

Validacije spektrofotometrijske metode određivanja nitrita u vodi

Bebek, Nera

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:485030>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nera Bebek

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Nera Bebek**

Predala je izrađen završni rad dana: 5. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Sandra Babić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistent, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 8. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nera Bebek

VALIDACIJE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE
ODREĐIVANJA NITRITA U VODI

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

dr. sc. Kristina Tolić Čop

v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, rujan 2023.

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na strpljenju i na svim savjetima i pomoći tijekom pisanja ovog završnog rada. Također, velike zahvale svim tehničarkama na Zavodu za analitičku kemiju jer su uvijek bile tu tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Zahvalu dugujem i svojoj obitelji koja je uvijek bila moja najveća podrška i svojim prijateljima jer su vjerovali u mene.

SAŽETAK

Koncentraciju nitrita u vodi za ljudsku potrošnju potrebno je neprestano pratiti zbog njihovog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Kako bi se utvrdilo da je metoda prikladna namijeni potrebno je provesti validaciju te metode. U ovom radu provedena je validacija spektrofotometrijske metode za određivanje nitrita u vodi, a ispitane izvedbene karakteristike su: selektivnost, linearnost, preciznost (ponovljivost i međupreciznost), istinitost, granica kvantifikacije i granica detekcije, radno područje i robusnost metode. Analiza je provedena sa standardnim otopinama nitrita u MilliQ i vodovodnoj vodi. Rezultati ispitivanja potvrđuju selektivnost, linearnost metode u određenom radnom području (0.01 – 1.00 mg/l NO₂⁻), preciznost, istinitost te robusnost. Određene su granica kvantifikacije (0.01 mg/l NO₂⁻) i granica detekcije (0.003 mg/l NO₂⁻).

Ključne riječi: nitriti, spektrofotometrija, validacija

SUMMARY

The concentration of nitrites in water for human consumption should be constantly monitored due to their harmful impact on human health. In order to determine the suitability of the method for its intended purpose, the method should be validated. In this study, the validation of the spectrophotometric method for nitrite determination in water was carried out. The examined performance characteristics included: selectivity, linearity, precision (repeatability and intermediate precision), trueness, limit of quantification, limit of detection, working range, and robustness. The analysis was performed with nitrite standard solutions prepared in MilliQ and tap water. The test results confirm the method's selectivity, linearity within a certain working range (0.01 – 1.00 mg/l NO₂⁻), precision, trueness, and robustness. The limit of quantification (0.01 mg/l NO₂⁻) and limit of detection (0.003 mg/l NO₂⁻) were determined.

Key words: nitrites, spectrophotometry, validation

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Nitriti.....	2
2.2. Spektrometrija.....	3
2.2.1. Molekulska spektrometrija.....	4
2.3. Validacija metode.....	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. Materijali.....	8
3.1.1. Kemikalije.....	8
3.2. Instrumenti.....	8
3.2.1. Analitička vaga.....	8
3.2.2. Spektrofotometar.....	8
3.2.3. Uređaj za dobivanje MilliQ vode.....	9
3.3. Metode rada.....	11
3.3.1. Spektrofotometrijska analiza.....	11
3.3.2. Priprema Griessovog reagensa.....	11
3.3.3. Priprema temeljne standardne otopine nitrita.....	12
3.3.4. Priprema standardnih otopina nitrita za izradu kalibracijskog pravca.....	12
3.3.5. Priprema standardnih otopina za procjenu preciznosti.....	13
3.3.6. Priprema standardnih otopina za ispitivanje robusnosti.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4.1. Validacija spektrofotometrijske metode za određivanje nitrita.....	14
4.1.1. Selektivnost.....	14
4.1.2. Linearnost.....	15
4.1.3. Osjetljivost.....	17
4.1.4. Preciznost.....	19
4.1.5. Istinitost.....	22
4.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije.....	23

4.1.7. Radno područje.....	24
4.1.8. Robusnost.....	25
4.1.9. Stabilnost.....	32
4.1.10. Sažetak rezultata.....	33
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA.....	35

1. UVOD

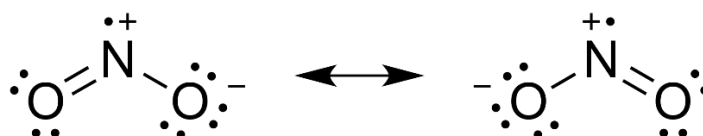
Voda za piće mora zadovoljiti zakonom propisan standard kvalitete kako bi bila prihvatljiva za konzumaciju. Jedan od parametara koji se ispituju tijekom analize vode za piće je koncentracija nitrita. Nitriti se mogu oksidirati u nitrati koji su manje štetni za ljudsko zdravlje i maksimalna dopuštena koncentracija u vodi im je veća, također se mogu ukloniti adsorpcijskim filtrima ili procesom denitrifikacije. Zbog svoje štetnosti na ljudsko zdravlje potrebno je razviti pouzdanu metodu određivanja nitrita, a to podrazumijeva i validaciju metode.

Validacija je neizostavan korak pri razvoju potpuno nove metode ili prilagođavanju metode novoj svrsi ako se želi utvrditi da je metoda prikladna namjeni za koju je razvijena i da daje točne rezultate analize. Validacija metode obuhvaća ispitivanje izvedbenih karakteristika koje moraju zadovoljiti unaprijed definirane kriterije. U ovom radu prikazana je validacija spektrofotometrijske metode za određivanje nitrita u vodi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nitriti

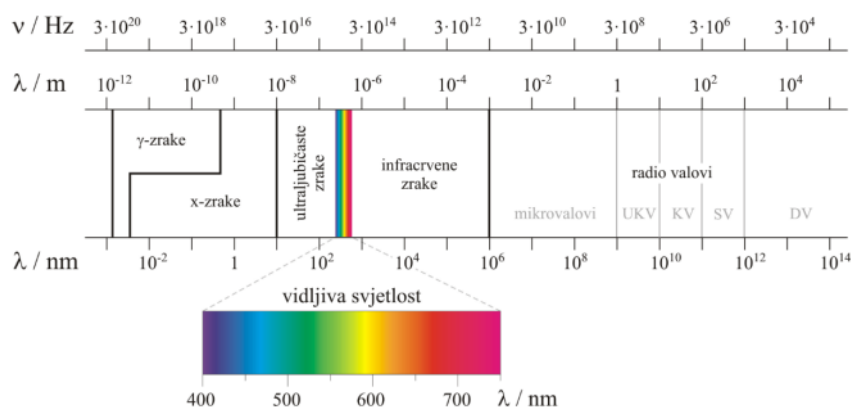
Nitriti su kemijski spojevi koji sadrže anion nitrit NO_2^- (Slika 1.). Nitritni ion sastoji se od atoma dušika koji je centralni atom povezan s dva atoma kisika u linearnu strukturu. Nitritni ion može se pronaći u okolišu, uključujući tla, vodu i atmosferu. Može biti prisutan kao rezultat bioloških procesa poput nitrifikacije. Nitriti se koriste u kemijskoj industriji, u sklopu nje ponajviše u farmaceutskoj industriji, a široka im je primjena i u prehrambenoj industriji. U farmaceutskoj industriji nitritni ion koristi se se kod vazodilatacije, terapije nitritnom solju itd. Koristi se kao aditiv u prehrambenoj industriji i dodaje se u prerađene mesne proizvode kako bi spriječio rast bakterija i produžio rok trajanja. Susrećemo ga i u kozmetici poput šampona i krema u kojima služi kao konzervans [1]. Nitritni ion može biti štetan za ljudsko zdravlje ovisno o koncentraciji u kojoj se nalazi u hrani. Može reagirati s aminokiselinama koje su također prisutne u hrani i stvarati nitrozamine koji su kancerogeni za ljude i povećavaju rizik od razvoja raka. Kako nitritni ioni u određenim koncentracijama nisu sigurni za ljudsko zdravlje, nitrite je potrebno ukloniti iz vodovodne vode kako bi bila sigurna za konzumaciju. Dozvoljena koncentracija nitrata u pitkoj vodi je 50 mg/l, a nitrita 0.5 mg/l [2]. Nitriti u podzemne vode dopijevaju na više načina, a najčešće preko poljoprivrednih zemljišta na kojima se koriste dušična gnojiva ili iz otpadnih voda industrijskih postrojenja koje prodiru u tlo. Gnojiva i otpadne vode sadrže nitrata koji se zatim biološkim procesima pretvaraju u nitrite.



Slika 1. Struktura nitritnog iona

2.2. Spektrometrija

Spektrometrija je grana analitičke kemije kojom se dobivaju informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari. Temelji se na separaciji, detekciji i mjerenju energetske promjene koje se zbivaju u jezgri atoma, elektronskom omotaču ili u molekulama kao rezultat njihove interakcije s energijom zračenja, toplinskom, električnom ili kemijskom [3]. Spektrometrija se dijeli na atomsku i molekulsku spektrometriju ovisno o tome odvija li se apsorpcija ili emisija zračenja na atomskoj ili molekularnoj razini. Atomska spektrometrija dijeli se na tehnike kod kojih se mjeri elektromagnetsko zračenje, tehnike kod kojih se mjeri zračenje elektrona i tehnike kod kojih se mjeri zračenje iona. Molekulska spektrometrija se dijeli na tehnike kod kojih se mjeri elektromagnetsko zračenje, zračenje iona i toplinsko zračenje [3]. Najrazvijenije tehnike kod obje vrste spektrometrije su one kod kojih se mjeri elektromagnetsko zračenje. Elektromagnetsko zračenje je oblik energije koji se kroz prostor prenosi elektromagnetskim valovima. Duljine tih valova, odnosno frekvencije su drugačije što rezultira različitim vrstama zračenja, a to su gama i rendgensko zračenje, ultraljubičasto, vidljivo i infracrveno zračenje, mikrovalovi i radiovalovi. Valne duljine i frekvencije navedenih vrsta zračenja prikazane su na slici 2.



