

Razvoj i validacija metode za određivanje teških metala u vodi ICP-MS tehnikom

Pavlinić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:149:516287>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Valentina Pavlinić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2024.

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

Kandidatkinja **Valentina Pavlinić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 28. listopada 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 31. listopada 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Valentina Pavlinić

**RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE TEŠKIH
METALA U VODI ICP-MS TEHNIKOM**

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. dr. sc. Lidija Furač, v. pred.
2. doc. dr. sc. Matija Cvetnić
3. dr. sc. Martina Miloloža

Zagreb, listopad 2024.

Ovom prilikom želim se zahvaliti mentorici dr.sc. Lidiji Furač i doc. dr. sc. Matiji Cvetnić na pruženoj pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada. Mojim roditeljima i braći, hvala na bezuvjetnoj ljubavi i potpori te što su zajedno sa mnom proživljavali sve uspone i padove s kojima sam se susrela tijekom studiranja. Također hvala i svim mojim prijateljima koji su bili uz mene te mi pružili bezbroj savjeta i utjehe. Ovaj rad posvećujem upravo svima njima bez kojih ne bih uspjela sve ovo postići!

SAŽETAK

U ovom je radu provedena validacija metode detekcije teških metala tehnikom masene spektrometrije povezane s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Za postupak validacije korištene su temeljne standardne otopine (TSO) 19 elemenata (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn). Određeni parametri validacije su linearnost, preciznost, radno područje, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK) i istinitost. Validirana metoda je zatim primijenjena za određivanje elemenata u realnim uzorcima: voda sa ulaza i izlaza uređaja za pročišćavanje voda akumulacijskog jezera hidroelektrane (HE) s područja vapnenačkih stijena i na morski sediment iz područja srednjeg i južnog Jadrana. Uzorak sedimenta podvrgnut je kiseloj digestiji u zatvorenim teflonskim posudama u mikrovalnoj pećnici koristeći HNO₃, HCl i HF. Optimalni uvjeti razgradnje uzorka sedimenta postignuti su u trećoj digestiji nakon 10 minuta, pri snazi od 400 W i volumenima kiselina; 1 mL HCl, 3 mL HNO₃ i 1 mL HF. Rezultati analize pokazuju kako su u uzorku sedimenta prisutni Al, Fe, P i V. Rezultati dobiveni za uzorke vode na ulazu i izlazu iz uređaja za pročišćavanje vode akumulacijskog jezera HE pokazuju da su na ulazu povišene koncentracije S i Zn. Bitno je da su na izlazu iz uređaja za pročišćavanje vode svi elementi uspješno uklonjeni.

Ključne riječi: ICP-MS, validacija, teški metali, voda, morski sediment

ABSTRACT

In this study, the validation of the method for detecting heavy metals using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was carried out. Fundamental standard solutions (FSS) of 19 elements (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V, and Zn) were used for the validation process. The specific validation parameters were linearity, precision, working range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and accuracy. The validated method was then applied to determine the elements in real samples: water from the inlet and outlet of a water treatment device of a hydroelectric reservoir (HE) in an area of limestone rocks, and in marine sediment from the central and southern Adriatic Sea. The sediment sample was subjected to acid digestion in closed Teflon vessels in a microwave oven using HNO₃, HCl, and HF. The optimal conditions for sediment sample decomposition were achieved in the third digestion after 10 minutes and with the following acid volumes: 1 mL of HCl, 3 mL of HNO₃, and 1 mL of HF. The analysis results show that Al, Fe, P, and V are present in the sediment sample. The results obtained for the water samples at the inlet and outlet of the hydroelectric reservoir water treatment device show elevated concentrations of S and Zn at the inlet. Importantly, all elements were successfully removed at the outlet of the water treatment device.

Key words: ICP-MS, validation, heavy metals, water, marine sediment

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Prisutnost metala u okolišu	3
2.1.1. Izvori teških metala u okolišu.....	3
2.2. Najzastupljeniji toksični metali u okolišu i njihov utjecaj	6
2.2.1. Kadmij (Cd).....	6
2.2.2. Živa (Hg)	8
2.2.3. Olovo (Pb)	10
2.2.4. Arsen (As)	12
2.3. Postupci pripreme uzoraka i izazovi pri mjerenju ICP-MS tehnikom	14
2.4. Masena spektrometrija povezana sa induktivno spregnutom plazmom	19
2.4.1. Glavni dijelovi ICP-MS instrumenta.....	19
2.4.2. Masena spektrometrija.....	26
2.5. Validacija metode	26
2.5.1. Izvedbene karakteristike validacije.....	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Kemikalije i instrumentacija	33
3.2. Validacija metode	37
3.2.1. Postupak pripreme standardnih otopina (SO).....	37
3.2.2. Kriteriji validacije.....	41
3.3. Priprema uzorka sedimenta za analizu	41
3.4. Priprema uzorka vode za analizu	46
3.5. Analiza uzoraka ICP-MS tehnikom	46
4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Rezultati validacije	48
4.2. Rezultati mjerenja ICP-MS	57
4.2.1. Uzorak sedimenta	57
4.2.2. Uzorak vode.....	62
5. ZAKLJUČAK	64
6. POPIS SLIKA	65
7. POPIS KRATICA	67
8. LITERATURA	69

1. UVOD

Onečišćenja u okolišu, uključujući metale u tragovima, pesticide, poliklorirane bifenile (PCB) i lijekove, značajno utječu na živi svijet. Jedan od izraženijih utjecaja imaju metali koji su rasprostranjeni od zemljine jezgre pa sve do gornje atmosfere. Upravo zbog njihove široke rasprostranjenosti i prisutnosti u svim prehrambenim lancima nemoguće ih je u potpunosti eliminirati iz okoliša. U okoliš se mogu akumulirati iz antropogenih izvora ili putem prirodnih procesa. Iako neki metali, poput bakra (Cu) i cinka (Zn), nisu nužno štetni, metali poput žive (Hg), olova (Pb), kadmija (Cd) i arsena (As) su izrazito toksični. Nazivaju se još i „sustavnim otrovima“ zbog mogućnosti oštećenja ljudskih organa pri niskim koncentracijama te su ih tako Američka organizacija za očuvanje okolišta (engl. *United States Environmental Protection Agency, U.S. EPA*) i Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) klasificirale kao kancerogene supstance za ljudski organizam. Stoga je važan monitoring prisutnosti metala u vodama tlu i hrani, a parametri sukladnosti, metode analiza i monitorinzi propisuju maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) utvrđene zakonskim regulativama. ^[1,2,3]

Prije svake analize potrebna je priprema uzorka koja ovisi o svojstvima istog te o komponenti koju želimo detektirati. Za određivanje metala iz vode masenom spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS*) najčešće je potrebno zakiseliti uzorak kako bi se spriječilo taloženje metala. Kod laserski inducirane probojne spektroskopije mogu se koristiti hidrofilne grafitne ljuskice u svrhu povećanja koncentracije teških metala u uzorku vode.^[4] Zbog izuzetno kompleksne i heterogene matrice, uzorak tla zahtijeva nešto složeniju pripremu. Uzorak je potrebno osušiti, zatim homogenizirati te prosijati na željenu veličinu čestica. Tako dobivene čestice mogu se analizirati pomoću rendgenske fluorescencije (engl. *X-ray fluorescence, XRF*).^[5] Kako bi se uzorak tla razgradio i preveo u topljiv oblik dalje se podvrgava različitim digestijama.^[6] Ovakva priprema uzorka najčešća je za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju (engl. *Atomic absorption spectrometry, AAS*), optičku emisijsku spektroskopiju sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES*) i ICP-MS.^[7,8,9,10] Uzorci mulja komunalnih otpadnih voda također se najprije osuše do konstantne mase, zatim usitne te homogeniziraju. Daljnji koraci pripreme, odnosno razgradnje uzorka, ovise o zahtjevima primijenjene analitičke metode.^[11,12,13] Shodno prethodnom, i za

uzorke sedimenta je potrebno provesti iste korake pripreme kao i za tlo i mulj komunalnih otpadnih voda. Za sve uzorke proces digestije uveliko ovisi o matrici samog uzorka.^[14,15,16]

Pored analitičkih metoda za određivanje metala u okolišu spomenutih u prethodnom odlomku, primjenjuju se i mnoge druge metode. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (engl. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS) iznimno je osjetljiva tehnika koja se koristi za određivanje metala u tragovima u različitim okolišnim uzorcima.^[17,18] Također se koriste i kromatografske tehnike od kojih je najzastupljenija tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC).^[19,20] Ionska kromatografija (engl. *Ion Chromatography*, IC) može se koristiti za određivanje metala iz raznih okolišnih uzoraka korištenjem odgovarajućih stacionarnih faza.^[21,22] Mikroskopske tehnike, skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning electron microscopy* (SEM)) i transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission electron microscopy* (TEM)), omogućuju vizualizaciju i analizu distribucije metala u uzorcima na mikroskopskoj razini.^[23,24,25] Navedene tehnike predstavljaju najčešće primjenjivane analitičke metode za određivanje metala u okolišu.

Validacija metode je postupak utvrđivanja prikladnosti metode za korištenje u određenu namjenu. Razvoj metode uključuje validaciju koja osigurava povjerenje u točnost rezultata ispitivanja. Proces validacije provodi se kod nestandardiziranih metoda, novorazvijenih metoda u laboratoriju, standardnih metoda izvan područja primjene te modificiranih standardnih metoda. Parametri validacije su linearnost, osjetljivost, selektivnost/specifičnost, radno područje, robusnost, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK), točnost te mjerna nesigurnost. Kako bi se neka metoda akreditirala prema normi HR EN ISO/IEC 17025:2017 nužno je provesti proces validacije.^[26]

Svrha ovog rada je razvoj i validacija metode za određivanje teških metala ICP-MS tehnikom. Postupak validacije proveden je pomoću temeljnih standardnih otopina (TSO) 19 metala (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn). Parametri validacije koji su određeni su linearnost, preciznost, radno područje, granica detekcije, granica kvantifikacije i istinitost. Validirana metoda primijenjena je na realne uzorke vode sa ulaza i izlaza hidroelektrane s područja vapnenačkih stijena i na morski sediment iz područja srednjeg i južnog Jadrana. Kod uzorka sedimenta nastojalo se optimirati uvjete kisele digestije provedene u mikrovalnoj pećnici u svrhu potpune razgradnje uzorka. U uzorcima su određene koncentracije Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb, S, Sb, Se, V i Zn.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Prisutnost metala u okolišu

Prisutnost metala u okolišu predstavlja složen problem s ozbiljnim posljedicama po ekosustave i ljudsko zdravlje. Metali mogu biti zastupljeni u okolišu u raznim oblicima te pokazuju širok raspon oksidacijskih stanja i koordinacijskih brojeva. Neki se metali mogu bioakumulirati u okolišu, a neki i transformirati u organometalne spojeve. Njihova široka rasprostranjenost otežava samu analizu i zbrinjavanje istih. Naime, različite koncentracije metala moguće je pronaći u vodenom okolišu, tlu i sedimentu te čak i u zraku. One variraju na lokalnoj, regionalnoj i globalnoj razini. Važno je naglasiti i to da su metali bitni mikronutrijenti mnogih ekosustava na Zemlji, ali problem počinje kada koncentracija određenih metala, npr. cink i bakar, prijeđe dozvoljene granice i tada postaju toksični. S druge strane, neki metali, poput Hg i Pb, toksični su po prirodi. Najpoznatiji biotoksični elementi su Be, Al, Cr, Ni, As, Nb, Ag, Cd, Sb, Ba, Hg, Pb, Zn i U.^[1,27,28] Zanimljiva je činjenica da su biljne vrste tijekom evolucije razvile specifične potrebe za kemijskim elementima pa tako i za teške metale. Tako željezo, mangan, bakar, cink i molibden posjeduju metaboličku ulogu kod stablašica, a nikal kod mahunarki. Također, neke biljke su se prilagodile novim uvjetima okoliša te stoga postoje halofiti u slanim uvjetima, metalofiti na tlima s visokom koncentracijom teških metala te selenofiti na područjima visoke koncentracije selena. Međutim, visoke koncentracije metala mogu imati negativne učinke na metabolizam i performansu biljaka, a ozbiljnost oštećenja ovisi o koncentraciji metala i interakciji s drugim čimbenicima tla.^[28]

