenidis, Analytical and Bioanalytical Chemistry 379 (2004) 458-463
- [66] E. Turiel, J. L. Tadeo, P. A. G. Cormack, A. Martin-Esteban, Analyst 130 (2005) 1601-1607
- [67] Y. Hu, X. Yang, C. Wang, J. Zhao, W. Li, Z. Wang, Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 25 (2008) 314-319
- [68] Q. Wu, Y. Li, C. Wang, Z. Liu, X. Zang, X. Zhou, Z. Wang, Analytica Chimica Acta 638 (2009) 139-145
- [69] P. Zhang, J. Tian, A. Rustum, Journal of AOAC International 100 (2017) 74-81
- [70] I. D. Wilson, M. L. Marina, M. A. García, Encyclopedia of Separation Science, 2000.
- [71] J. Peris-Vicente, A. Marzo-Mas, P. Roca-Genovés, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, Journal of Environmental Sciences 42 (2016) 284-292
- [72] J. Peris-Vicente, P. Roca-Genovés, K. Tayeb-Cherif, J. Esteve-Romero, Electrophoresis 37 (2016) 2517-2521

- [73] S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M. L. Riekkola, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, 2<sup>nd</sup> Edition, 2017.
- [74] C. Cacho, L. Schweitz, E. Turiel, C. Pérez-Conde, *Journal of Chromatography A* 1179 (2008) 216-223
- [75] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Zagreb, 2010.
- [76] O. V. Volnyanska, O. V. Labyak, M. Ye. Blazheyevskiy, O. A. Brizitskiy, V. I. Tkach, *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry* 5 (2016) 271-281
- [77] J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija, Školska knjiga*, Zagreb, 2013.
- [78] P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, N.Christofi, *Encyclopedia of Analytical Science*, 2<sup>nd</sup> Edition, 2005.
- [79] D. C. Erwin, J. J. Sims, D. E. Borum, J. R. Childers, *Phytopathology* 61 (1971) 964-967
- [80] S. K. Vashist, J. H. T. Luong, *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*, 2018.
- [81] M. Blažková, P. Rauch, L. Fukal, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2122-2128
- [82] R. J. Bushway, L. B. Perkins, K. L. Larkin, T. S. Fan, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 21 (1998) 1217-1226