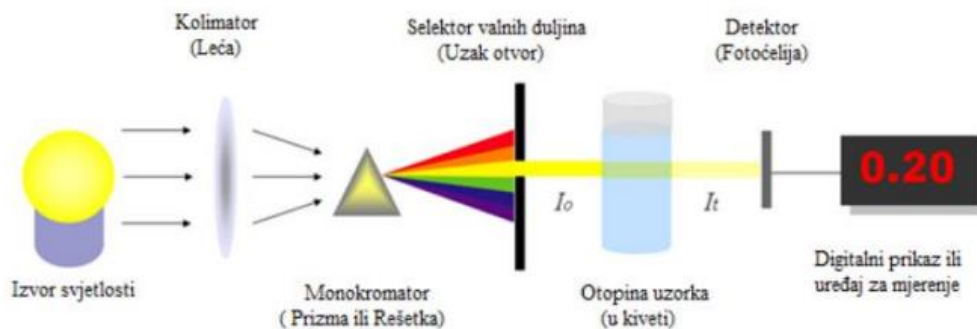
Slika 2. Spektar elektromagnetskog zračenja [4]

Atomska i molekulska spektrometrija imaju značajne razlike. Atomska spektrometrija temelji se na apsorpciji, emisiji i fluorescenciji, a kod molekulske su primjenjive apsorpcija i fluorescencija. Atomska spektrometrija daje podatke o identitetu i koncentraciji atoma u analiziranom uzorku, dok molekulska govori o kvalitativnim i kvantitativnim svojstvima molekula u uzorku. Instrumenti koji se koriste za analize atomskom i molekulskom spektrometrijom koriste monokromatore ili filtre za odabir valnih duljina, a za određivanje intenziteta zračenja koriste fotonske detektore. Bitno se razlikuju po spremniku uzoraka, kod molekulske spektrometrije spremnik je kiveta, a kod atomske je to plazma, plamen, luk ili iskra [5].

2.2.1. Molekulska spektrometrija

Spektrometri su uređaji koji se koriste u optičkoj spektrometriji i slični su u svojoj izvedbi bez obzira jesu li namijenjeni za rad u ultraljubičastom, vidljivom ili infracrvenom području. Sastoje se od stabilnog izvora zračenja, selektora valnih duljina, jednog ili više spremnika za uzorke, detektora zračenja i procesora signala. Kod molekulske spektrometrije upotrebljava se kontinuirani izvor zračenja poput ksenonove lampe, H₂ i D₂ lampe, volframove žarulje, Nernstovog štapića itd. Selektor valnih duljina izdvaja određeno valno područje i na taj način utječe na osjetljivost i selektivnost instrumenta. Ne može se izdvojiti zračenje samo jedne valne duljine nego se izdvaja usko područje valnih duljina koje se naziva vrpcom. Postoje dvije osnovne vrste selektora, monokromatori i filtri. Spektrometar može biti jednozračni ili dvozračni ovisno o tome može li se istovremeno analizirati željeni uzorak i referentni uzorak tj. mogu li se istovremeno propuštati dvije zrake. Detektori mogu biti fotonski i toplinski i oni pokazuju postojanje neke fizičke pojave. Kivete ili ćelije koje služe kao spremnici za uzorke moraju biti načinjene od materijala koji je proziran u određenom spektralnom području [3, 5].

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrometrija imaju kvantitativnu primjenu u određivanju brojnih anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta. U Instrumentima koji se koriste za ultraljubičastu i vidljivu apsorpcijsku spektrometriju uzorak se smješta između monokromatora i detektora, time se osigurava da neće doći do fotokemijske razgradnje uzorka [3, 5]. Unutrašnji izgled i princip rada spektrofotometra prikazan je na slici 3.



Slika 3. Izgled UV/VIS spektrofotometra [6]

2.3. Validacija metode

Validacija metode bitan je korak u razvoju analitičke metode kojim osiguravamo pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Definicija validacije je da je to postupak kojim dokazujemo da naša metoda služi svrsi kojoj je namijenjena [7]. Validaciji prethodi razvijanje metode, može se koristiti već postojeća metoda ili se postojeća metoda može prilagoditi tako da odgovara novoj svrsi. Analitičar može razviti sasvim novu metodu no to zahtjeva puno više vremena i znanja, a u konačnici nema garancije da će nova metoda biti uspješna. Validaciji se može pristupiti na dva načina: međulaboratorijskim i/ili laboratorijskim ispitivanjima. U međulaboratorijskom pristupu dva ili više laboratorija ispituju identičan uzorak uz unaprijed definirane uvjete ispitivanja, takav pristup potreban je kada se razvija metoda namijenjena širokoj primjeni. Laboratorijski pristup koristi se kada je metoda potrebna samo jednom laboratoriju, a provodi se u različitim uvjetima za analizu istih ili različitih uzoraka. Validacija se provodi ispitivanjem izvedbenih karakteristika koje mogu biti kvalitativne i kvantitativne [7,8]. U nastavku teksta opisane su izvedbene karakteristike.

1. Selektivnost

Selektivnost je jedna od najbitnijih karakteristika metode. To je mogućnost metode da odredi više komponenti, a da one pri određivanju ne smetaju jedna drugoj. Potrebno je razlikovati pojam analitičke specifičnosti od selektivnosti. Specifična metoda je ona koja se koristi za određivanje samo jednog specifičnog analita [7].

2. *Linearnost*

Linearnost je mogućnost metode da daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analiziranog uzorka. Provjera linearnosti provodi se analizom najmanje pet koncentracija analita i mjerenje se ponavlja bar tri puta nakon čega se srednja vrijednost odziva kojeg mjerimo stavlja u ovisnost o koncentraciji analita, a zatim se provjerava linearnost te ovisnosti [8].

3. *Preciznost*

Preciznost se definira kao stupanj podudarnosti između rezultata višestruko ponovljenih mjerenja i izražava se kao ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost. Ponovljivost podrazumijeva ispitivanje u jednom laboratoriju, istog analitičara i odnosi se na kratko razdoblje. Međupreciznost uključuje isti laboratorij u duljem razdoblju uz promjenu radnih uvjeta poput analitičara, instrumenata, otopina različitih dobavljača. Ispitivanje obnovljivosti uključuje najmanje dva laboratorija u kojima su osigurani jednaki uvjeti [8].

4. *Istinitost*

Stupanj podudaranja između prihvaćene stvarne odnosno izmjerene vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata. Procjenjuje se na više načina kao npr. usporedbom izmjerenih rezultata s rezultatima referentne metode, analizom uzorka poznate koncentracije ili obogaćivanjem matrice [7, 8].

5. *Granica detekcije i granica kvantifikacije*

Granica kvantifikacije predstavlja koncentraciju analita koju je moguće pouzdano kvantitativno odrediti, dok je granica detekcije koncentracija koju je moguće samo detektirati no ne i odrediti njenu točnu vrijednost. Obje granice mogu se odrediti na više načina, vizualno, preko omjera signala i šuma te na temelju standardnog odstupanja rezultata i nagiba pravca [8, 10].

6. Radno područje

Definira se kao područje između gornje i donje granice koncentracije analita za koje se može odrediti odgovarajuća preciznost, istinitost i linearnost. Donja granica radnog područja predstavlja granicu kvantifikacije, a gornja granica je koncentracija nakon koje dolazi do značajnih odstupanja u osjetljivosti metode. U većini slučajeva nije potrebno ispitivati cijelo radno područje nego samo do granice do koje je potrebno ovisno o svrsi ispitivanja [7].

7. Robusnost

Robusnost govori koliko je metoda osjetljiva na male promjene radnih uvjeta. Ispitivanje robusnosti provodi se mijenjanjem radnih uvjeta i praćenjem kvantitativnih promjena rezultata analize. Ispitivanjem je potrebno dokazati da ne dolazi do značajnih promjena rezultata prilikom promjene jednog ili više radnih uvjeta, a ujedno nam daje informaciju koje varijable ispitivanja treba kontrolirati zbog velikog utjecaja na rezultate prilikom malih promjena tih varijabli [7]. Jedan od parametara ispitivanja robusnosti je ispitivanje stabilnosti otopine reagensa.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Popis kemikalija i njihove specifikacije

Naziv	Kemijska formula	Proizvođač
4-aminobenzen sulfonamid	$C_6H_8N_2O_2S$	Sigma-Aldrich Missouri, SAD
Fosforna kiselina	H_3PO_4	Kemika, Zagreb, Hrvatska
MilliQ voda	H_2O	Millipore Corporation, Billerica, SAD
Natrijev nitrit	$NaNO_2$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan dihidroklorid	$C_{12}H_{16}Cl_2N_2$	Merck, Darmstadt, Njemačka

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Sva vaganja tijekom eksperimentalnog dijela rada provedena su na analitičkoj vagi prikazanoj na slici 4. Vaga ima visoku razinu točnosti i namijenjena je vaganju malih količina uzorka. Ima rešetku za vaganje koja omogućuje veću učinkovitost prilikom rada. Zaštićena je staklenim stijenkama koje sprječavaju utjecaj strujanja zraka ili prašine na rezultate mjerenja.



Slika 4. Analitička vaga XA105 DualRange, Mettler Toledo

3.2.2. Spektrofotometar

Spektrofotometrom moguće je mjeriti apsorbanciju i transmitanciju uzorka. U specifikacijama instrumenta navedena je tolerancija od ± 0.9 nm na valnoj duljini od 360.3 nm i tolerancija od ± 1.5 nm na valnoj duljini od 807.0 nm.



Slika 5. Spektrofotometar Hach Lange DR 3900

3.2.3. Uređaj za dobivanje MilliQ vode

MilliQ voda je ultračista voda iz koje su uklonjene sve anorganske i organske tvari te ioni. Koristi si se u laboratorijskim istraživanjima jer tvari iz vode mogu interferirati s tvarima koje se analiziraju te korištenje MilliQ vode omogućuje dobivanje pouzdanih rezultata istraživanja.



Slika 6. Uređaj za dobivanje MilliQ vode Milli-Q Water System

3.3. Metode rada

3.3.1. Spektrofotometrijska analiza

Nitriti u uzorcima MilliQ i vodovodne vode određeni su molekularnom apsorpcijskom spektrometrijskom metodom (HRN EN ISO 26777:1998). Uzorci su pripremljeni na način da se prvo doda određeni volumen standardne otopine nitrita u tikvicu od 50 ml. Nakon toga potrebno je dodati otprilike 40 ml MilliQ ili vodovodne vode, a zatim se dodaje 1 ml Griessovog reagensa. Griessov reagens reagira s nitritnim ionima i daje otopini ljubičastu boju, intenzitet boje otopine ovisi o koncentraciji nitritnih iona u otopini. U konačnici se tikvica nadopuni MilliQ ili vodovodnom vodom do oznake i dobro promiješa. Potrebno je ostaviti tikvicu da miruje barem 20 minuta prije početka mjerenja apsorbancije na spektrofotometru. Analiza započinje snimanjem apsorpcijskog spektra otopine i određivanjem valne duljine maksimalne apsorbancije. Sva daljnja mjerenja apsorbancije provode se pri toj valnoj duljini. Zapčinje se s analizom uzorka najmanje koncentracije nitrita, svaki uzorak analizira se tri puta tako što se svaki put uzima novi uzorak iz tikvice i stavlja u kivetu koja se zatim umeće u spektrofotometar. Prilikom prelaska na analizu otopine nove koncentracije, kiveta se prvo ispire tom otopinom kako bi sa stijenki kivete isprali svu prethodno analiziranu otopinu, a zatim se prelazi na analizu nove otopine. Iz dobivenih rezultata, odnosno iz izmjerenih apsorbancija izrađuje se kalibracijski dijagram ovisnosti apsorbancije otopine o koncentraciji nitrita.

