

## **VEEPROOVIDES NITROSODIMETÜÜLAMIINI JA NITROSODIETÜÜLAMIINI SISALDUSE MÄÄRAMINE KASUTADES TAHKEFAAS EKSTRAKTSIOONI JA GAASIKROMATOGRAAFIAT- MASSISPEKTROMEETRIAT**

### **DETERMINATION OF NITROSODIMETHYLAMINE AND NITROSODIETHYLAMINE IN WATER SAMPLES USING SOLID PHASE EXTRACTION COMBINED WITH GAS CROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

MAGISTRITÖÖ

Üliõpilane: Lisett Kiudorv

Üliõpilaskood 183164KAKM

Juhendaja: Juri Bolobajev, teadur

## **AUTORIDEKLARATSIOON**

Olen koostanud lõputöö iseseisvalt.

Lõputöö alusel ei ole varem kutse- või teaduskraadi või inseneridiplomit taotletud.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

“27 ” mai 2020

Autor: Lisett Kiudorv

/ allkiri /

Töö vastab bakalaureusetöö/magistritööle esitatud nõuetele

“27” mai 2020

Juhendaja: Juri Bolobajev

/ allkiri /

Kaitsmisele lubatud

“.....” .....2020

Kaitsmiskomisjoni esimees: Marina Trapido

/ nimi ja allkiri /

# Materjali- ja keskkonnatehnoloogia instituut

## LÕPUTÖÖ ÜLESANNE

**Üliõpilane:** Lisett Kiudorv, 183164KAKM

Õppekava, peeriala: KAKM02/18 Keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia

Juhendaja: Teadur, Juri Bolobajev, 620 2851

### Lõputöö teema:

Veeproovides nitrosodimetüülamiini ja nitrosodietüülamiini sisalduse määramine kasutades tahkefaas ekstraktsiooni ja gaasikromatograafiat-massispektromeetriaat  
Determination of nitrosodimethylamine and nitrosodiethylamine in water samples using solid phase extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry

### Lõputöö põhieesmärgid:

1. Metoodika valideerimine nitrosodimetüülamiini ja nitrosodietüülamiini määramiseks veeproovidest
2. Valideeritud metoodika rakendamine Eestist pärit joogi- ning heitvee proovide analüüsiks

### Lõputöö etapid ja ajakava:

Nr	Ülesande kirjeldus	Tähtaeg
1.	Katseline osa	02.-03.20
2.	Kirjanduse ülevaade	17.02.20
3.	Materjalid ja meetodid	16.03.20
4.	Tulemused ja arutelu	20.04.20
5.	Eessõna, sissejuhatus, kokkuvõte, summary	18.05.20

**Töö keel:** eesti keel

**Lõputöö esitamise tähtaeg:** "27" mai 2020.a

**Üliõpilane:** Lisett Kiudorv ..... "5" september 2019.a  
/allkiri/

**Juhendaja:** Juri Bolobajev ..... "5" september 2019.a  
/allkiri/

**Programmijuht:** Marina Trapido ..... "5" september 2019.a  
/allkiri/

# SISUKORD

EESSÕNA .....	6
Lühendite ja tähiste loetelu .....	7
SISSEJUHATUS .....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	9
1.1. Nitrosoamiinid .....	9
1.1.1. NDMA, NDEA ja NMOR omadused .....	9
1.1.2. Piirsaldused .....	10
1.1.3. Nitrosoamiinide teke .....	11
1.1.4. Nitrosoamiinide analüüs .....	13
1.2. Kromatograafilised meetodid .....	13
1.2.1. Gaasikromatograafia (GC) .....	13
1.2.2. Vedelikkromatograafia .....	15
1.3. Massispektromeetria (MS) .....	15
1.3.1. Ionisatsiooni meetodid .....	15
1.3.2. Massianalüsaatorite tüübid .....	18
1.3.3. MS Detektorid .....	21
1.4. Teised detektorid nitrosoamiinide analüüsil .....	22
1.4.1. Kemoluminestsents detektor ehk soojusenergia analüsaator (TEA) .....	23
1.5. Ekstraktsioon .....	23
1.5.1. Vedelik-vedelik ekstraktsioon .....	23
1.5.2. Tahkefaas ekstraktsioon (SPE) .....	24
1.6. Aktiivsüsi .....	25
1.7. Sisestandard .....	25
1.8. Metoodika valideerimise karakteristikud .....	26
2. MATERJALID JA MEETODID .....	27

2.1.	Analüüsiks kasutatud materjalide ning aparatuuri kirjeldus.....	27
2.1.1.	Kemikaalid .....	27
2.1.2.	Solvendid .....	27
2.1.3.	Aparatuur ja lisaseadmed .....	27
2.1.4.	Viaalide kalibreerimine ja nõude pesu .....	29
2.2.	Metoodika optimeerimine .....	30
2.2.1.	Proovide eeltöötlus tahke faas ekstraktsiooniga (SPE).....	30
2.2.2.	GC-MS analüüs .....	32
2.2.3.	Sisestandardid .....	35
2.3.	GC-MS kalibreerimine .....	35
3.	TULEMUSED JA ARUTELU .....	37
3.1.	Metoodika karakteristikud .....	37
3.1.1.	Selektiivsus .....	37
3.1.2.	Kalibreering .....	38
3.1.3.	Avastamispiir ja määramispiir .....	41
3.1.4.	Määramatus .....	43
3.1.5.	Saagis .....	45
3.1.6.	Maksumus .....	46
3.2.	Metoodika rakendamine .....	48
3.2.1.	Joogivee proovid .....	48
3.2.2.	Heitvee proovid.....	51
	KOKKUVÕTE .....	53
	SUMMARY.....	55
	KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	57

## EESSÕNA

Lõputöö teema sõnastati töö juhendaja Juri Bolobajevi algatusel. Töö kirjutamiseks vajalikud katsed teostati Tallinna Tehnikaülikooli keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia eriala õppe- ja teaduslaborites.

Aitäh AS Tallinna Veele ja AS Narva Veele joogivee proovide eest. Suur tänu juhendajale Juri Bolobajevile heade nõuannete ning kasulike tehnoloogiliste lahenduste eest.

Magistritöö raames valideeriti meetodika kahe nitrosoamiini- nitrosodimetüülamiini (NDMA) ja nitrosodietüülamiini (NDEA) kvantiseerimiseks veeproovides kasutades proovide eeltötluseks tahkefaasekstraktsiooni ning analüüsimiseks gaasikromatograafi ja elektronionistasiooniga kvadrupool massispektromeetrit. Valideeritud meetodikat rakendati Eesti joogi- ning heitvee proovide analüüsimiseks.

Nitrosoamiinid, vesi, GC-MS, SPE, magistritöö

## Lühendite ja tähiste loetelu

A- piigi pindala mass-kromatogrammil

APCI (*Atmospheric-pressure chemical ionization*)- keemiline ionisatsioon  
atmosfäärirõhul

C- kontsentratsioon (ng/l)

CI (*Chemical Ionization*)- keemiline ionisatsioon

DL (*Detection Limit*)- avastamiskiir

GC (*Gas Chromatography*)- gaasikromatograafia

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)- kõrgefektiivne  
vedelikkromatograafia

DMA (*Dimethylamine*)- dimetüülamiin

DMAB (*Dimethyl aminobenzene*)- dimetüülaminobenseen

DMFA (*Dimethylformamide*)- dimetüülformamiid

EI (*Electron Impact Ionization*)- elektronlöögi ionisatsioon

ESI (*Electrospray Ionisation*)- elektropihustus ionisatsioon

IARC (*International Agency for Research on Cancer*)- Rahvusvaheline  
Vähiuurimiskeskus

MRL (*Minimum Reporting Level*)- määramiskiir

MS (*Mass Spectrometry*)- massispektromeetria

NDMA (*Nitrosodimethylamine*)- nitrosodimetüülamiin

NDEA (*Nitrosodiethylamine*)- nitosodietüülamiin

NMOR (*Nitrosomorpholine*)- nitrosomorfoliin

s- standardhälve

SIM (*Selective Ion Monitoring*)- ionide valikkontroll

SPE (*Solid Phase Extraction*)- tahkefaas ekstraktsioon

SPME (*Solid Phase Microextraction*)- tahkefaas mikroekstraktsioon

TEA (*Thermal Energy Analyser*)- soojusenergia analüsaator

TIC (*Total Ion Current*)- ionide üldvoog

TMA (*Trimethylamine*)- trimetüülamiin

TOF (*Time of Flight*) analüsaator – lennuaja analüsaator

UPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)- ülikõrge efektiivsusega  
vedelikkromatograafia

WHO (*World Health Organization*)- Maailma Terviseorganisatsioon

## SISSEJUHATUS

Nitrosoamiinid on kantserogeensed mikrosaasteained, mis võivad madalates kontsentratsioonides (suurusjärgus  $\mu\text{g/l}$  või  $\text{ng/l}$ ) esineda joogivees, heitvees ning basseini vees. Mitmed riigid ning rahvusvahelised organisatsioonid on nitrosoamiinide maksimaalse kontsentratsiooni kohta joogivees teinud soovituslikke ning seaduslikke ettekirjutisi. Euroopa Liit ega Eesti pole veel nitrosoamiinide kontsentratsioonile vees piiranguid kehtestanud. Siiani puuduvad ka andmed, kas selliste piirangute kehtestamine oleks tarvilik või on olukord juba niigi kontrolli all.

Joogivette võivad nitrosoamiinid sattuda kas otse joogiveeallikast või vee töötlemise tulemusel. Põhiliseks joogiveeallika nitrosoamiinidega saastumise põhjuseks on vette juhitud reo- või heitvesi. Vee töötlemisel on põhilisteks nitrosoamiine tekitavateks protsessideks kloreerimine, klooramiinimine ning osoneerimine.

Reovette satub nitrosoamiine nii tööstus- kui ka olmereoveest. Suuremas koguses nitrosoamiine võib leida näiteks naha-, kummi- ning pestitsiidide tööstusest pärit reovees. Olmereovees on põhilisteks nitrosoamiinide tekitajateks puhastusvahendid, väljaheidet ning uriin. Sarnaselt joogiveele tekib nitrosoamiine heitvette ka vee töötlemisel.

Töö põhieesmärgiks oli valideerida meetodika kahe enamlevinud nitrosoamiini-nitrosodimetüülamiini (NDMA) ja nitrosodietüülamiini (NDEA) kvantitatiivseks analüüsiks veeproovides, toetudes EPA meetodikale 521. Magistritöö teiseks eesmärgiks oli valideeritud meetodikat rakendada Eestist pärit veeproovide analüüsiks.

Proovide kontsentreerimiseks kasutati tahkefaas ekstraktsiooni ning analüüsimiseks gaasikromatograafi ja elektronionisatsiooniga kvadrupool massispektromeetrit. Tahkefaas ekstraktsioon võimaldas proovis sisalduvaid nitrosoamiine kontsentreerida ning vabaneda potentsiaalsetest interferentsidest. Gaasikromatograafia (GC) kasutamine analüüsiks oli võimalik tänu analüütide lenduvusele. GC eraldas proovi komponendid üksteisest suurema selektiivsuse saavutamiseks. Massispektromeetri kasutamine detektorina andis kvalitatiivset ning kvantitatiivset informatsiooni madalas kontsentratsioonis esinevate analüütide kohta.

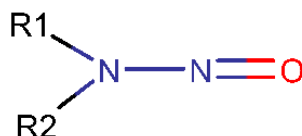
Valideeritud meetodikat kasutati kahest erinevast pinnaveest toodetud joogivee ning ühe heitvee analüüsimiseks.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Nitrosoamiinid

Nitrosoamiinid (joonis 1.1) on polaarsed enamasti vees lahustuvad ühendid [1]. Närilistega läbiviidud katsed on tõestanud, et enamikel nitrosoamiinidest on kantserogeensed omadused [2,3].



Joonis 1.1. Nitrosoamiini üldvalem

Nitrosoamiinide kantserogeensed omadused väljenduvad peale biokeemilist aktivatsiooni, milleks on enamasti  $\alpha$ -hüdrosüülimine. Reaktsiooni käigus tekkinud ebastabiilse ühendi lagunemisel moodustub agressiivne diasooniumioon, mis on võimeline DNA-d, RNA-d ja valke alküülama. [3]

### 1.1.1. NDMA, NDEA ja NMOR omadused

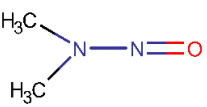
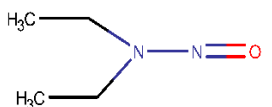
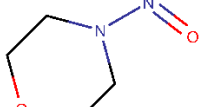
N-nitrosodimetüülamiin (NDMA) on toatemperatuuril vedel veega segunev kollase värvusega kergsüttiv aine. NDMA logaritmiline oktanool/vesi jaotustegur ( $\log K_{ow}$ ) on -0,57 ja molaarmass on 74 g/mol. NDMA keemispunktiks on  $\sim 153$  °C ning tiheduseks 1,0 g/ml. NDMA kuulub Rahvusvahelise Vähiuurimiskeskuse (IARC) klassifikatsiooni kohastel A2 vähiriskiga ainete gruppi, mis tähendab, et tegemist on tõenäoliselt inimestele kantserogeense ainega. Samasse gruppi kuulub veel 82 kemikaali [4,5]. [6,7]

N-nitrosodietüülamiin (NDEA) on toatemperatuuril vedel, veega segunev aine. NDEA molaarmass on 102 g/mol. NDEA nagu ka NDMA kuulub IARC klassifikatsiooni kohastel A2 vähiriskiga ainete gruppi [4,5]. [8]

N-nitrosomorfoliin (NMOR) on toatemperatuuril kristalliline (sulamispunkt 29 °C) aine. NMOR-i molaarmass on 116 g/mol. NMOR kuulub IARC klassifikatsiooni kohastel vähiriskiga ainete gruppi 2B. Gruppi 2B kuuluvad ained, millel on võib-olla kantserogeensed omadused [4,5]. [9,10]

NDMA, NDEA ja NMOR olulisemad füüsikalised ja keemilised omadused on kokkuvõtlikult toodud tabelis 1.1.

Tabel 1.1. NDMA, NDEA ja NMOR omadused

	NDMA	NDEA	NMOR
Keemiline struktuur			
Molaarmass (g/mol)	74 [7]	102 [8]	116 [9]
Sulamispunkt (°C)	-25 [7] või -50 [11]	<25	29 [10]
Keemispunkt (°C)	~153 [11]	177 [8]	224 [10]
logK <sub>ow</sub>	-0,57 [11]	0,48 [12]	-0,45 [10]
IARC klassifikatsioon	A2 [4,5]	A2 [4,5]	2B [4,5]
Tihedus (g/ml)	1,0 [7]	0,95 [8]	1,3 [13]
Keskmine surmav annus ehk LD50 (rottidel, suukaudselt) (mg/kg)	26 [14]	280 [15]	320 [15]

### 1.1.2. Piirsaldused

Eestis on nitrosoamiinide sisaldusi määratud erinevates toiduproovides, kusjuures kõrgemad sisaldused on leitud liha- ja kalatoodetest [16]. Siia maani puuduvad andmed nitrosoamiinide sisalduse kohta Eesti joogi- ning heitvees.

Euroopa Liidus ega Eestis pole joogi- ja heitvees nitrosoamiinide kohta piirsaldusi kehtestatud. Enamgi veel, kui enne Euroopa Liiduga liitumist kehtisid Eestis NDMA ja NDEA summaarse sisalduse piirnormid mõningate toiduainete kohta, näiteks võis kalatoodetes nimetatud nitrosoamiinide sisaldus küündida kuni 3 µg/kg ning suitsulihas kuni 4 µg/kg, siis peale Euroopa Liiduga liitumist need piirnormid tühistati. [16]

Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) poolt loodud joogivee kvaliteedijuhiste kohaselt peaks NDMA kontsentratsioon joogivees jääma alla 0,1 µg/l (ehk alla 100 ng/l) [17]. Mitmed riigid (ja USA osariigid) on omaltpoolt kehtestanud piirnormid NDMA ning NDEA sisaldustele joogivees (tabel 1.2).

Tabel 1.2. NDMA ja NDEA piirnormid joogivees

	NDMA piirnorm (ng/l)	NDEA piirnorm (ng/l)
WHO*	100 [17]	-
Kanada	40 [18]	-
Inglismaa ja Wales	200 [19]	-
Austraalia	100 [20]	-
US EPA*	7 [21]	2 [21]
Massachuset*	10 [22]	-
Minnesota (USA)*	5 [23]	-
California (USA)*	300 [24]	100 [24]

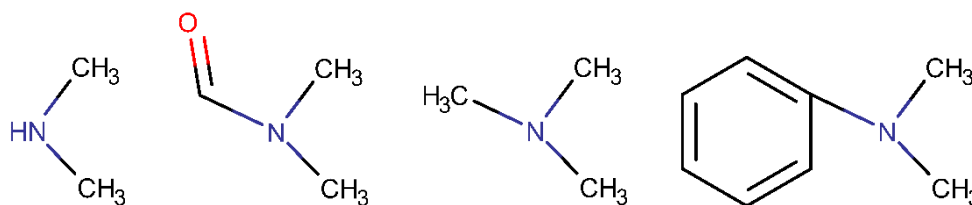
\*soovituslikud piirnormid

### 1.1.3. Nitrosoamiinide teke

NDMA kontsentratsioonid joogivees on enamasti kuni 180 ng/l. Nitrosoamiinide kontsentratsioonid heitvees võivad olla aga mitu suurusjärku suuremad. [25]

Nitrosoamiinid tekivad erinevate mehhanismide järgi olenevalt olemasolevatest prekursoritest ning keskkonna tingimustest. Nitrosoamiinid võivad moodustuda sekundaarsetest ja tertsiaalsetest amiinidest lämmastikhappe juuresolekul. [26]

Kõige levinumaks nitrosoamiiniks on NDMA, mille prekursoriteks on dimetüülamiin (DMA), dimetüülformamiid (DMFA), trimetüülamiin (TMA) ja dimetüülaminobenseen (DMAB) (keemilised struktuurid toodud joonisel 1.2). [27]



Joonis 1.2. Vasakult paremale DMA, DMFA, TMA ja DMAB keemilised struktuurid

Põhilised NDEA prekursorid on hüdrofiilsed madala molekulmassiga orgaanilised ühendid [28].

### Nitrosoamiinide teke veepuhastusprotsessis

Joogivette võib nitrosoamiine sattuda otse joogiveeallikast või need võivad tekkida vee töötlemisel [29]. Veepuhastusprotsessis võivad nitrosoamiinid moodustuda osoneerimisel, kloreerimisel ja klooramiinimisel [30]. Nitrosoamiinide teket on seostatud ka amiinipõhiste polümeeride (kasutatakse koagulandina) ja anioonvahetusvaikude kasutamisega veepuhastusprotsessides [31].

Klooramiini kasutamisel vee desinfitseerimiseks esineb vees nii monoklooramiini kui ka diklooramiini. Üks võimalik NDMA tekkemehhanism on diklooramiini reageerimisel dimetüülamiiniga, kui NDMA tekib läbi kloreeritud ebasümmeetrilise dimetüülhüdrasiini vaheühendi. [30]

Suurem nitrosoamiinide kontsentratsioon joogiveses võib olla tingitud ka joogiveeallika saastumisest nitrosoamiinidega. Saastumine võib toimuda, kui joogiveeallikasse suunatakse heitvett või kui heitvett kasutatakse otse joogivee tootmiseks. Põhjavee saastumine võib toimuda, kui pinnasesse satub reovett või ebasümmeetrilise dimetüülhüdrasiini põhise raketi kütust. [32,33]

Vee nitrosoamiinide eemaldamine on keerukas ning kallis ülesanne. Nitrosoamiinid on hüdrofiilsed (adsorptsioon aktiivsöele ja teistele sorbentidele on madal) ning pole eriti lenduvad (õhu läbi puhumine ei ole efektiivne). Nitrosoamiinide lagundamiseks joogiveses on osutunud efektiivseks UV-kiirguse kasutamine koos vesinikperoksiidi lisamisega. [30]

Vähendades vees nitrosoamiinide prekursorite sisaldust enne vee desinfitseerimist, saab nitrosoamiinide teket takistada. Nitrosoamiinide prekursorite eemaldamiseks on tõhusaks meetodiks sorptsioon kasutades aktiivsöe pulbrit või graanuleid. [30]

### **Nitrosoamiinide teke reovees ning reoveepuhastusprotsessis**

Nitrosoamiinid võivad heitvette tekkida munitsipaalreoveest, tööstuslikust reoveest või reovee puhastusprotsessist. Kõrgemad nitrosoamiinide sisaldused on tuvastatud reoveest, mis pärineb kummitööstusest, naha tööstusest, pestitsiidide tootmisest, toiduainete töötlemisest ja valukodadest [6]. Munitsipaalreovees on nitrosoamiinide ning nitrosoamiinide prekursorite põhilisteks allikaks pesuvahendid (nt šampoon ja seep), uriin ja väljaheited. [34]

Reoveetöötlusprotsessis on nitrosoamiinide üheks tekkepõhjuseks dimetüülamiini põhiste katioonsete polümeeride kasutamine [35]. Sarnaselt joogivee tootmisprotsessile on ka heitvee tootmisel potentsiaalselt nitrosoamiine tekitavateks protsessideks osoneerimine ja klooramiinimine. [34]

### **Nitrosoamiinide teke basseini vees**

Basseinivees esineb mitmeid lämmastikku sisaldavaid orgaanilisi ühendeid, mis võivad toimida nitrosoamiinide prekursoritena. Nitrosoamiinide teket soodustavad ka

kasutatavad desinfitseerimise meetodid - kloreerimine ja UV-kiirguse rakendamine. Kuigi UV-kiirgust on kasutatud ka nitrosoamiinide lagundamiseks, on basseini vees efekt enamasti vastupidine nitrosoamiinide prekursorite rohkuse tõttu. [36–38]

#### **1.1.4. Nitrosoamiinide analüüs**

Nitrosoamiinide analüüsil kasutatakse enamasti gaasikromatograafiat (GC) või vedelikkromatograafiat (enamasti HPLC või UPLC) koos (sageli tandem) massispektromeetriaga (MS). Kromatograafia koos massispektromeetriaga sobib nitrosoamiinide analüüsimiseks, sest nitrosoamiine leidub proovides enamasti vaid väga madalates kontsentratsioonides, mistõttu on oluline tundliku tuvastamis- ning kvantiseerimismeetodi olemasolu. Lisaks nitrosoamiinidele leidub aga analüüsitavates proovides palju kõrgemas kontsentratsioonis mitmeid teisi ühendeid, mis võivad analüüsi segada. Kromatograafilised meetodid aitavad interferendid analüüdist eraldada ning tänu massispektromeetrile on võimalik madalaid analüüdi kontsentratsioone usaldusväärselt tuvastada ja kvantiseerida. [39,40]

Ainult kromatograafi ja massispektromeetri abil saavutatav tundlikkus pole enamasti madalate nitrosoamiini sisalduste analüüsimiseks piisav. Tundlikkuse ning selektiivsuse suurendamiseks kontsentreeritakse proove kromatograafilise analüüsi eel. Levinuimateks kontsentreerimise meetoditeks on seejuures tahkefaas ekstraktsioon ning tahkefaas mikroekstraktsioon. [39,40,41]

Lisaks massispektromeetrile on kromatograafilise eraldamise järgselt detektorina kasutatud ka kemoluminestsentsi detektorit ehk soojusenergia analüsaatorit (TEA) [42–44]. Kuigi TEA on nitrosoamiinide suhtes suure tundlikkusega, on tegemist vähem kasutatava meetodiga selle piiratud kasutusala ning analüsaatorite kalli hinna tõttu [45].