2.1.1. Izvori teških metala u okoliš

Metali u okoliš mogu dospjeti na mnoge načine od kojih su najznačajnije antropogene aktivnosti. One imaju sposobnost potpune ili djelomične modifikacije koncentracije kemijskih elemenata u različitim područjima okoliša. Najučestalije antropogene aktivnosti koje uzrokuju prisustvo teških metala u okoliš su metalurgija, rudarstvo, poljoprivreda, energetika, promet, urbanizacija i nepravilno zbrinjavanje otpada.^[27]

Rudarstvo i metalurgija uzrokuju značajno onečišćenje kopnenog i vodenog okoliša teškim metalima, najčešće olovom, cinkom, željezom, manganom i bakrom. Glavne štetne

učinke predstavljaju promjene u hidrogeološkim sustavima, hidrološkoj transformaciji tla i površinskim tokovima, onečišćenju tla i površinskim rezervoarima vode te onečišćenju atmosfere.^[29,30] E. H. Rybicka (1996) navodi kako su u Poljskoj najonečišćeniji gornji tokovi rijeka Visle i Odre te kako 50% površinskih tokova ne zadovoljava ni standarde za III. razred kvalitete.^[29] Upravljanje i sanacija rudarskog otpada smatraju se vitalnim komponentama održive rudarske prakse. Tako se, upotrebom letećeg pepela, od spaljivanja komunalnog krutog otpada i mljevene granulirane troske iz visokih peći, na olovo-cink rudničku jalovinu poboljšava njezino skrućivanje i stabilizacija te se tako proizvela nepečena opeka. Ovim se pristupom učinkovito imobiliziraju teški metali prisutni u jalovini i proizvode cigle sa zadovoljavajućim mehaničkim i ekološkim svojstvima. Također, se primjenjuje i proces magnetske separacije temeljene na ugljenu za recikliranje obojenog metalurškog otpada s visokim sadržajem željeza. Ovom se metodom nastoje odvojiti svi vrijedni resursi iz otpada, a da se pritom umanjuju rizici za onečišćenje okoliša.^[30]

Poljoprivreda značajno doprinosi prisutnosti metala u okolišu kroz uporabu pesticida i gnojiva. Pesticidi su kemijske ili biološke tvari koje imaju sposobnost potpunog ili djelomičnog onesposobljavanja, odbijanja ili ubijanja raznih nametnika, a često u svom sastavu sadrže metale poput bakra, arsena, kadmija, cinka i nikla. Služe kao značajni agroagensi za smanjenje ekonomskih gubitaka uzrokovanih štetnicima i/ili biljnim bolestima, čime potiču kvalitetu i kvantitetu globalne proizvodnje hrane. Primjerice, spojevi bakra se koriste kao fungicidi, dok se spojevi arsena koriste kao herbicidi. Ovi metali mogu se akumulirati u tlu i biljkama, isprati u površinske i podzemne vode, te kontaminirati vodene ekosustave. Dugotrajna primjena ovih poljoprivrednih kemikalija može smanjiti plodnost tla, utjecati na zdravlje biljaka i životinja, te potencijalno ugroziti ljudsko zdravlje putem prehrambenog lanca.^[31] T. L. A. Ataikiru i sur. (2023.) došli su do zaključka da bi se bioremedijacija kontaminiranog tla pesticidima mogla postići i poboljšati stimuliranjem autohtone mikrobne zajednice potrebnim hranjivim tvarima (kompost).^[32] S druge strane, gnojiva se koriste za poboljšanje plodnosti tla i povećanje prinosa usjeva te sadrže esencijalne hranjive tvari poput dušika, fosfora i kalija, ali često uključuju i teške metale. Tako se, na primjer, anorganska fosfatna gnojiva proizvode kiselim razlaganjem samljevenih ili usitnjenih fosfatnih stijena koje sadrže povišene razine toksičnih metala, kao što su uranij, kadmij i arsen, koji se onda mogu ugraditi u fosfatna gnojiva.^[33]

Područje energetike obuhvaća proizvodnju nuklearne energije iz fosilnih goriva. Naime, sagorijevanje ugljena, nafte i zemnog plina može oslobađati metale poput žive, olova i arsena u atmosferu. U ovom pogledu značajan doprinos prisutnosti metala u zraku imaju i motorna

vozila.^[34] U zraku su metali najčešće adsorbirani na partikularne čestice PM_{2.5} (promjer manji od 2.5 μm) i PM₁₀ (promjer 2,5 i 10 μm). S. Nuchdang i sur. (2023) provodili su istraživanje o koncentraciji, elementarnoj karakterizaciji i identifikaciji mogućih izvora PM_{2.5} i PM₁₀ u predgrađu Pathum Thani u Tajlandu. Glavni izvori PM_{2.5} čestica bili su promet i spaljivanje biomase, dok su tlo i erozija građevinskih proizvoda bili glavni izvori PM₁₀ čestica. Neki od metala koji su detektirani, pomoću XRF metode, na objema česticama bili su željezo, kalij, krom, kalcij, bakar, sumpor i olovo.^[27]

Kontaminacija okoliša teškim metalima iz otpada predstavlja sve veću zabrinutost zbog ozbiljnih posljedica po ekosustave i ljudsko zdravlje. Industrijski, elektronički i kućni otpad često sadrže teške metale, a posljedica njihovog neadekvatnog zbrinjavanja dovodi do ispuštanja metala u zrak, vodu, tlo i hranidbeni lanac. Brza industrijalizacija i urbanizacija povećavaju količinu otpada, osobito u zemljama u razvoju, gdje nepravilno gospodarenje dovodi do onečišćenja. Odlaganje i spaljivanje otpada bez kontrole može isprati metale u tlo i podzemne vode te emitirati otrovne pare. Primjerice neadekvatno odlaganje baterija i akumulatora može dovesti do otpuštanja olova, kadmija, žive i nikla u okoliš.^[35]

Osim spomenutih antropogenih aktivnosti, metali dospijevaju u okoliš i kroz različite prirodne procese. Erozija stijena i tla, najčešće potaknuta vjetrom i vodom, oslobađa metale poput željeza i cinka u tlo i vodene tokove. Vulkanske erupcije izbacuju velike količine metala u atmosferu, dok prirodni požari spaljuju vegetaciju, oslobađajući metale u zrak i tlo. Raspadanjem biljaka i životinja akumulirani metali reapsorbiraju se u tlo, a morski aerosoli prenose metale iz oceana u atmosferu. Ovim procesima održava se biogeokemijski ciklus metala u okolišu.^[36,37] M. Bełdowska i sur. (2022) proveli su istraživanje u Gdanjskom zaljevu na južnom dijelu Baltičkog mora. Prikupljeni su uzorci sedimenta sa četiri hridi: Orłowo, Mechelinki, Oslonino i Puck na zapadnoj obali Gdanjskog zaljeva. Uzorci su analizirani rendgenskom fluorescentnom spektroskopijom (XRF), a određivani su krom, mangan, željezo, bakar, cink, rubidij, stroncij, itrij, cirkonij i barij. Koncentracije ispitivanih metala su u rasponu vrijednosti za nekontaminirana područja te su najzastupljeniji bakar, cink, krom i rubidij, a najmanje prisutni su mangan, barij i željezo. Pomoću korelacijskih vrijednosti između pojedinih metala određeno je njihovo geokemijsko ponašanje i podrijetlo. Tako su za željezo, cink i rubidij utvrđene pozitivne korelacije, što govori o njihovom sličnom geokemijskom ponašanju ili zajedničkom podrijetlu. S druge strane, nepostojanje korelacije između željeza i mangana može upućivati na antropogeno podrijetlo jednog od ovih metala. Osim korelacija među metalima, određena je i korelacijska ovisnost između udjela fine frakcije sedimenta i

koncentracije metala. Dobiveni rezultati pokazuju pozitivnu korelaciju povećanjem udjela fine frakcije sedimenta s povećanjem koncentracije željeza, bakra, rubidija i stroncija. Ovaj se odnos objašnjava na način da fine čestice sedimenta imaju veću specifičnu površinu te samim time i veću sposobnost adsorpcije metala.^[37]

2.2. Najzastupljeniji toksični metali u okolišu i njihov utjecaj

Teški metali u okolišu mogu se pojaviti pojedinačno ili kao mješavine dvaju ili više metala. Spadaju u skupinu bionerazgradivih tvari, a usprkos njihovom toksičnom djelovanju njihova prisutnost u ekosustavu je u porastu. Najzastupljeniji toksični metali u okolišu su kadmij, živa, olovo i arsen te se još nazivaju i „sustavnim otrovima“ jer je dokazano da već pri niskim koncentracijama imaju izražena štetna djelovanja. Američka organizacija za očuvanje okolišta (EPA, engl. *United States Environmental Protection Agency, U.S.*) i Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*) klasificirale kao poznate kancerogene supstance za ljudski organizam.^[1]

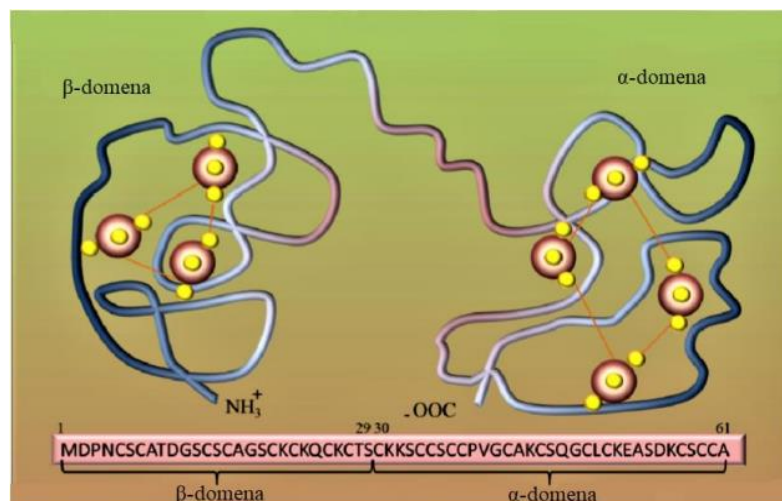
2.2.1. Kadmij (Cd)

Kadmij (Cd) u ekološke sustave najčešće dopijeva iz industrija za taljenje te putem trošenja automobilskih guma, gorenja dizela, zagrijavanja ulja, fosfatnih gnojiva, pesticida i aerobiološki obrađenog otpadnog mulja deponiranog na tlo.^[28]

Prisutnost Cd u fosilnim gorivima ne doprinosi njihovoj energetske vrijednosti zbog zanemarive koncentracije, oko 0.1 – 1.0 ppm, te ga se s ekonomskog aspekta ne isplati uklanjati. S druge strane, fosfatna gnojiva sadrže puno veće količine Cd od oko 2 – 200 ppm. Njihovom se uporabom na poljoprivrednim zemljištima, obogaćuje tlo Cd što za posljedicu ima smanjeni prinos uzgojene poljoprivredne kulture. U automobilskim gumama koristi se cinkov oksid (ZnO), a Cd je uvijek prisutan kao kontaminant na Zn spojevima. Koncentracija Cd u gumama iznosi oko 20 – 90 ppm te se tijekom trošenja guma emitira i akumulira u okoliš. Jedan od najvećih problema urbanih područja predstavlja raspolaganje velikom količinom vodenog i glomaznog otpada stvorenog od industrije i različitih ljudskih aktivnosti. Naime, od izrazite je važnosti pravilno odlaganje i zbrinjavanje otpada kako potencijalno ne bi došlo do ekološkog

onečišćenja. Stoga, rastu ulaganja u alternativne metode zbrinjavanja otpada, od strane općina i vlade država, od kojih je najzastupljenija metoda navodnjavanja poljoprivrednih površina muljem i otpadnim vodama od obrade biljaka. Također, prilikom uporabe ove metode treba biti na oprezu u kojoj količini su prisutni teški metali, što znatno ovisi o vrsti i količini otpada koje se ispušta u sustav za obradu otpada u industrijama. Tako se, mulj komunalnih otpadnih voda najčešće primijenjuje za omekšavanje tla i kao gnojivo, no može sadržavati Cd u rasponu koncentracija od 3 ppm do preko 3000 ppm. Kadmij uzrokuje brojne posljedice na biljke od kojih su najznačajnije inhibicija rasta same biljke odnosno korijena i izdanka te disfunkciju fotosinteze oštećujući klorofil. Na ovaj način, odnosno kroz vezu tlo – biljka, dolazi do najznačajnije akumulacije Cd u ljudski organizam što dovodi do ozbiljnih zdravstvenih problema.^[28]