3.3.2. Priprema Griessovog reagensa

Griessov reagens koristi se za otkrivanje prisutnosti nitritnih iona u otopini. Reagens je pripremljen otapanjem 39.99 g 4-aminobenzen sulfonamida u mješavini 100 ml fosforne kiseline i 500 ml MilliQ vode. U tu otopinu dodano je i otopljeno 2.0063 g N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan dihidroklorida. Otopina je dobro promiješana i premještena u zatamnjenu bocu od 1000 ml koja je nadopunjena do oznake MilliQ vodom. Boca s otopinom je čuvana u frižideru na 2 °C do 5 °C.

3.3.3. Priprema temeljne standardne otopine nitrita

Temeljna standardna otopina nitrita pripravljena je otapanjem 0.4929 g natrijeva nitrita u 750 ml MilliQ vode. Prethodno je natrijev nitrit osušen u sušioniku na 105 °C kroz dva sata. Osušeni natrijev nitrit je zatim izvagan na analitičkoj vagi i premješten u tikvicu od 1 litre te u njoj otopljen u MilliQ vodi. Nakon što se sav natrijev nitrit otopio u 750 ml vode, tikvica je nadopunjena do oznake od 1000 ml. Temeljna standardna otopina čuvana je u zatamnjenoj staklenoj boci u frižideru na 2 °C do 5 °C. Isti postupak ponovljen je za pripremu temeljne standardne otopine nitrita u vodovodnoj vodi. Iz temeljne standardne otopine dalje su pripravljene radne standardne otopine nitrita.

3.3.4. Izrada kalibracijskog pravca

Standardna otopina nitrita priprema se iz temeljne standardne otopine nitrita tako što se uzme 1 ml temeljne standardne otopine i premjesti u tikvicu od 100 ml. Tikvica se zatim nadopuni do oznake MilliQ vodom. Iz ove otopine se u daljnjem radu pripremaju uzorci različitih volumena nitrita reakcijom s Griessovim reagensom i nadopunjavaju se do oznake od 50 ml s MilliQ vodom, uzorci različitih koncentracija zatim idu na spektrofotometrijsku analizu. Za izradu kalibracijskog pravca pripravljene su otopine s idućim volumenima otopine nitrita: 0.1 ml, 0.25 ml, 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 5 ml, 7.5 ml i 10 ml. Odgovarajuće koncentracije nitrita u otopinama prikazane su u prilogu u tablici P1. Otopine su pripravljene tako što se u tikvice od 50 ml dodaju odgovarajući volumeni otopine nitrita, doda se oko 40 ml MilliQ vode, zatim se doda 1 ml Griessovog reagensa i na kraju se otopina razrijedi do oznake s MilliQ vodom. Nakon pripreme otopina slijedi spektrofotometrijska analiza kako je već opisano i izrada kalibracijskog pravca.

3.3.5. Ispitivanje preciznosti

Za procjenu preciznosti, koja je izražena preko ponovljivosti i međupreciznosti, pripremljene su tri standardne otopine koje su sadržavale sljedeće volumene otopine nitrita: 0.5 ml, 2 ml i 10 ml. Ti volumeni nalaze se u radnom području i korišteni su za izradu kalibracijskog pravca. Ponovljivost je ispitana mjerenjem apsorbancije tri puta za svaku koncentraciju otopine. Međupreciznost je ispitana usporedbom rezultata od četiri različita dana za iste vrijednosti koncentracija kao i kod ponovljivosti za uzorke u MilliQ vodi. Ponovljivost i međupreciznost određene su na jednake načine i za jednake koncentracije u uzorcima vodovodne vode. Međupreciznost u uzorcima vodovodne vode ispitana je usporedbom rezultata od tri različita dana.

3.3.6. Ispitivanje robusnosti

Robusnost je ispitivana na dva načina, preko vremena reakcije analita s reagensom i mjerenjem apsorbancije pri različitim valnim duljinama. Robusnost je ispitana preko vremena reakcije analita s reagensom tako što je mjerena apsorbancija nakon 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minuta od trenutka kada je dodan reagens. Mjerenja su provedena na četiri standardne otopine koje su sadržavale sljedeće koncentracije otopine nitrita: 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.20 mg/l i 1.00 mg/l. Za svaku otopinu, mjerenje apsorbancije ponovljeno je po tri puta bez uzimanja novog uzorka za analizu. Svakom uzorku mjerena je apsorbancija tri puta uzastopno i izračunata je srednja vrijednost. Robusnost je ispitivana i mjerenjem apsorbancije pri različitim valnim duljinama. Valne duljine pri kojima je mjerena apsorbancija su: 530 nm, 535 nm, 540 nm, 545 nm i 550 nm. Analiza je provedena na isti način kao i kod mjerenja vremena reakcije analita s reagensom, odnosno isti uzorak je analiziran uzastopno tri puta i izračunate su srednje vrijednosti određenih apsorbancija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

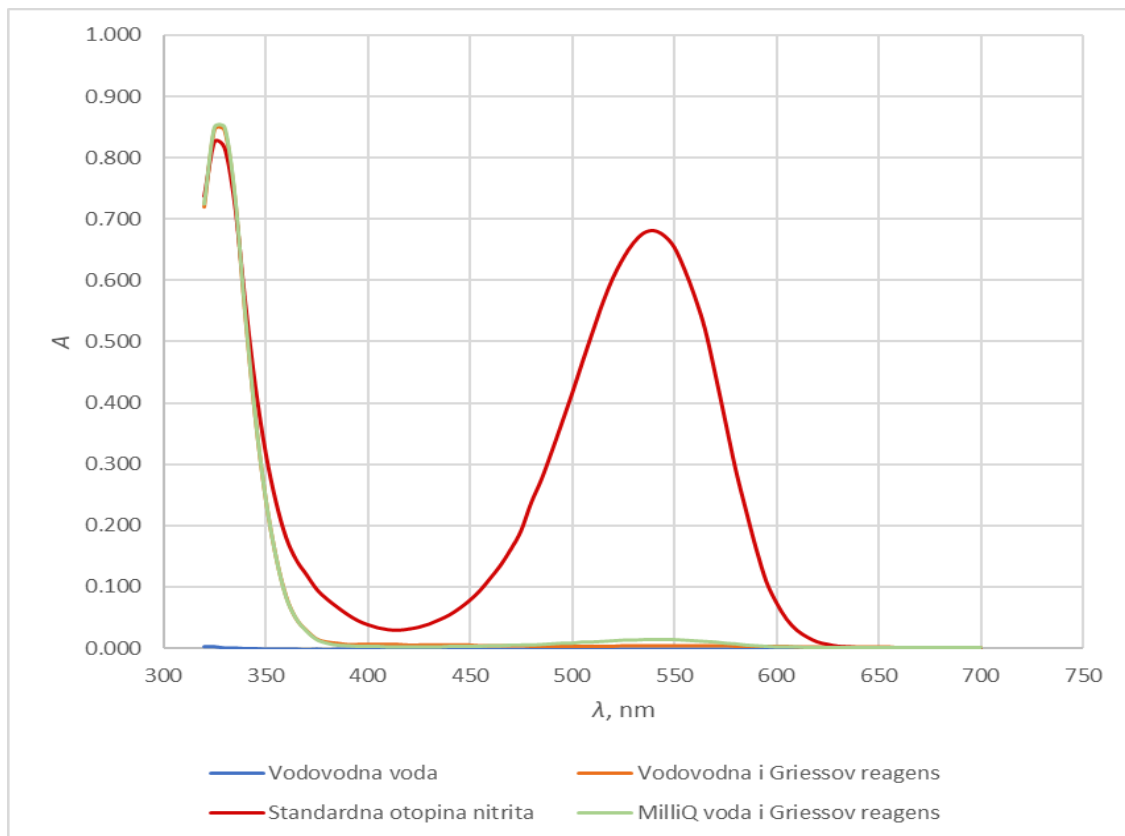
4.1. Validacija spektrometrijske metode za određivanje

nitrita

Validacija metode zahtjeva postavljanje kriterija prihvatljivosti za ispitivane izvedbene karakteristike. Kriteriji prihvatljivosti za sve izvedbene karakteristike navedeni su u tablici rezultata validacije metode (Tablica 19.)