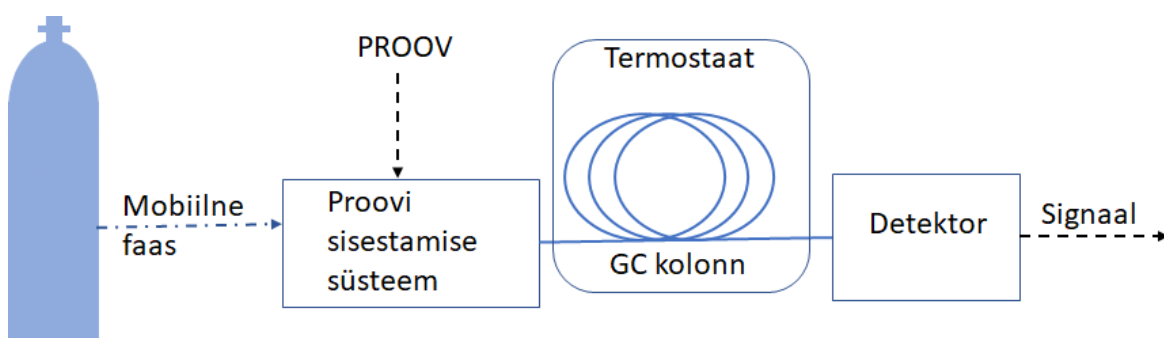
## **1.2. Kromatograafilised meetodid**

### **1.2.1. Gaasikromatograafia (GC)**

Gaasikromatograafia sobib lenduvate ja termiliselt vastupidavate keemiliste ühendite (kaasaarvatud lenduvate nitrosoamiinide) analüüsimiseks. Gaasikromatograaf ei sobi

proovide analüüsimiseks, mis sisaldavad vähe-lenduvaid, ioonseid või kõrge molekulmassiga ühendeid. [46]

**Gaaskromatograafiline analüüs algab proovi süstimisega kolonni** (joonis 1.3). Proovi võib süstida nii manuaalselt kui kasutades automatproovivõtjat. Süstimine võib toimuda kas eelneva aurustamisega või otse kolonni. Aurustamisega süstimise puhul võib kolonni suunata kas kogu süstitud proovi (*spiltless*) või ainult kindla osa sellest (*split*). Proovi koguse vähendamist kasutatakse enamasti kõrgete analüüdi kontsentratsioonide puhul. Otse kolonni süstides toimub komponentide aurustamine kolonni kuumutamise käigus, mis võimaldab analüüsida ka termiliselt ebastabiilseid ühendeid. Samas võib see põhjustada kolonni saastumist, kui proov sisaldab mittelenduvaid komponente. [46,47]



Joonis 1.3. GC lihtsustatud skeem

**Analüütide eraldamine toimub gaasikromatograafi kolonnis.** Gaasikromatograafi kolonni puhul on enamlevinud statsionaarseks faasiks polaarsed ja mittepolaarsed vedelikud ning polümeerid. Mittepolaarse statsionaarse faasi puhul sõltub analüüdi retentsiooniaeg põhiliselt analüüdi lenduvusest, kusjuures suurema lenduvusega analüütide (madalam keemispunkt) retentsiooniaeg on lühem kui vähem lenduvatel (kõrgem keemispunkt) analüütidel. Polaarse statsionaarse faasi puhul mõjutab peale lenduvuse analüüdi retentsiooniaega ka analüüdi polaarsus. [46]

GC-s on mobiilseks faasiks inertne gaas - enamasti heelium, lämmastiku ja vesiniku kasutamine on vähem levinud. Gaasikromatograafi kapillaarkolonnide pikkus võib ulatuda viiest kuni saja meetrini, kusjuures mida pikem on kromatograafi kolonn, seda parem komponentide lahutuvus on saavutatav. Samas pikeneb ka proovi analüüsimiseks kuluv aeg ning suureneb mobiilsele faasile rakenduva surve kadu pikki kolonni. Kõige levinumaks kolonni pikkuseks on 30 meetrit. [46]

## 1.2.2. Vedelikkromatograafia

**Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia** (HPLC) on sarnaselt gaasikromatograafiale proovi komponentide eraldamise meetod. HPLC mobiilseks faasiks on vedelik ning statsionaarse faasina kasutatakse tahket materjali või poorse materjaliga füüsikaliselt seotud vedelikku. [48]

Eraldatakse normaalfaas, pöördfaas, ionvahetus, suuruseraldus ja hüdrofiilsete interaktsioonide vedelikkromatograafiat. Tänapäeval on enimkasutatavaks pöördfaas vedelikkromatograafia. [49]

Pöördfaaskromatograafia puhul kasutatakse mobiilse faasina polaarset vedelikku või vedelike segu (nt vesi ja atsetonitril) ning statsionaarse faasina mittepolaarse kattega tahkiseid. Komponentide eraldatus saavutatakse hüdrofoobsuse alusel - mida hüdrofoobsem on molekul, seda kauemaks jääb see kolonni ehk seda pikem on selle retentsiooniaeg. Erinevalt GC-st ei eelda HPLC analüüdi lenduvust, mistõttu saab HPLC-d kasutades analüüsida ka suure molekulmassiga ja mittelenduvaid ühendeid. [50]

**Ülikõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia** (UPLC) põhimõte on sama, mis kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafial, kuid tänu väiksematele statsionaarse faasi osakestele ning suuremale mobiilse faasi lineaarkiirusele saavutatakse kõrgem resolutsioon ning tundlikkus väiksema ajaga. [51]

## 1.3. Massispektromeetria (MS)

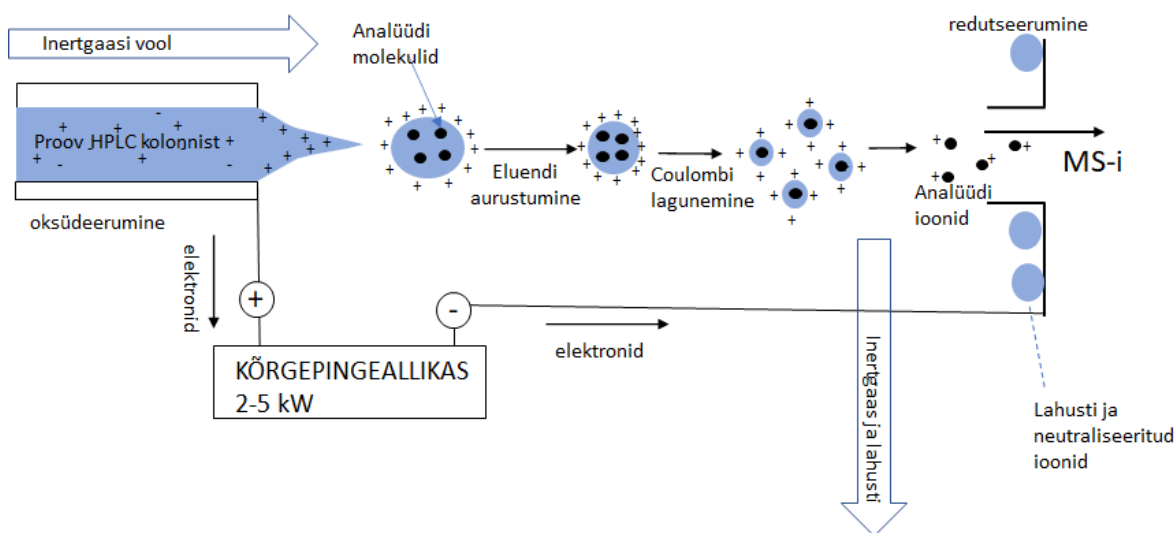
Massispektromeetria võimaldab tundmatu proovi komponente (kaasaarvatud nitrosoamiine) identifitseerida ning kvantiseerida. Enamasti kasutatakse massispektromeetrid suurema selektiivsuse saavutamiseks peale komponentide kromatograafilist eraldamist. Massispektromeetrid koosnevad iooniallikast, massi analüsaatorist ja detektorist [52]. [53]

### 1.3.1. Ionisatsiooni meetodid

Proovi komponentide ioniseerimine toimub ioonallikas. GC-MS puhul kasutatakse ioniseerimiseks enamasti elektronionisatsiooni (EI) või keemilist ionisatsiooni (CI).

HPLC-MS puhul on levinud ionisatsiooni meetodiks elektropihustus ionisatsioon (ESI). [54]

**Elektropihustus ionisatsioon (ESI)** on nõrke ionisatsiooni meetod, mis võimaldab analüüsida ka makromolekule. ESI puhul rakendatakse aeglaselt voolavale vedelikule (proovile) kõrget pinget, mille tulemusel proov pihustub. Proovi pihustumisele aitab kaasa ka samasuunaliselt liikuv inertse gaasi vool. Kõrge pinge ning tilkade kuivamise tulemusel vabanevad ioonid, mis juhitakse edasi massianalüsaatorisse (joonis 1.4). [55]



Joonis 1.4. ESI põhimõtteline skeem

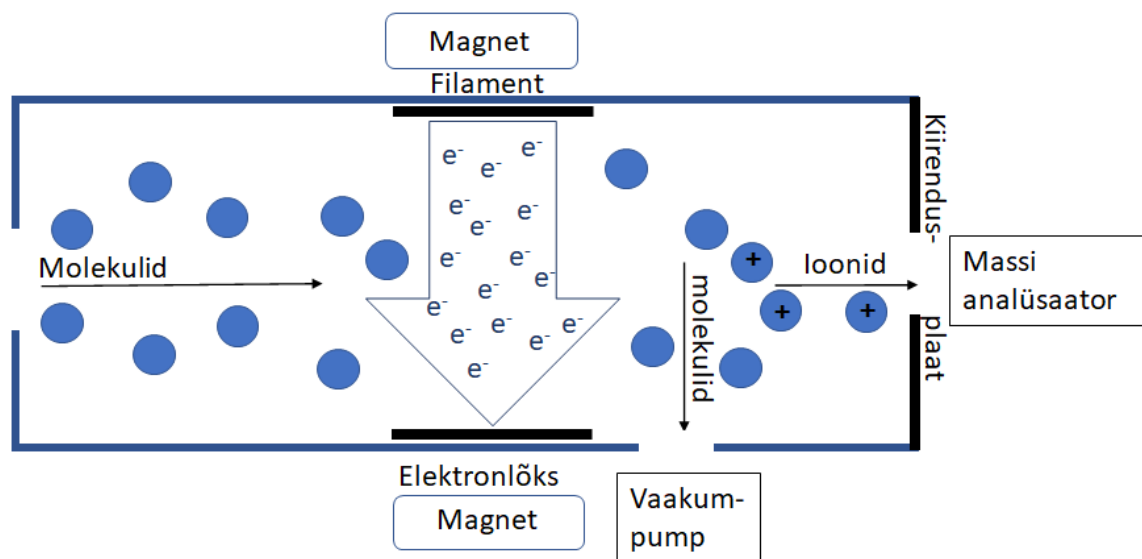
**Nano-elektropihustusionisatsiooni (nano-ESI-t)** kasutatakse proovide massispektromeetriliseks analüüsiks ilma eelneva proovi komponentide kromatograafilise eraldamiseta. Nano-ESI eeliseks on, et see võimaldab analüüsida vaid ühe-kahe mikrolitri suuruseid proove. [56]

Nano-ESI on kasutatud ka nitrosoamiinide analüüsiks [57].

**Elektronionisatsiooni (EI-d)** kasutatakse enamasti GC-MS süsteemides. EI puhul hakkab filamendilt kõrge pinge ning temperatuuri mõjul elektrone eralduma (joonis 1.5). Eralduvaid elektrone kiirendatakse läbi proovi anoodi suunas. Proovi molekulidega põrkudes kandub osa elektroni kineetilisest energiast edasi neutraalsele osakesele. Kui see energia on suurem osakese ionisatsiooni energiast, siis tekib neutraalsest osakesestioon. Tekkinud iooni laeng sõltub seejuures osakesele edastatud energia hulgast. EI on tugev ionisatsiooni meetod, mis tähendab, et enamik molekule fragmenteeruvad



elektronidega kokkupõrgetes ning molekulaarioone tekib vähe. Fragmentide teke on kasulik saamaks informatsiooni molekulide struktuuri kohta. [52,58]



Joonis 1.5. EI skeem

Enamasti on molekuli ionisatsiooni energia 7-14 eV. Selleks, et elektron, mis kannab vaid minimaalset ionisatsiooni energiat suudaks molekuli ioniseerida peaks kogu elektroni kineetiline energia molekulile üle kanduma. Enamasti kandub vaid mingi osa energiast molekulile edasi, mistõttu on ioniseerimise efektiivsus madal. Kui elektroni kineetiline energia on aga liiga kõrge, siis suureneb elektroni lainepikkus sedavõrd, et molekulid muutuvad selle jaoks nähtamatuks. Kui elektroni kineetiline energia on 70 eV, siis on selle de Broglie lainepikkus lähedane sideme pikkusele molekulis (suurusjärgus 0,1 nm) ning molekulide ioniseerimise ning fragmenteerimise efektiivsus maksimaalne. Filamendile rakendatakse -70 eV suurust pinget, et see hakkaks emitteerima 70 eV kineetilise energiaga elektrone. Molekulide identifitseerimiseks saab kasutada massispektrite andmebaase, sest need on enamasti mõõdetud samadel tingimustel. [52,58–60]

EI on efektiivsem molekulide ioniseerimisel, millel on nõrgemini seotud elektrone. Enamasti sisaldavad sellised molekulid n-sidemeid ja/või aatomeid, millel on vabad elektronid. EI massispektrid on hea korratavusega, mis võimaldab välja töötada massispektrite andmebaase. Andmebaasi kasutades on võimalik teatud tõenäosusega proovi komponente identifitseerida. Seejuures tuleks aga arvesse võtta ka proovi päritolu ning andmebaaside mittetäielikkust. [58,59]

**Keemiline ionisatsioon (CI)** on pehme ionisatsiooni meetod, mis tähendab, et ionisatsioon ei põhjusta enamasti molekulide ulatuslikku fragmenteerumist, mis võimaldab määrata tundmatu ühendi molekulmassi. [58]

CI-MS-i kasutatakse põhiliselt koos GC-ga. CI puhul täidetakse ionisatsiooni kamber reaktiivgaasiga (enamasti metaan). Reaktiivgaas ioniseeritakse EI meetodil. Ioniseerunud reaktiivgaasi osakesed reageerivad analüüdi molekulidega ja ioniseerivad analüüdi. Kasutades reagentgaasi vaheetappi väheneb ioniseerimisel ülekantava energia hulk, mistõttu väheneb analüüdi fragmenteerumine. [58]

**Keemilist ionisatsiooni atmosfäärirõhul (APCI-d)** kasutatakse peamiselt HPLC-MS süsteemides. APCI toimib sarnasel põhimõttel kui CI - analüüdi ioonid saadakse ioniseeritud reagentgaasi molekulide reageerimisel analüüdiga. Vedelikkromatograafist väljuv proov koos mobiilse faasiga pihustatakse pneumaatilist nebulisaatorit ja inertse gaasi (enamasti lämmastiku) voogu kasutades ionisatsioonikambrisse. Ionisatsioonikambris aurustatakse mobiilne faas ja proov kõrgel temperatuuril (meetod ei sobi termiliselt ebapüsivale analüüdile). Koroonalahenduse abil solvent ioniseeritakse. Ioniseeritud solvent reageerib analüüdiga tekitades analüüdi ioonid. [52,58,61]

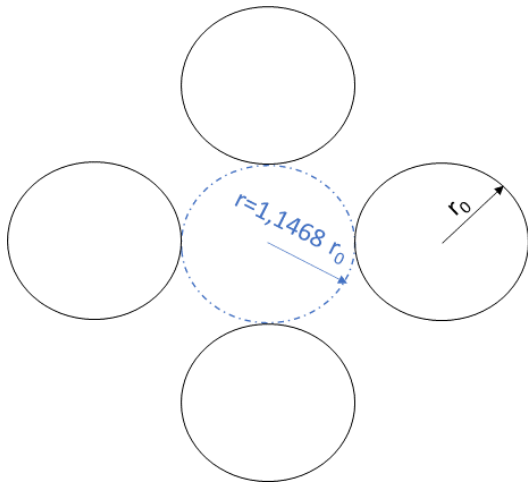
### 1.3.2. Massianalüsaatorite tüübid

Massianalüsaator eraldab ioonid ruumis või ajas massi-laengu suhte alusel elektri- ja/või magnetvälja abil. [52]

**Magnetsektoriga massianalüsaatori** puhul antakse ionidele impulss ning need suunatakse sektorikujulisse magnetisse. Sõltuvalt iooni laengust ning impulsist on see magneti poolt erineval määral mõjutatud. Raadius, millega ioon magnetsektorit läbib, on määratud iooni massi/laengu suhtega. [62]

**Lineaarne kvadrupool** massianalüsaator koosneb neljast paralleelsest vardast. Ideaalis võiks need vardad olla paraboolse ristlõikega, kuid sageli kasutatakse ringikujulise ristlõikega vardaid, mille raadius ( $r$ ) on 1,1468 korda väiksem kui kvadrupooli välja raadius ( $r_0$ ) (joonis 1.6). Varrastele rakendatakse nii alalis- kui ka vahelduvpotentsiaali, kusjuures vastastikku paiknevatele varrastele rakendatav alalispotentsiaal on samalaenguline ning kõrvuti asetsevatele varrastele vastaslaenguline. Varrastele rakendatav vahelduvpotentsiaal on sama amplituudiga ja kõrvuti asetsevatel varrastel erimärgiline. Vahelduvpotentsiaali sageduseks on enamasti umbes 1,2 MHz [63]. Massispektri mõõtmiseks muudetakse vahelduvpotentsiaali ning

alalispotentsiaali väärtusi, jättes nende suhte muutumatuks. Valides sobiva alalispotentsiaali väärtuse ning vahelduvpotentsiaali amplituudi, juhitakse massianalüsaatorisse vaid kindla massi/laengu suhtega ioonid, kõik ülejäänud ioonid neutraliseeritakse varrastel. [64,65]



Joonis 1.6. Kvadrupooli ristlõige

Ioonide liikumist läbi kvadrupool massianalüsaatori saab kirjeldada Mathieu võrrandiga (võrrand 1.1). [66]

$$m \frac{d^2 u}{dt^2} = \frac{-m\Omega^2}{4} (a_u - 2q_u \cos \Omega t) u \quad (1.1)$$

m- iooni mass

u- asukoht koordinaatteljel

t- aeg

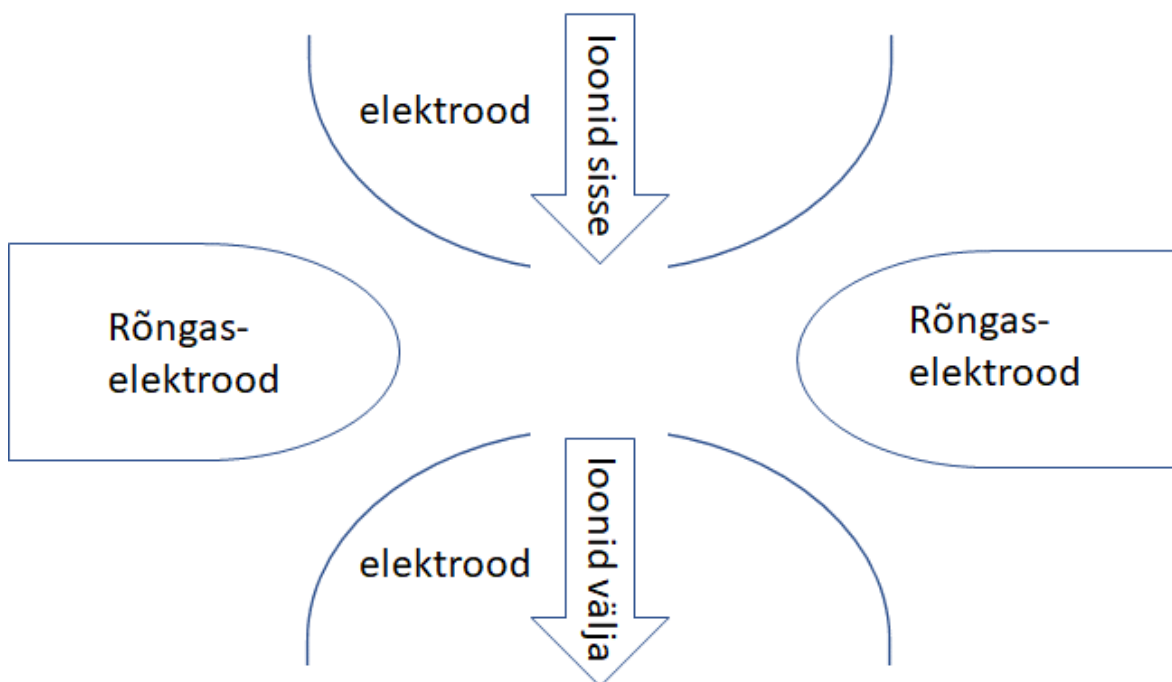
$\Omega$ - vahelduvvoolu sagedus

$a_u$ - püünisparameeter

$q_u$ - püünisparameeter

Võrreldes magnetsektor massianalüsaatoriga on kvadrupool massianalüsaatorid odavamad, kergemad ja kiiremad, kuid neil on madalam (enamasti vaid ühikuline) massieraldusvõime. [58,65]