U ljudski organizam Cd može ući putem hrane, udisaja te preko kože. Sam mehanizam njegova djelovanja temelji se na vezanju na metalotionein (MT, *slika 1.*), koji spada u unutrašnje proteine male molekulske mase koji imaju sposobnost vezanja esencijalnih (cink, bakar, selen) i neesencijalnih (kadmij, živa, srebro, arsen) metala. Metalotionein obiluje cisteinom (Cys), koji sadrži tiolne skupine koje omogućuju stvaranje veze metal - MT. Kompleks Cd – MT reapsorbira se nakon prijenosa do organa, a najčešće su to bubrezi, jetra, pluća i gušterača. Najveći problem je u tome što ne postoji mehanizam putem kojeg bi se ovaj kompleks izlučio iz organizma. Eksperimentalnim dokazima utvrđeno je da u otrovanim organima Cd ima citotoksični učinak stvarajući reaktivne kisikove tvari (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Na taj način uzrokuje peroksidaciju lipida, oštećenje DNA te denaturaciju proteina što u konačnici dovodi do razvoja tumora i drugih neurodegenerativnih bolesti. Kadmij ima sposobnost zamjene željeza i bakra u raznim membranskim i citoplazmatskim proteinima, gdje onda slobodni željezo i bakar sudjeluju u oksidativnom stresu kroz Fentonovu reakciju. Još jedan negativan učinak Cd je narušavanje transporta hranjivih tvari kroz stanične membrane i epitele što za posljedicu ima poremećenu funkciju stanice i homeostaze. Osim kod ljudi, metalotionein se nalazi i u biljnom i u životinjskom organizmu, no njegova se kemijska struktura, odnosno količina molekula cisteina, znatno razlikuje. Stoga, MT se može koristiti kao indikator okolišne opterećenosti metalima, kao biomarker izloženosti Cd u medicinskim ispitivanjima, te za ispitivanje izloženosti ljudi drugim metalima te može pridonijeti pri izračunavanju dopuštene količine unosa Cd.^[1,38]



Slika 1. Shematski prikaz strukture metalotioneina kod sisavaca. Prikazane su C-terminalna α -domena s 4 klastera i N-terminalna β -domena s 3 klastera. Crvene kuglice predstavljaju metalni atom (npr. Cu), dok žute kuglice atome S.^[38]

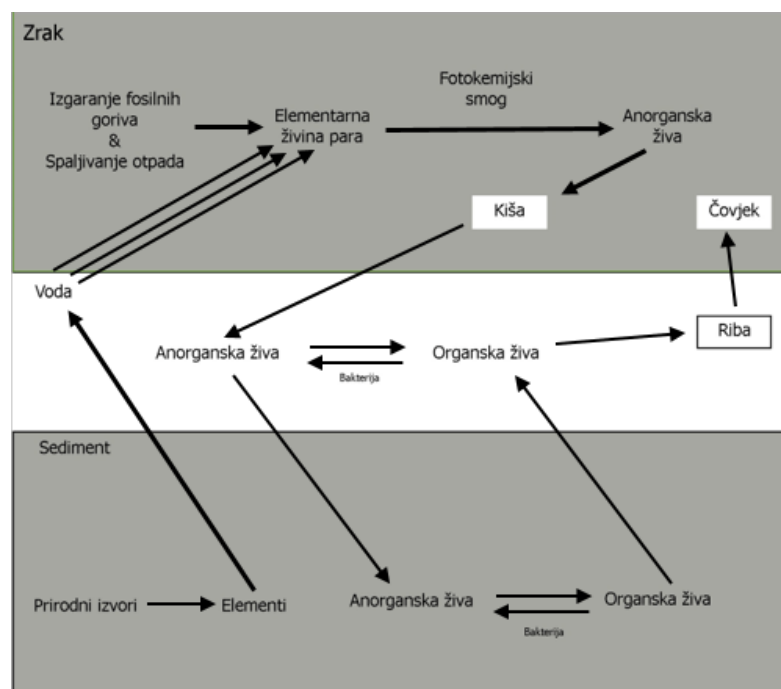
2.2.2. Živa (Hg)

Živa (Hg) zbog svoje visoke hlapljivosti ima tendenciju široke rasprostranjenosti u okolišu odnosno ima sposobnost olakšanog kruženja između vode, tla, zraka i biotičkih komponenti okoliša. Pojavljuje se u monovalentnom i divalentnom stanju u kojima stvara kompleksne soli kao što su kalijev tetracijanomerkurat(II), $K_2[Hg(CN)_4]$, i kalijev tetratiocijanomerkurat(II), $K_2[Hg(SCN)_4]$. Također, Hg je moguće pronaći i u stijinama u obliku malih kuglica ili u legurama sa zlatom i srebrom. Komercijalno se najviše ekstrahira iz cinabarita odnosno crveno-crnog živinog sulfida, HgS, koji predstavlja i primarni izvor žive u industrijskoj proizvodnji.^[1,28]

Živa u okoliš dopijeva putem mnogih ljudskih i prirodnih aktivnosti kroz njezino direktno ispuštanje u zrak, vodu i tlo. Glavna ispuštanja uzrokovana ljudskim djelovanjem nastaju kroz razne primjene pesticida, proizvodnju klora i kaustične sode, izgaranje goriva, katalitičke procese, rafiniranje ruda, obradu otpadnih voda, spaljivanje otpada, obradu fosfatnih stijena, proizvodnju i upotrebu boja i kvarove uređaja koji sadrže Hg. Zabrinutost je najviše usmjerena na primjenu pesticida i ispuštanje vode iz klor alkalnih postrojenja zbog njihove uske povezanosti s kontaminacijom prehrambenog lanca. Po proizvodnji jedne tone klora oslobodi se oko 159 g – 227 g Hg u okoliš. Pesticidi na bazi Hg koriste se u proizvodnji boja, papira i celuloze te u poljoprivredi kao fungicidni tretman na zrnima žitarica. Ograničena emisija Hg iz

prirodnih ruda može uzrokovati lokalno onečišćenje zraka i vodenog okoliša. Svi metali, osim željeza, imaju sposobnost vezanja sa Hg tj. amalgamacije. Prije razvoja cijanidnog postupka, Hg se koristila za dobivanje zlata i srebra iz ruda stvaranjem amalgama, pri čemu se na kraju Hg uklonila destilacijom. Tako se kalijevi, natrijevi i cinkovi amalgami koriste kao reducirajuća sredstva, a natrijev amalgam se koristi i u proizvodnji tetraetilnog i tetrametilnog olova. Jedna od najvažnijih primjena Hg je u proizvodnji vinil klorida (PVC) gdje djeluje kao katalizator te se na 0,5 kg proizvedenog PVC-a oslobodi oko 34 g Hg u okoliš. Organske soli Hg koriste se u uretanskim elastomerima za lijevanje i brtvljenje. Znatna količina Hg koristi se u električnim aparatima, instrumentima i u laboratorijima. Takve upotrebe uključuju baterije, lampe, elektronske cijevi, uređaje za kontrolu tlaka, termometre, barometre te ventile. Također se koristi i u različitim farmaceuticima kao što su diuretici, antiseptici, pripravci za kožu te kao konzervansi u kozmetici.^[28]

Ljudi najčešće u svoj organizam Hg unose kroz kontaminiranu hranu i vodu. Ribe imaju visoku tendenciju zadržavanja Hg u svojim mišićnim tkivima. Brojna ozbiljna oštećenja nastaju zbog izloženosti metil merkuratu (CH_3Hg). Koraci njegovog nastanka transformiranjem žive i njezinih spojeva prikazani su na *slici 2*. Metil merkurat napada imunološki sustav, mijenja genetski kod i enzimski sustav te uzrokuje brojna oštećenja živčanog sustava kao što su kordinacija i osjetila za dodir, okus i vid. Prenatalna izloženost CH_3Hg kod djece povezuje se s jakim oštećenjem mozga. Ovako izrazita toksičnost CH_3Hg proizlazi iz sposobnosti interakcije s nukleofilima, najčešće sulfhidrilom ($-\text{SH}$) i selenohidrilom ($-\text{SeH}$), koji su sastavni dijelovi brojnih proteina. Ovim interakcijama nastaju stabilni kompleksi te dolazi do oksidativnog stresa zbog iscrpljivanja antioksidansa u biomolekulama i povećanog stvaranja ROS. Također, iznimno bitan mehanizam povezan s toksičnošću Hg je oštećenje mitohondrija zbog iscrpljivanja glutationa (GSH), antioksidansa koji se nalazi u svakoj stanici u tijelu, što dovodi do pojačanog stvaranja slobodnih radikala. Elementarna Hg, oblik koji se prije mogao osloboditi iz termometara uzrokuje drhtavicu, upalu zubnog mesa i razdražljivost nakon dužeg vremenskog perioda udisanja para. Manje je toksična od CH_3Hg i relativno se sporo apsorbira te može proći kroz probavni sustav, a da pri tome ne uzrokuje ozbiljnija oštećenja. Gutanje drugih uobičajnih oblika Hg, kao što je sol HgCl_2 , uzrokuje oštećenje gastrointestinalnog trakta i zatajenje bubrega.^[1,28]



Slika 2. Konceptualni biogeokemijski ciklus žive [28]

2.2.3. Olovo (Pb)

Olovo (Pb) je mekan i toksičan metal sivo-plave boje. Prisutan je u određenim insekticidima, ispušnim plinovima automobila i industrijskim emisijama. Njegova široka upotrebljivost temelji se na pogodnim svojstvima, kao što su visoka gustoća, nisko talište, mekoća, sposobnost blokiranja radijacije, otpornost na koroziju, mogućnost stvaranja legura i drugih kemijskih spojeva te jednostavnost recikliranja. Najčešće je vezan sa sumporom, cinkom, srebrom, bakrom i nešto rjeđe sa zlatom, a upravo ti metali stvaraju minerale poput pirita (FeS_2), sfalerita (ZnS), kvarca (SiO_2) i barita (BaSO_4). Usprkos pozitivnim svojstvima, Pb je značajan okolišni kontaminat zbog svoje toksičnosti, stabilnosti te sposobnosti skladištenja u biološkim tkivima.^[1,28]