4.1.1. Selektivnost

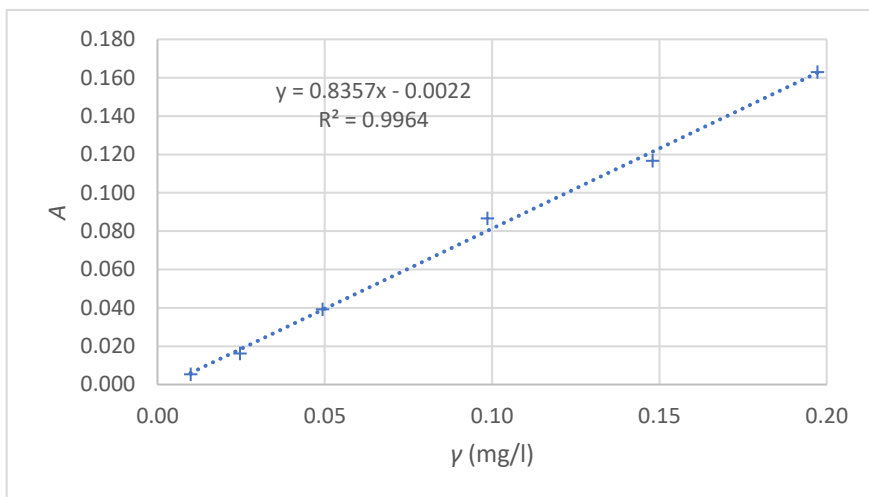
Selektivnost je ispitana snimanjem apsorpcijskog spektra za četiri različita uzorka. Snimljen je apsorpcijski spektar za uzorak koji je sadržavao samo vodovodnu vodu i uzorak koji je sadržavao vodovodnu vodu i Griessov reagens. Zatim je snimljen spektar za uzorak MilliQ vode i Griessovog reagensa, a na kraju spektar za otopinu najveće koncentracije nitrita koja se koristila tijekom eksperimentalnog dijela rada, odnosno uzorak s dodanim volumenom od 10 ml standardne otopine koji je reagirao s Griessovim reagensom. Usporedbom dobivenih apsorpcijskih krivulja dokazana je selektivnost metode. Na Slici 7. vidimo kako odziv na instrumentu pri valnoj duljini od 540 nm daje samo uzorak otopine nitrita najveće ispitivane koncentracije. Vodovodna voda, vodovodna voda uz dodatak Griessovog reagensa i MilliQ voda uz dodatak Griessovog reagensa ne daju odziv na instrumentu. Iz dobivenih podataka zaključujemo da je metoda selektivna na nitrite jer ne postoji ni jedna druga komponenta koja apsorbira valno zračenje na mjerenoj valnoj duljini od 540 nm. Kako nema ni jedne tvari koja se ponaša poput nitrita, sav izmjereni signal pripisujemo nitritima.



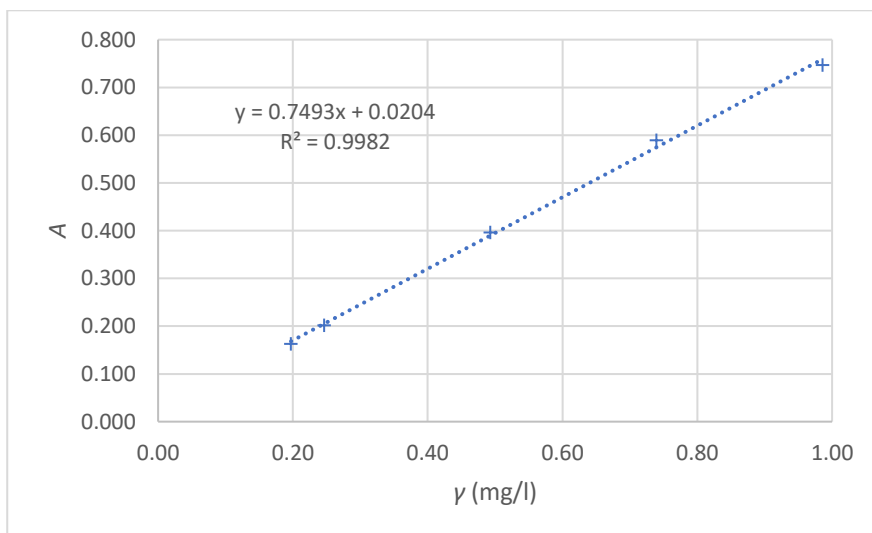
Slika 7. Prikaz izmjerenih apsorpcijskih spektara za različite uzorke

4.1.2. Linearnost

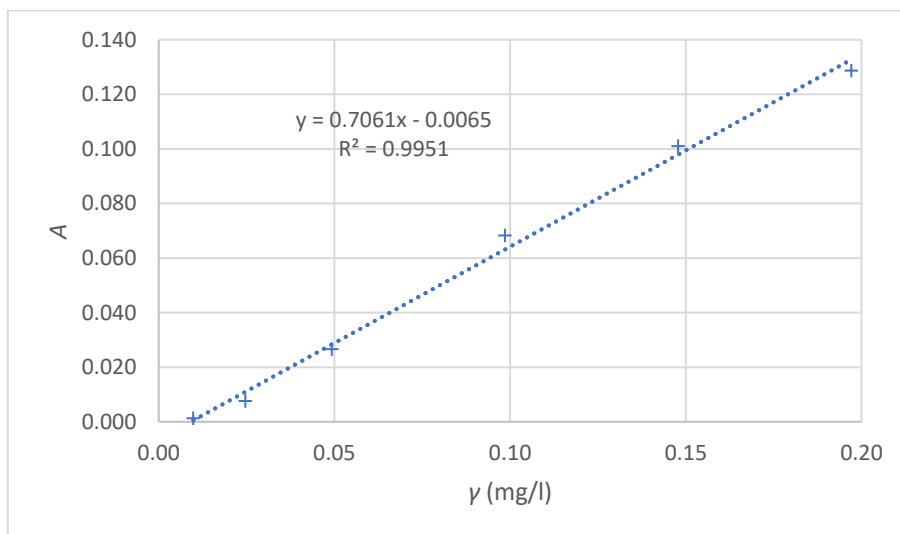
Linearnost je izvedbena karakteristika koja se temelji na pretpostavci da se ovisnost između dvije varijable može prikazati jednadžbom pravca na način da se povećanjem vrijednosti jedne varijable, druga mijenja linearno u ovisnosti o prvoj. Za izradu kalibracijskog pravca korišteno je 10 standardnih otopina koje su bile u rasponu dodanih volumena nitrita od 0.1 ml do 10 ml, odnosno u rasponu koncentracija od 0.01 mg/l do 1.00 mg/l. Radno područje sastoji se od područja niskih i područja visokih koncentracija pa tako imamo dva kalibracijska područja u kojima se ispitivala linearnost. Područje niskih koncentracija odnosi se na koncentracije od 0.01 mg/l do 0.20 mg/l, a područje visokih koncentracija od 0.20 mg/l do 1.00 mg/l.



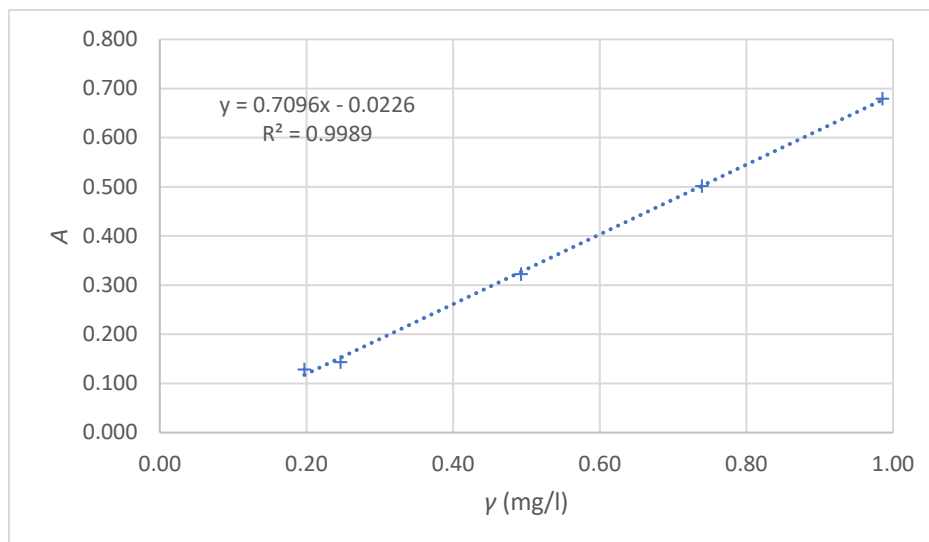
Slika 8. Kalibracijski pravac u MilliQ vodi za područje niskih koncentracija nitrita



Slika 9. Kalibracijski pravac u MilliQ vodi za područje visokih koncentracija nitrita



Slika 10. Kalibracijski pravac u vodovodnoj vodi za područje niskih koncentracija nitrita

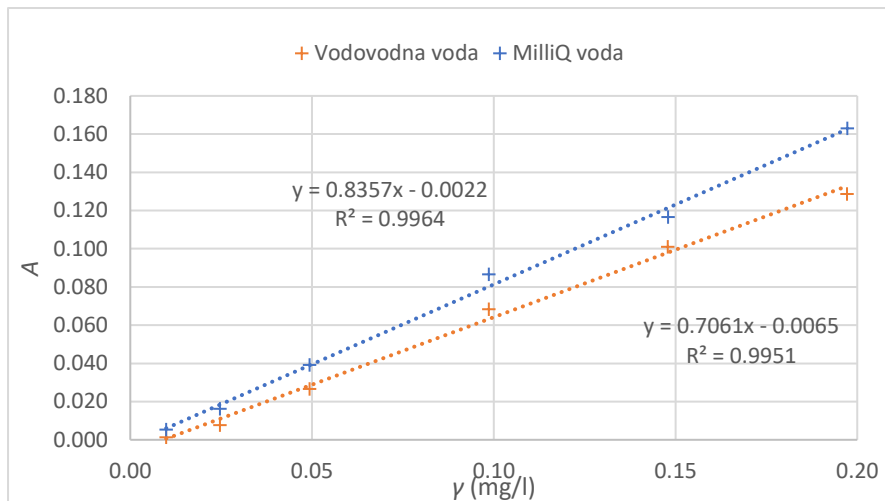


Slika 11. Kalibracijski pravac u vodovodnoj vodi u području visokih koncentracija nitrita

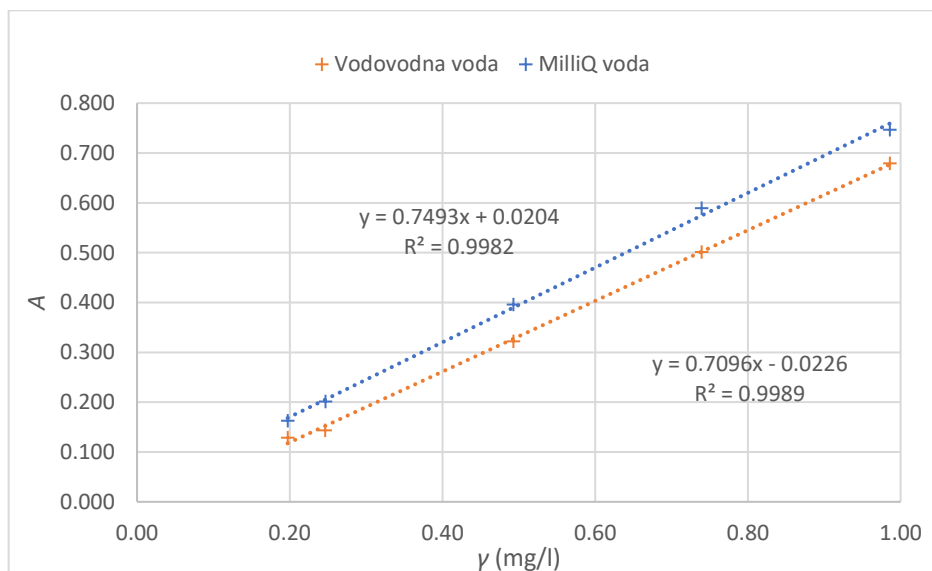
Iz prikazanih grafova može se zaključiti da koeficijent determinacije zadovoljava postavljeni kriterij ($R^2 > 0.99$) u području niskih i visokih koncentracija nitrita i kod uzoraka u MilliQ vodi i u vodovodnoj vodi. Zadovoljavanjem koeficijenta determinacije se potvrđuje linearnost metode.