**3D ioonlõks** sarnaneb oma tööpõhimõttelt kvadrupoolile - ioonide seleksioon toimub vahelduvpotentsiaali ning alalispotentsiaali koostoimel. Ioonlõks on alarõhul täidetud heeliumiga ning koosneb rõngaselektroodist ja kahest ellipsikujulisest elektroodist (joonis 1.7). Elektroodidele rakendatava alalis- ning vahelduvpotentsiaali toimel väljuvad ioonlõksust kindlal ajahetkel vaid defineeritud massi-laengu suhtega ioonid. [52,58]



Joonis 1.7. Ioonlõksu läbilõikeline skeem illustreerimaks elektrodide paiknemist

**Lennuaja (TOF) analüsaatoris** rakendatakse ioonidele nende kiirendamiseks potentsiaali, kusjuures suurema laenguga ioonid hakkavad potentsiaali toimel kiiremini liikuma kui madalama laenguga ioonid. Ioonide eraldus toimub ka massi alusel, sest konstantse potentsiaali toimel liiguvad raskemad ioonid aeglasemalt kui kergemad. Ioonide massi/laengu suhted määratakse aja põhjal, mis kulub neil analüsaatori läbimiseks. TOF analüsaatorid on leidnud kasutatust ka nitrosoamiinide analüüsiks. [57,67]

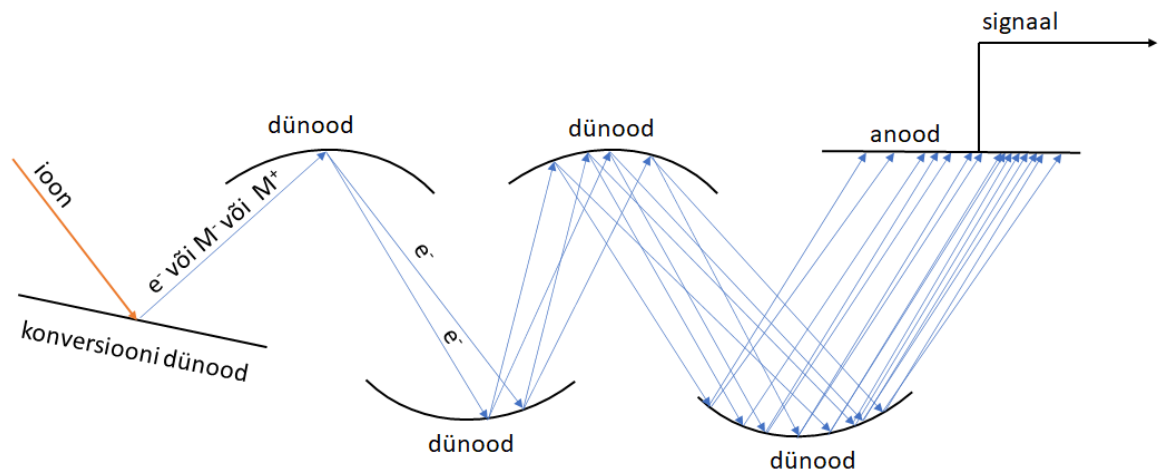
**Tandem massispektromeetria ehk MS/MS** võimaldab võrreldes ühekordse MS-ga teadaolevat analüüti suurema kindlusega tuvastada ning annab olulist lisainformatsiooni tundmatu komponendi kindlakstegemiseks. Sarnaselt ühekordsele MS-le kasutatakse tandem MS enamasti koos GC või HPLC-ga. [52]

MS/MS puhul kasutatakse ioonide massispektrometrilist määramist kahel järjestikusel korral. Tandem MS võib toimuda ajas või ruumis. Ajas toimuva MS/MS puhul kasutatakse sama massianalüsaatorit korduvalt. Ruumis toimuva MS/MS analüüsi korral on vajalik kahe järjestikku ühendatud massispektromeetri olemasolu. [52]

Selleks, et mitmekordne massianalüsaatori kasutamine uut informatsiooni annaks, peab peale esimest MS-i kasutamist muutuma analüüsivate ioonide massi-laengu ( $m/z$ ) suhe. Enamasti toimub ioonide  $m/z$  suhte muutumine fragmentatsiooni tõttu. [52]

### 1.3.3. MS Detektorid

Massianalüsaatori enimkasutatavaks detektoriks on elektronkordisti. Eristatakse diskreetse ja pideva dünoodiga elektronkordisteid. Diskreetne elektronkordisti koosneb vaakumis olevatest metallist või pooljuhtivast materjalist enamasti kausikujulistest dünoodidest (joonis 1.8). Konversiooni dünoodile rakendatakse detekteeritavate osakeste laenguga vastasmärgilist potentsiaali. Positiivsed osakesed põhjustavad dünoodilt negatiivsete osakeste emissiooni ning negatiivsed osakesed vastupidi positiivsete osakeste emissiooni. Konversiooni dünoodi emiteeritud laenguga osakesed muutuvad esimese dünoodiga põrkudes elektronideks. Kusjuures iga dünoodiga põrkuv laenguga osake põhjustab dünoodilt mitme elektroni emiteerumise. Sekundaarsed elektronid suunatakse edasi järgmisele dünoodile, kust emiteerub jällegi iga põrkuva elektroni kohta mitu elektroni. Peale mitmekordset dünoodidega põrkumist registreeritakse sekundaarelektronide poolt tekitatud elektrivool anoodil. [52]



Joonis 1.8. Diskreetse elektronkordisti põhimõtteline skeem

Pideva elektronkordisti puhul on diskreetsed dünoodid asendatud pideva dünoodiga. Tööpõhimõttelt on pidev elektronkordisti analoogne diskreetse elektronkordistiga. Kujult võivad pidevad elektronkordistid olla torukujulised või trompetit meenutava kujuga. [52]

Elektronkordisti kasutamine võimaldab signaali suurendada umbes miljon korda. [68]

### **1.3.1. MS kromatograafia detektorina**

Massispektromeetria kasutamine kombinatsioonis gaasi- või vedelikkromatograafiaga võimaldab analüüsida madalaid analüüdi kontsentratsioone ka kompleksete ainete segudest. [58]

Analüüsi tulemusel saadakse mass-kromatogramm. Mass-kromatogrammi registreerimiseks võib kasutada kas ionide valikkontrolli (SIM) või skannerivat (TIC) režiimi. Skanneeriv mass-kromatogramm on väga kasulik tundmatute proovide koostise uurimiseks ehk kvalitatiivseks analüüsiks. SIM režiimi võiks suurema tundlikkuse tõttu eelistada kvantitatiivses analüüsis. Mass-kromatogrammi x-teljel on aeg, mis kulub ionidel kromatograafi kolonni läbimiseks ja y-teljel kujutatakse ionide signaalide summaarset (skanneeriv režiim) või individuaalseid (SIM) intensiivsuseid. [58]

Kasutades skanneerivat režiimi on võimalik mass-kromatogrammil olevaid piike integreerides näha, millise massi-laengu suhtega ionidest on piigid põhjustatud ehk näha mass-spektrit. Kasutades mass-spektrite andmebaasi on võimalik proovis esinevaid komponente identifitseerida. SIM režiimis seevastu ei mõõdata üldist mass-kromatogrammi, registreeritakse vaid eelnevalt defineeritud massi/laengu suhetega ionide signaalid ajas. [69]

## **1.4. Teised detektorid nitrosoamiinide analüüsil**

MS kasutamine kromatograafia detektorina võimaldab isegi madalas kontsentratsioonis analüüte suure kindlusega tuvastada ning kvantiseerida. Siiski on lisaks MS-le nitrosoamiinide analüüsiks kasutatud ka mitmeid teisi detektoreid. Näiteks on rakendatud leekionisatsiooni detektorit (FID), mis mõõdab seda läbiva süsiniku hulka [70]. Samuti on kasutatud lämmastiku-fosfori detektorit, millel on kõrgem tundlikkus lämmastiku, fosfori ja halogeenide aatomite suhtes [71].

Edukamatest katsetustest vääraks ära märkimist kemoluminestsents detektor ehk soojusenergia analüsaator (TEA). Siiski pole TEA kasutamine nitrosoamiinide analüüsiks eriti populaarseks osutunud, sest tegemist on piiratud kasutusala ning suhteliselt kalliga aparatuuriga. [45]

### **1.4.1. Kemoluminestsents detektor ehk soojusenergia analüsaator (TEA)**

TEA-d kasutatakse nitrosoamiinide analüüsimisel peale kromatograafi (enamasti GC-d või HPLC-d) komponentide kvantiseerimiseks. TEA sobib ainult lämmastikku sisaldavate ühendite analüüsimiseks. Kromatograafist elueeruvad komponendid pürolüüsitakse. Pürolüüsi tulemusel ühendid lagunevad ning nitroso-rühmast tekib nitrosüülradikaal ( $\bullet\text{NO}$ ). Nitrosüülradikaal suunatakse edasi reaktsioonikambrisse, kus reaktsioonil osooniga tekib ergastatud lämmastikdioksiid ( $\text{NO}_2^*$ ). Ergastunud lämmastikdioksiidi üleminekul normaalolekusse kiirgub kindla lainepikkusega valguskvant, mis registreeritakse fotoelektronkordisti abil. Olenevalt temperatuurist saab TEA detektorit kasutada kas ainult nitroso-ühendite või kõiki lämmastikku sisaldavate ühendite kvantiseerimiseks. [42–44]

## **1.5. Ekstraktsioon**

Nitrosoamiinide analüüsil kasutatakse sageli proovi eeltötluseks ekstraktsiooni, et proovi kontsentreerida ja vabaneda ebasoovitavatest lisanditest. Nitrosoamiinide analüüsil on kasutatud nii vedelik-vedelik ekstraktsiooni [72], tahkefaas ekstraktsiooni [39] kui ka tahkefaas mikroekstraktsiooni [41].

### **1.5.1. Vedelik-vedelik ekstraktsioon**

Vedelik-vedelik ekstraktsioon põhineb analüüdi jaotumisel proovi maatriksi (vedelik) ja ekstrahendi vahel. Meetod eeldab ekstrahendi olemasolu, millesse analüüt jaotub piisaval määral, kuid mis ei lahustu proovi maatriksis. Sellise ekstrahendi leidmine on sageli problemaatiline. Meetodi puuduseks on ka suur ekstrahendi kulu, sest ekstraktsioon viiakse enamasti läbi mitmeastmelisest. [73]

Vedelik-vedelik ekstraktsiooni on kasutatud nitrosoamiinide analüüsimiseks reovees/heitvees, õlles ja teistes maatriksites. Ekstrahendina kasutati seejuures diklorometaani. Vee jäägid eemaldati orgaanilisest lahustist naatriumsulfaadiga. Olenevalt proovi maatriksist ja nitrosoamiinide kontsentratsioonidest on vedelik-vedelik ekstraktsiooniga saavutatud nii keskpäraseid (~60%) kui ka 100%-lähedasi saagiseid. [72]

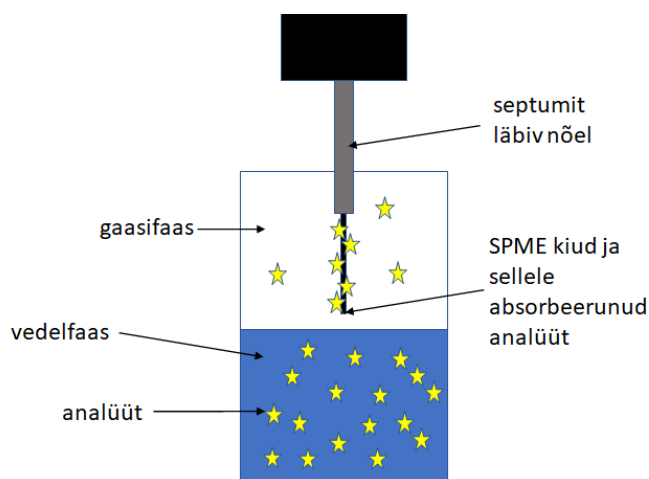
## 1.5.2. Tahkefaas ekstraktsioon (SPE)

Tahkefaas ekstraktsiooni puhul sorbeerub proovis sisalduv analüüt tahketele osakestele. SPE eeliseks vedelik-vedelik ekstraktsiooni ees on, et tegemist ei ole tasakaalulise protsessiga. Tänu sellele on võimalik saavutada suuremaid saagiseid väiksema solvendi kuluga. [74]

Tahkefaasekstraktsiooni kasutatakse põhiliselt kas proovi puhastamiseks interferentidest ja/või proovi kontsentreerimiseks. Üldiselt koosneb SPE protseduur padruni konditsioneerimisest, analüütide ekstraktsioonist SPE padrunisse, interferentide väljapesemisest padrunist (ei kasutata alati) ning analüüdi padrunist elueerimisest. Harvemini kasutatakse SPE metoodikat, mille kohaselt adsorbeeritakse interferendid padrunisse ning analüüt läbib padrunit. [75]

Eristatakse normaalfaas, pöördfaas, ionvahetus ja suuruseralduse põhimõttel töötavaid SPE sorbente. Nitrosoamiinide kontsentreerimiseks on põhiliselt kasutatud pöördfaas SPE-d kookoskoorest valmistatud poorse aktiivsöe täidisega padrunitega [76]. Proovi läbi padruni juhtimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid: alarõhku, tsentrifugaaljõudu, gravitatsiooni ja ülerõhku. [75]

**Tahkefaas mikroekstraktsioon (SPME)** on solvendivaba meetod lenduvate analüütide kontsentreerimiseks. Kiud SPME seadeldis on põhimõtteliselt õõnsa nõelaga süstal, mille sees paikneb haprast kvartsklaasist analüüdile sobiliku polümeerkattega kiud (joonis 1.9). SPME kiud viiakse kas otse vedelasse proovi või prooviga tasakaalus olevasse gaasifaasi. Kui kiule on sorbeerunud piisavalt analüüti, eemaldatakse kiud proovist ning sisestatakse otse gaasikromatograafi süstimiskabrisse. [77–79]



Joonis 1.9. SPME skeem



## 1.6. Aktiivsüsi

Aktiivsüsi on levinud adsorbent. Adsorptsioon aktiivsöele toimub tänu van der Waalsi jõududele. Aktiivsöe tootmisel on väga oluline toormaterjali stabiilsus, et tagada produkti pooride eesmärgilised karakteristikud. Pooride kuju ning suurus määravad aktiivsöe kasutusvõimalused. Aktiveeritud söe baasmaterjalideks kasutatakse näiteks koksi, kivisütt, kookoskoori, puitu, kõrvitsaid, bambust ja männikäbisid. Esmalt toormaterjal karboniseeritakse kõrgel temperatuuril (700-1000 °C) inertses atmosfääris. [76,80]

Saadud söe aktiveerimiseks kasutatakse keemilisi ning füüsikalisi ehk termilisi meetodeid. Termiline söe aktiveerimine toimub süsinikdioksiidi või veeauru abil temperatuuril 800-900°C. Aktiveerimise käigus reageerivad osad süsiniku aatomid gaasiga ning eralduvad söe struktuurist - tekivad poorid. Söe keemiliseks aktiveerimiseks võib kasutada tsinkkloriidi, fosforhapet või naatriumhüdroksiidi. Aktiivsöe tädisega SPE padrunite puhul eristatakse üldiselt grafiitseid süsinkplokkke ja poorset aktiveeritud süsinikku. [76,80]

## 1.7. Sisestandard

Sisestandard on aine, mida lisatakse proovile, et võtta arvesse proovi eeltöötlusel tekkivaid (muutuvaid) analüüdi kadusid ning analüüsitava (kromatograafi süstitava) ruumala varieeruvust, kuid ka võimalikke proovist tulenevaid mõjutusi analüüdile (näiteks interferentide mõju). Sisestandardiks kasutatav aine peaks olema analüüdiga võimalikult sarnane (lähedane retentsiooniaeg, sarnased keemilised- ja füüsikalised omadused), kuid analüüdist eristatav ja proovis loomulikult mitteesinev aine. [81]

Enamasti sobib sisestandardiks suurepäraselt analüüdi isotoop analoog. Analüüdi isotoop analoogi puhul on tegemist analüüdi molekuliga, milles kindel aatom (või aatomid) on asendatud isotoobiga. Isotoobid on sama keemilise elemendi vormid, mis erinevad üksteisest neutronite arvu poolest. Isotoopidel on erinev mass kuid sarnased keemilised- ja füüsikalised omadused. Enamasti kasutatakse vesiniku asendamist deuteeriumiga või  $C^{12}$  asendamist  $C^{13}$ -ga. Sageli pole aga isotoopasendatud analüüdi kasutamine sisestandardina võimalik selle kõrge hinna või kommertsiaalse kättesaadavuse puudumise tõttu. [82]

## 1.8. Metoodika valideerimise karakteristikud

**Avastamispiir** on madalaim analüüdi kontsentratsioon, mille puhul saab suure tõenäosusega väita, et analüüt tõepoolest proovis esineb. IUPAC soovitude kohaselt tuleks metoodika avastamispiir leida valemi 1.2 kohaselt nullproovide analüüsi tulemuste põhjal. [83]

$$LD = x_D + s_D t \quad (1.2)$$

$LD$ - avastamispiir

$x_D$ - nullproovide keskmine arvutuslik kontsentratsioon

$s_D$ - nullproovide standardhälve

$t$  – Studenti  $t$ -kordaja soovitud usaldusnivool

Rahvusvaheline Analüüsikeemikute Ametlik Assotsiatsioon (AOAC) soovib metoodika avastamispiiri leidmiseks analüüsida kahtekümmend nullproovi (ehk analüüdi vaba proovi maatriksi) paralleeli. Avastamispiir defineeritakse sel juhul mõõtmiste vähemalt kahekordse standardhällbena. [84]

Leides avastamispiiri metoodikale, mis hõlmab keerukat proovi ettevalmistust on oluline tõestada, et analüüdi kontsentratsioon oleks avastamispiiril ka peale võimalikke kadusid müra eristatav. Selleks on võimalik avastamispiiri leida analüüsides proove, mille kontsentratsioon arvatakse olevat avastamispiiri lähedane. Sel juhul leitakse avastamispiir nende proovide standardhällbe ja valitud koefitsiendi (enamasti Studenti  $t$ -testi kordaja) korrutisena. [39]

**Määramis- ehk kvantiseerimispiir** on madalaim analüüdi kontsentratsioon proovis, mida saab usaldusväärselt numbriliselt väljendada. Sageli leitakse määramispiiri analoogiliselt avastamispiirile, kuid kasutades suuremat usaldusnivood. [85]

Ulatusliku prooviettevalmistuse protsessi puhul võiks määramispiiri leidmiseks kasutada hinnanguliselt määramispiiri lähedase teadaoleva kontsentratsiooniga proovide analüüsi, et vältida liialt optimistlikke tulemusi. Arvestades sobiva kontsentratsiooni hindamise keerukust kaasneb sel viisil määramispiiri leidmisega tõenäoliselt suurem töömahukus (kui määramispiir hinnatakse liiga madalaks, tuleb protseduuri korrata) ja/või hinnatakse määramispiir tegelikust kõrgemaks. Meetodi eeliseks võrreldes nullproovide analüüsiga on, et võetakse arvesse ka proovi potentsiaalselt kõikuvat saagist. [39]

**Saagis** on analüüsi tulemusel leitud analüüdi kontsentratsiooni (või massi) jagatis analüüdi tegeliku või teoreetilise kontsentratsiooniga (või massiga). Saagist väljendatakse protsentides. [86]

## 2. MATERJALID JA MEETODID

### 2.1. Analüüsiks kasutatud materjalide ning aparatuuri kirjeldus

#### 2.1.1. Kemikaalid

NDMA kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati sertifitseeritud Sigma-Aldrichi NDMA lahust metanoolis kontsentratsiooniga 200 µg/ml (ehk 200 mg/l). NDEA kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati minimaalselt 99,0%-lise puhtusastmega Aldrich Chemistry kemikaali.

Kalibreerimislahustele lisati sisestandardina Sigma-Aldrichi toodetud 100% lähedase sisaldusega NMOR-i. Ekstraktidele lisati teise sisestandardina sama firma vähemalt 98% puhast alakloori (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub>).

Proovide dekloratsiooniks kasutati analüütiliselt puhast naatriumtiosulfaat pentahüdraati (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O). Ekstrakte kuivatati Lach-Ner minimaalselt 95%-lise puhtusastmega naatriumsulfaadiga (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Proovid kontsentreeriti kasutades Parker LCMS30-1 lämmastiku generaatoriga toodetud lämmastikku.