Postoje brojni izvori putem kojih Pb dopire u okoliš. Industrijska emisija, izgaranje fosilnih goriva, emisija iz automobila, industrijske otpadne vode te mulj komunalnih otpadnih voda spadaju među značajnije izvore odgovorne za prisutnost Pb u ekosustavima. Taljenje i rafiniranje Pb dovodi do razvoja para koje zatim odlaze u atmosferu. Prilikom ovih procesa Pb se primarno nalazi u oblicima olovog(II)sulfata (PbSO_4), olovog(II)oksida (PbO) i olovog (II) sulfida (PbS). Uslijed razvoja suvremenih regulacijskih uređaja sa izuzetno visokom učinkovitosti, emisije u atmosferu su se uvelike ograničile. U procesu izgaranja fosilnih goriva,

najveća koncentracija Pb prisutna je u pepelu i iznosi oko 200 mg/kg. U kućanstvima, izgaranjem ugljena većina pepela ostane u rešetki dimnjaka, dok se u komercijalnom izgaranju, npr. u elektrani, većina pepela prenosi kao leteći pepeo čija količina ovisi o korištenim kontrolnim uređajima. Sirova nafta sadrži oko 0,001 – 2,0 mg/kg Pb, a njezinim se frakcioniranjem Pb koncentrira u ostacima teških loživih ulja. Olovo iz ispušnih plinova automobila postoji u obliku anorganskih čestica, sastavljenih od halogenida, kao što su olovov bromoklorid (PbClBr) ili amonijevog klorida i olovovog bromoklorida ($\text{NH}_4\text{Cl} \cdot 2 \text{PbCl} \cdot \text{Br}$ ili $2 \text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{PbCl} \cdot \text{Br}$) ili miješanog oksida ($\text{PbO} \cdot \text{PbCl} \cdot \text{Br} \cdot \text{H}_2\text{O}$) i sulfata ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{PbSO}_4$ koji predstavlja intermedijar u nastajanju PbSO_4 . Olovo se dodaje u benzin kao aditiv u obliku tetrametilolova, tetraetilolova te kao miješani alkilni trietilmetilolovo, dietildimetilolovo i etiltrimetilolovo. Čak 75% Pb u benzinu koje vozilo koristi ispušta se iz ispušnih plinova. Koncentracija Pb u ispušnim plinovima vozila kreće se 2000 – 10 000 mg/m³. Znanstvenici su otkrili povezanost količine emitiranog Pb s brzinom vozila te su došli do zaključka da se porastom brzine vozila povećava i sama emisija Pb u atmosferu. Industrijske otpadne vode ispuštaju značajnu količinu Pb u vodeni sustav, posebice talionica cinka i Pb te industrija pamuka i boja. Obrada vode prije same distribucije u opskrbu pitke vode podrazumijeva smanjenje količine Pb te je njegov glavni izvor olovne cijevi te lemljenje u distribucijskom sustavu. Pročišćena voda može općenito sadržavati manje od 10 µg/L Pb prije same distribucije. Mulj izdvojen iz otpadnih komunalnih voda sadrži velike količine Pb. Značajne količine Pb, ugrađenog u mulj, mogu se prenijeti u različite vodotoke i u tlo u kojem je relativno nepomičan. Pomoću postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda moguće je pročistiti industrijske i kućne otpadne vode koje su u određenoj mjeri onečišćene Pb te se time smanjuje prisutna količina olova na prihvatljivu razinu jer se ne može u potpunosti ukloniti.^[28]

Olovo je široko rasprostranjen ksenobiotik i izrazito je opasan za ljude. U ljudski organizam najčešće dopijeva kroz usta, gutanjem i udisanjem dima i prašine u atmosferi. Ima sposobnost prekidanja aktivacije enzima, inhibiranja apsorpcije minerala u tragovima, zaustavljanja strukturne sinteze proteina vezanjem na sulfhidril protein te smanjivanja razine i dostupnosti rezervi sulfhidril antioksidansa u tijelu. Postoje dva mehanizma kojima Pb stvara oštećenja. Prvi je izravno stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kao što su O_2 , H_2O_2 i hidroperoksidi, dok se drugim mehanizmom postiže smanjenje antioksidansa u stanicama. Prisutnost Pb u ljudskoj krvi rezultat je inhibicije enzima delta aminolevulinske kiseline dehidrataze (ALAD) i glutation reduktaze (GR). Glutation reduktaza služi za obnovu oksidiranog glutationa (GSSG) u reducirani glutation (GSH) te u reakciji GR i Pb dolazi do

smanjenja GSH. S druge strane, učinak Pb na ALAD je takav da povećava delta-ALAD za koji je utvrđeno da pospješuje stvaranje ROS. Izloženost Pb može dovesti i do stvaranja reaktivnih vrsta dušika (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) koje su najčešće povezane s hipertenzijom. Također, Pb^{2+} ioni pri niskoj koncentraciji inhibiraju obje fosforibozil transferaze u eritrocitima što dovodi do hemolize odnosno raspadanja eritrocita. Znanstvenim istraživanjima je otkriveno da Pb mijenja ekspresiju gena zamjenom elemenata poput cinka u proteinima pa je samim time smanjeno vezanje istih na DNA.^[1]

2.2.4. Arsen (As)

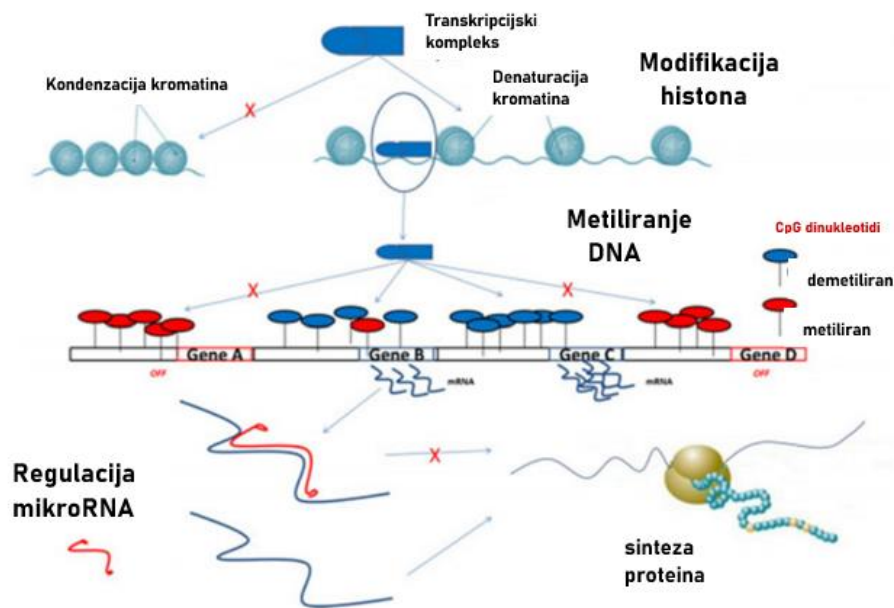
Arsen (As) je polumetal koji se u okolišu nalazi u anorganskom i organskom obliku s prosječnom koncentracijom od 1,8 mg/kg. Može biti zastupljen u različitim valentnim stanjima od 0, -3, +3 do +5. U prirodi je prisutan u više od 200 različitih mineralnih oblika, od kojih su 60% arsenati, 20% sulfidi i sulfati, a preostalih 20% su arsenidi, oksidi i silikati. Najčešći minerali bogati As su realgar tzv. crveni arsenov blistavac (As_2S_2), orpiment tzv. žuta arsenska mješavina (As_2S_3), arsenopirit ($FeSAs$) i enargit (Cu_3AsS_4).

Među najznačajnije antropogene izvore dospijeća As u okoliš spadaju poljoprivredne aktivnosti, rudarenje te izgaranje fosilnih goriva, a pod prirodne izvore vulkanske i geotermalne aktivnosti te geološke formacije. Izvori As u poljoprivrednim aktivnostima uglavnom podrazumijevaju korištenje pesticida i kemijskih gnojiva. Od pesticida se najčešće koriste insekticidi i herbicidi koji sadrže As te njihovom uporabom ostaci As u tlu mogu biti i do 2 g/kg. Izgaranjem fosilnih goriva, posebice ugljena s visokim sadržajem As, dovodi do porasta As u zraku u obliku prašine koncentracije 20 – 760 g/m³. Njegovo vremensko zadržavanje u zraku traje oko 7 – 10 dana, te se pomoću padalina taloži u tlo. Tijekom rudarenja As prisutan u mineralima oslobađa se i akumulira u okolnim podzemnim vodama s prosječnom koncentracijom od 5 µg/L do 72 mg/L. Arsen je, kako je već prije spomenuto, povezan s drugim metalnim mineralima poput bakra, nikla, olova i cinka. Kada dođe do trošenja i ispiranja minerala, minerali željezovog i manganovog oksida u sedimentima vodonosnika postaju glavni nositelji As što dovodi do prisutnosti As u podzemnim vodama u obliku anorganskog As(III) (arsenit) ili As(V) (arsenat). Podzemna voda bogata As smatra se kada njegova koncentracija premaši 10 µg/L. Nakon iskopa ili taljenja minerala, As će se u velikoj količini ispustiti u okoliš, a godišnja procjena ispuštanja je 62 000 t. Od prirodnih izvora erozija stijena i minerala su

glavni izvori As u vodi i tlu. Naime, tijekom raznih mehaničkih i kemijskih procesa As se oslobađa iz minerala prisutnih u stijenama te se akumulira u tlo i vodu. Koncentracija As u magmatskim stijenama je relativno niska i iznosi oko 1,5 mg/kg, dok je u vulkanskim staklima nešto veća oko 5,9 mg/kg. Unatoč niskim koncentracijama As, vulkanske stijene, posebno pepeo, često su povezani s prisutnošću As u vodama. Metamorfne stijene sadrže As do 5 mg/kg, a pelitske stijene (škriljavci, filiti) oko 18 mg/kg. Sedimentne stijene pak sadrže As u rasponu 5 – 10 mg/kg, gdje pijesci i pješčanici sadrže najniže koncentracije (oko 4 mg/kg), dok naslage gline najviše koncentracije (oko 13 mg/kg). Također, morske naslage gline sadrže veće koncentracije As od ne-morskih zbog drugačije raspodjele veličine zrna. Naime, veći udio finog materijala prisutan je u pelagičkim sedimentima na moru koji ujedno sadrže i više sumpora i pirita s kojima As može ući u interakciju.^[39,40,41]

Toksičnost As povezana je s njegovim metabolizmom, a sami mehanizam djelovanja ovisi o prisutnoj vrsti As. Tako As(V) zamjenjuje fosfate u vitalnim biokemijskim reakcijama i u anionskoj izmjeni u eritrocitima, dok As(III) inhibira piruvat dehidrogenazu što dovodi do smanjene pretvorbe piruvata u acetil koenzim A (acetyl CoA) vezanjem na sulfhidril. Također, inhibira i unos glukoze u stanice, oksidaciju masnih kiselina te glukoneogenezu. As(III) reagira s molekulama koje sadrže tiolne skupine, npr. glutation (GSH) i cistein, te njegov afinitet raste s porastom broja tiolnih skupina. Vežanjem As(III) na tiolne skupine dolazi do inhibicije vitalnih biokemijskih reakcija koje dovode do toksičnosti. Prisutnost As stvara razne reaktivne spojeve kao što su H₂O₂, OH radikal, reaktivne dušikove vrste i peroksilni radikali. Postoje različiti načini djelovanja reaktivnih vrsta kao što su inhibicija popravka DNA, genotoksičnost, stanična proliferacija i prijenos signala. Mehanizmi koji se trenutačno predlažu za karcinome koji su nastali kao posljedica izlaganja As uključuju epigenetske promjene i inducirane genetske promjene. Epigenetika podrazumijeva povratnu regulaciju ekspresije gena koja je neovisna o sekvenci DNA. Pod epigenetske promjene spada modifikacija histona, metiliranje DNA i regulacija mikroRNA. Histoni su alkalni proteini koji pakiraju i uređuju DNA u strukturne jedinice te se njihovom modifikacijom stvara mehanizam za regulaciju procesa povezanih s bolešću. Metiliranje DNA zasniva se na vežanju metilne skupine na citozin ili na adenin. Ovako metilirana DNA sprječava izgradnju gena za transkripcijske proteine, a može biti vezana i metilCpG veznim proteinima (MBD) čiji gubitak utišava transkripciju hipermetiliranih gena kod raka. Nekodirajuća RNA je molekula funkcionalne RNA koja nije prevedena u protein. Njihova neravnoteža ili mutacija može uzrokovati bolesti poput raka, autizma, Alzheimerove

bolesti i hipoplazije. Epigenetske promjene, prikazane na *slici 3.*, daju ranjivost genoma na pojavu raka kao rezultat izloženosti As.^[1]



Slika 3. Prikaz epigenetskog mehanizma As^[1]

2.3. Postupci pripreme uzoraka i izazovi pri mjerenju ICP-MS tehnikom

Postupak pripreme uzorka pripada u jedan od najvažnijih koraka u svim analitičkim metodama te ima ključnu ulogu u dobivanju točnih i pouzdanih rezultata. Glavni cilj pripreme je transformacija uzorka, koji može biti u čvrstom, tekućem ili plinovitom stanju, u oblik pogodan za mjerenje analitičkim instrumentom. Najveće poteškoće pri mjerenju krutih uzoraka ICP-MS tehnikom predstavlja njihovo prevođenje u topljivi oblik te moguće različite interferencije između specija.^[42]