4.1.3. Osjetljivost

Osjetljivost metode se u praksi izražava preko nagiba pravca, a definira se kao mogućnost metode da prepozna male promjene u koncentraciji analita koje uzrokuju promjene u mjernom signalu. Na slikama 12. i 13. prikazani su kalibracijski pravci u MilliQ i vodovodnoj vodi u području niskih i visokih koncentracija nitrita. Što je veći nagib pravca to se bolje mogu očitati promjene u koncentraciji analita, odnosno moguće je očitati male promjene u koncentraciji i kažemo da je metoda osjetljivija.



Slika 12. Usporedba osjetljivosti metode u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi u području niskih koncentracija nitrita



Slika 13. Usporedba osjetljivosti metode u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi u području visokih koncentracija nitrita

Iz priloženih grafova zaključujemo da je osjetljivost metode u oba koncentracijska područja veća pri mjerenju u MilliQ vodi jer je nagib kalibracijskog pravca veći. U području visokih koncentracija nema značajne promjene u nagibu odnosno nema promjene osjetljivosti pri mjerenju u MilliQ i vodovodnoj vodi. Pri mjerenju u području niskih koncentracija dolazi do promjene nagiba tj. promjene osjetljivosti pa zaključujemo da vodovodna voda ima utjecaj na osjetljivost, ali taj utjecaj nije značajan.

4.1.4. Preciznost

Preciznost se definira kao stupanj podudaranosti rezultata između više nezavisnih mjerenja, a izražava se kao ponovljivost i međupreciznost. Ponovljivost je određen mjerenjem apsorbancije uzastopno tri puta za tri uzorka različitih koncentracija. U tablicama 2.-5. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja za uzorke MilliQ vode. Izmjerene su apsorbancije i njihova srednja vrijednost, određeno je standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje. U tablicama 6.-8. nalaze se rezultati mjerenja za uzorke vodovodne vode za koje su također određeni standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje. Kriterij prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost je da relativno standardno odstupanje iznosi manje od 10%.

a) Ponovljivost

Tablica 2. Rezultati ponovljivosti za MilliQ vodu (24.11.2022.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.040	0.040	0.038	0.039	0.0012	2.94
0.20	0.162	0.163	0.164	0.163	0.0010	0.61
1.00	0.746	0.747	0.747	0.747	0.0006	0.08

Tablica 3. Rezultati ponovljivosti za MilliQ vodu (8.12.2022.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.038	0.038	0.037	0.038	0.0006	1.53
0.20	0.159	0.160	0.160	0.160	0.0006	0.36
1.00	0.748	0.753	0.754	0.752	0.0032	0.43

Tablica 4. Rezultati ponovljivosti za MilliQ vodu (22.12.2022.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.035	0.034	0.035	0.035	0.0006	1.67
0.20	0.153	0.154	0.153	0.153	0.0006	0.38
1.00	0.745	0.743	0.741	0.743	0.0020	0.27

Tablica 5. Rezultati ponovljivosti za MilliQ vodu (21.2.2023.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.038	0.037	0.037	0.037	0.0006	1.55
0.20	0.150	0.150	0.151	0.150	0.0006	0.38
1.00	0.741	0.743	0.744	0.743	0.0015	0.21

Tablica 6. Rezultati ponovljivosti za vodovodnu vodu (24.2.2023.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.027	0.026	0.027	0.027	0.0006	2.17
0.20	0.127	0.130	0.129	0.129	0.0015	1.19
1.00	0.678	0.680	0.680	0.679	0.0012	0.17

Tablica 7. Rezultati ponovljivosti za vodovodnu vodu (3.3.2023.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.027	0.026	0.026	0.026	0.0006	2.19
0.20	0.124	0.125	0.123	0.124	0.0010	0.81
1.00	0.622	0.622	0.626	0.623	0.0023	0.37

Tablica 8. Rezultati ponovljivosti za vodovodnu vodu (10.3.2023.)

γ (mg/l)	A1	A2	A3	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.033	0.033	0.032	0.033	0.0006	1.77
0.20	0.133	0.134	0.135	0.134	0.0010	0.75
1.00	0.659	0.658	0.659	0.659	0.0006	0.09

b) Međupreciznost

Međupreciznost je određena iz podataka za ponovljivost jer se određivala za iste koncentracije uzoraka. Uzete su srednje vrijednosti apsorbancija, za tri određivane koncentracije nitrita, od svakog dana i izračunata je nova srednja vrijednost tih apsorbancija. Na taj način je određena međupreciznost odnosno ispitivano je jesu li srednje vrijednosti određenih apsorbancija ostale iste kroz duži vremenski period. U tablici 9. prikazani su rezultati procjene međupreciznosti za uzorke MilliQ vode, a u tablici 10. za uzorke vodovodne vode.

Tablica 9. Rezultati međupreciznosti za MilliQ vodu

γ (mg/l)	A_{sr1}	A_{sr2}	A_{sr3}	A_{sr4}	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.039	0.038	0.035	0.037	0.037	0.0019	5.19
0.20	0.163	0.160	0.153	0.150	0.157	0.0058	3.69
1.00	0.747	0.752	0.743	0.743	0.746	0.0042	0.56

Tablica 10. Rezultati međupreciznosti za vodovodnu vodu

γ (mg/l)	A_{sr1}	A_{sr2}	A_{sr3}	\bar{A}	s	RSD, %
0.05	0.027	0.026	/	0.027	0.0002	0.89
0.20	0.129	0.124	0.134	0.129	0.0050	3.88
1.00	0.679	0.623	0.659	0.654	0.0283	4.33

Pri procjeni međupreciznosti za vodovodnu vodu, apsorbancije koje su izmjerene treći dan za koncentraciju 0.05 mg/l odstupale su od vrijednosti izmjerenih prvi i drugi dan. Mjerenja provedena za navedenu koncentraciju prikazana su u tablici 11.

Tablica 11. Apsorbancije određene u tri različita dana za koncentraciju od 0.05 mg/l

Dan	γ (mg/l)	A1	A2	A3	A_{sr}	s	RSD, %
1. dan	0.05	0.027	0.026	0.027	0.027	0.0006	2.17
2. dan	0.05	0.027	0.026	0.026	0.026	0.0006	2.19
3. dan	0.05	0.033	0.033	0.032	0.033	0.0006	1.77

Kako bi se provjerilo postoji li statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima apsorbancija određenim kroz tri dana provedena je analiza varijance (ANOVA). Rezultati ANOVA-e ($F(114.3) > F_t(5.1)$) potvrdili su da razliku u srednjim vrijednostima nije moguće pripisati samo slučajnim varijacijama.

4.1.5. Istinitost

Istinitost metode definirana je kao stupanj podudaranja stvarne tj. izmjerene vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena iz velikog niza rezultata. Istinitost je određena za tri različite koncentracije u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi i izražena je preko iskoristivosti, a rezultati su prikazani u tablici 13.

Tablica 13. Iskoristivost u MilliQ vodi

γ (mg/l)	γ izračunata (mg/l)	iskoristivost, %
0.05	0.0497	100.81
0.20	0.1977	100.24
1.00	0.9693	98.32

Tablica 14. Iskoristivost za vodovodnu vodu

γ (mg/l)	γ izračunata (mg/l)	iskoristivost, %
0.05	0.0470	95.30
0.20	0.1914	97.10
1.00	0.9892	100.35

Izračunata koncentracija nitrita dobivena je iz jednadžbi pravca prikazanih na slici 8. i 9. za MilliQ vodu. Jednadžba pravca za područje niskih koncentracija nitrita korištena je za koncentraciju 0.05 mg/l i za koncentraciju 0.20 mg/l. Iako koncentracija od 0.20 mg/l spada u oba područja, bolja iskoristivost se dobije primjenom jednadžbe pravca za nisko područje koncentracija. Jednadžba pravca za područje visokih koncentracija korištena je za koncentraciju 1.00 mg/l. Na isti način određena je iskoristivost za vodovodnu vodu uvrštavanjem u jednadžbe pravca prikazanih na slikama 10. i 11. Kriterij prihvatljivosti za iskoristivost je između 95% i 105%. Iskoristivost u MilliQ vodi i vodovodnoj vodi zadovoljile su kriterij za sve koncentracije.

4.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije

Maksimalna dopuštena koncentracija nitrita u vodi iznosi 0.5 mg/l [2]. Granica kvantifikacije mora biti 30% ili manja od vrijednosti maksimalne dopuštene koncentracije [10]. Izračunata granica kvantifikacije tada iznosi 0.15 mg/l. Eksperimentalno određena granica kvantifikacije iznosi 0.01 mg/l što zadovoljava kriterij koji je postavljen. Eksperimentalno određivanje granice kvantifikacije obuhvatilo je provjeru preciznost i istinitost za koncentraciju 0.01 mg/l, a rezultati ispitivanja nalaze se u tablicama 15. i 16.