#### 2.1.2. Solvendid

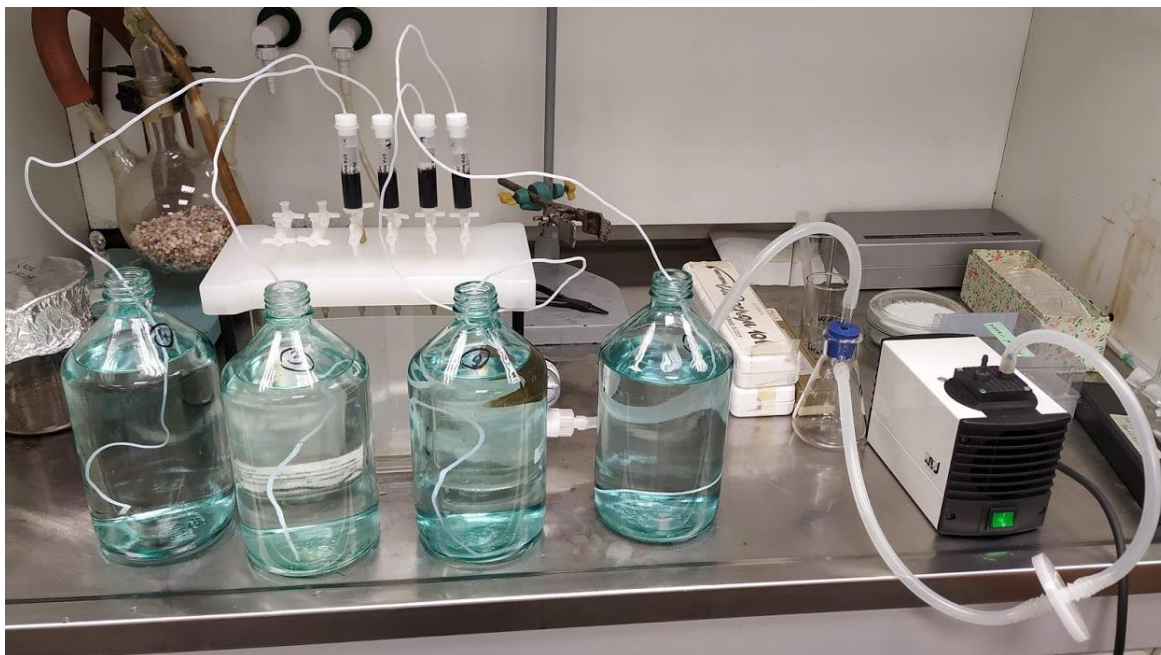
Lahuste valmistamiseks kasutati Milli Pore Simplicity veepuhastusseadet, mis toodab I tüüpi ultrapuhast vett eritakistusega 18,2 MΩ·cm (25°C).

SPE padrunid konditsioneeriti Saksamaalt pärit Honeywell HPLC jaoks toodetud 99,9% puhta metanooliga (CH<sub>3</sub>OH). SPE padrunite konditsioneerimiseks, nitrosoamiinide padrunitest ekstraheerimiseks ning ekstrakti kvantitatiivseks ülekandmiseks kasutati Fisher Chemical firma diklorometaani (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) puhtusastmega 99,8%.

#### 2.1.3. Aparatuur ja lisaseadmed

**Resteki SPE padrunid**, mida kasutati nitrosoamiinide ekstraheerimiseks olid kuumilliliitriise mahuga ning spetsiaalselt nitrosoamiinide veest eraldamiseks välja töötatud. Padrunid olid täidetud 2 g poorse aktiivsõega, mille eripinnaks oli 972 m<sup>2</sup>/g.

**SPE kollektoriks** oli Waters firma kahekümne pesaga seade (joonis 2.1), mis kannatas kuni 20 inHg ( $\sim 67728$  Pa) suurust alarõhku. Alarõhu suurust sai hinnata seadme külge ehitatud rõhuanduri abil. SPE seadmesse tekitati alarõhk KNF Lab Laboport® Mini laboripumbaga, mille võimsuseks oli 50 W (joonis 2.1). Vee jäägid eemaldati padrunitest kasutades pumpa võimsusega 250 W.



Joonis 2.1. Nitrosoamiinide ekstraktsioon veest padrunisse

**Gaasikromatograaf-massispektromeeter**, millega proove analüüsiti oli Schimadzu QP2010 Plus gaasikromatograaf-massispektromeeter. Kromatograafis kasutati Zebron phase ZB-5MS kolonni, mille statsionaarseks faasi koostiseks oli: 5% fenüül-arüleen ja 95% polüdimetüülsiloksaani (ehk dimetüülpölüsiloksaani). Kolonn oli 30 meetrit pikk ning 0,32 millimeetrise sise-diameetriga. Proovide masinasse süstimiseks kasutati HTA firma HT2800T kõikühes GC automaatproovivõtjat.

Gaasikromatograafi detektorina kasutati massispektromeetrit. Molekulid ioniseeriti elektronionisatsiooni abil. Massianalüsaatoriks oli lineaarne kvadrupool massianalüsaator ning detektoriks elektronkordisti. MS seadistuse kontrollimiseks viidi läbi uus seadistamine, mille tulemused olid väga lähedased eelmisele seadistusele. Selleks, et varasemalt mõõdetud tulemused oleksid uutega võrreldavad kasutati edasi varasemalt tehtud seadistust.

#### 2.1.4. Viaalide kalibreerimine ja nõude pesu

Proovi kontsentratsiooni arvutamiseks oli vaja lisaks analüüsiks kasutatud proovi ruumalale teada ka lõpliku ekstrakti täpset ruumala. Katsetati nii ühemilliliitriste kui ka sajamikroliitriste ekstraktide tegemist. Mõlema jaoks kasutati automaatpipeti ning ultrapuhta vee abil kalibreeritud viaale. Ühemilliliitriste ekstraktid tehti enamlevinud umbes kahemilliliitristesse GC viaalidesse ning sajamikroliitriste ekstraktide jaoks kasutati spetsiaalseid mikroviale mahtuvusega  $\sim 200 \mu\text{l}$  (joonis 2.2). Tänu sisestandardi kasutamisele ei põhjustanud viaalide kalibreerimisel ning märgini täitmisel tehtud hälbed olulisi varieeruvusi saadud tulemustes.



Joonis 2.2. Ekstrakti kontsentreerimine  $\sim 1\text{ml}$ -ni (vasakul) ja  $\sim 100 \mu\text{l}$ -ni (keskel), kalibreeritud viaalid (paremal)

Vesilahustega kokkupuutuvate nõude pesuks kasutati detergendi lahust ning ohtralt kraani- ning destilleeritud vett. Enne kasutamist loputati nõusid korduvalt ultrapuhta vee või prooviga. Orgaaniliste lahustite ning ekstraktidega kokkupuutuvaid nõusid pesti kroomhappe, kraanivee ning destilleeritud veega, kusjuures kasutati vaid täielikult kuivi nõusid.

## 2.2. Metoodika optimeerimine

### 2.2.1. Proovide eeltötlus tahke faas ekstraktsiooniga (SPE)

Nitrosoamiinid esinevad vees enamasti väga madalates kontsentratsioonides, mistõttu on proovide analüüsimiseks vajalik nende eelnev kontsentreerimine. Proovide kontsentreerimiseks kasutati aktiivsõe täidisega SPE padruneid. Arvestades padrunite mahtuvust ning toetudes kirjanduslikele andmetele [39] otsustati proovi algseks ruumalaks valida üks liiter. Katsetati ka kaheliitriste proovide analüüsimist, kuid see suurendas tunduvalt analüüsiks kuluvat aega ning vähendas metoodika kasutusmugavust.

**SPE padrun konditsioneeriti** enne proovi analüüsimist kasutades kaks korda 3 ml diklorometaani, neli korda 3 ml metanooli (alates kolmandast metanooli doseerimisest ei lastud padrunil enam kuivaks jääda) ja viis korda 3 ml ultrapuhast vett. Konditsioneerimiseks kasutatud protokoll leiti kirjandusest [39]. Diklorometaan oli vajalik padruni puhastamiseks analüüdi jääkidest, metanool diklorometaani jääkide padrunist välja pesemiseks ning vesi pesi omakorda padrunist välja metanooli jäägid.

**Nitrosoamiinide ekstraktsiooniks padrunisse** täideti padrun prooviga ning ühendati korgi ning teflonist vooliku abil proovi anumaga (joonis 2.1). Tefloni kasutamine doseerimissüsteemi valmistamiseks oli oluline, et vältida ebasoovitavate lisandite sattumist proovi [74]. Proovi voolukiiruseks läbi SPE padruni reguleeriti umbes 10 ml/min ehk üks liiter proovi läbis padrunit umbes saja minuti jooksul. Selline voolukiirus saavutati tekitades analüüsiseadmesse alarõhu kasutades täisvõimsusel vaakumpumpa. Peale seda kui kogu veeproov oli padrunit läbinud tuli katseseade ning padrunid veest kuivatada.

**Padrunite kuivatus** oli vajalik selleks, ekstraktid oleksid homogeenised. Kuivade ekstraktide saamiseks katsetati kolme erinevat varianti.

Esiteks kuivatati SPE padruneid ~5 inHg (~16932 Pa) suuruse alarõhuga pikema aja jooksul (kuni 30 minutit). Ekstraktid jäid pikale õhu läbipuhumisele vaatamata küllaltki märjaks. Ekstrakti pinnale tekkis selgesti eristatav vee kiht (~1 ml), mis eemaldati koheselt peale ekstraktsiooni süstla abil.

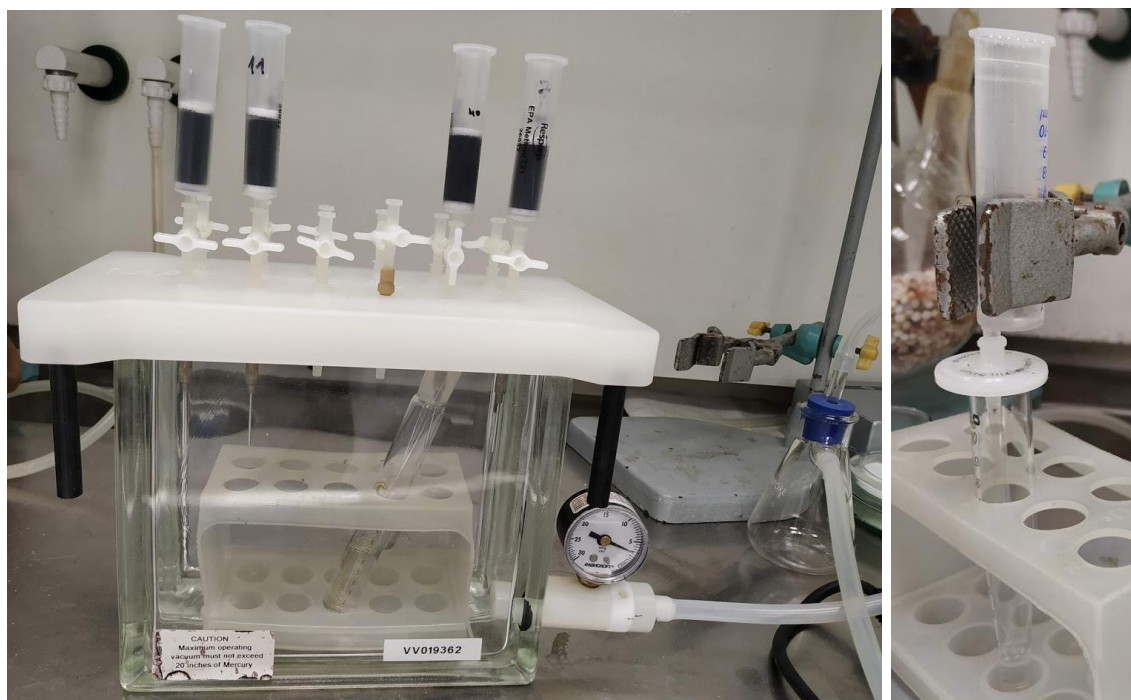
Lisaks alarõhule katsetati SPE padrunite kuivatamist kuumutamise abil. Padruneid kuumutati kahel eri temperatuuril. 40 °C juures pidi padruneid kuivatama vähemalt ööpäeva. 65 °C juures tuli padruneid kuumutada umbes 8 tundi. Kuivatuskapi

temperatuuri tõstmine olulisi analüüdi kadusid kaasa ei toonud. Visuaalsel vaatlusel saadi veevabad ekstraktid. Padrunite pikaajaline kuumutamine tõi kaasa mõningad lisandid mass-kromatogrammis ning pikendas oluliselt proovi analüüsiks kuluvat aega, mistõttu jätkati optimaalse kuivatusmeetodi otsimist.

Optimaalseks osutus meetod, mille puhul kuivatati esmalt kogu katseseade paberrätikuid kasutades ning seejärel kuivatati padruneid neist õhku läbi puhudes. Katseseadmesse tekitati selleks kuni 15 inHg ( $\sim 50796$  Pa) suurune alarõhk (katseseade kannataks kuni 20 inHg ( $\sim 67728$  Pa) suurust alarõhku) ning õhku puhuti padrunitest läbi umbes viie minuti jooksul. Saadud ekstraktid sisaldasid vee jääke, mis seoti veevaba naatriumsulfaadi abil.

**Nitrosoamiinide ekstraktsiooniks diklorometaani** paigutati SPE kollektorisse katseklaaside statiiv koos katseklaasi(de)ga. Kuna proove oli vaja edasi kuivatada naatriumsulfaadiga, tuli kasutada suuremaid lihviga katseklaase, mille mahutamine katseseadmesse oli raskendatud (joonis 2.3). SPE kollektor ning kasutatud katseklaasi statiiv võimaldasid korraga ekstraheerida maksimaalselt kahte proovi ning alarõhu tekitamiseks tuli eelnevalt katseseadet füüsiliselt kokku suruda.

Padruni ülemine reservuaar täideti diklorometaaniga. Alarõhu abil täideti padrun diklorometaaniga ning oodati üks minut. Edasi jätkati elueerimisega umbes 1 ml/min. Ekstrakti mahuks koos veega saadi umbes 6-7 ml.



Joonis 2.3. Nitrosoamiinide ekstraktsioon diklorometaani (vasakul) ja  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  filtreerimine proovist (paremal)

**Ekstraktide kuivatamiseks** lisati korgiga katseklaasi veevaba naatriumsulfaati ning loksutati. Protseduuri korrati kuni naatriumsulfaadi helveste moodustumiseni proovis. Proov valati ettevaatlikult padrunfiltrile ning suruti läbi filtri (joonis 2.3). Katseklaasi loputati kolm korda 0,5-1 ml diklorometaaniga, mis valati samuti filtrile.

**Ekstrakti kontsentreerimiseks** katsetati kolme erinevat meetodit. Esiteks lasti ekstraktil toatemperatuuril aurustuda. See meetod toimis, kuid oli väga ajamahukas. Ekstrakti aurustamine võttis aega umbes kaks ööpäeva, mille jooksul tuli diklorometaani taset jälgida, et kogu ekstrakt ära ei auruks.

Teiseks prooviti ekstrakti kontsentreerida keetmisel (Julabo® TW8 kaheksaliitrisel) vesivannis. Kuna ekstrakt oli kogutud kitsasse katseklaasi ei tekkinud diklorometaani keemistemperatuuril keemistsentrit. Keemine algas alles peaaegu 20 °C kõrgemal temperatuuril, kuid seeest väga intensiivselt. Eksperimendi tulemusel selgus, et keetmine kitsas katseklaasis ei ole optimaalne viis ekstrakti kontsentreerimiseks.

Kolmandaks katsetati ekstraktide kontsentreerimist vesivannis termostateeritult (25°C) lämmastiku voolus, mis osutus optimaalseks meetodiks. Termostateerimiseks kasutati Julabo® TW8 kaheksaliitrist vesivanni, mis täideti kraaniveega. Lämmastiku proovidest läbijuhtimiseks kasutati kummivoolikuga ühendatud teflonvoolikut, mis viidi katseklaasis olevasse ekstrakti (joonis 2.2). Ekstraktid kontsentreeriti umbes 0,6-0,8 milliliitriini. Kontsentraatidele lisati alakloori lahust ning ekstraktid viidi kvantitatiivselt üle kalibreeritud ühemilliliitristesse vialidesse, mis täideti diklorometaaniga märgini. Ekstrakte analüüsiti kasutades GC-MS.

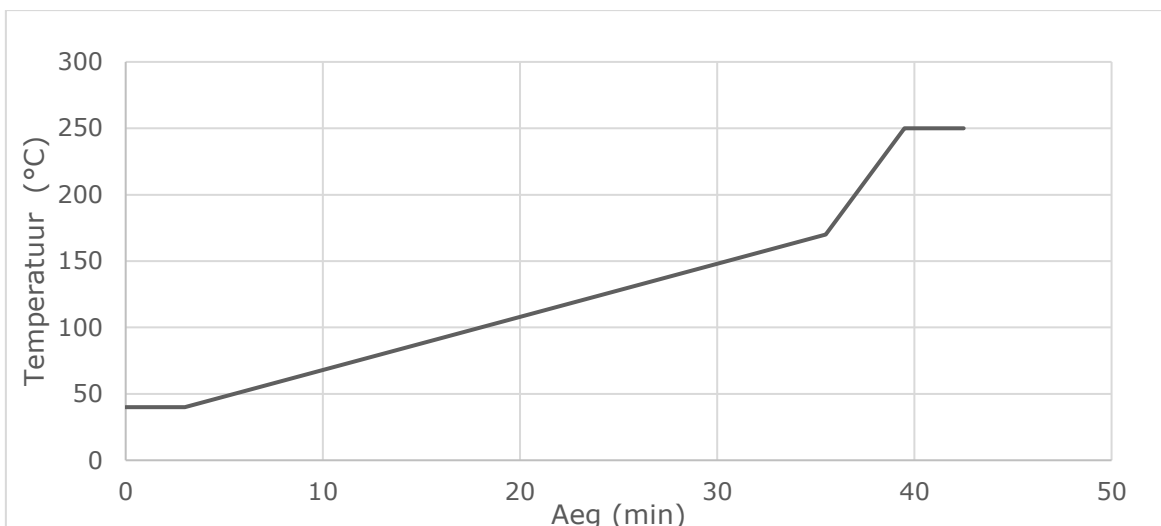
### 2.2.2. GC-MS analüüs

Temperatuuriprogrammi leidmiseks valmistati 100 µM NDMA lahus diklorometaanis (NDEA-d ja NMOR-i ei lisatud lahusesse, sest need ained polnud veel laborisse jõudnud). Sobivate temperatuuriprogrammi kandidaatide leidmiseks kasutati kirjanduse abi. Esmalt prooviti EPA meetodikas 521 [39] kasutatud temperatuurirežiimi (tabel 2.1. ja joonis 2.4). Temperatuurirežiim ei osutunud kasutatava kolonni ning uuritava analüüdiga sobivaks, sest NDMA piiki ei suudetud mass-kromatogrammist tuvastada.

Tabel 2.1. Temperatuuriprogrammi katse 1

Temperatuur (°C)	Hoidmisaeg (min)	Temperatuuritõus (°C/min)
40	3	0
170	0	4
250	3	20



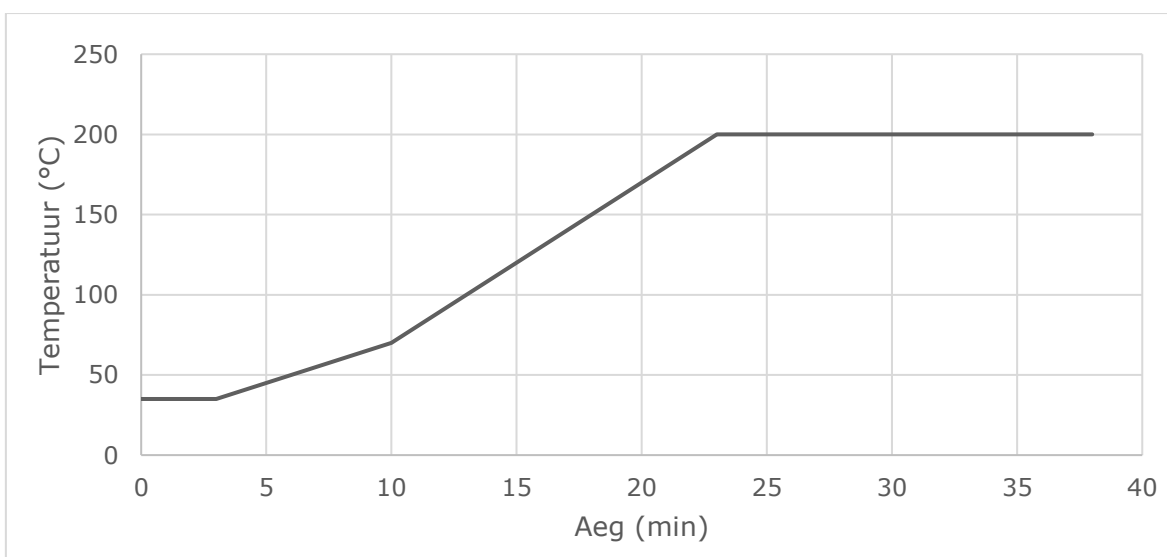


Joonis 2.4. Temperatuuriprogrammi katse 1

Seejärel katsetati Filho et al. [87] kasutatud temperatuuriprogrammi (joonis 2.5. ja tabel 2.2). NDMA piik suudeti antud programmiga tuvastada, kuid NDMA elueerub juba umbes kolmandal minutil ning NDMA piik oli suhteliselt lame. Selgus ka põhjus, miks esimene temperatuurirežiimi katsetus ebaõnnestus - NDMA elueerub kolonnist juba ~40°C juures.

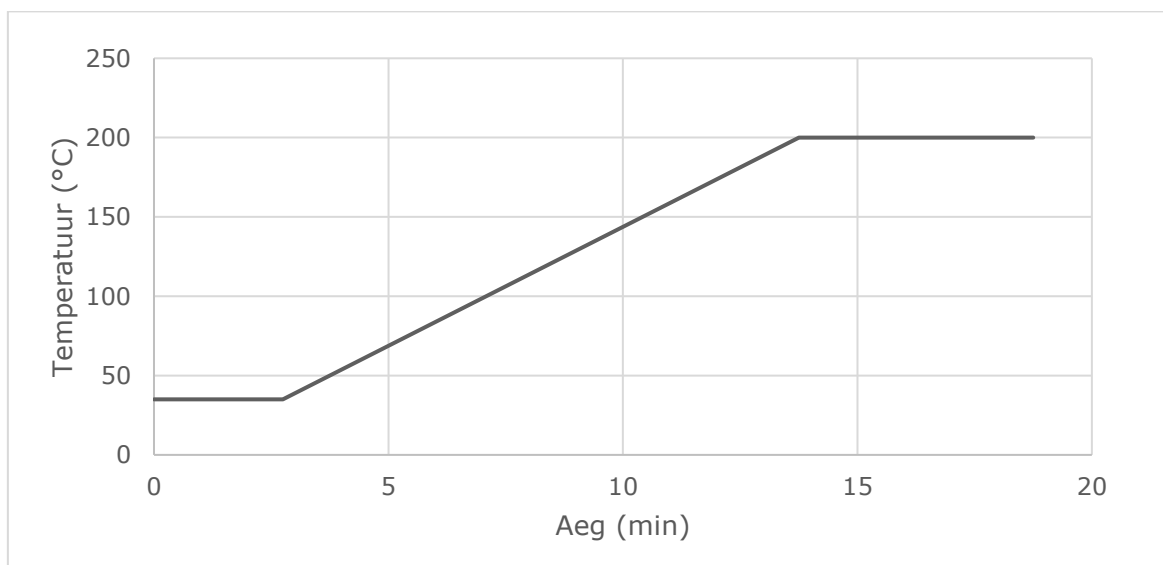
Tabel 2.2. Temperatuuriprogramm katse 2.