Priprema uzoraka **vode** za mjerenje ICP-MS tehnikom ne zahtijeva složenije postupke. Najčešće se koriste filteri koji na temelju veličina pora zadržavaju krute i koloidne čestice prisutne u uzorku. K. Schöne i sur. (2017) koristili su 3 Minisart® filtera različitih veličina pora koji su bili međusobno povezani. Ovi filteri sadrže mikroporoznu filtersku membranu koja može biti napravljena od polietersulfona (PES), celuloznog acetata (CA) i regenerirane celuloze (RC). Uobičajeni međunarodni standard za veličinu pora je 0,45 µm te su u ovom radu korišteni uz PES i CA s porama od 0,45 µm i RC filterski materijal s porama veličine 0,2 µm. Volumen uzorka vode koji se filtrirao po jedinici Minisart® RC (0.2 µm) je 2,4 mL, a dobiveni eluat za

ova 3 međusobno povezana filtera iznosio je 4 mL. Za preostala dva filtera, Minisart® PES (0.45 µm) i Minisart® CA (0.45 µm), volumeni uzoraka vode po jedinici filtera iznosili su 3,1 mL, a dobiveni volumen eluata iznosio je 7 mL. Svaki eluat je prije analize na Agilent ICP-MS 7500 uređaju zakiseljen dušičnom i klorovodičnom kiselinom kako bi se postigla potpuna mineralizacija.^[43] G. Xing i sur. (2019) koristili su kolonu punjenu NOBIAS smolom čiju bazu predstavljaju hidrofilne metakrilatne polimerne kuglice i funkcionalne skupine etilendiamintriocetene i iminodioctene kiseline. Hidrofilni karakter polimera poboljšava učinkovitost i adsorpcije i eluacije metala. Spomenute funkcionalne skupine imaju sposobnost stvaranja kelata s mnogim prijelaznim metalima u blago kiselom mediju. Prije samog unošenja uzorka u kolonu potrebno je istu kondicionirati kako bi se očistila od svih mogućih nečistoća i tragova metala. Kolona je prvo isprana acetonom za uklanjanje svih organskih nečistoća, a onda s 1M HNO₃ za ispiranje svih tragova metalnih iona. Zatim, s deioniziranom vodom je ispran ostatak HNO₃ te je na kraju kolona isprana s puferom octene kiseline i amonijevog acetata čiji je pH 6 kako bi se i pH kolone podesio u blizini 6. Nakon kondicioniranja uzorak, kojem je pH podešen oko 6 acetatnim puferom, propušten je kroz kolonu. Nakon propuštanja uzorka, kolona je isprana s deioniziranom vodom (3x5 mL) kako bi se uklonili alkalijski i zemnoalkalijski metali, koji ne tvore stabilan kompleks s NOBIAS smolom, te tragovi pufera octene kiseline i amonijevog acetata. Zatim su metali u tragovima eluirani s 3M HNO₃ (3 mL) i analizirani pomoću ICP-MS i HPLC. Korištena kolona pokazala je izvrsnu selektivnost za metale u tragovima iz flaširane vode i vode iz slavine. Analitički povrat metala bio je 100 ± 3%, *RSD* < 5% te je više od 99% alkalijskih i zemnoalkalijskih metala bilo ukloljeno iz kolone.^[44]

Sama priprema **tla** za analizu ICP-MS tehnikom je nešto složenija zbog veće heterogenosti uzorka. F. Pan i sur. (2020) provodili su različite načine pripreme uzoraka tla i analizirali ih ICP-MS, ICP-AES i AAS. Provedenim mjerenjima odredili su koja je metoda najprikladnija za pojedini metal. Metali koje su analizirali su bakar, cink, olovo i krom. Uzorci su osušeni i samljeveni kako bi se profilirali prvo kroz sito od 2 mm, zatim 1 mm i na kraju kroz 0,25 mm. Uspoređivane su 3 metode zagrijavanja i 7 kombinacija kisele digestije. Metode zagrijavanja uključuju električnu grijaču ploču, vodenu kupelj i mikrovalnu pećnicu, dok sustavi razgradnje uključuju HNO₃/HF, HNO₃, HNO₃/HF/H₂O₂, HNO₃/HF/HCl, HNO₃/HF/HClO₄, HNO₃/HCl/HClO₄ i HNO₃/HF/HCl/HClO₄. Provedenim mjerenjem dobiveni su prihvatljivi rezultati u odnosu na mjerenja standardnih uzoraka te se smatra kako su korišteni postupci digestije pogodni za pripremu uzoraka tla.^[8] Y.J.A.Bezerra da Silva i sur. (2013) usporedili su 3 metode digestije uzoraka USEPA 3050B, USEPA 3051A i USEPA 3052.

Uzorci iz 10 vrsta tla analizirani su na bakar, cink, kadmij, olovo, nikal i živu. USEPA 3050B metoda provodi se na način da se usitnjeni uzorci tla (0,5 g) stave u teflonske posude, te se doda 10 mL 50 % HNO₃. Otopine su zagrijavane na vrućoj ploči na 95 °C ± 5 dopuštajući im da ispare (bez vrenja) tijekom 2 sata. Zatim je u čaše dodano 2 mL ultračiste vode i 3 mL vodikovog peroksida (30 % H₂O₂) te su otopine ponovno zagrijavane dok se ne smanji pjenušavost. Dodavano je 1 mL 30% H₂O₂ dok pjenušavost nije postala minimalna. Nakon toga je ponovljen postupak zagrijavanja, čime su otopine isparile (bez vrenja) također tijekom 2 h. Na kraju, 10 mL koncentrirane HCl dodano je otopinama, nakon čega je uslijedilo zagrijavanje vruće ploče (95 °C ± 5) 15 minuta. USEPA 3051A metoda provodi se tako da se usitnjeni uzorci (0,5 g) prebace u teflonske posude i doda 9 mL HNO₃ i 3 mL HCl. Držali su se u zatvorenom sustavu u mikrovalnoj pećnici 8 min 40 s dok se postigla temperatura od 175°C, a zatim se ista održavala dodatnih 4 min 30 s. USEPA 3052 metoda provodi se tako da se usitnjeni uzorci tla (0,5 g) stave u teflonske posude, u koje se doda 9 mL HNO₃ i 3 mL koncentrirane HF, visoke analitičke čistoće. Nakon toga, uzorci su podvrgnuti mikrovalnom zračenju 5,5 minuta da bi dosegli 180°C, postigavši maksimalni tlak od 16 atm, i 4,5 minuta razgradnje uz konstantnu temperaturu i tlak. Nakon digestije, svi su uzorci prebačeni u tikvice od 50 mL, nadopunjeni ultračistom vodom te filtrirani kroz filter papir. USEPA metoda 3052 pokazala je najbolju učinkovitost digestije među ocijenjenim metodama, ali zbog precjenjivanja koncentracija njeno se korištenje ne preporučuje u regulatorne svrhe. Rezultati su pokazali da je USEPA 3051A učinkovitija od USEPA 3050B metode jer osim što osigurava veći analitički povrat ispitivanih elemenata, zahtijeva kraće vrijeme digestije, manju potrošnju kiselina te smanjen rizik od gubitka elemenata.^[6]

Za uzorke **mulja komunalnih otpadnih voda** također je potrebna složenija priprema te se primjenjuju različite metode kisele digestije. A. Turek i sur. (2019) proveli su analize mulja komunalnih otpadnih voda za čiju su pripremu koristili 3 vrste digestija. Prva metoda tzv. metoda A je kisela digestija u mikrovalnoj pećnici. Izvagano je 0,5 g uzorka osušenog na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Digestiran je sa 6 mL koncentrirane HNO₃ i 2 mL koncentrirane HCl u zatvorenim posudama od politetrafluoroetilena (PTFE) u mikrovalnoj pećnici. Prvih 5 minuta digestije tlak je bio 17 - 20 atm, a snaga na 60 %, sljedećih 10 minuta tlak je bio 24 - 27 atm i snaga se povećala na 80 % te u zadnjem koraku od 10 minuta tlak je bio 27 - 30 atm i snaga na 100 %. Nakon digestije otopina s čvrstom fazom je stavljena u odmjernu tikvicu od 100 mL, napunjena do oznake deioniziranom vodom i filtrirana kroz filter papir (veličina pora 8 μm) u polietilensku posudu. Metoda B se od metode A razlikuje samo u

početnom koraku gdje se uzorak mulja prije digestije pržio na temperaturi od 600 °C. Ostali koraci digestije bili su isti kao i u metodi A. Metoda C je također kisela digestija koja se provodila u otvorenom sustavu. Mulj je osušen do konstantne mase na 105 °C. Zatim je 1 g mulja digestiran korištenjem kombinacije 12 mL HNO₃ i 4 mL HCl. Uzorci su zagrijavani 2 h u poklopljenim čašama na vrućoj ploči. Sve otopine s neotopljenim zaostalim čvrstim fazama prebačene su u odmjerne tikvice od 100 mL i napunjene do oznake deioniziranom vodom. Nakon toga je uslijedila filtracija otopina kroz filter papir (veličina pora 8 mm) u polietilensku posudu. Kako bi se smanjili učinci matrice na određivanje kroma, uzorci su nakon digestije razrijeđeni s 1% otopinom latantanijeva(III)klorida, LaCl₃, u omjeru 4:1. Provedbom analize utvrđeno je da ne postoji opća metoda za uništavanje matrice uzorka. Učinkovita metoda digestije je obrada prženog mulja smjesom HNO₃ i HCl pod visokim tlakom (metoda B) koja omogućuje ekstrakciju najvećih količina elemenata uz dobar analitički povrat.^[12]

Uzorke **sedimenta** također je potrebno na što učinkovitiji način pripremiti za daljnju analizu. V. Sandroni i sur. (2002) provodili su mikrovalnu digestiju mulja komunalnih otpadnih voda, tla i sedimenta. Za digestiju uzorka riječnog sedimenta koristili su kiselu digestiju u mikrovalnoj pećnici. Koristili su 65% HNO₃, 30% HCl i 40% HF. S razlogom su odabrane baš ove kiseline i njihove kombinacije. Biološki materijal se uništava oksidirajućim svojstvom HNO₃, dok HF djeluje protiv mineralnih aluminosilikatnih matrica. HCl je jaka kiselina i koristi se za razgradnju organskih komponenti u kombinaciji s HNO₃. Korištene kombinacije kiselina su sljedeće:

1. 6 mL 65% HNO₃
2. 10 mL 65% HNO₃
3. 3 mL 65% HNO₃ + 2 mL 40% HF
4. 3 mL 65% HNO₃ + 2 mL 40% HF + 1 mL 30% HCl

Mikrovalna digestija provodila se, po tzv. programu B, u 3 koraka pri konstantnoj temperaturi od 175 °C tako da je prvih 6 minuta snaga bila 400 W, zatim sljedećih 15 minuta 1000 W i zadnjih 15 minuta 0 W. Pri ovim uvjetima postignula se kompletna digestija riječnog sedimenta te su se ispitivale prethodno spomenute kombinacije kiselina. Kao najučinkovitija metoda za digestiju morskog sedimenta pokazala se kombinacija dušične i fluorovodične kiseline (3.) jer su tada dobivene najveće vrijednosti analitičkog povrata.^[15] J. A. Nóbrega i sur. (2005) provodili su bazičnu digestiju uzoraka sedimenta. Digestija uzorka provela se korištenjem

0,28 M Na₂CO₃ i 0,5 M otopine NaOH. Uzorak je zagrijavan na 90 - 95 °C tijekom 60 minuta kako bi se otopio Cr(VI) i stabilizirao protiv redukcije u Cr(III).^[14]