Kao potencijalna granica kvantifikacije ispitivana je i koncentracija od 0.005 mg/l, ali nije zadovoljavala kriterije preciznosti i istinitosti iako se uklapala u kalibracijski pravac i zbog toga je odbačena kao moguća granica kvantifikacije.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja preciznosti pri granici kvantifikacije 0.01 mg/l

Broj mjerenja	A
1	0.006
2	0.007
3	0.006
4	0.006
5	0.006
6	0.007
7	0.006
8	0.006
9	0.006
10	0.006
A_{sr}	0.006
s	0.0004
RSD (%)	6.80

Tablica 16. Rezultati ispitivanja istinitosti pri granici kvantifikacije 0.01 mg/l

Broj mjerenja	A	γ_2 izračunata (mg/l)
1	0.006	0.0098
2	0.007	0.0110
3	0.006	0.0098
4	0.006	0.0098
5	0.006	0.0098
6	0.007	0.0110
7	0.006	0.0098
8	0.006	0.0098
9	0.006	0.0098
10	0.006	0.0098
srednja vrijednost		0.0101
iskoristivost (%)		101.53
s		0.0005
RSD, %		5.02

Koncentracija 0.01 mg/l zadovoljava kriterij preciznosti jer je relativno standardno odstupanje manje od 10%. Također zadovoljava kriterij istinitosti jer je dobiveno iskorištenje 101.53%, a kriterij iznosi između 95% i 105%, a relativno standardno odstupanje je manje od 10% odnosno iznosi 5.02%. Granica detekcije je tri puta manja vrijednost od granice kvantifikacije i ona iznosi 0.003 mg/l.

4.1.7. Radno područje

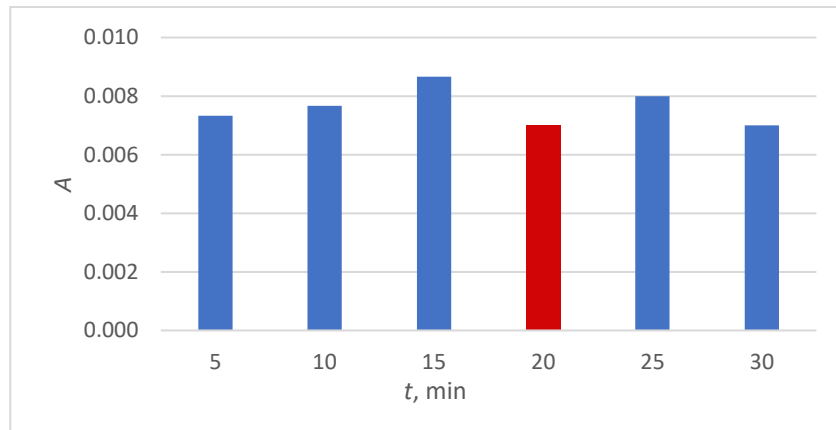
Radno područje definirano je intervalom unutar granica između kojih je moguće točno kvantitativno određivanje. Nije potrebno provoditi zasebne eksperimente nego se radno područje definira na temelju rezultata ispitivanja linearnosti, istinitosti i preciznosti. U radnom području moraju biti zadovoljeni kriteriji preciznosti, istinitosti i linearnosti. Radno područje sastoji se od dva linearna područja od kojih je prvo područje niskih koncentracija nitrita i odnosi se na koncentracije od 0.01 mg/l do 0.20 mg/l, a područje visokih koncentracija nitrita odnosi se na koncentracije od 0.20 mg/l do 1.00 mg/l. Najniža točka kalibracijskog pravca je granica kvantifikacije za koju su zadovoljeni svi kriteriji, a najviša koncentracija je koncentracija do koje su se provodila ispitivanja.

4.1.8. Robusnost

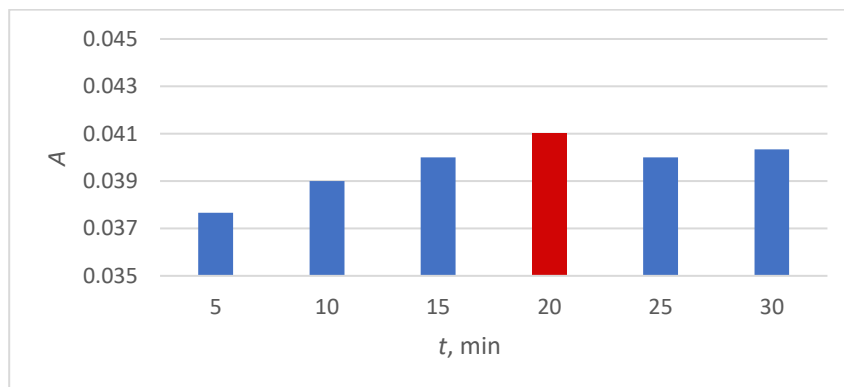
Tijekom ispitivanja robusnosti mijenjaju se radni uvjeti metode kako bi se odredilo koliko male promjene eksperimentalnih uvjeta ispitivanja utječu na rezultate analize. Robusnost je ispitivana promjenom dvaju radnih uvjeta metode, promjenom vremena reakcije analita s reagensom i promjenom valne duljine pri kojoj je mjerena apsorbancija. Referentno vrijeme reakcije analita s reagensom je 20 minuta, a referentna valna duljina iznosi 540 nm.

a) Ispitivanje robusnosti mijenjanjem vremena reakcije analita s reagensom

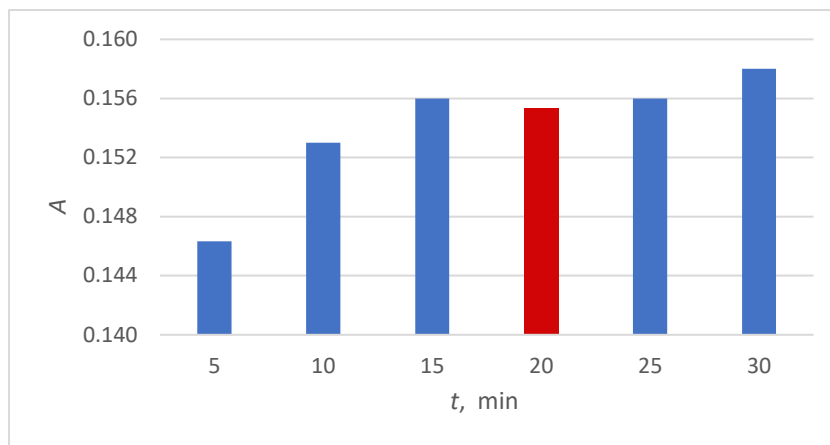
Mjerila se vrijednost apsorbancija nakon 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minuta reakcije analita s Griessovim reagensom. Robusnost je ispitana na koncentracijama nitrita od 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.20 mg/l i 1.0 mg/l. Rezultati mjerenja prikazani su na slikama 14.-17.



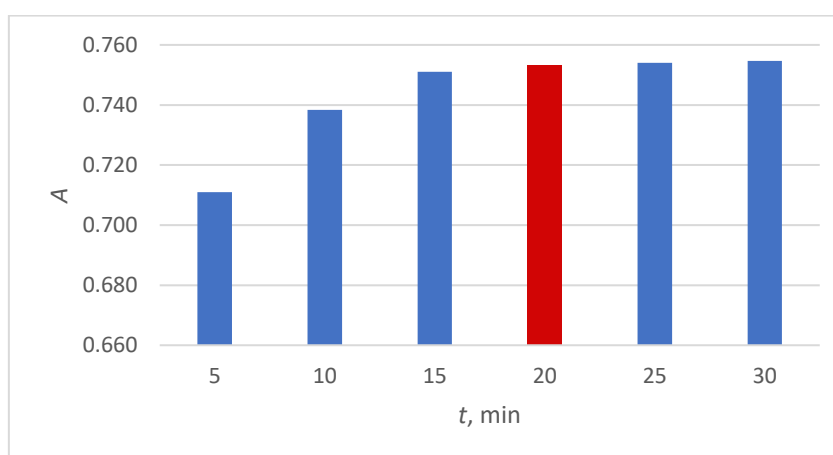
Slika 14. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.01 mg/l



Slika 15. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.05 mg/l



Slika 16. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.20 mg/l



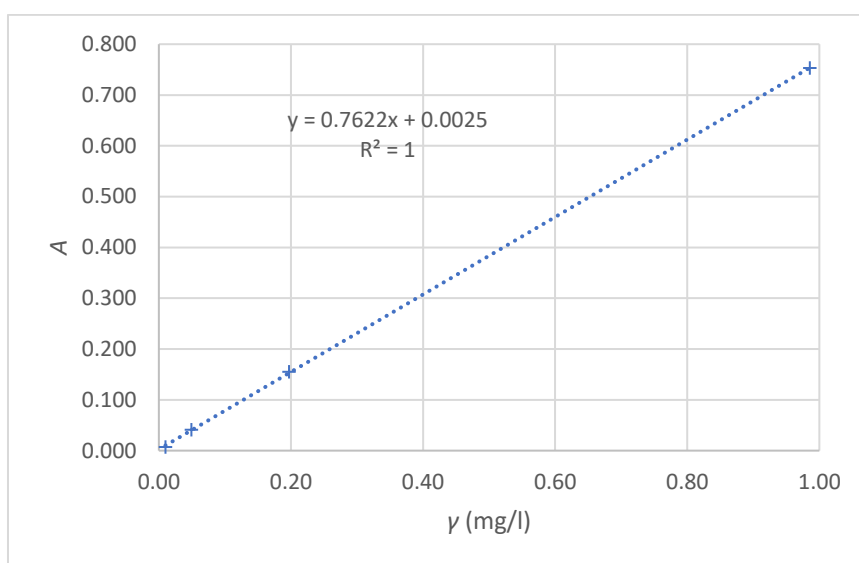
Slika 17. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 1.00 mg/l

Promatrajući rezultate ispitivanja robusnosti zaključuje se da je za granicu kvantifikacije optimalno vrijeme reakcije analita s Griessovim reagensom 15 minuta jer su na tom vremenu izmjerene najveće vrijednosti apsorbancije za tu koncentraciju. Za koncentraciju nitrita 0.05 mg/l vrijeme od 20 minuta je najbolje, dok za preostale dvije koncentracije nema razlike u vrijednostima apsorbancije nakon 15 i 20 minuta od početka reakcije. Uspoređene su vrijednosti izmjerenih apsorbancija svih koncentracija nakon reakcije u trajanju od 15 i 20 minuta.