Temperatuur (°C)	Hoidmise aeg (min)	Temperatuuritõus (°C/min)
35	3	0
70	0	5
200	10	15



Joonis 2.5. Temperatuuriprogrammi katse 2

Temperatuuri programmi katse 2 võeti optimaalse temperatuuri režiimi leidisel aluseks. Edasi katsetati, kuidas mõjub temperatuuritõusu muutus analüüdi piigile. NDMA varajase elueerumise tõttu kolonnist ei suudetud katsetuste tulemusel NDMA piiki oluliselt teravdada ega retentsiooniga oluliselt pikendada. Küll aga suudeti ilma negatiivsete efektideta temperatuuriprogrammi pikkust tunduvalt vähendada. Optimaalseks osutus programm kogupikkusega 18,75 minutit. Esimese 2,75 minuti jooksul hoiti temperatuuri 35 °C juures, seejärel tõsteti temperatuuri 15 °C/min kuni 200 °C saavutamiseni (11 minutit), 200 °C juures hoiti temperatuuri veel 5 minutit kolonni puhastamiseks (joonis 2.6).



Joonis 2.6. GC temperatuuriprogramm

Temperatuuriprogrammi sobivust NDEA ning NMOR-i määramiseks testiti esimesel võimalusel, kui ained laborisse jõudsid. NDMA põhjal valitud temperatuuriprogramm sobis ka NDEA ja NMOR-i analüüsiks, kusjuures NDEA ja NMOR-i piigid olid kasutades valitud temperatuuriprogrammi tunduvalt teravamad kui NDMA piik. Samuti olid nende retentsiooniajad pikemad (~3,2 minutit NDMA, ~5,3 NDEA ning ~7,5 NMOR-i puhul).

**Massispektromeetri** abil detekteeriti ja kvantiseeriti GC kolonnist elueeruvad analüüdid. Ioonallika ja liidese temperatuuriks valiti 200 °C. MS viibeajaks määrati 2,5 minutit. Sobiv detektori pinge väärtus leiti seadistamise tulemusel. Suurema tundlikkuse saavutamiseks mõõdeti mass-kromtogrammide SIM (*Selective Ion Monitoring*) režiimis. SIM režiimi kasutamiseks tuli eelnevalt leida iga analüüdi retentsiooniaeg ning sellele omane massi/laengu suhe. Vajalike andmete leidmiseks analüüsiti avastamispiirist sadu kordi kõrgema kontsentratsiooniga spaigitud proove massispektromeetri skaneerivas režiimis.

### 2.2.3. Sisestandardid

Sisestandardina kasutati nitrosomorfoliini. NMOR valiti sisestandardiks, sest tegemist on nitrosoamiiniga, mistõttu on selle seondumine ja elueerumine SPE padrunist sarnane analüütidele (NDEA ja NDMA). NMOR retentsiooniaeg on lähedane NDEA-le. NMOR-i esinemine joogivee proovides on tunduvalt vähem tõenäoline kui NDEA või NDMA esinemine. Kirjanduse andmetel ei tekkinud vees NMOR-i ka prekursorite lisamisel [31]. Joogivees on NMOR-i leitud kontsentratsioonil kuni 3 ng/l, mis on tunduvalt madalam, kui NMOR-i kasutatav kontsentratsioon (520 ng/l) sisestandardina [25]. NMOR-i on leitud kõrgemates kontsentratsioonides (5-30 ng/l) heitvee proovidest [89], mistõttu võiks heitvee proove analüüsida paralleelidena (kusjuures NMOR-i tuleks lisada ainult ühele paralleelidest).

NMOR lisati nii kalibreerimisproovidele kui ka reaalsele proovidele enne SPE-d. Niisiis võttis NMOR arvesse võimalikke kadusid SPE protsessis, naatriumsulfaadiga kuivatamisel, naatriumsulfaadi filtreerimisel, lämmastiku voolus aurustamisel, ekstrakti ülekandmisel ja märgini täitmisel ning gaasikromatograaf-massispektromeetrise süstimisel.

Metoodika väljatöötamisel kasutati enne NMOR-i saabumist ning hiljem paralleelselt NMOR-ga sisestandardina alakloori. Alakloori puhul ei olnud tegemist eriti hea sisestandardiga, sest alakloori struktuur, füüsikalise ja keemilised omadused ning retentsiooniaeg erinesid oluliselt analüütidest. Seetõttu lisati alakloor juba aurustatud ekstraktile ning alaklooriga sai hinnata vaid katseklaasist viaali ülekandmisel tekkivaid kadusid, ekstrakti ruumala erinevusi ning gaasikromatograafi süstitava ruumala varieerumist. Erinevate alakloori kontsentratsioonide süstimisel gaasikromatograaf-massispektromeetrise hinnati alakloori sobivaimaks kontsentratsiooniks ekstraktis 270 µg/l.

## 2.3. GC-MS kalibreerimine

GC-MS kalibreerimiseks valmistati vesilahused, mis sisaldasid eri kontsentratsioonides analüüte (NDMA ja NDEA) ning sisestandardit (NMOR). NMOR-i lisati kalibreerimislahustele kasutades NMOR põhilahust kontsentratsiooniga 1,3 mg/l (1 µl NMOR-i lahustati ühes liitris vees). Kalibreerimislahustele lisati 0,4 ml NMOR põhilahust ehk NMOR-i kontsentratsioon kalibreerimislahustes oli 520 ng/l.

NDEA kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati NDEA põhilahust kontsentratsiooniga 0,95 mg/l ja vahelahjendust kontsentratsiooniga 9,5 µg/l. NDEA põhilahuse valmistamiseks mõõdeti üks mikroliter (kasutades ühe mikrolitriise nominaalruumala mikrosüstalt) üheliitrisesse mõõtkolbi, mis täideti ultrapuhhta veega märgini. Vahelahjenduse tegemiseks kasutati 200-ml mõõtkolbi, millesse doseeriti viiemilliliitriise nominaalruumalaga automaatpipetti kasutades 2 ml NDEA põhilahust. Mõõtkolb täideti ultrapuhhta veega märgini.

NDMA kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati NDMA põhilahust kontsentratsiooniga 8 µg/l. NDMA põhilahuse valmistamiseks mõõdeti 10 mikrolitrit (kasutades 10 µl nominaalruumalaga mikrosüstalt) NDMA sertifitseeritud lahust metanoolis (200 mg/l) 25 milliliitrisesse mõõtkolbi, mis täideti ultrapuhhta veega märgini.

Kalibreerimislahuste valmistamiseks doseeriti pudelisse NDMA, NDEA ning NMOR-i põhilahuseid kasutades automaatpipette. Põhilahustele lisati üks liiter ultrapuhast vett. Vee lisamiseks kasutati mõõtsilindrit, sest kalibreerimislahuste juures oli väga oluline, et need sisaldaksid kindlas koguses analüüte. Vähem oluline oli lahuse täpne kontsentratsioon. NDEA kalibreerimislahuste jaoks valiti järgmised vesilahuste kontsentratsioonid: 4,75; 9,5; 23,75; 38,0; 47,5; 57,0; 71,25; 95,0; 142,5; 190,0 ng/l. NDMA kalibratsiooni jaoks kasutati vesilahuseid kontsentratsioonidega 100; 120; 150; 176; 200; 252; 300; 350 ng/l. Lisaks erinevas kontsentratsioonis NDMA-le ja NDEA-le sisaldasid kalibreerimislahused ka NMOR-i, mille kontsentratsioon kõikides kalibreerimislahustes oli 520 ng/l.

Kõikidele lahustele lisati 450-600 mg naatriumtiosulfaat pentahüdraati. Naatriumtiosulfaadi lisamine proovidele oli vajalik, et vees lahustunud kloor ei moodustaks diklorometaaniga NDMA-d ja teisi nitrosoamiine [88]. Naatriumtiosulfaadi lisamine kalibreerimislahustele oli vajalik tõestamiseks, et see ei mõjuta analüütide kvalitatiivset ega kvantitatiivset analüüsi.

Lisaks kalibreerimisproovidele analüüsiti ka nullproove (ultrapuhast vett), millega viidi läbi kõik analüüsi protseduurid analoogselt kalibreerimisproovidele (kaasaarvatud naatriumtiosulfaadi ja sisestandardite lisamine). Nullproovide analüüs oli oluline tõestamiseks, et olulised mass-kromatogrammi piirkonnad on analüütide puudumisel tõepoolest tühjad.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

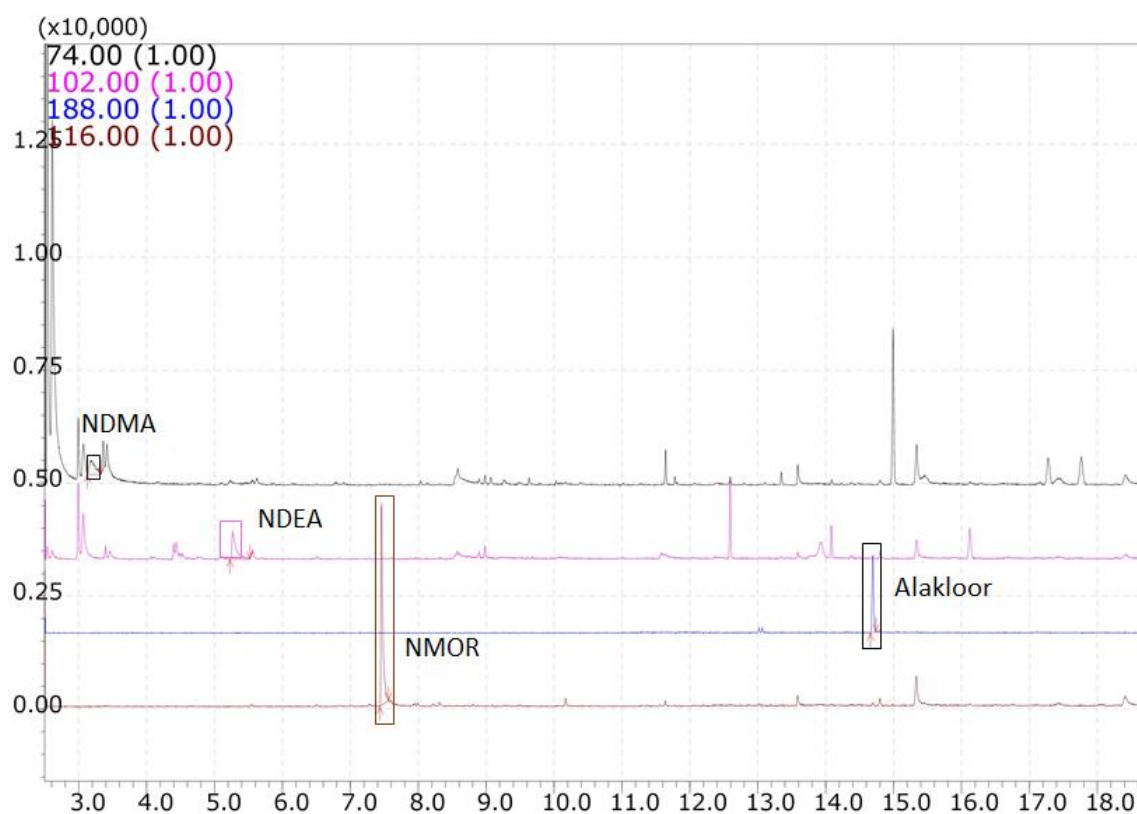
#### 3.1. Metoodika karakteristikud

##### 3.1.1. Selektiivsus

Analüüdi identifitseerimiseks kasutati massi-laengu suhet ja retentsiooniaega (tabel 3.1). Joonisel 3.1 on toodud ühe kalibreerimisproovi mass-kromatogramm, milles analüütide sisaldused olid järgnevad: NDEA 71 ng/l, NDMA 200 ng/l, NMOR 520 ng/l. Alakloori kontsentratsioon ekstraktis oli 270 µg/l.

Tabel 3.1. Analüütide ja sisestandardite karakteristikud mass-kromatogrammil

	NDMA	NDEA	NMOR	Alakloor
Massi-laengu suhe (m/z)	74	102	116	188
Umbkaudne retentsiooniaeg (min)	3,2	5,3	7,5	14,7



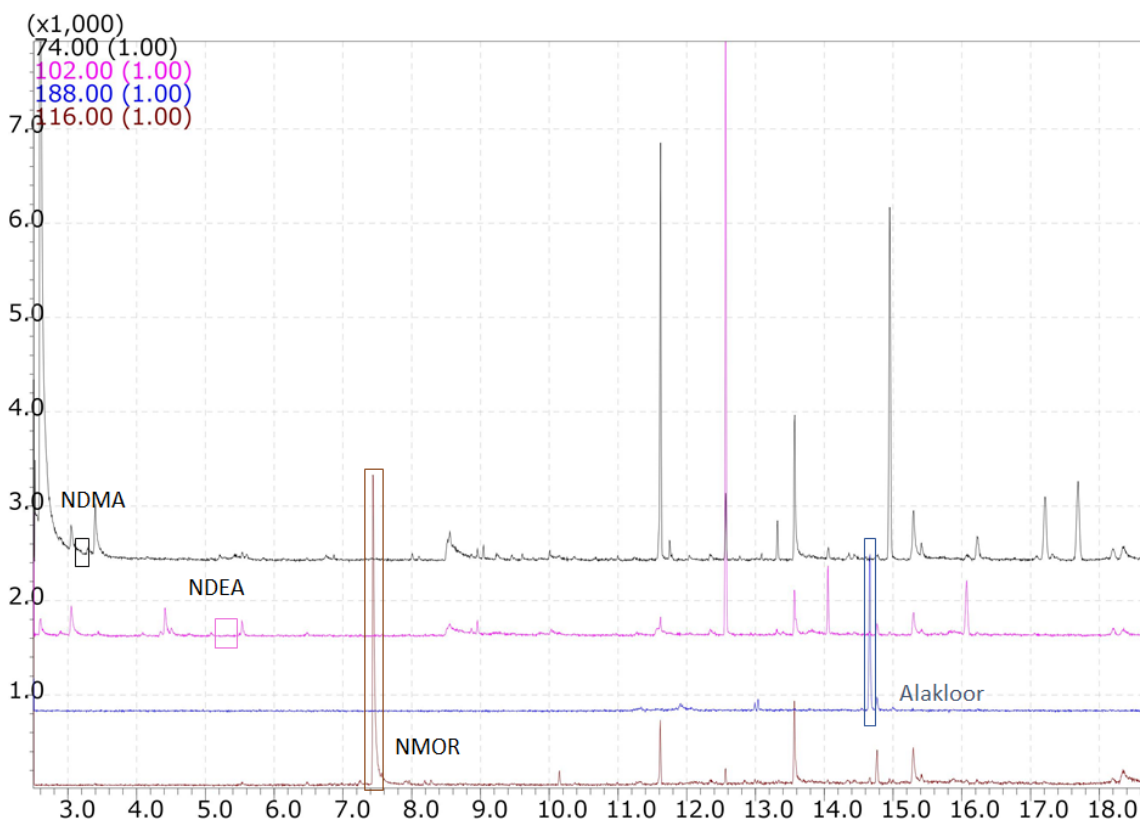
Joonis 3.1. Analüüte ning sisestandardeid sisaldav kalibreerimisproov

Proovide kontsentreerimine ning madalad analüüdi sisaldused tõid tugevalt esile solvendi puhtuse ning solvendis sisalduvate lisandite olulisuse. Aurustades Fisher Chemical 99,8% puhtusega diklorometaani kümnet milliliitrit ühe milliliitrini suurenesid mass-kromatogrammil mitmed ka algsest esinenud piigid, mistõttu võib eeldada, et need

lisandid tulenesid diklorometaani ebapuhtusest. Võrdlusena aurustati ka sama puhtusastmega Sigma-Aldrichi diklorometaani, kuid mass-kromatogrammil esines veelgi rohkem ja suuremaid lisandite piike.

Saadud tulemuste näitasid, et solvendi puhtus ning selles esinevad lisandid on antud meetodika juures väga olulised ning alla 99,8% puhtusastmega diklorometaani kasutamine ei annaks rahuldavaid tulemusi. Samuti tõestati sellega, et analüütidele mitteomaste piikide esinemine mass-kromatogrammil on kasutatud meetodika ning kemikaalide puhul vältimatu.

Aurustatud diklorometaani ja nullproovide (joonis 3.2) analüüs ning võrdlus näitasid, et enamus lisandid satuvad ekstrakti diklorometaanist ja võimenduvad ekstrakti kontsentreerimisel. Esinenud lisandite retentsiooniajad ja m/z suhted ei kattunud analüütidega.



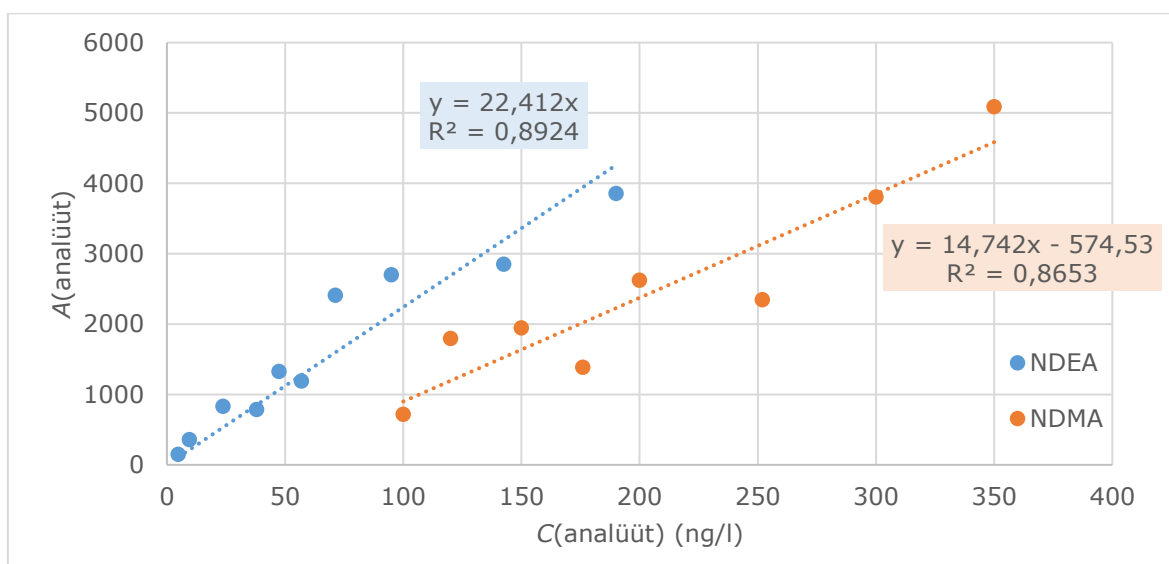
Joonis 3.2. Sistandarditega nullproov

### 3.1.2. Kalibreering

NDEA-le ja NDMA-le koostati ühemilliliitriste ekstraktside analüüsil võrdlusena kolm kalibreerimisgraafikut. Kalibreerimisgraafikute koostamiseks analüüsiti erinevate NDEA

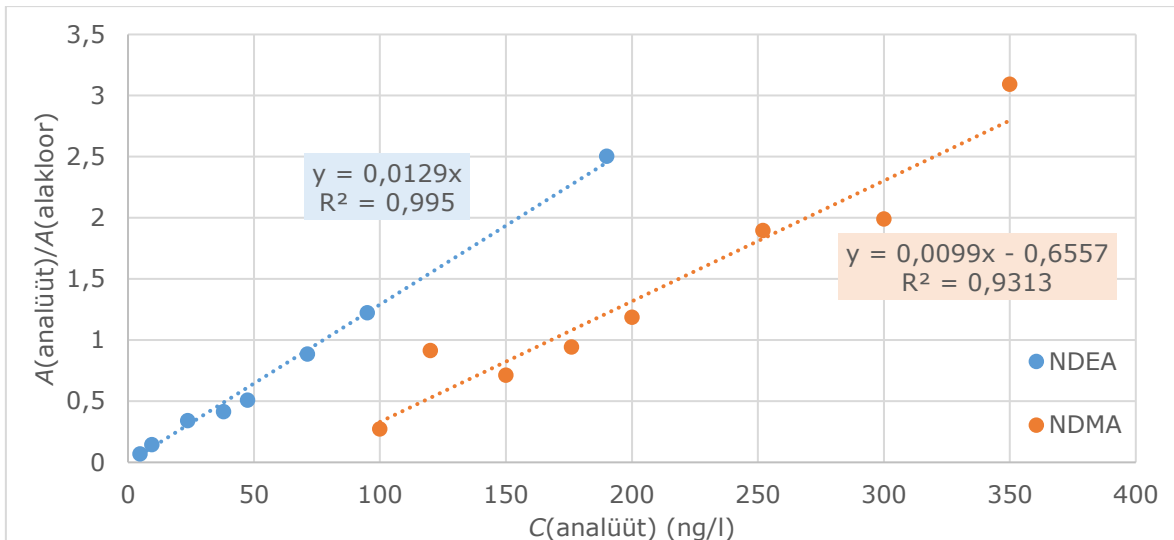
ja NDMA sisaldustega ning konstantse NMOR (sisestandard) kontsentratsiooniga vesilahuseid. Teine sisestandard - alakloor lisati juba aurustatud ekstraktidele. Esimesed kalibreerimisgraafikud võtsid arvesse ainult analüüdi signaali (joonis 3.3), teised võtsid arvesse analüüdi signaali võrreldes alakloori signaaliga (joonis 3.4) ja kolmandad baseerusid analüüdi signaali võrdlusel NMOR signaaliga (joonis 3.5 ja 3.6).