Izazovi koji se javljaju pri samom mjerenju ICP-MS tehnikom su razne vrste interferencija kao što su izobarne interferencije elemenata, interferencije izobarnih poliatomskih iona, fizičke interferencije, memorijske interferencije te osjetljivost na količinu elemenata. **Izobarne interferencije elemenata** uzrokovane su izotopima različitih elemenata koji tvore jednostruko ili dvostruko nabijene ione istog nominalnog omjera mase i naboja i ne mogu se razlučiti spektrometrom mase. Tako na primjer, ⁹⁸Mo (rutenij) i ⁸²Se (kripton) imaju izobarne elementarne interferencije. Ako dođe do izobarne interferencije, svi se podaci moraju ispraviti mjerenjem signala drugog izotopa interferirajućeg elementa i oduzimanjem odgovarajućeg omjera signala od izotopa od interesa. **Interferencije izobarnih poliatomskih iona** nastaju kada ioni sastavljeni više od jednog atoma imaju isti nominalni omjer mase i naboja kao izotop od interesa i koji se ne mogu razlučiti masenim spektrometrom koji se koristi. Ti se ioni obično stvaraju u plazmi iz pomoćnih plinova i komponenata uzorka. Takve se interferencije moraju prepoznati, a kada se ne mogu izbjeći odabirom alternativnih analitičkih izotopa, moraju se izvršiti odgovarajuće korekcije podataka. Jednadžbe za ispravak podataka trebale bi se uspostaviti u vrijeme analitičkog rada jer će interferencije poliatomskih iona značajno ovisiti o matrici uzorka i odabranim uvjetima instrumenta. **Fizičke interferencije** povezane su s fizičkim procesima koji upravljaju prijenosom uzorka u plazmu, procesima pretvorbe uzorka u plazmi i prijenosom iona kroz sučelje plazma - maseni spektrometar. Ove interferencije mogu rezultirati razlikama između odgovora instrumenta za uzorak i kalibracijske standarde. Fizičke interferencije mogu se pojaviti u prijenosu otopine do nebulizatora (npr. učinci viskoznosti), na mjestu stvaranja aerosola i transporta do plazme (npr. površinska napetost) ili tijekom procesa pobude i ionizacije unutar same plazme. Visoke razine otopljenih krutih tvari u uzorku mogu pridonijeti naslagama materijala na konusima smanjujući efektivni promjer otvora, a time i prijenos iona. Interna standardizacija može se učinkovito koristiti za kompenzaciju mnogih učinaka fizičkih interferencija te bi samim time interni standardi trebali imati što sličnije analitičko ponašanje kao elementi koji se određuju. **Memorijske interferencije** nastaju kada izotopi elemenata u prethodnom uzorku pridonose signalima izmjerenim u novom uzorku. Učinci ovih interferencija mogu proizaći iz taloženja uzorka na konusima i nakupljanja materijala uzorka u plazma plameniku i komori za raspršivanje. Mjesto na kojem se pojavljuju ovi učinci ovisi o elementu, a mogu se minimizirati ispiranjem sustava slijepom probom između uzoraka. Prije analize treba procijeniti potrebno

vrijeme ispiranja za određeni element. Ako se sumnja na memorijske interferencije, uzorak treba ponovno analizirati nakon dugog razdoblja ispiranja. Osjetljivost na količinu elemenata je svojstvo koje definira stupanj preklapanja pikova masa te ovisi o energiji iona i radnom tlaku. Interferencije preklapanja pikova mogu nastati kada se mali ionski pik mjeri uz veliki. Potencijal za ove interferencije treba prepoznati i razlučivost spektrometra masa prilagoditi kako bi se svele na najmanju moguću mjeru.^[45,46]

2.4. Masena spektrometrija povezana sa induktivno spregnutom plazmom

Masena spektrometrija povezana sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) analitička je tehnika koja se koristi za mjerenje elemenata u tragovima pri koncentracijama od ng/L do µg/L. Ovom se tehnikom mjeri prisutnost elemenata u uzorku, a ne molekula i spojeva koji se mogu mjeriti pomoću LC/MS i GC/MS. ICP-MS tehnika ima sposobnost multielementne detekcije u uzorku s jednostavnom ili složenom matricom što joj daje značajnu prednost pred drugim tehnikama. Uzorak mora biti u tekućem stanju i pH vrijednosti u kiselom području.^[47,48]

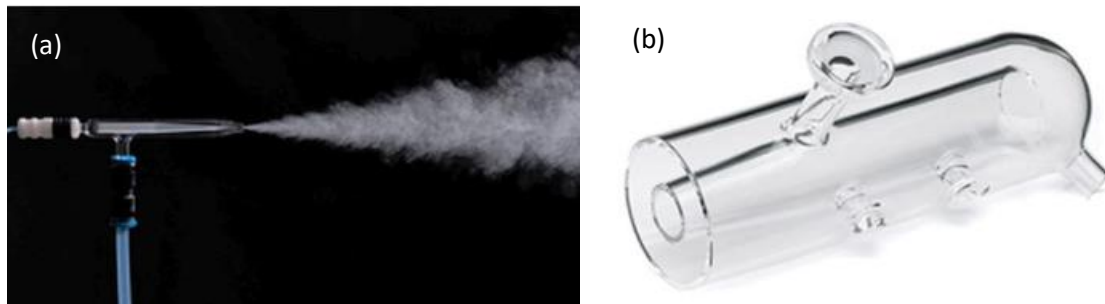
2.4.1. Glavni dijelovi ICP-MS instrumenta

ICP-MS koristi induciranu plazmu argona za ionizaciju uzorka te se nastali ioni direktno mjere spektrometrom masa. ICP-MS instrument se sastoji od sustava za injektiranje uzorka, plazme (ICP), sučelja za prijenos iona u vakuumski sustav, ionskih leća, kolizijsko/reaktivne ćelije (CRC), masenog spektrometra (MS), detektora i sustava za obradu podataka (*slika 4.*). Izvor iona je pod atmosferskim tlakom, dok su MS i detektor u vakuumskoj komori.



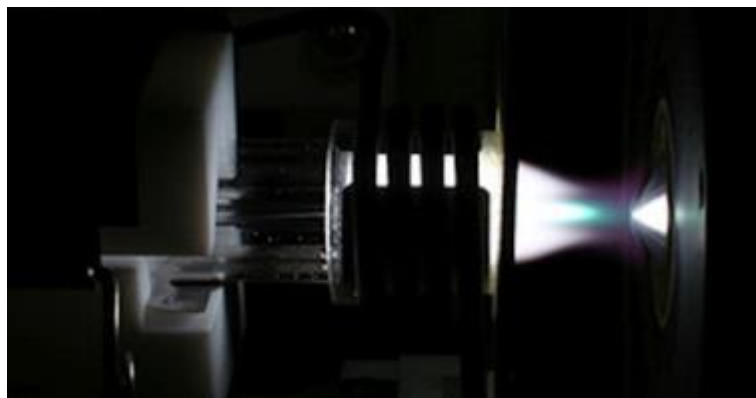
Slika 4. Shematski prikaz dijelova ICP-MS instrumenta^[49]

Otopina uzorka pumpa se u raspršivač (*slika 5. (a)*) gdje se pretvara u aerosolnu maglu pomoću mlaza argona. Veće kapljice zaostaju u komori za raspršivanje (*slika 5. (b)*), dok se one finije prenose do ICP plazme.



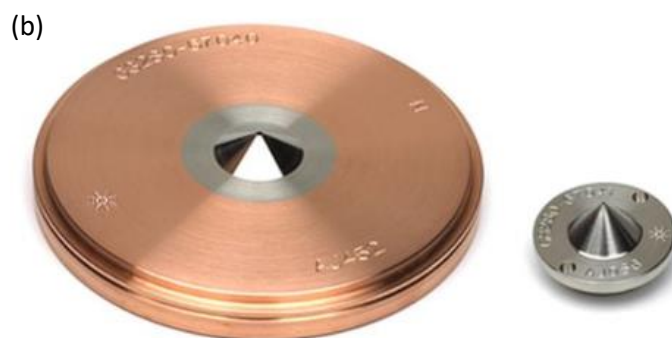
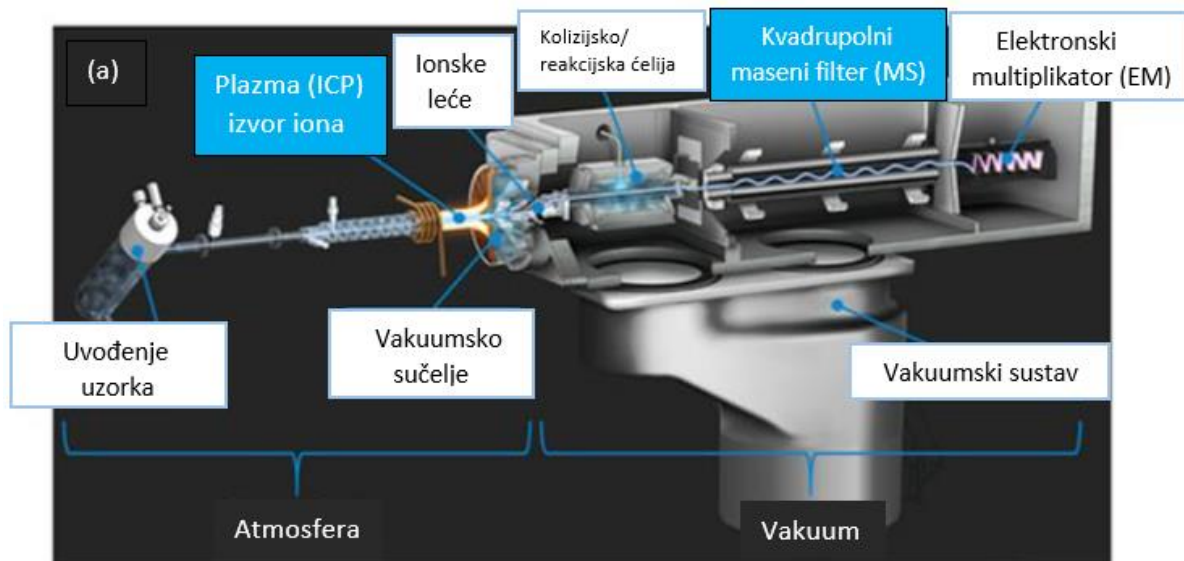
Slika 5. Prikaz raspršivača (a) i komore za raspršivanje (b)^[49]

ICP plazmu čini ionizirani plin argona koji teče kroz kvarcnu cijev (*slika 6.*). Radiofrekvencijski generator osigurava energiju koja se prenosi na protok argona induktivnim spajanjem preko zavojnice koja je omotana s vanjske strane kvarcne cijevi. Plazma se formira tako da radiofrekvencijsko polje uzrokuje oscilacije slobodnih elektrona u protoku plina te se oni sudaraju s atomima argona i ioniziraju ih, pri čemu se oslobodi još više slobodnih elektrona. Novi ioni i elektroni argona dalje osciliraju te dolazi do novih sudara i daljnje ionizacije što pogoduje distribuciji energije kroz struju argona. ICP doseže temperaturu od 10 000 °C zbog velike gustoće energije u ioniziranom plinu argona.^[49]



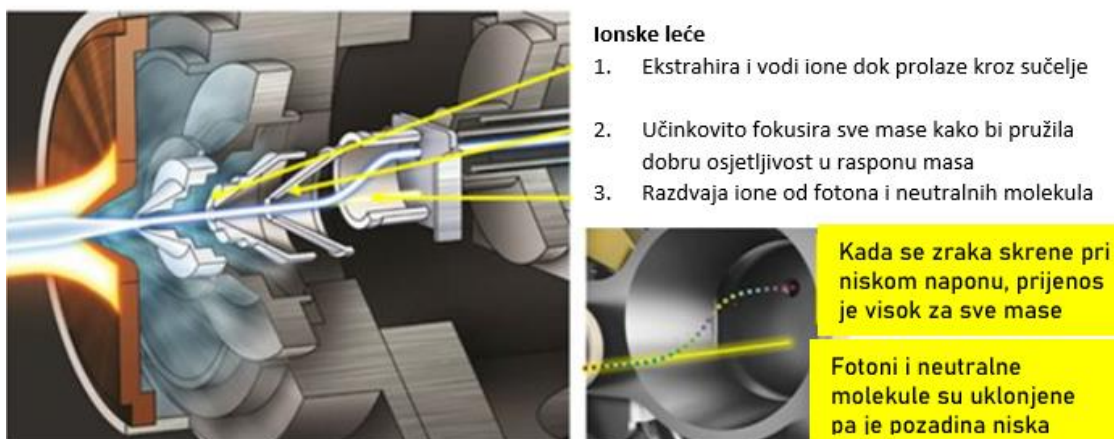
Slika 6. Prikaz ICP plazme ^[49]