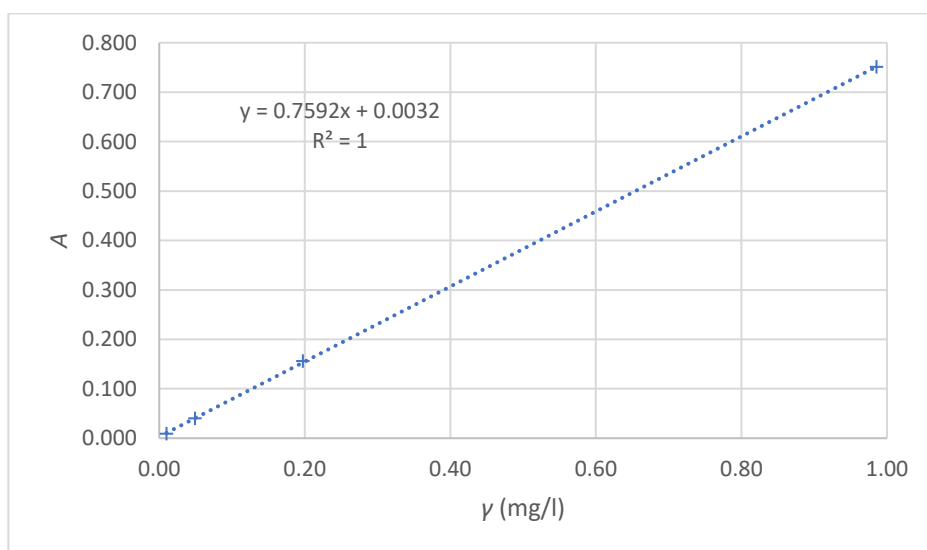
Tablica 17. Srednje vrijednosti apsorbancija izmjerenih nakon 15 i 20 minuta od početka reakcije

γ (mg/l)	A_{sr} (20 min)	A_{sr} (15 min)
0.01	0.007	0.009
0.05	0.041	0.040
0.20	0.155	0.156
1.00	0.753	0.751

Iz podataka u tablici nacrtani su kalibracijski pravci ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita i prikazani su na slikama 18. i 19.



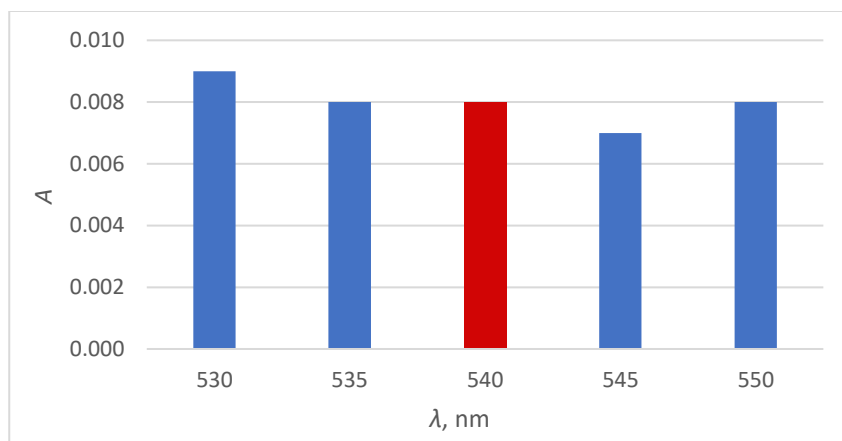
Slika 18. Kalibracijski pravac za mjerenja nakon reakcije u trajanju od 20 minuta



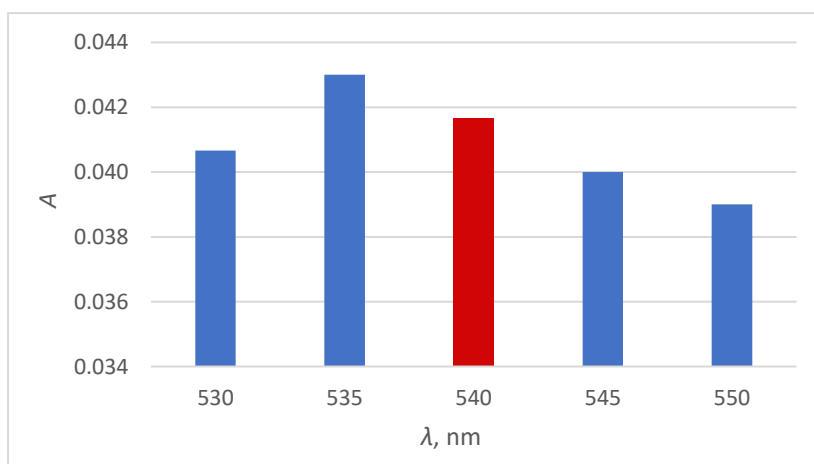
Slika 19. Kalibracijski pravac za mjerenja nakon reakcije u trajanju od 15 minuta

Usporedbom dobivenih kalibracijskih pravaca odnosno njihovih nagiba uočava se da su nagibi gotovo jednaki i time se zaključuje da nema značajne razlike između provođenja reakcije analita i Griessovog reagensa 15 ili 20 minuta odnosno nema promjene osjetljivosti metode što omogućava fleksibilnost prilikom rada.

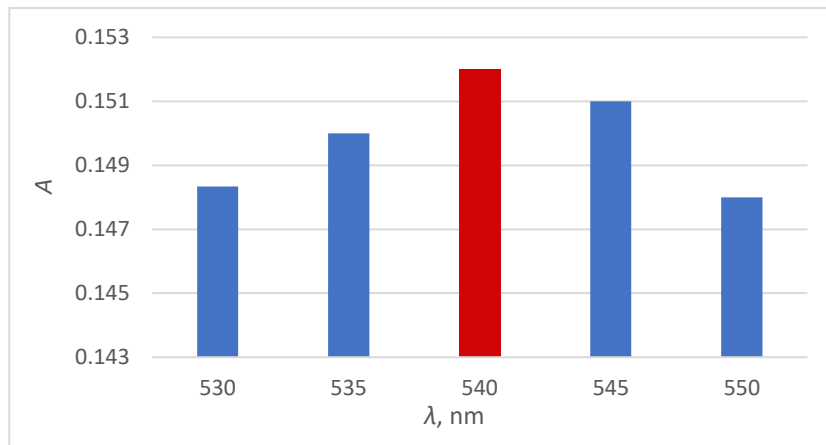
b) Ispitivanje robusnosti mijenjanjem valne duljine



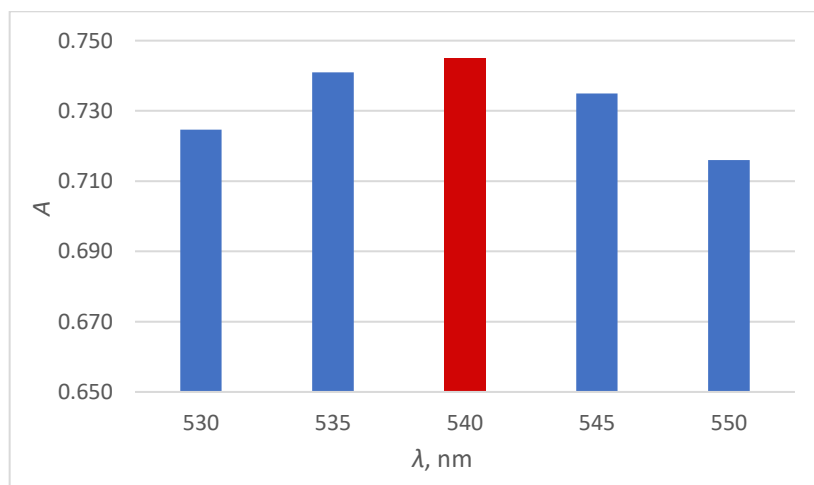
Slika 20. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.01 mg/l



Slika 21. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.05 mg/l



Slika 22. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 0.20 mg/l

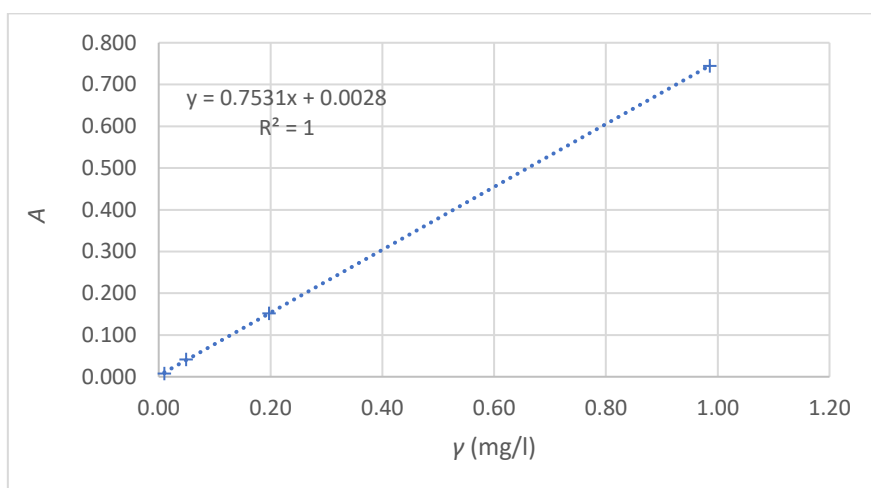


Slika 23. Ispitivanje robusnosti na koncentraciji 1.00 mg/l

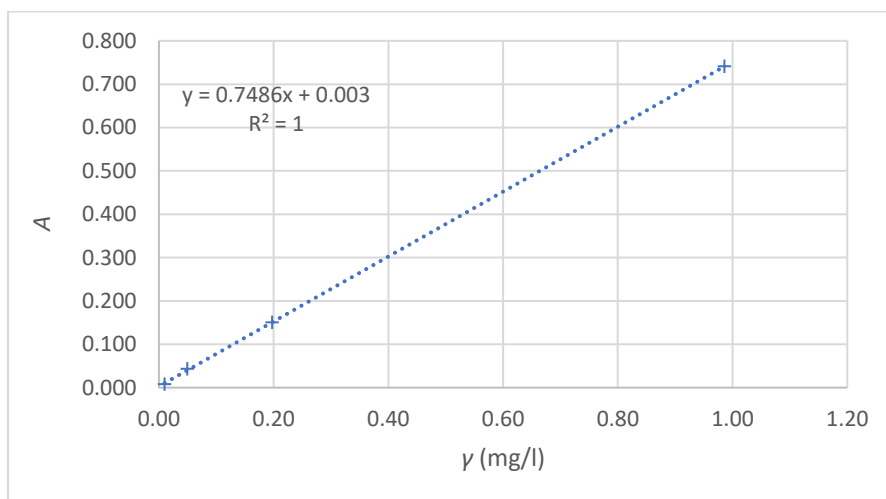
Iz dobivenih grafova uočava se da nižim koncentracijama više pogoduje mjerenje pri nižim valnim duljinama odnosno koncentraciji nitrita od 0.01 mg/l najviše pogoduje mjerenje pri 530 nm, a koncentraciji 0.05 mg/l pri 535 nm. Otopinama viših koncentracija najbolji rezultati dobivaju se pri referentnoj valnoj duljini odnosno pri 540 nm. Napravljena je usporedba osjetljivosti metode na promjenu valnih duljina kao na promjenu vremena trajanja reakcije analita s reagensom. Uspoređeni su rezultati mjerenja pri referentnoj valnoj duljini od 540 nm i pri 535 i 545 nm.