Ainult analüüdi signaalil põhinevatel kalibreerimisgraafikutel (joonis 3.3) esineb suhteliselt suur kalibreerimispunktide hajuvus. Positiivselt poolelt paiknevad punktid kalibreerimisfunktsiooni ümber juhuslikult ning korrelatsioonikordaja ruudud on 0,9 lähedased. Kuigi analüüdi sisaldust proovis saaks teataval määral hinnata ka ilma sisestandardit kasutamata, tuleks seejuures arvestada tunduvalt suurema määramatusega.



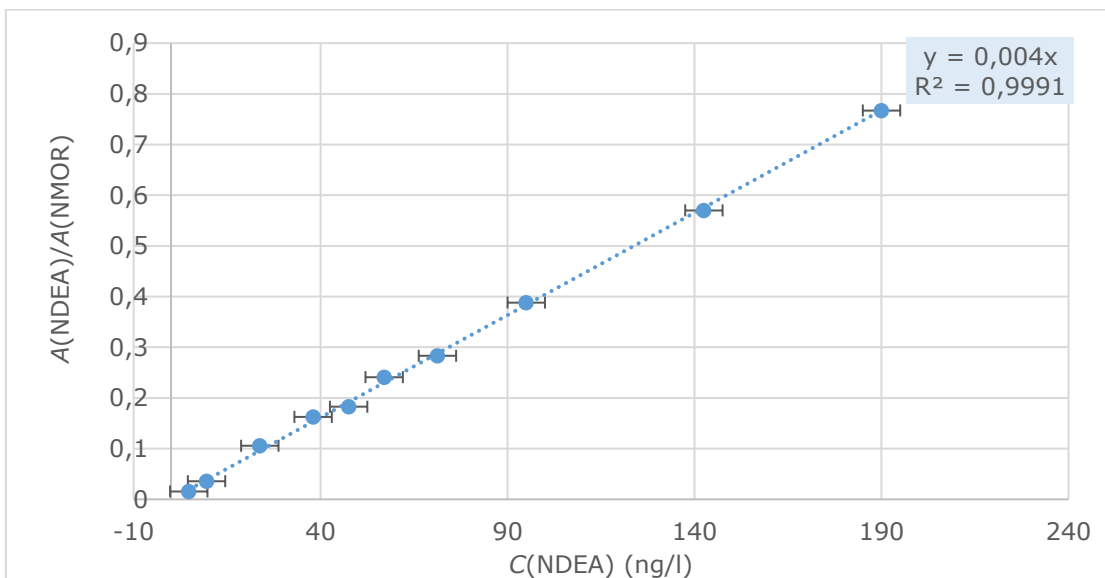
Joonis 3.3. NDEA ja NDMA kalibreerimisgraafikud ainult analüüdi signaalide põhjal

Teise kalibreerimisgraafiku puhul kasutati sisestandardina alakloori (joonis 3.4), mis erineb oma keemiliste ja füüsikaliste omaduste poolest tunduvalt analüütidest, mistõttu lisati see alles kontsentreeritud ekstraktile. Punktide hajuvus on võrreldes sisestandardita kalibreerimisgraafikuga tunduvalt vähenenud, millest võib järeldada, et ekstrakti viaali ülekandmisel, viaali märgini täitmisel ning gaasikromatograafi proovi süstimisel tekivad erisused on küllaltki suure tähtsusega. Nii NDEA ja kui ka NDMA kalibreerimisfunktsioonide korrelatsioonikordajate ruudud on üle 0,9 ning punktide jaotus kalibratsioonifunktsiooni ümber on juhuslik. Kuigi alakloor pole optimaalne aine NDMA ja NDEA sisestandardina kasutamiseks, võimaldavad koostatud kalibreerimisgraafikud anda adekvaatse hinnangu analüütide kontsentratsioonidele sobivama sisestandardi puudumisel.



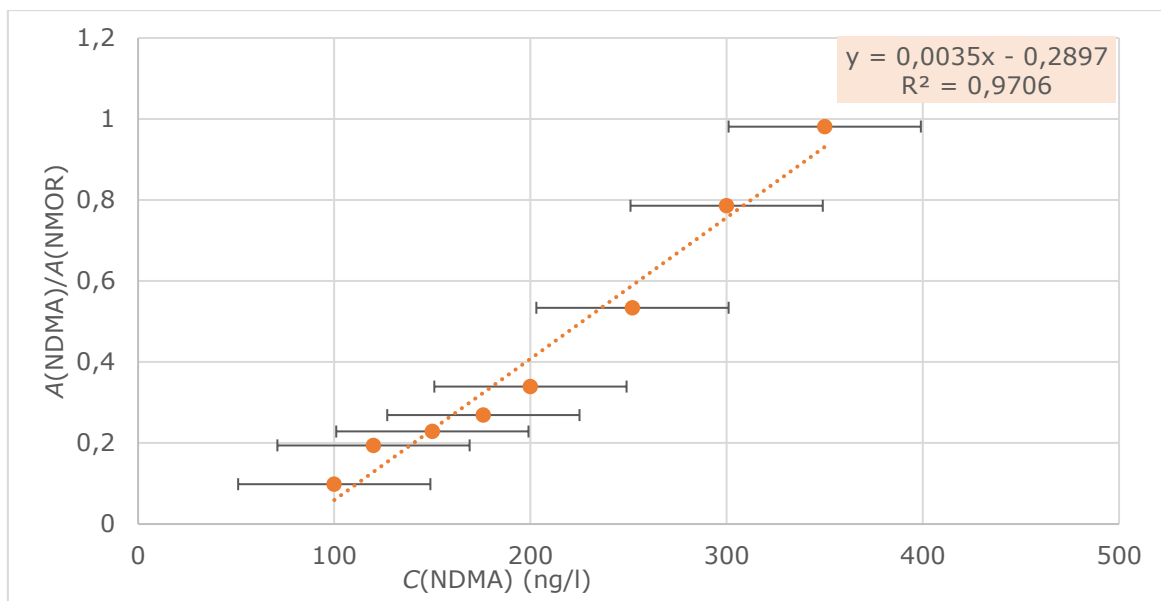
Joonis 3.4. NDEA ja NDMA kalibreerimisgraafikud, sisestandardiks alakloor

Kõik kalibreerimisgraafikud andsid rahuldavaid tulemusi, kuid suurima usaldusväärsuse ja korrelatsiooni kordaja ruudu ( $R^2$ ) väärtusega olid NMOR-i sisestandardina kasutatavad kalibreerimisgraafikud (joonised 3.5 ja 3.6). Optimaalse kalibreerimisgraafiku lineaarsust näitab ühele lähenev korrelatsiooni kordaja ruut. Määramatuse sobivust tõestab see, et kõik kalibreerimispunktid jäävad kalibreerimisfunktsioonist vähem kui määramatuse kaugusele. Kasutades sisestandardina NMOR-i võetakse arvesse kadusid kogu analüüsi protsessi käigus, mis suurendab kalibreeringu usaldusväärsust.



Joonis 3.6. NDEA kalibreerimisgraafik, sisestandardiks NMOR





Joonis 3.6. NDMA kalibreerimisgraafik, sisestandardiks NMOR

NDMA kalibreerimisgraafiku korrelatsioonikordaja ruudud oli üldiselt madalamad kui vastavatel NDEA kalibreerimisgraafikutel. Peamiseks kalibreerimispunktide hajuvuse põhjuseks võiks pidada NDMA piikide lamedat kuju, mis muutis NDMA tuvastamise ning täpse piigi integreerimise keerukaks.

Pärast ühemilliliitri ekstrakti analüüsi avati proovi viaal ning aurustati ekstrakt lämmastiku voolus ~80 µl-ni (joonis 2.2). Ekstrakt kanti kvantitatiivselt üle kalibreeritud 100 µl viaali ning täideti märgini. Ekstrakti analüüsiti uuesti GC-MS abil.

Sel viisil sai võrrelda kontsentreerimise mõju analüüdi piikidele. Proovi kontsentreerimisel 100 µl-ni teravnes NDEA piik, NDMA piik muutus aga mürast raskemini eristatavaks või kadus sootus. Katsete tulemusel osutus optimaalseks kasutada ekstrakte lõppruumalaga 1 ml.

### 3.1.3. Avastamispiir ja määramispiir

**Metoodika avastamis- ehk detekteerimispiiri** määramiseks kasutati EPA metoodikas 521 soovitatud meetodit [39]. Analüütide jaoks valiti eeldatavasti detekteerimispiiri lähedal paiknevad kontsentratsioon, milleks NDMA puhul valiti 100 ng/l ning NDEA puhul 5 ng/l. Lisaks analüütidele lisati lahustesse sisestandardina NMOR-i (520 ng/l). Kokku valmistati ja analüüsiti seitse lahust sama nädala kolmel eri päeval.

Metoodika detekteerimispiir leiti kasutades valemit 3.1. NDEA avastamispiiriks määrati 6 ng/l (võrrand 3.2) ning NDMA avastamispiiriks määrati 42 ng/l (võrrand 3.3). Avastamispiiride leidmiseks kasutatud andmed ning saadud tulemused on toodud tabelis 3.2.

$$DL = st_{(n-1, 1-\alpha=0,99)} \quad (3.1)$$

$DL$ - avastamispiir (ng/l)

$s$ - kontsentratsioonide standardhälve (ng/l)

$t_{(n-1, 1-\alpha=0,99)}$  - Studenti  $t$ -kordaja 99% usaldusnivoo korral, kui  $n-1$  tähistab vabadusastmete arvu ja  $n$  tähistab korduste arvu

$$DL_{NDEA} = 1,53 * 3,71 \approx 6 \text{ [ng/l]} \quad (3.2)$$

$$DL_{NDMA} = 11,35 * 3,71 \approx 42 \text{ [ng/l]} \quad (3.3)$$

Tabel 3.2. NDMA ja NDEA avastamispiiri määramine

A(NDMA)	A(NDEA)	A(NMOR)	A(NDMA)/ A(NMOR)	A(NDEA)/ A(NMOR)	C(NDMA) [ng/l]	C(NDEA) [ng/l]
1827	245	10507	0,174	0,023	132,9	5,77
1485	290	8990	0,165	0,032	130,4	7,99
1688	250	9240	0,183	0,027	135,4	6,70
1400	246	7097	0,197	0,035	139,6	8,58
1959	316	9220	0,212	0,034	144,0	8,48
-	249	8352	-	0,030	-	7,38
-	168	9429	-	0,018	-	4,41
653	-	7263	0,090	-	108,8	-
1513	-	8095	0,187	-	136,6	-
Keskmine (ng/l)					132,5	7,04
Standardhälve (ng/l)					11,35	1,53
Kordusmõõtmiste arv					7	7
Vabadusastmete arv					6	6
$t(99\%)$					3,71	3,71
Avastamispiir (ng/l)					<b>42</b>	<b>6</b>

A- piigi pindala mass-kromatogrammil

C- kontsentratsioon (ng/l)

**Metoodika määramis- ehk kvantiseerimispiiri (MRL)** leidmiseks kasutati EPA metoodika 521 juhiseid [39]. Määramispiiri leidmiseks valiti eeldatavasti määramispiiri lähedal asuv analüüdi kontsentratsioon. Valitud kontsentratsioonil valmistati seitse lahust, mida analüüsiti väljatöötatud metoodika kohaselt. Edasi leiti analüüsi tulemuste põhjal arvatud analüüdi kontsentratsioonide standardhälve. Valitud määramispiir hinnati sobilikuks, kui võrrandites 3.4 ja 3.5 esitatud tingimused olid täidetud.

$$\frac{C_{\text{keskm}} + 3,963s}{C_{\text{teor}}} \leq 150\% \quad (3.4)$$

s- analüüdi kontsentratsioonide standardhälve (ng/l)

$C_{\text{keskm}}$ - analüüdi (signaalide põhjal arvatud) kontsentratsioonide aritmeetiline keskmine (ng/l)

$C_{\text{teor}}$ - analüüdi teoreetiline kontsentratsioon ehk analüüsitud vesilahuse spaigitud kontsentratsioon (ng/l)

$$\frac{C_{\text{keskm}} - 3,963s}{C_{\text{teor}}} \geq 50\% \quad (3.5)$$

NDEA puhul valiti määramispiiri kontsentratsiooniks **23,75 ng/l** ning NDMA puhul **200 ng/l**. Paralleelmõõtmiste algandmed ning vahearvutused on toodud tabelis 3.3, tulemusi kajastab tabel 3.4.

Tabel 3.3. NDEA ja NDMA määramispiiri kinnitamise algandmed ja vahearvutused

A(NDMA)	A(NDEA)	A(NMOR)	A(NDMA)/ A(NMOR)	$C_{\text{arv}}(\text{NDMA})^1$ (ng/l)	A(NDEA)/ A(NMOR)	$C_{\text{arv}}(\text{NDEA})^1$ (ng/l)
1488	419	4821	0,309	171,5	0,087	21,5
1400	356	4490	0,312	172,4	0,079	19,6
1601	419	4737	0,338	179,9	0,088	21,9
1884	422	4816	0,391	195,2	0,088	21,7
1655	437	4391	0,377	191,1	0,100	24,6
1574	-	5022	0,313	172,9	-	-
1488	565	4796	0,310	172,0	-	-
-	392	4171	-	-	0,094	23,3
-	449	5153	-	-	0,087	21,6

<sup>1</sup> - arvutamiseks kasutati andmeid kalibreerimisgraafikutelt joonis 3.6 ja joonis 3.7

Tabel 3.4. NDEA ja NDMA määramispiiri kinnitamise tulemused

	NDMA	NDEA
$C_{\text{teor}}$ (ng/l)	200	23,75
$C_{\text{keskm}}$ (ng/l)	179,3	22,0
Standardhälve (ng/l)	9,9	1,57
Ülemine piir ( $\leq 150\%$ )	109%	113%
Alumine piir ( $\geq 50\%$ )	70%	63%

### 3.1.4. Määramatus

NDEA ja NDMA määramatuste arvutamiseks kasutati määramispiiri kinnitamiseks tehtud analüüside tulemusi. Määramatuste arvutamiseks kasutati standardhälbe

arvutamise valemit 3.6, mis võrdleb analüütide teoreetilisi kontsentratsioone arvutuslike väärtustega. Saadud standardhälve korrutati määramatuse leidmiseks kahega. Eldusel, et leitud tulemused vastavad standardjaotusele ning et määramatus ei sõltu analüüdi kontsentratsioonist proportsionaalselt, peaks 95% saadud tulemustest jääma tegelikust väärtusest kuni määramatuse kaugusele. NDEA ja NDMA määramatuste arvutuseks kasutatud andmed ning saadud tulemused on toodud vastavalt tabelites 3.5 ja 3.6.

$$s(\text{analüüt}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{\text{teor}} - C_{\text{arv}})^2}{n - 1}} \quad (3.6)$$

$s(\text{analüüt})$ - analüüdi standardhälve (ng/l)

$C_{\text{teor}}$ - analüüdi teoreetiline kontsentratsioon ehk analüüsitud vesilahuse spaigitud kontsentratsioon (ng/l)

$C_{\text{arv}}$ - analüüdi kontsentratsioon arvutatuna analüüdi signaali ja kalibreerimisgraafiku (joonised 3.5 ja 3.6) abil (ng/l)

$n$ - kordusmõõtmiste arv

Tabel 3.5. NDEA määramatuse arvutus

$C_{\text{teor}}(\text{NDEA})$ (ng/l)	$C_{\text{arv}}(\text{NDEA})$ (ng/l)	$C_{\text{teor}}(\text{NDEA}) - C_{\text{arv}}(\text{NDEA})$ (ng/l)	$[C_{\text{teor}}(\text{NDEA}) - C_{\text{arv}}(\text{NDEA})]^2$ (ng/l) <sup>2</sup>
23,75	21,5	2,23	4,99
	19,6	4,12	16,99
	21,9	1,85	3,43
	21,7	2,06	4,24
	24,6	-0,89	0,79
	23,3	0,48	0,23
	21,6	2,18	4,75
s(NDEA) (ng/l)			2,48
s(NDEA)*2 (ng/l)			<b>4,95≈5</b>

NDEA määramatuseks hinnati ±5 ng/l. Leitud määramatuse veapiirid on kantud ka joonisele 3.5.

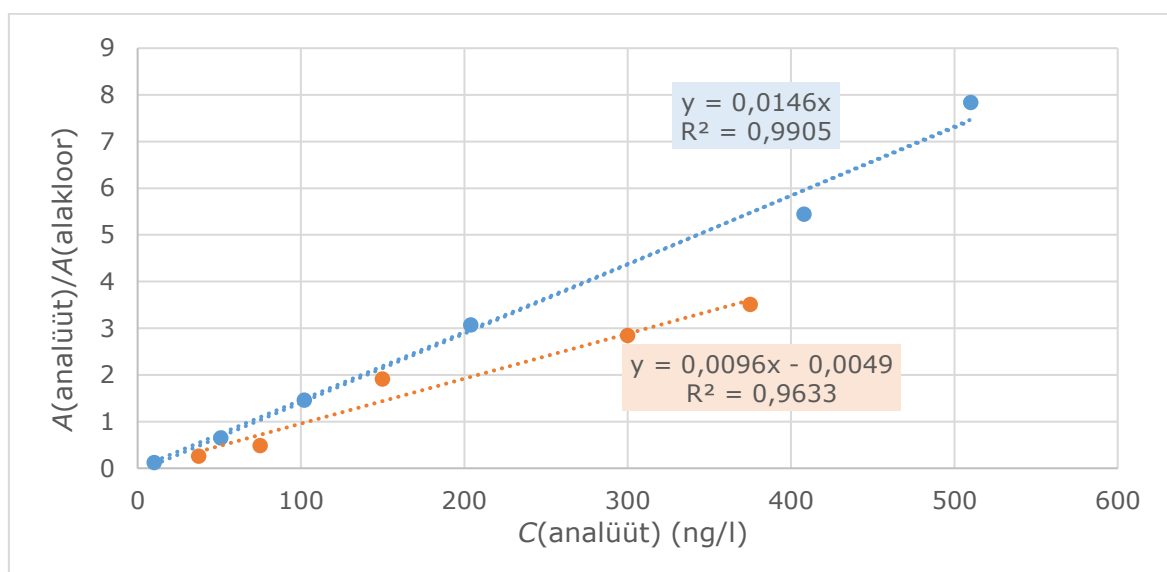
Tabel 3.6. NDMA määramatuse arvutus

$C_{\text{teor}}(\text{NDMA})$ (ng/l)	$C_{\text{arv}}(\text{NDMA})$ (ng/l)	$C_{\text{teor}}(\text{NDMA}) - C_{\text{arv}}(\text{NDMA})$ (ng/l)	$[C_{\text{teor}}(\text{NDMA}) - C_{\text{arv}}(\text{NDMA})]^2$ (ng/l) <sup>2</sup>
200	171,53	28,47	810,45
	172,44	27,56	759,78
	179,94	20,06	402,43
	195,20	4,80	23,08
	191,08	8,92	79,60
	172,90	27,10	734,44
	171,99	28,01	784,40
s(NDEA) (ng/l)			24,48
s(NDEA)*2 (ng/l)			<b>48,95≈49</b>

NDMA määramatuseks hinnati  $\pm 49$  ng/l. Leitud määramatusest tulenevad veapiirid on kantud ka joonisele 3.6.

### 3.1.5. Saagis

Metoodika saagist hinnati analüütide jaoks eraldi. Saagise hindamiseks valmistati analüütide lahused diklorometaanis, millele lisati sisestandardina alakloori ning mida analüüsiti kasutades GC-MS (joonis 3.7). NDEA ja NDMA saagise arvutamiseks kasutatud andmed ning saadud tulemused on toodud tabelites 3.7 ja 3.8.



Joonis 3.7. NDEA ja NDMA kalibreerimisgraafikud diklorometaanis

Tabel 3.7. NDEA saagis

$C_{\text{teor}}(\text{NDEA})$ (ng/l)	A(NDEA)	A(Alakloor)	$A(\text{NDEA})/$ $A(\text{alakloor})$	$C_{\text{peale eeltöötlust}}(\text{NDEA})$ (ng/l)	Saagis
9,5	356	2466	0,14	9,9	104%
23,75	833	2448	0,34	23,3	98%
38	787	1901	0,41	28,4	75%
47,5	1327	2609	0,51	34,8	73%
71,25	2411	2726	0,88	60,6	85%
95	2702	2210	1,22	83,8	88%
142,5	2848	1199	2,38	162,7	114%
190	3853	1539	2,50	171,5	90%

NDEA saagis varieerus 73%-114%. Alla 100% saagised tulenevad põhiliselt proovi töötlemisel tekkinud kadudest. Üle 100% saagised ei tähenda, et analüüti oleks analüüsil kuskilt juurde tekkinud. Kuna saagise % sõltub alakloori kogusest ekstraktis,

on tõenäoline, et nende proovide puhul tekkis alakloori kadu sisestandardi lisamisel ekstrakti või ekstrakti ülekandmisel katseklaasist viaali.

Tabel 3.8. NDMA saagis

$C_{\text{teor}}(\text{NDMA})$ (ng/l)	A(NDMA)	A(Alakloor)	A(NDMA)/ A(alakloor)	$C(\text{NDMA}_{\text{peale eeltöötlust}})$ (ng/l)	Saagis
100	715	2609	0,27	28,5	29%
120	1794	1962	0,91	95,2	79%
150	1945	2726	0,71	74,3	50%
176	1386	1471	0,94	98,1	56%
200	2622	2210	1,19	123,5	62%
252	2345	1237	1,90	197,3	78%
300	3803	1911	1,99	207,2	69%
350	5089	1646	3,09	321,8	92%

NDMA saagis oli üldiselt 50%-92%. Madalam saagis (29%) esines NDMA kontsentratsioonil 100 ng/l, mis jäi ka alla NDMA määramispiiri. See, et NDMA saagised pigem suurenesid kontsentratsiooni tõusuga näitas, et saagist limiteerivaks teguriks ei olnud SPE padrundi mahtuvus. NDMA tunduvalt madalamad saagised võrreldes NDEA-ga võisid tuleneda NDMA piigi lamedamast kujust.