Ključna uloga plazme je u razgradnji matrice uzorka, razdvajanju interferencija i ionizaciji atoma analita te cijela izvedba ICP-MS ovisi upravo o dizajnu plazme i uvjetima rada. Stoga, veća brzina protoka plina smanjuje vrijeme obrade kapljica aerosola te je visoka temperatura plazme kritični parametar u ovim procesima. S druge strane, niža brzina plina pogoduje duljem zadržavanju kapljica aerosola u najtoplijem dijelu plazme pa je razgradnja matrice bolja. Postoje različiti dizajni plamenika od kojih razlikujemo odvojivi plamenik s platinastom ili safirnom injektorskom cijevi za uzorke pripremljene u visoko korozivnim kiselinama i plamenici s uskim injektorom za analizu hlapljivih otopina. Također, od izuzetne je važnosti i sami odabir plina. Argon ima energiju ionizacije u odnosu na mnoge druge elemente iznad prve i ispod druge energije ionizacije što dovodi do stvaranja jednostruko nabijenih iona (M^+) i u jako malom postotku dvostruko nabijenih iona (M^{2+}). Visoki postotak ionizacije pogoduje postizanju visoke osjetljivosti i niskih granica detekcije. Vakuumsko sučelje prenosi ione iz plazme u maseni spektrometar (*slika 7. (a)*). Ono se sastoji od konusa s malim rupama koje omogućuju prolaz iona. Najčešći raspored konusa je takav da se prvo postavlja konus za izdvajanje iona iz plazme (*slika 7. (b)*-lijevo), zatim konus za izdvajanje iona iz središnjeg ionskog snopa (*slika 7. (b)*-desno). Manji konusni otvori pružaju optimalne vakuumske uvjete za rad kvadrupolnog masenog filtera i detektora, ali je takve konuse teže proizvesti i skloniji su začepljenju ako matrica uzorka nije u potpunosti disocirana u plazmi.^[49]



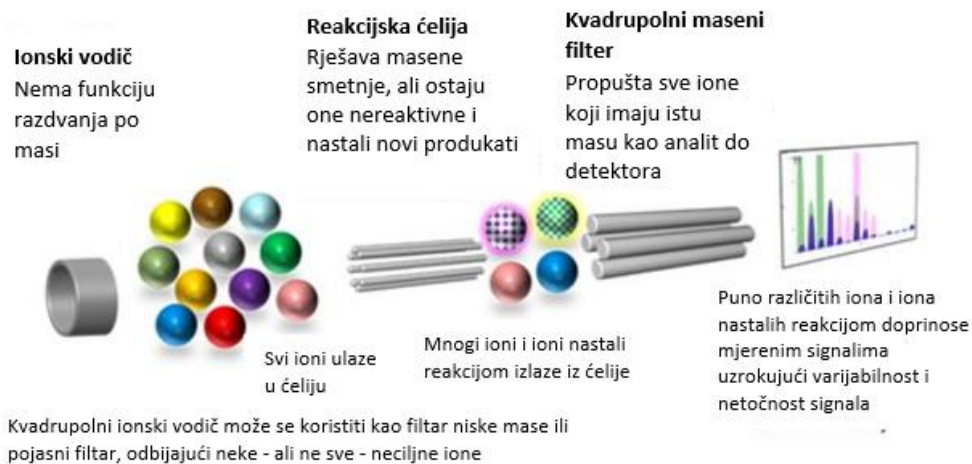
Slika 7. (a) Prikaz vakuumnog sučelja ICP-MS uređaja i (b) konus za izdvajanje iona iz plazme (lijevo) i konus za konus za izdvajanje iona iz središnjeg ionskog snopa (desno) ^[49]

Ioni, nakon što prođu konuse, fokusiraju se u uski snop pomoću ionske leće koja se sastoji od metalnih ploča s podesivim naponom. Tako ploča s pozitivnim naponom odbija pozitivno nabijene ione, a privlači negativno nabijene ione. Ionska leća također razdvaja ione i od neutralnih čestica i od fotona na način da se nastavljaju kretati u ravnoj liniji budući da nisu nabijeni s ciljem sprječavanja pozadinskog signala.^[49] Na **slici 8.** prikazan je položaj i rad same ionske leće.

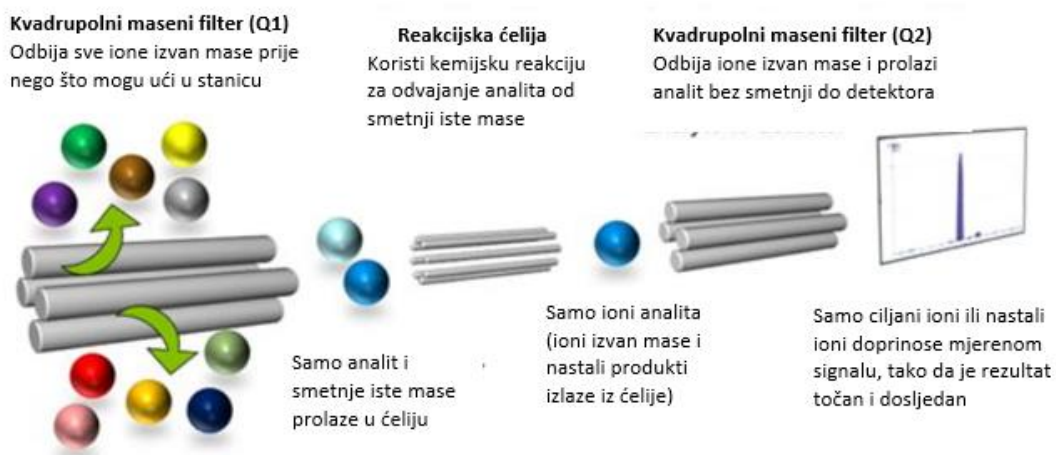


Slika 8. Prikaz položaja i rada ionske leće^[49]

Nakon ionske leće nalazi se kolizijsko/reakcijska ćelija (engl. *collision/reaction cell*, CRC) koja ima ulogu uklanjanja spektralnih preklapanja između iona analita i nastalih višeatomskih iona iste molekulske mase kao analit. CRC se sastoji od ionskog vodiča, oktopola ili kvadrupola, koji je smješten u zatvorenoj komori koja se može stlačiti plinom. Proces uklanjanja spektralnih smetnji može se podijeliti na mehanizam sudara i reakcije, a ovisi o plinu u ćeliji. U mehanizmu sudara, CRC je pod pritiskom nereaktivnog plina, najčešće helija (He), te se ioni sudaraju s atomima He i na taj način gube dio svoje kinetičke energije. Višeatomski ioni imaju veći ionski presjek od iona analita, pa se češće sudaraju s atomima He te samim time gube i više energije od iona analita. Proces kojim se odbijaju niskoenergijski ioni od ionske zrake pozitivnim prednaponskim korakom naziva se razlikovanje kinetičke energije (engl. *kinetic energy discrimination*, KED). Princip sudara zahtijeva da ioni ulaze u ćeliju s uskim rasponom energije, a ionski vodič mora minimizirati gubitke raspršenja kako bi se postigao učinkovit KED pri visokim tlakovima i stopama sudara. S druge strane, reakcijski mehanizam koristi reakcijski plin od kojih se najčešće koriste H₂, O₂, NH₃, CH₄, N₂O ili CH₃F. Odabir reakcijskog plina ovisi o razlici kemijske reakcije plina s interferirajućim ionom i ionom analita. Mehanizam reakcije je učinkovitiji od He KED mehanizma zbog toga što je za reakciju dovoljno tek 2-3 sudara, dok He KED zahtijeva višestruke sudare što podrazumijeva i viši tlak plina u ćeliji.^[48] Na *slikama 9. i 10.* prikazan je shematski reakcijski način rada s jednostrukom odnosno trostrukom kvadrupolnom ICP-MS konfiguracijom.^[49]

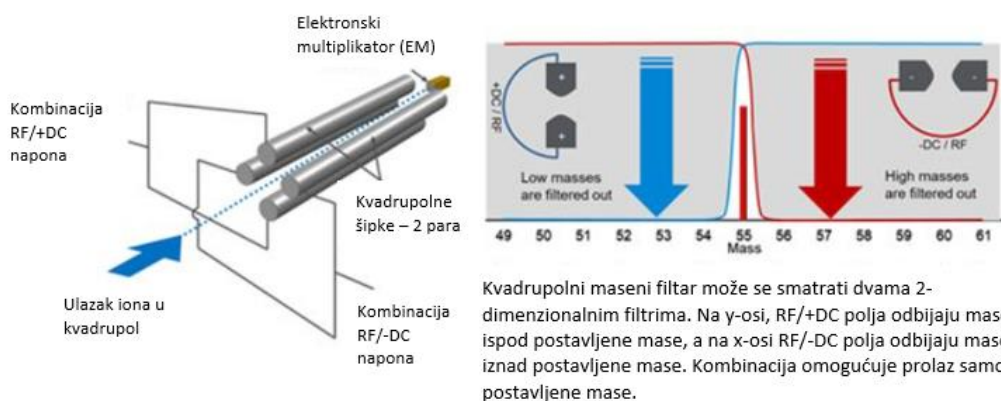


Slika 9. Reakcijski način rada s jednostrukom kvadrupolnom ICP-MS konfiguracijom^[49]



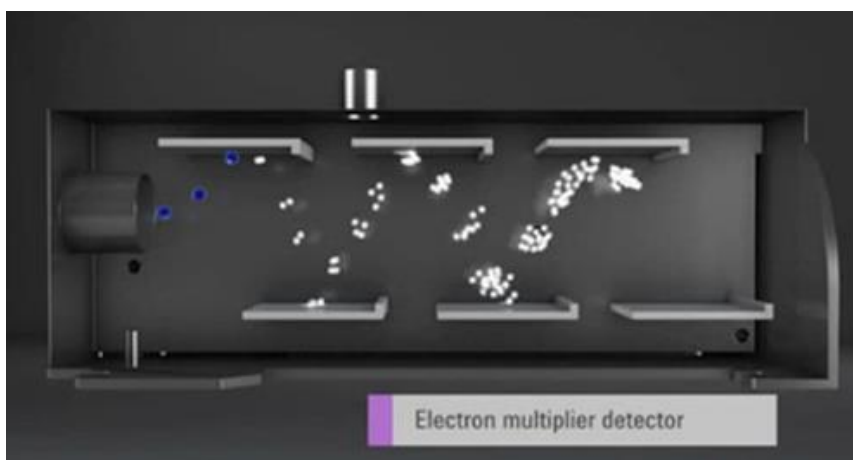
Slika 10. Reakcijski način rada s trostrukom kvadrupolnom ICP-MS konfiguracijom^[49]

Kvadrupolni maseni filter se sastoji od dva para elektroda povezanih na radiofrekvencijski i istosmjerni napon (*slika 11.*). Između šipki se stvara oscilirajuće električno polje koje onda određuje putanje iona različitih masa prema njihovom omjeru masa/naboj (m/z).