Tablica 18. Izmjerene apsorbancije za različite valne duljine

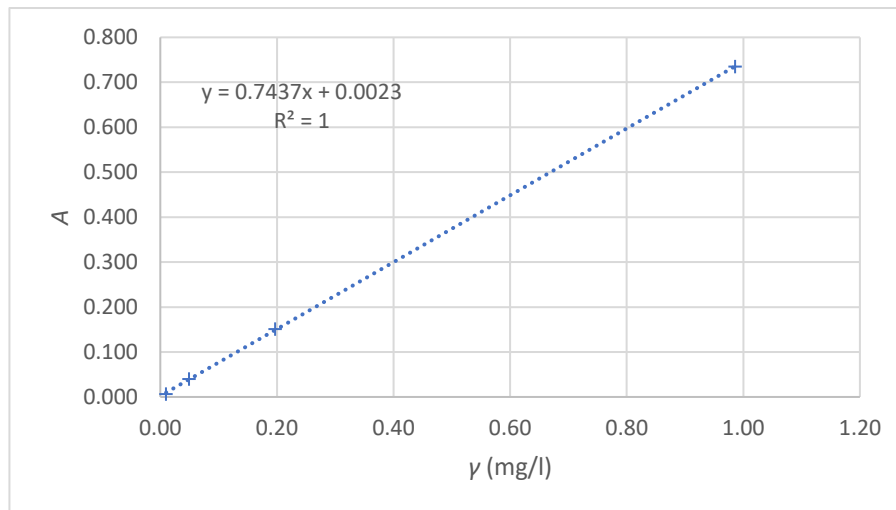
γ (mg/l)	A_{sr} (540 nm)	A_{sr} (535 nm)	A_{sr} (545 nm)
0.01	0.008	0.008	0.007
0.05	0.042	0.043	0.040
0.20	0.152	0.150	0.151
1.00	0.745	0.741	0.735



Slika 24. Kalibracijski pravac za mjerenja pri 540 nm



Slika 25. Kalibracijski pravac za mjerenja pri 535 nm



Slika 26. Kalibracijski pravac za mjerenja pri 545 nm

Nagibi sva tri kalibracijska pravca su gotovo jednaki što znači da ne dolazi do promjene osjetljivosti pri promjeni valne duljine za ± 5 nm od referentne valne duljine. Ovime je dokazano da ni pri većim rasponima valnih duljina od onih koje su navedene u specifikaciji instrumenta, ne dolazi do značajne promjene pri mjerenju apsorbancije.

4.1.9. Stabilnost

Jedan od parametara ispitivanja robusnosti je ispitivanje stabilnosti otopine reagensa. Kako bi se procijenilo je li otopina Griessovog reagensa stabilna potrebno je usporediti rezultate apsorbancija za različite koncentracije otopina tijekom više tjedana. To je učinjeno preko rezultata za međupreciznost koji se nalaze u tablici 9. za MilliQ vodu i u tablici 10. za vodovodnu vodu. Budući da rezultati mjerenja kroz više tjedana nemaju značajna odstupanja i relativno standardno odstupanje im je manje od 10% može se zaključiti da je otopina Griessovog reagensa stabilna jer nije došlo do promjena u izmjerenim vrijednostima apsorbancija. Iako vrijednost apsorbancija određena treći dan za vodovodnu vodu koncentracije 0.05 mg/l odstupa od vrijednosti određenih prva dva dana, ona se ne prepisuje manjoj stabilnosti Griessovog reagensa jer su za ostale dvije koncentracije određene apsorbancije koje odgovaraju apsorbancijama određenim prva dva dana.

4.1.10. Sažetak rezultata

Tablica 19. Rezultati validacije metode

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat MilliQ / vodovodna voda	Zadovoljenost kriterija DA/NE
Selektivnost			DA
Linearnost	$R^2 > 0.99$		
Niske koncentracije		0.9964 / 0.9951	DA / DA
Visoke koncentracije		0.9982 / 0.9989	DA / DA
Preciznost			
Ponovljivost	RSD < 10%		
0.05mg/l		2.94% / 2.17%	DA / DA
0.20 mg/l		0.61% / 1.19%	DA / DA
1.00 mg/l		0.08% / 0.17%	DA / DA
Međupreciznost	RSD < 10%		
0.05 mg/l		5.19% / 0.89%	DA / DA
0.20 mg/l		3.69% / 3.88%	DA / DA
1.00 mg/l		0.56% / 4.33%	DA / DA
Istinitost	$95% < R < 105%$		
0.05 mg/l		100.81% / 95.30%	DA / DA
0.20 mg/l		100.24% / 97.10%	DA / DA
1.00 mg/l		98.32% / 100.35%	DA / DA
Granica kvantifikacije (GK) (mg/l)		0.01	
Granica detekcije (GD) (mg/l)		0.003	
Radno područje			
Donja granica (mg/l)		0.01 / 1.00	
Gornja granica (mg/l)		0.01 / 1.00	

Usporedbom dobivenih rezultata validacije sa zadanim kriterijima može se potvrditi da je metoda prihvatljiva za određivanje nitrita u vodi. Zadovoljeni su kriteriji selektivnosti, linearnosti, preciznosti te istinitosti. Određena je granica kvantifikacije koja iznosi 0.01 mg/l NO_2^- i granica detekcije od 0.003 mg/l NO_2^- . Radno područje određeno je kao interval između koncentracija 0.01 mg/l i 1.00 mg/l NO_2^- .

5. ZAKLJUČAK

Provedena je validacija molekularne apsorpcijske spektrometrijske metode za određivanje nitrita u vodi, validacija je provedena s uzorcima MilliQ i vodovodne vode. Prema rezultatima može se zaključiti da je metoda selektivna za određivanje nitrita i linearna u dva koncentracijska područja (niže 0.01 – 0.20 mg/l i više 0.20 – 1.00 mg/l) sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije $R^2 > 0.99$. Nisu uočene značajne razlike u nagibima kalibracijskih pravaca iz čega se zaključuje da tvari iz matrice vodovodne vode ne utječu na osjetljivost metode. Potvrđena je preciznost ispitivanjem ponovljivosti i međupreciznost pri koncentracijama 0.05 mg/l, 0.20 mg/l i 1.00 mg/l, pri sve tri koncentracije u oba uzorka zadovoljen je kriterij, odnosno relativno standardno odstupanje ne prelazi granicu od 10% . Izvedbena karakteristika iskorištenje ispitana je pri istim koncentracijama nitrita i dokazano je da su pri sve tri koncentracije u MilliQ i vodovodnoj vodi ispunjeni kriterij prihvatljivosti istinitosti jer je iskorištenje u granicama između 95% i 105%. Određena je granica kvantifikacije (GK) koja iznosi 0.01 mg/l i granica detekcije (GD) koja iznosi 0.003 mg/l. Pri koncentraciji granice kvantifikacije zadovoljeni su kriteriji za preciznosti i istinitosti, odnosno relativno standardno odstupanje pri koncentraciji 0.01 mg/l je manje od 10%, a iskorištenje je u zadanim granicama između 95% i 105%. Radno područje odnosi se na koncentracije nitrita od 0.01 mg/l do 1.00 mg/l, unutar tog intervala zadovoljeni su kriteriji za linearnost, istinitost i preciznosti. Ispitan je utjecaj promjene vremena reakcije analita s reagensom i utjecaj promjene valne duljine pri mjerenju apsorpcije. Dokazano je da je metoda robusna jer prilikom malih promjena uvjeta ispitivanja, nije došlo do značajnih promjena rezultata ispitivanja. U razmaku od tri mjeseca potvrđena je i stabilnost otopine Griessovog reagensa. Na temelju svih dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda prikladna za određivanje nitrita u vodi.

7. LITERATURA

- [1] L. Ma, L. Hu, X. Feng, S. Wang, Nitrate and Nitrite in Health and Disease, Aging and disease, 9 (2018) 938-945.
- [2] Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, Narodne novine NN 47/2008
- [3] D. Ašperger: Karakterizacija materijala; spektrometrijske metode,
URL: https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/2_predavanje_KIM-KM-2019-2020-Asperger_Danijela.pdf (pristup 17.4.2023.)
- [4] Generalić, Eni. "Elektromagnetski spektar." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. 29 June 2022. KTF-Split. 12 Aug. 2023. <https://glossary.periodni.com>
- [5] Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.
URL: <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/spektrometrija.pdf> (pristup 12.5.2023.)
- [6]
URL: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry) (pristup 26.5.2023.)
- [7] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, Svijet po mjeri, 1 (2012) str. 61-64.
- [8] The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd Edition, Eurachem, 2014.
- [9] European Medicines Agency, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, London, 1995.
- [10] Pravilnik o posebnim uvjetima za obavljanje djelatnosti uzimanja uzoraka i ispitivanja voda, Narodne novine NN 3/2020

PRILOG

Tablica P1: Rezultati mjerenja linearnosti uzoraka u MilliQ vodi

γ (mg/l)	A1	A2	A3	Asr
0.01	0.006	0.006	0.004	0.005
0.02	0.016	0.016	0.017	0.016
0.05	0.040	0.040	0.038	0.039
0.10	0.085	0.088	0.087	0.087
0.15	0.116	0.117	0.117	0.117
0.20	0.162	0.163	0.164	0.163
0.25	0.201	0.202	0.201	0.201
0.49	0.395	0.397	0.397	0.396
0.74	0.589	0.589	0.590	0.589
1.00	0.746	0.747	0.747	0.747

Tablica P2: Rezultati mjerenja linearnosti uzoraka u vodovodnoj vodi

γ (mg/l)	A1	A2	A3	Asr
0.01	0.001	0.002	0.001	0.001
0.02	0.007	0.009	0.007	0.008
0.05	0.027	0.026	0.027	0.027
0.10	0.068	0.068	0.069	0.068
0.15	0.101	0.101	0.101	0.101
0.20	0.127	0.130	0.129	0.129
0.25	0.143	0.143	0.144	0.143
0.49	0.323	0.321	0.323	0.322
0.74	0.501	0.501	0.503	0.502
1.00	0.678	0.680	0.680	0.679