### 3.1.6. Maksumus

Metoodika kasutuselevõtul on lisaks metoodika analüütilisele võimekusele ning kasutusmugavusele oluline ka selle maksumus. Metoodika maksumuse võiks jaotada üldiselt muutuvkuludeks ning algkapitaliks.

Muutuvkuludena on arvesse võetud lahusteid ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ja  $\text{CH}_4\text{OH}$ ), sisestandardit (NMOR), SPE kassette, filtreid (süstalfilter, membraanfilter, tselluloos filter), GC viaali kõrge, kuivatusagenti (veevaba  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), dekloreerimise agent (  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ning tööjõudu ehk palgafondi. Tabel 3.9 kajastab ühe proovi analüüsimisel tekkivate muutuvkulude umbkaudseid väärtusi ning tabel 3.10 vastavalt ainult muutuvkulude põhjal arvatud proovi analüüsi omahinda. Materjalide maksumuse hindamiseks on põhiliselt kasutatud tuntud kemikaale tootvate firmade kodulehti (Merck, Fisher Scientific). Hinnad on umbkaudsed ning arvesse ei ole võetud tarneprobleeme ega maksumust.

Tabel 3.9. Muutuvkulud ühe proovi analüüsiks

Materjal	Materjali kulu	Ühik	(Materjali maksumus, €)/ (ostetavate ühikute arv)	Materjali maksumus ühiku kohta (€)	Maksumus (€)	Osakaal heitvee proovi maksumuses
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18,5	ml	164/2500	0,07	1,21	4%
CH <sub>4</sub> OH	12	ml	75,8/2000	0,04	0,45	1%
NMOR	0,52	µg	190/1300	0,15	0,08	0,2%
SPE kassett	0,05	tk	274/30	9,13	0,46	1%
Süstalfilter	0,125	tk	237/50	4,74	0,59	2%
GC viaali kork	1	tk	12,12/100	0,12	0,12	0,4%
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	g	26,8/500	0,05	0,05	0,2%
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,1	g	23,2/250	0,09	0,01	0,03%
Töäjõud (palgafond)	2	h	11/1	11,00	22,00	69%
Membraanfilter	1	tk	196/100	1,69	1,60	-
Membraanfilter	4	tk	196/100	1,69	6,80	21%
Tselluloos filter	5	tk	1,88/100	0,02	0,09	0,3%

Tabel 3.10. Muutuvkulude maksumus ühe proovi analüüsiks

	Kokku	Kokku ilma tööjõu kuluta
Kalibreerimisproov	24,98	2,98
Joogivee proov	26,67	4,67
Heitvee proov	31,83	9,83

Kulude hindamisel selgus, et kõige suuremaks muutuvkuluks on tööjõud. Tööjõukulude minimeerimiseks tuleks analüüsida võimalikult palju proove samas prooviseerias ning katsetada, kas ning kui palju oleks võimalik proovi voolukiirust läbi padruni suurendada. Igapäevase analüüsi puhul oleks samuti mõistlik kaaluda mitme pesaga lämmastikaurustaja soetamist. Heitvee analüüsi puhul on suure majandusliku kaaluga ka proovi töötlus enne tahkefaas ekstraktiooni - filtreerimine on aeganõudev ning membraanfiltrid on kallid.

Lisaks eelmainitud muutuvkuludele peaks kasutatav labor olema varustatud järgmiste seadmetega: sobiv GC-MS seade, vaakumpump, automaatpipetid (100 µl, 1 ml, ja 5 ml nominaalruumalaga), kaal (vähemalt kahe komakohaga), ultrapuhta vee masin, termostateeritav vesivann, lämmastiku generaator, tõmbekapp, külmkapp. Lisaks seadmetele on vajalikud ka järgmised laborinõud/-tarvikud: üheliitrine mõõtsilinder, proovipudelid, 10 ml nominaalruumaga katseklaasid (lihviga ja ilma), keeduklaasid, nutsche filter, SPE süsteem, GC viaalid, mõõtkolvid, mikrosüstlad, koonilised kolvid ja lehrid.

## 3.2. Metoodika rakendamine

Metoodikat rakendati kahest eri veepuhastusjaamast pärit joogivee ning ühest reoveepuhastusjaamast pärit heitvee proovide analüüsimiseks.

### 3.2.1. Joogivee proovid

Enne analüüsi filtreeriti proovid, kasutades membraanfiltriga nutsche filtrit (Joonis 3.8). Filtreerimisel eemaldati proovidest lahustumatud raua ühendid ja teised hõljuvained, mis võiksid SPE padrunite filtreid ummistada. Analüüsiks kasutatava proovi koguse (1 liiter) mõõtmiseks kasutati mõõtsilindrit. Proovile lisati ~50 mg naatriumtiosulfaat pentahüdraati ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).



Joonis 3.8. Proovide filtreerimine nutsche filtriga

### Tallinna Vee joogivee tootmise protsess

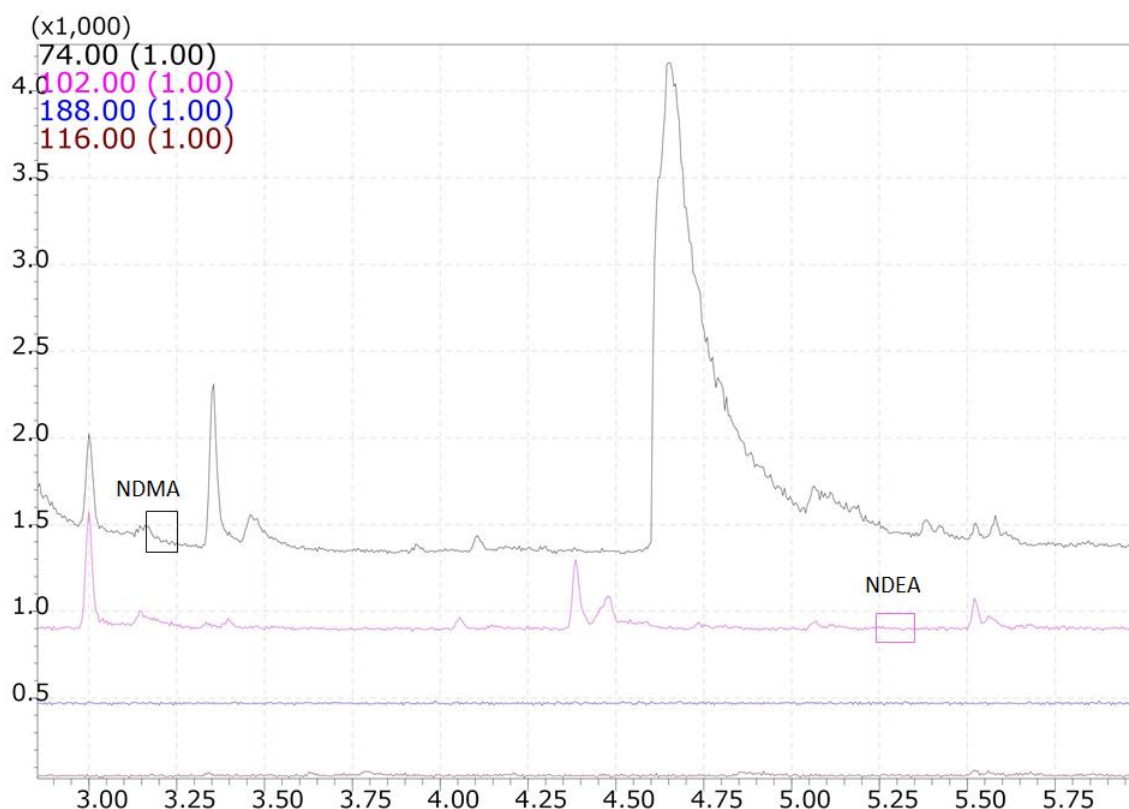
Tallinna Vesi kasutab joogivee tootmiseks pinnavett Ülemiste järvest. Esmalt eemaldatakse veest võrede abil suuremad tahkised. Seejärel suunatakse vesi mikrofiltritele, kus toimub biopuhastus. Peale biopuhastust toimub vee osoneerimine, millele järgneb koagulandi ja flokulandi abil selitamine ning lõpuks filtreerimine. Juba puhtale joogiveele lisatakse kloori, et vesi oleks steriilne mitte ainult jaamast väljudes vaid ka tarbija kraanidesse jõudes. [90]



Tallinna Vee veepuhastusprotsessis on potentsiaalseteks nitrosoamiine tekitavateks protsessideks osoneerimine ja järelkloreerimine.

### Tallinna Vee proovid

Kaks proovi võeti 8.00 Tallinna Vee Ülemiste veepuhastusjaamast linna suunduvatest hüdrantidest. Lisaks veepuhastusjaamast väljuvale veele analüüsiti ka vett tarbija kraanist. Samal päeval kell 9.00 võeti veel kolmas proov Tallinna Tehnikaülikooli labori kraanist. Enne proovi võtmist lasti veel mõned minutid täissurvega joosta ning proovivõtu anumad loputati. Proovide analüüsimisega alustati sama päeva hommikul. Kõikides analüüsitud proovides jäi nii NDMA kui ka NDEA sisaldus alla avastamispiiri. Näide registreeritud mass-kromatogrammi analüütide piirkonnast on toodud joonisel 3.9.



Joonis 3.9. Mass-kromatogramm: Tallinna Vee Ülemiste veepuhastusjaamast linna suunduv hüdrant

### Narva Vee joogivee tootmise protsess

Narva Veevõrk kasutab joogivee tootmiseks Narva jõe vett. Esmalt filtreeritakse veest suuremad ning kuni 0,5 mm suurused tahkised. Järgnevalt kasutatakse flotatsiooni vees oleva orgaanika eemaldamiseks. Peale flotatsiooni läbib vesi liiva ja anartsidi filtri, millele järgneb vee osoneerimine. Osoneeritud vesi filtreeritakse kasutades granuleeritud aktiivsöe täidisega filtreid. Viimaste joogiveetöötlusprotsesside

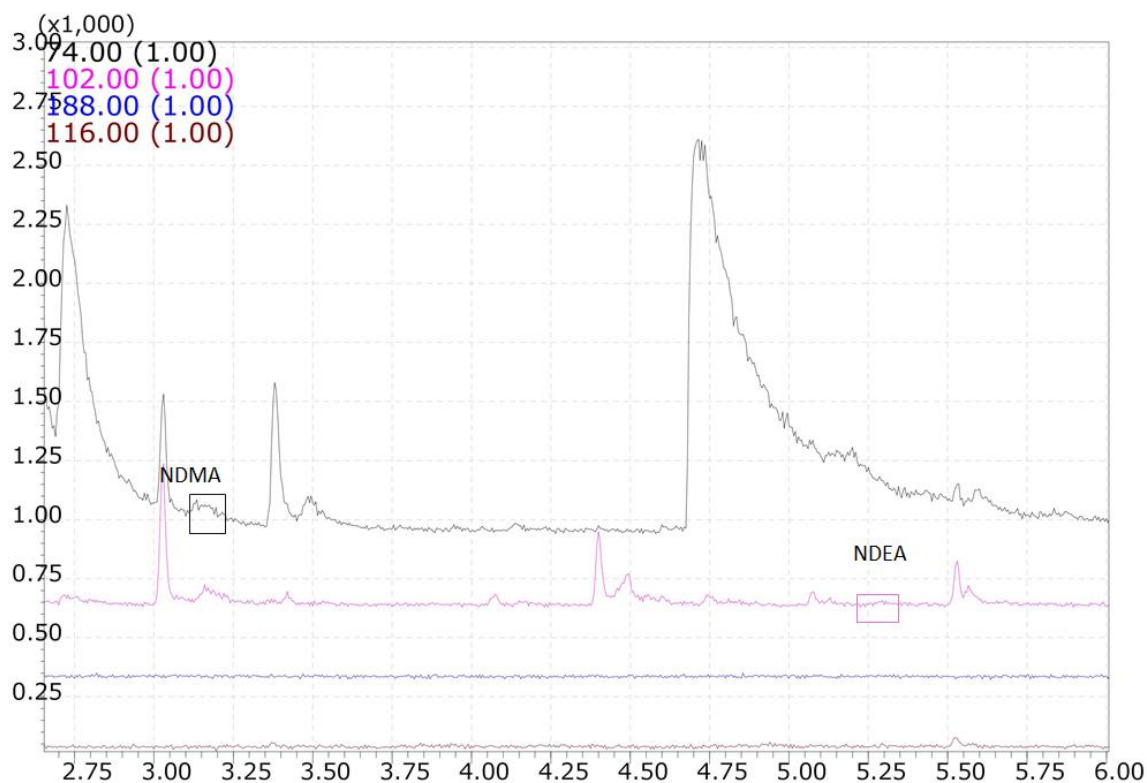
eesmärgiks on desinfitseerimine, selleks kasutatakse UV-kiirgust ning klooramiinide lisamist. [91]

Nitrosoamiinide tekke seisukohast on potentsiaalselt ohtlikud protsessid osoneerimine ning klooramiinide lisamine. Nitrosoamiine potentsiaalselt lagundavaks protsessiks on seevastu vee töötlus UV-kiirgusega.

### Narva Vee proovid

Analüüsi kahte Narva Vee proovi. Esimeseks prooviks oli Narva veepuhastusjaamast linna veevõrku väljuv vesi. Proov oli võetud S. Shlypkina poolt aadressilt Kulgu tn 1, Narva 11. veebruaril 2020 kell 8.30. Teine analüüsitud proov oli võetud I. Gorlova poolt samal päeval kell 10.10 tarbija kraanist. Proovid võeti tumedatesse klaaspudelitesse, mida hoiustati proovide analüüsimiseni 5...10 °C juures. Proove analüüsi kaks päeva hiljem (13. veebruaril).

Analüüsi tulemusel ei suudetud NDMA-d ega NDEA-d proovidest tuvastada. Näide registreeritud mass-kromatogrammi analüütide piirkonnast on toodud joonisel 3.10.



Joonis 3.10. Mass-kromatogramm: Narva Vee veepuhastusjaamast linna suunduv hüdrant

### **3.2.2. Heitvee proovid**

#### **Reoveetöötlus ning nitrosoamiinid**

Nitrosoamiinide esinemine ja kontsentratsioon heitvees sõltub reovee päritolust ning töötlemismeetoditest. Analüüsitud heitvesi oli toodetud peamiselt olmereoveest. Reoveepuhastusprotsess, mida analüüsitud heitvee tootmiseks kasutati ei hõlmanud kõrge nitrosoamiinide tekkimise potentsiaaliga protsesse.

#### **Heitvee proovide analüüs**

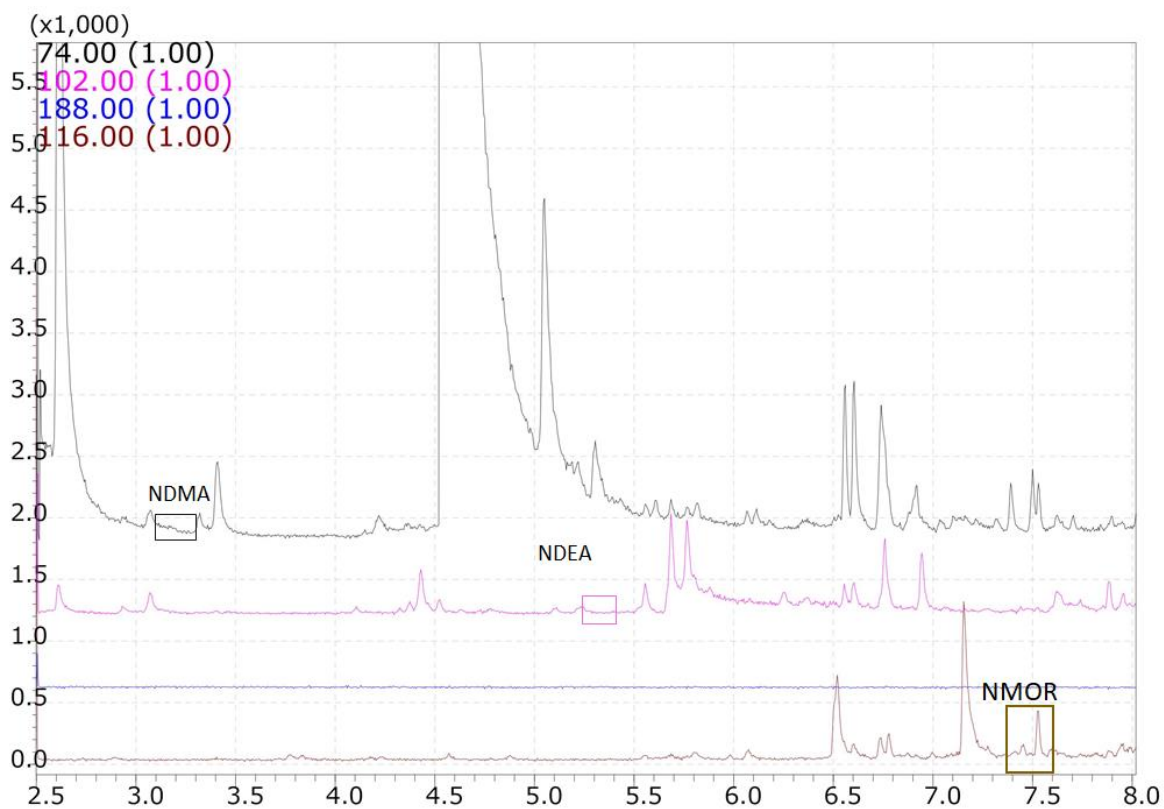
Analüüsiti kahte heitvee proovi samast reoveepuhastusjaamast. Ühe proovi puhul oli tegemist hetkeprooviga, teise puhul vooluhulgaga proportsionaalselt kogutud ehk keskmistatud prooviga. Mõlemad proovid olid võetud analüüsiga samal päeval ning nende analüüsimist alustati esimesel võimalusel. Mõlemat proovi analüüsiti kahe paralleelina.

Heitvee koostis on joogivee omast varieeruvam ning heitvees sisaldub tunduvalt rohkem erinevaid orgaanilisi ühendeid, mis suurendab NMOR-i tekkimise tõenäosust. Heitvett analüüsiti seetõttu paralleelides. Esimese paralleeli analüüs viidi läbi ilma NMOR-i lisamiseta ning see oli vajalik tõestamiseks, et analüüsitava vesi ei sisalda detekteeritavas kontsentratsioonis NMOR-i. Teisele paralleelile lisati NMOR-i, võimaldamaks määrata analüütide ja NMOR piikide suhet NDEA ja NDMA kontsentratsioonide leidmiseks.

Heitvee analüüsimine nõudis pikemat proovi ettevalmistust kui joogivee analüüs. Proovides oli tunduvalt rohkem suspenseerunud tahkiseid, mistõttu filtreeriti proovi kaks korda. Esmalt kasutati eriti tihedat puuvillast paberfiltrit, mis sisaldas üle 98%  $\alpha$ -tselluloosi (klass 391). Seejärel filtreeriti proov nutsche filtri abil läbi 0,45  $\mu\text{m}$  suuruste pooridega membraanfiltrit. Kuna olemasoleva proovi hulk oli piiratud ning mitmekordsel filtreerimisel tekkisid kaod, tuli analüüsitava proovi ruumala vähendada 900 ml-ni. Kasutatud proovi ruumala arvesse võttes korrigeeriti vastavalt ka proovide kohta käivaid määramis- ja avastamispiire. Proovidele lisati ~50 mg naatriumtiosulfaati. Esimesele paralleelile ei lisatud NMOR-i, teisele paralleelile lisati 0,4 ml NMOR põhilahust kontsentratsiooniga 1,3 mg/l sisestandardiks. NMOR-ga spaigitud proovides oli NMOR sisaldus seega 580 ng/l.

Edasine analüüs toimus järgides valideeritud meetodikat. Proovide mass-kromatogramme analüüsides leiti esimestest paralleelidest NMOR retentsioonija läheduses väike piik (joonis 3.11  $m/z=116$ ,  $t\approx 7,55$  min). Analüüsides ka NMOR-ga spaigitud proovide mass-kromatogramme oli kõnealust väiksest piiki endiselt näha NMOR piigi kõrval, mis näitas, et tegemist ei olnud siiski NMOR-ga ja NMOR-i

kasutamine sisestandardina oli põhjendatud. NDEA ning NDMA retentsioonija piirkondades ei esinenud analüütidele iseloomulikke piike. Proovi ilma sisestandardita mass-kromatogramm analüütide ja sisestandardi piirkonnas toodud joonisel 3.11.



Joonis 3.11. Heitvee hetkproovi mass-kromatogramm analüütide ja sisestandardi piirkonnas

Kahe heitvee proovi analüüsi tulemused näitasid, et nii NDMA kui ka NDEA sisaldused heitvees olid alla avastamisiiri, milleks NDEA puhul oli 6 ng/l ning NDMA puhul 47 ng/l (avastamisiire kohandati analüüsiks kasutatud väiksema proovi kogusega). Samuti ei suudetud analüüsitud heitveest tuvastada NMOR-i.

# KOKKUVÕTE

EPA meetodika 521 põhjal valideeriti metoodika nitrosodimetüülamiini (NDMA) ja nitrosodietüülamiini (NDEA) sisalduse määramiseks veeproovides.

Proovid filtreeriti enne analüüsi. Analüüsil kasutati sisestandardina nitrosomorfoliini (NMOR), et arvesse võtta analüüsil tekkivaid juhuslikke ning süstemaatilisi kadusid. Proovidele lisati naatriumtiosulfaati ning viidi läbi tahkefaasekstraktsioon. Saadud ekstrakte kuivatati, kasutades veevaba naatriumsulfaati ning kontsentreeriti termostateeritult lämmastiku voolus. Proovidele lisati teist sisestandardit (alakloori) ning ekstraktid kanti kvantitatiivselt üle kalibreeritud ühemilliliitristesse GC viaalidesse.

Ekstraktide analüüsimiseks kasutati GC-MS meetodit. GC kolonn oli mittepolaarne ning kasutatud temperatuurirežiimi pikkuseks oli 18,75 minutit. NDMA elueerus ~3,2, NDEA ~5,3, NMOR ~7,5 ning alakloor ~14,7 minutil. GC detektorina kasutati elektron ionisatsiooniga kvadrupool massispektromeetrit, mille detektoriks oli elektronkordisti.

Valideeritud metoodika avastamispiiriks määrati NDMA jaoks 42 ng/l ning NDEA jaoks 6 ng/l. Metoodika määramispiirid olid vastavalt 200 ng/l ja 23,75 ng/l. Analüütide määramatusteks hinnati  $\pm 49$  ng/l (NDMA) ning  $\pm 5$  ng/l (NDEA). Kõik kalibreerimisgraafiku punktid jäid kalibreerimisfunktsioonist vähem kui määramatuse kaugusele.

Rakendades valideeritud metoodikat kahest eri pinnaveeallikast toodetud joogivee analüüsimiseks, ei suudetud analüüte proovidest tuvastada. Heitvee proovi analüüsi paralleelidena, lisades sisestandardit vaid ühele paralleelile, tõestamaks, et proov ei sisalda NMOR-i. Analüüsi tulemuseks oli, et NDMA ja NDEA kontsentratsioonid heitvees jäid vastavalt alla 47 ng/l ja 6 ng/l.

Vajaliku aparatuuriga varustatud labori muutuvkuludeks valideeritud metoodika rakendamisel hinnati ~30 eurot proovi kohta. Suurimaks analüüsi muutuvkuluks oli tööjõud, ilma milleta oleks analüüsi muutuvkulude summaks ~10 eurot.

Valideeritud metoodika rakendamine andis esmase hinnangu NDMA ja NDEA sisalduste kohta Eesti joogi- ning heitvees. Madalamate avastamispiiride saavutamiseks tuleks muuta analüüsiks kasutatud aparatuuri. Katsetada võiks näiteks polaarsemat GC kolonni, MS ionisatsiooni meetodina keemilist ionisatsiooni ning ühekordse MS asemel tandem MS kasutamist.

Metoodikat võiks lisaks uuritud proovidele rakendada ka põhjaveest toodetud joogivee ning basseinivee analüüsimiseks. Samuti tuleks analüüsida ka teistest reoveepuhastusjaamadest väljuvat heitvett.

## SUMMARY

Based on EPA Method 521 an analytical procedure aimed to determine the concentrations of nitrosodimethylamine (NDMA) and nitrosodiethylamine (NDEA) in water samples was validated.

Samples were filtrated before the analysis. Nitrosomorpholine was used as internal standard to take into account random and systematic losses of analyte. Potassium thiosulfate was added to the samples and solid phase extraction was conducted. The extract was dried using sodium sulphate and concentrated concentrated in thermostate by means of evaporation using the flow of nitrogen. Alachlor was added to the extract as second internal standard and the extract was quantitatively transferred to a 1 ml vial.

For the analysis of the extract GC-MS method with non-polar GC column was used. The temperature program lasted 18,75 minutes. The retention times for the analytes were as followed: NDMA ~3,2, NDEA ~5,3, NMOR ~7,5 and alachlor ~14,7 minutes. The mass spectrometer used electron ionization and was equipped with quadrupole mass analyser. The detector of MS was electron multiplier.

The limit of detection for NDMA and NDEA was determined to be 42 ng/l and 6 ng/l, respectively. The minimum reporting level for the analytes were 200 ng/l for NDMA and 23,75 ng/l for NDEA. The uncertainty of the analytes were  $\pm 49$  ng/l (NDMA) and  $\pm 5$  ng/l (NDEA). The calibration function was closer to calibration points than the uncertainty.

Applying a validated method for the analysis of drinking water produced from two different surface water sources, no analytes were detected in the samples. The wastewater effluent samples were analyzed in parallel. The internal standard (NMOR) was thereby added to only one of the parallels in order to demonstrate the absence of NMOR in the samples. The analysis showed that the concentration of NDMA in the effluent was less than 47 ng/l and 6 ng/l, respectively.

The variable costs for the application of this method in an analytical laboratory equipped with all necessary tools was found to be ca 30 euros per sample comprising the largest variable cost for labor. The amount of variable costs without taking into consideration the expenses for labor would be about 10 euros per sample.

The application of this analytical method allowed to conduct the preliminary assessment on the presence of NDMA and NDEA in Estonian drinking water and wastewater. The apparatus used for the analysis should be modified to achieve lower detection limits. For example, a more polar GC column could be used, chemical ionization as a method of MS ionization could be more effective, and the use of tandem MS would probably result in lower detection and quantification limits.

In addition to the studied samples, the method could also be applied for the analysis of groundwater and pool water. Wastewater from other wastewater treatment plants should also be analyzed.



## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] Nawrocki, J.; Anrzejewski, P. Nitrosamines and Water. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *189*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.005>.
- [2] International Agency of Research on Cancer. *Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins*; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization: Lyon, France, 2010; Vol. 94.
- [3] Loeppky, R. N. Nitrosamine and N-Nitroso Compound Chemistry and Biochemistry. In *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1994; Vol. 553, pp 1–18. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0553.ch001>.
- [4] World Health Organization. List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/> (accessed Dec 25, 2019).
- [5] Samet, J. M.; Chiu, W. A.; Coglianò, V.; Jinot, J.; Kriebel, D.; Lunn, R. M.; Beland, F. A.; Bero, L.; Browne, P.; Fritschi, L.; Kanno, J.; Lachenmeier, D. W.; Lan, Q.; Lasfargues, G.; Le Curieux, F.; Peters, S.; Shubat, P.; Sone, H.; White, M. C.; Williamson, J.; Yakubovskaya, M.; Siemiatycki, J.; White, P. A.; Guyton, K. Z.; Schubauer-Berigan, M. K.; Hall, A. L.; Grosse, Y.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; El Ghissassi, F.; Lauby-Secretan, B.; Armstrong, B.; Saracci, R.; Zavadil, J.; Straif, K.; Wild, C. P. Updated Procedures for Modern and Transparent Evidence Synthesis in Cancer Hazard Identification. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2020**, *112* (1). <https://doi.org/10.1093/jnci/djz169>.
- [6] Liteplo, R. G.; Meek, M. E.; Windle, W. Concise International Chemical Assessment Document 38: N-Nitrosodimethylamine. World Health Organization 2002.
- [7] EPA United States Environmental Protection Agency. Technical Fact Sheet – N-Nitrosodimethylamine (NDMA). 2014.
- [8] Sigmaaldrich. N-Nitrosodiethylamine <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n0756> (accessed Feb 23, 2020).
- [9] Nitrosomorpholine | 59-89-2 | Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n7382?lang=en&region=E> (accessed Apr 23, 2020).
- [10] NITROSOMORPHOLINE | C4H8N2O2 | ChemSpider <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5823.html> (accessed Apr 23, 2020).

- [11] Environment Canada; Health Canada. *Canadian Environmental Protection Act, 1999, Priority Substances List Assessment Report N-Nitrosodimethylamine (NDMA)*; 2001.
- [12] Handajani, U. S.; Supriyanto, G.; Raharjo, Y.; Saputra, G. D. Analysis of Nitrosodiethylamine (NDEA) in Salted Fish With Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction Gas Chromatography Flame Ionization Detector (HF-LPME-GC-FID) Method. In *Proceedings of The 9th Joint Conference on Chemistry*; Semarang, Indonesia, 2015.
- [13] N-NITROSOMORPHOLINE | 59-89-2  
[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3185221.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3185221.htm)  
 (accessed Feb 15, 2020).
- [14] OSHA Analytical Laboratory. *OSHA Analytical Methods Manual*, 2nd ed.; OSHA Analytical Laboratory: Salt Lake City, Utah, 1990; Vol. 1.
- [15] Bingham, E.; Cohrssen, B. *Patty's Toxicology*, 6th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2012; Vol. 1.
- [16] Reinik, M. Nitrates, Nitrites, N-Nitrosamines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food: Analytical Methods, Occurrence and Dietary Intake. *TARTU Univ. PRESS 2007*.
- [17] World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 3rd ed.; Geneva, 2008; Vol. 1.
- [18] Health Canada. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document — N-Nitrosodimethylamine. Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. 2011.
- [19] Guidance on the Water Supply (Water Quality) Regulations 2000a Specific to N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Concentrations in Drinking Water. Drinking Water Inspectorate 2000.
- [20] HMRC; NRMCC. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra 2011.
- [21] Kim, H.; Han, K. Ingestion Exposure to Nitrosamines in Chlorinated Drinking Water. *Environ. Health Toxicol.* **2011**, *26*.  
<https://doi.org/10.5620/eht.2011.26.e2011003>.
- [22] Massachusetts Department of Environmental Protection Office of Research and Standards. Supporting Documentation for Drinking Water Standards and Guidelines. 2018.

- [23] N-Nitrosodimethylamine and Water. Minnesota Department of Health September 2018.
- [24] California Water Boards State Water Resources Control Board. NDMA and Other Nitrosamines - Drinking Water Issues | California State Water Resources Control Board  
[https://www.waterboards.ca.gov/drinking\\_water/certlic/drinkingwater/NDMA.html](https://www.waterboards.ca.gov/drinking_water/certlic/drinkingwater/NDMA.html)  
 I (accessed Feb 16, 2020).
- [25] Huang, C.-H.; Padhye, L. P.; Wang, Y.-L. Catalytic Impact of Activated Carbon on the Formation of Nitrosamines from Different Amine Precursors. *ACS Symp. Ser.* 79–100.
- [26] WHO Information Note: Update on Nitrosamine Impurities. World Health Organization November 20, 2019.
- [27] Alaba, P. A.; Sani, Y. M.; Olupinla, S. F.; Daud, W. M. W.; Mohammed, I. Y.; Enweremadu, C. C.; Ayodele, O. O. Toward N-Nitrosamines Free Water: Formation, Prevention, and Removal. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2017**, 47 (24), 2448–2489. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1430438>.
- [28] Zheng, J.; Lin, T.; Chen, W. Removal of the Precursors of N-Nitrosodiethylamine (NDEA), an Emerging Disinfection Byproduct, in Drinking Water Treatment Process and Its Toxicity to Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chemosphere* **2018**, 191, 1028–1037. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.059>.
- [29] Six-Year Review 3 Technical Support Document for Nitrosamines. United States Environmental Protection Agency 2016.
- [30] Meadows, M.; Pradhanang, S. M.; Boving, T. B.; Hadjeres, H. Nitrosamines: A Review of Formation Pathways, Precursors, Control, and Occurrence in Drinking Water. *MATEC Web Conf.* **2019**, 280, 05003. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201928005003>.
- [31] Kristiana, I.; Tan, J.; Joll, C. A.; Heitz, A.; von Gunten, U.; Charrois, J. W. A. Formation of N-Nitrosamines from Chlorination and Chloramination of Molecular Weight Fractions of Natural Organic Matter. *Water Res.* **2013**, 47 (2), 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.014>.
- [32] Newcombe, G.; Morran, J.; Culbert, J.; Kapralos, C. *Generic Management Plan for Nitrosamines in Drinking Water*; IWA Publishing: London, United Kingdom, 2014.
- [33] Ma, F.; Wan, Y.; Yuan, G.; Meng, L.; Dong, Z.; Hu, J. Occurrence and Source of Nitrosamines and Secondary Amines in Groundwater and Its Adjacent Jialu River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46 (6), 3236–3243. <https://doi.org/10.1021/es204520b>.

- [34] Zeng, T.; Mitch, W. A. Contribution of N-Nitrosamines and Their Precursors to Domestic Sewage by Greywaters and Blackwaters. *ResearchGate* **2015**, 49 (22). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04254>.
- [35] Padhye, L.; Tezel, U.; Mitch, W. A.; Pavlostathis, S. G.; Huang, C.-H. Occurrence and Fate of Nitrosamines and Their Precursors in Municipal Sludge and Anaerobic Digestion Systems. *Environ. Sci. Amp Technol.* **2009**, 43 (9), 3087–3093.
- [36] Muller, B. The Danger of the Swimming Pool: Nitrosamine Carcinogens. *Yale Sci. Mag.* **2010**, 1032–1037.
- [37] Soltermann, F.; Lee, M.; Canonica, S.; von Gunten, U. Enhanced N-Nitrosamine Formation in Pool Water by UV Irradiation of Chlorinated Secondary Amines in the Presence of Monochloramine. *Water Res.* **2013**, 47 (1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.034>.
- [38] Kim, H.; Han, K. Swimmers Contribute to Additional Formation of N-Nitrosamines in Chlorinated Pool Water. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2011**, 3 (3). <https://doi.org/10.1007/s13530-011-0094-1>.
- [39] Munch, J. W.; Bassett, M. V. *Method 521 Determination of Nitrosamines in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography with Large Volume Injection and Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2005.
- [40] Kadmi, Y.; Favier, L.; Soutrel, I.; Lemasle, M.; Wolbert, D. Ultratrace-Level Determination of N-Nitrosodimethylamine, N-Nitrosodiethylamine, and N-Nitrosomorpholine in Waters by Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Open Chem.* **2014**, 12, 928–936. <https://doi.org/10.2478/s11532-014-0537-z>.
- [41] Grebel, J.; Young, C.; Suffet, M. Solid-Phase Microextraction of N-Nitrosamines. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1117 (1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.044>.
- [42] Yinon, J.; Zitrin, S. *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosives*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New York, United States, 1996.
- [43] Landon, M.; James, P.; James, A. The Importance of the Analysis of Nitrosamines by a Thermal Energy Analyser (TEA) and Their Link to Cancer. *Labmate* **2012**, 4–6.
- [44] Ellutia Chromatography Solutions. 810 TEA Manual 700063 V3.3. Ellutia Chromatography Solutions 2008.
- [45] Kleiböhmer, W. *Environmental Analysis*, 1st ed.; Handbook of Analytical Separations; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2001; Vol. 3.

- [46] Stashenko, E.; Martínez, J. R. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Advances in Gas Chromatography*; Guo, X., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia, 2014; p Ch. 1. <https://doi.org/10.5772/57492>.
- [47] Varejão, J. M. T. B. New On-Column GC Sample Injection Techniques: Making Holes in Separation Capillaries. *Sci. Chromatogr.* **2015**, *6* (4). <https://doi.org/10.4322/sc.2015.012>.
- [48] Aniszewski, T. Chapter 2 - Alkaloid Chemistry. In *Alkaloids*; Aniszewski, T., Ed.; Elsevier: Boston, 2015; pp 99–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59433-4.00002-X>.
- [49] The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. Agilent Technologies, Inc. 2016.
- [50] Boone, C.; Adamec, J. 10 - Top-Down Proteomics. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*; Ciborowski, P., Silberring, J., Eds.; Elsevier: Boston, 2016; pp 175–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00010-0>.
- [51] Sayyed Hussain; Tabrez Shaikh. Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC): A New Trend in Analysis. *World J. Pharm. Res.* **2016**, *5* (3), 387–394.
- [52] Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: London, United Kingdom, 2007.
- [53] Thompson, J. M. *Mass Spectrometry*, 1st ed.; Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: Singapore, 2017.
- [54] Herbert, C. G.; Johnstone, R. A. W. *Mass Spectrometry Basics*; CRC Press: United States of America, 2002.
- [55] Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, e282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [56] El-Faramawy, A.; Siu, K. W. M.; Thomson, B. A. Efficiency of Nano-Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (10), 1702–1707. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.06.011>.
- [57] Zhao, Y. Y.; Liu, X.; Boyd, J. M.; Qin, F.; Li, J.; Li, X.-F. Identification of N-Nitrosamines in Treated Drinking Water Using Nanoelectrospray Ionization High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47* (1), 92–96. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.1.92>.
- [58] Gross, J. H. *Mass Spectrometry - A Textbook*, 2nd ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2004; Vol. 1.
- [59] Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*, 4th ed.; John Wiley & Sons: London, United Kingdom, 2007.

- [60] Sullivan, R. C.; Gorkowski, K.; Jahn, L. Chapter 12 - Characterization of Individual Aerosol Particles. In *Physical Chemistry of Gas-Liquid Interfaces*; Faust, J. A., House, J. E., Eds.; Developments in Physical & Theoretical Chemistry; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2018; pp 353–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813641-6.00012-1>.
- [61] Hanan Awad; Khamis, M. M.; El-Aneed, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2015**, *50* (2), 158–175. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>.
- [62] Medhe, S. Mass Spectrometry: Analysers an Important Tool. *Int. J. Chem. Sci.* **2018**, *16* (3), 1–8.
- [63] Savaryn, J. P.; Toby, T. K.; Kelleher, N. L. A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics* **2016**, *16* (18), 2435–2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600113>.
- [64] Somogyi, Á. Medical Applications of Mass Spectrometry Chapter 6 - Mass Spectrometry Instrumentation and Techniques. In *Medical Applications of Mass Spectrometry*; Vékey, K., Telekes, A., Vertes, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 93–140. <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50008-2>.
- [65] Miller, P. E.; Denton, M. B. The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63* (7), 617–622. <https://doi.org/10.1021/ed063p617>.
- [66] March, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32* (4), 351–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y).
- [67] Rockwood, A. L.; Kushnir, M. M.; Clarke, N. J. 2 - Mass Spectrometry. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*; Rifai, N., Horvath, A. R., Wittwer, C. T., Eds.; Elsevier: Washington, United States, 2018; pp 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>.
- [68] Caballero, B.; Trugo, L. C.; Finglas, P. M. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed.; Academic: San Diego, Calif.; London, 2003.
- [69] Bruchmann, A.; Lahaniatis, M. R.; Schwabe, R.; Tschickardt, M.; Kettrup, A. GC/MS Analysis. In *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety; Air Monitoring Methods*; American Cancer Society, 2007; Vol. 10, pp 4–37. <https://doi.org/10.1002/3527600418.amgcmse0010>.
- [70] Al-Kaseem, M.; Al-Assaf, Z.; Karabeet, F. Development and Validation of GC-FID Method for the Determination of Volatile N-Nitrosamines in Meat. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *25* (1), 59–64.
- [71] Grebel, J. E.; Mel Suffet, I. H. Nitrogen-Phosphorus Detection and Nitrogen Chemiluminescence Detection of Volatile Nitrosamines in Water Matrices:

- Optimization and Performance Comparison. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1175* (1), 141–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.073>.
- [72] *Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants*; Shibamoto, T., Ed.; Chromatographic Science Series; CRC Press: Davis, California, 1998; Vol. 77.
- [73] Berk, Z. *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed.; Elsevier: Israel, 2018. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03186-8>.
- [74] Fritz, J. S. Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (49), 12411–12412. <https://doi.org/10.1021/ja0047976>.
- [75] Thurman, E. M.; Mills, M. S. *Solid-Phase Extraction Principles and Practice*; Chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications; John Wiley & Sons: New York, United States of America, 1998; Vol. 147.
- [76] Xu, M.; Li, D.; Yan, Y.; Guo, T.; Pang, H.; Xue, H. Porous High Specific Surface Area-Activated Carbon with Co-Doping N, S and P for High-Performance Supercapacitors. *RSC Adv.* **2017**, *7* (69), 43780–43788. <https://doi.org/10.1039/C7RA07945A>.
- [77] Lappas, N. T.; Lappas, C. M. Chapter 9 - Sample Preparation. In *Forensic Toxicology*; Academic Press: London, UK, 2016; pp 143–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00009-8>.
- [78] Morrison, R. D.; O’Sullivan, G. Chapter 15 - Forensic Applications of Dendroecology. In *Introduction to Environmental Forensics*; Murphy, B. L., Morrison, R. D., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2015; pp 531–552. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404696-2.00015-1>.
- [79] Heredia, F. J.; González-Miret, M. L.; Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M. 19 - Instrumental Assessment of the Sensory Quality of Juices. In *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality*; Kilcast, D., Ed.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013; pp 565–610e. <https://doi.org/10.1533/9780857098856.3.565>.
- [80] Marsh, H.; Rodríguez Reinoso, F.; Rodríguez-Reinoso, F. *Activated Carbon*, 1st ed.; Elsevier Science & Technology: Oxford, UK, 2006.
- [81] Coleman, D.; Vanatta, L. Part 19-Internal Standards. *Am. Lab.* **2005**.
- [82] Points, J. Use of Stable Isotope Internal Standards for Trace Organic Analysis. *LCG Stand.* **2007**.
- [83] Janos Inczedy; Tamas Lengyel; Allan M. Ure. *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature Definite Rules 1997*, 3rd ed.; Santa Fe, NM, USA, 2000.

- [84] Shrivastava, A.; Gupta, V. B. Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods. *Chron. Young Sci.* **2011**, *2* (1), 21–25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
- [85] European Union Reference Laboratory. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. 2016.
- [86] United Nations Office for Drugs and Crime. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nations Publication October 2009.
- [87] Filho, P. J. S.; Hall, M. dos S.; Caramao, E. B. Determination of Nitrosamines in Sausages by Solid Phase Extraction with Activated Carbon – GC/MS. *Ann. Chromatogr. Sep. Tech.* **2016**, *2* (2).
- [88] Mitch, W. A.; Sharp, J. O.; Trussell, R. R.; Valentine, R. L.; Alvarez-Cohen, L.; Sedlak, D. L. N-Nitrosodimethylamine (NDMA) as a Drinking Water Contaminant: A Review. *Environ. Eng. Sci.* **2003**, *20* (5), 389–404. <https://doi.org/10.1089/109287503768335896>.
- [89] Krauss, M.; Longrée, P.; Dorusch, F.; Ort, C.; Hollender, J. Occurrence and Removal of N-Nitrosamines in Wastewater Treatment Plants. *Water Res.* **2009**, *43* (17), 4381–4391. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.048>.
- [90] AS Tallinna Vesi. Veepuhastusprotsess <https://tallinnavesi.ee/ettevotte/tegevused/veepuhastus/veepuhastusprotsess/> (accessed Mar 2, 2020).
- [91] Narva Vesi AS. Narva Vesi - Veepuhastus <http://www.narvavesi.ee/59est.html> (accessed Mar 2, 2020).