Slika 11. Shema kvadrupolnog masenog filtera koji se koristi u većini ICP-MS instrumenata ^[49]

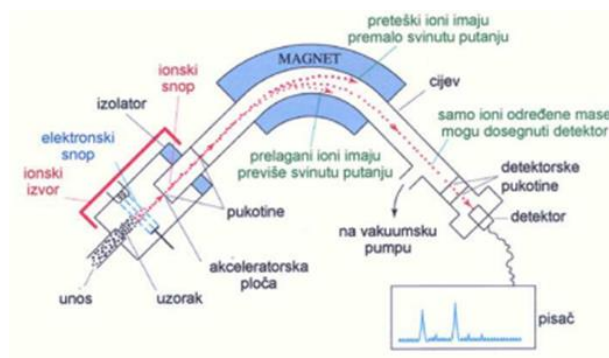
Nakon izlaza iz kvadrupolnog masenog filtera ioni udaraju u detektor ICP-MS instrumenta. U većini slučajeva je to diskretni dinodni elektronski multiplikator (engl. *discrete dynode electron multiplier*, DDEM) te kada ioni udare u visokonaponsku dinodu oslobađaju elektrone koji kaskadno pogađaju niz dinoda pri čemu stvaraju puls koji bilježi EM elektronika, što je shematski prikazano na *slici 12*. EM detektor ima sposobnost detekcije jako niskih koncentracija iona i ima jako široki dinamički raspon. Zatim, program za analizu podataka obrađuje brojeve zabilježene od detektora i izračunava koncentracije pojedinih elemenata uspoređujući ih s referentnim otopinama. ^[49]



Slika 12. Prikaz elektronskog multiplikatora (EM) koji pokazuje nakupljanje kaskade elektrona niz detektorske dinode za generiranje ionskog pulsa ^[49]

2.4.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika koja mjerenjem omjera mase i naboja iona (m/z) određuje njegovu molekulsku masu. Prvi korak je ionizacija uzorka te ioni ubrzani elektronskim poljem uzlaze u magnetsko polje gdje će onda ioni veće mase imati veći polumjer putanje, dok će oni manje mase imati manji. Tim karakterističnim putanjama samo određeni ioni padaju na detektor mase. Kao rezultat dobiva se maseni spektar koji prikazuje ovisnost intenziteta signala o vrijednostima m/z pojedinih iona. Navedeni koraci masene spektrometrije shematski su prikazani na *slici 13*. Masena spektrometrija ima široku primjenu te se tako koristi u forenzici, medicini, analizi okolišnih spojeva i mnogih drugih. Ovako veliku primjenu ove metode može se pripisati njezinoj visokoj osjetljivosti, točnosti, specifičnosti i brzini same analize.^[50]



Slika 13. Shematski prikaz rada masenog spektrometra^[51]

Masena spektrometrija može se povezati zajedno s plinskom kromatografijom (GC-MS) i induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS).

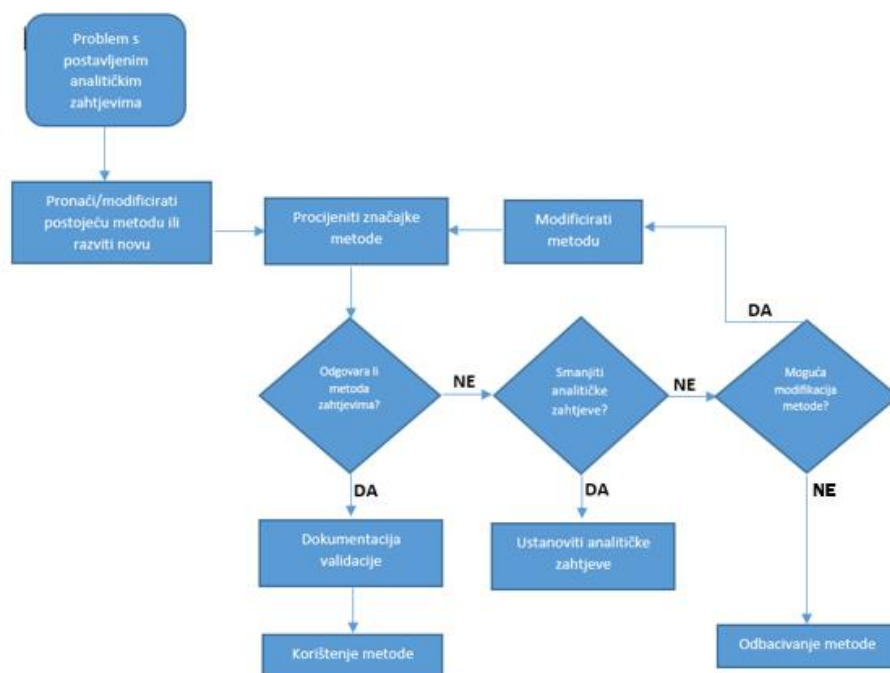
2.5. Validacija metode

Validacija metode je postupak provjere njezine učinkovitosti za predviđenu namjenu. To se prvo postiže razvojem same metode, a zatim ispitivanjem kroz niz izvedbenih značajki validacije (*slika 14*). Nije potrebno validirati sve metode, već samo one koje su nenormirane, novorazvijene u laboratoriju te prilikom korištenja normiranih metoda izvan radnog područja.

Metode koje su već prije normirane potrebno je verificirati odnosno potvrditi da određeni laboratorij ima sposobnost provesti metodu kroz nekoliko eksperimenata te koji potvrđuju ispravno funkcioniranje korištenih instrumenata. Postupak validacije potrebno je ponoviti tj. revalidirati kod:

- promjene proizvodnog postupka sirovine ili formulacije
- promjena analitičkih ili predanalitičkih parametara
- promjene antikoagulansa prilikom uzimanja uzorka
- prenošenja metode iz jednog u laboratorija u drugi
- promjene vrsta uzorka (npr. plazma umjesto urina)
- promjene instrumenta

Postoje dva pristupa validaciji, a to su **laboratorijski** (unutarnje vrednovanje) i **međulaboratorijski** (vanjsko vrednovanje). Odabir samog pristupa ovisi o širini primjene razvijene metode. Tako će se koristiti laboratorijski pristup za metodu koja je razvijena za užu primjenu odnosno samo za potrebe jednog laboratorija u kojem je i razvijena. S druge strane, međulaboratorijski pristup koristi se pri razvoju metode za široku primjenu. U ovom pristupu dva ili više laboratorija provode ispitivanja uzorka pri istim dogovorenim uvjetima. Ovakav pristup validaciji omogućuje i drugim laboratorijima da u budućnosti koriste određenu validiranu metodu čime se značajno smanjuje opseg posla.^[26,47,48]



Slika 14. Validacijski proces: od postavljenog analitičkog problema do odluke laboratorija može li se problemu pristupiti odabranom metodom ^[26]

2.5.1. Izvedbene karakteristike validacije

Ovisno o primjeni metode i je li ona kvalitativna ili kvantitativna, procjenjuju se određene izvedbene karakteristike validacije. Najčešće ispitivane karakteristike metode su: linearnost, osjetljivost, selektivnost/specifičnost, radno područje, robusnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, točnost te mjerna nesigurnost.

Linearnost (engl. *linearity*) analitičke metode govori o proporcionalnoj ovisnosti između odziva analize i koncentraciji analita u uzorku. Ovakva ovisnost može se prikazati jednadžbom pravca (1) u kojoj promjenom vrijednosti jedne varijable, dolazi do promjene vrijednosti druge varijable. Izražava se koeficijentom determinacije, R^2 , koji poprima vrijednosti $0 \leq R^2 \leq 1$.

$$y = ax + b \quad (1)$$

gdje je:

a – nagib pravca

b – odsječak pravca na y-osi

x – odječak pravca na x-osi

Za utvrđivanje linearne ovisnosti potrebno je provesti minimalno 5 mjerenja. Dobivene rezultate moguće je prikazati koeficijentom determinacije ili jednadžbom pravca te grafičkom ovisnosti odziva analize o koncentraciji analita.

Radno područje (engl. *working range*) definira se kao interval između najviše i najniže koncentracije analita u uzorku u kojem korištena metoda daje rezultate sa prihvatljivom nesigurnošću i točnošću. Donja granica je najčešće granica kvantifikacije, a gornja granica je koncentracija pri kojoj postoje odstupanja u osjetljivosti metode.

Osjetljivost (engl. *sensitivity*) je svojstvo uređaja ili metode da razlikuje male promjene u mjernoj veličini odnosno koncentraciji analita. Definira se kao nagib kalibracijskog pravca u točki blizu granice kvantifikacije te što je nagib pravca veći to je i osjetljivost metode veća. Naime, ova izvedbena karakteristika nema preveliko značenje pa se i ne koristi toliko često.

Selektivnost (engl. *selectivity*) je svojstvo metode da odredi željeni analit u uzorku uz interferenciju raznih drugih komponenti sa sličnim svojstvima. Prisutne interferencije imaju sposobnost pojačavanja ili smanjivanja signala analita što onda dovodi do pogrešnih rezultata. Vrlo je važno razlikovati pojam selektivnosti od specifičnosti (engl. *specificity*) metode. Naime, selektivna je ona metoda koja ima sposobnost određivanja više komponenata istovremeno dok

je specifična metoda ona kojom je moguće odrediti samo jedan specifičan analit. Pri samom određivanju selektivnosti/specifičnosti koriste se identifikacijski testovi i testovi onečišćenja.

Robusnost (engl. *ruggedness/robustness*) metode pokazuje razinu podložnosti analitičke metode na promjene uvjeta mjerenja. Poželjno je ukazati na sve moguće uvjete koji su promjenjivi, a koji bi potencijalno mogli utjecati na rezultate analize, a odabir istih ovisi o samoj metodi. Testira se na način da se promijene uvjeti analize određene metode te se prati njihov utjecaj na rezultate analize što omogućuje utvrđivanje varijabli koje imaju najznačajniji utjecaj te je iste potrebno striktno kontrolirati.

Granica detekcije (engl. *limit of detection, GD*) je najmanja koncentracija analita u uzorku koju je moguće detektirati, ali ne i kvantificirati. Postoje 3 načina na koja se može odrediti GD ovisno o tome je li metoda instrumentalna ili ne:

- 1) Računanje GD na temelju mjerenja slijepog uzorka – provodi se mjerenje najmanje 10 nezavisnih slijepih uzoraka te se iz dobivenih rezultata računa standardna devijacija i srednja vrijednost koncentracije analita ($\bar{x} = 0$ jer analit nije prisutan u slijepoj probi)

$$GD = \bar{x} + 3s \quad (2)$$

- 2) Metoda temeljena na omjeru signala i šuma (engl. *signal-to-noise, S/N*) – izmjereni signal uzorka s poznatom koncentracijom analita uspoređuje se sa signalom slijepe probe te se za određivanje minimalne koncentracije analita koristi vrijednost $S/N = 3:1$
- 3) Metoda temeljena na standardnoj devijaciji (σ) odziva i nagiba kalibracijskog pravca (a) – u ovom se slučaju standardna devijacija množi s 3,3 te dijeli s nagibom kalibracijskog pravca (jednadžba 3).

$$GD = \frac{3,3s}{a} \quad (3)$$

Standardnu devijaciju moguće je izračunati na 2 načina:

- 1) Analizom slijepe probe (6 – 10 mjerenja) i računanjem standardne devijacije odziva
- 2) Pomoću kalibracijskog pravca uzoraka koji sadrže analit u rasponu granice detekcije, pri čemu se računa standardna devijacija pravca ili odsječka na y-os, b .

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, GK) predstavlja najmanju koncentraciju analita u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti uz prihvatljivu preciznost i točnost. Također se može odrediti mjerenjem slijepe probe (jednadžba 4), metodom omjera S/N koji mora iznositi 10:1 i metodom standardne devijacije odziva i nagiba pravca prema formuli (5):

$$GK = \bar{x} + 10 s \quad (4)$$

$$GK = \frac{10 s}{a} \quad (5)$$

Točnost (engl. *accuracy*) izražava bliskost dobivenog rezultata (x_i) i prave odnosno referentne vrijednosti (T). Pojam referentna vrijednost odnosi se na referentnu vrijednost određenog standarda. Određuje se utvrđivanjem preciznosti i istinitosti.

Istinitost (engl. *trueness*) izražava slaganje srednje vrijednosti ponovljenih mjerenja (\bar{x}) i prave ili referentne vrijednosti (T), a razlika ovih mjerenja definira se kao mjerno odstupanje (engl. *bias*) uzrokovano sustavnom pogreškom. Može se odrediti pomoću rezultata analize referentnog uzorka, dobivenih primjenom standardne metode ili sintetičkog uzorka koji sadrži poznatu koncentraciju analita (metoda standardnog dodatka – analitički povrat). Analitički povrat (engl. *recovery*) govori o postotnom udjelu analita koji je izdvojen tijekom analitičkog postupka.

$$\text{analitički povrat (\%)} = \frac{\bar{x}}{T} * 100 \quad (6)$$

gdje je:

\bar{x} – srednja vrijednost ponovljenih mjerenja referentnog standarda poznate koncentracije analita

T – poznata koncentracija analita u referentnom standardu

Preciznost (engl. *precision*) je stupanj slaganja između rezultata nezavisnih mjerenja dobivenih iz istog homogenog uzorka pod unaprijed određenim uvjetima. Izuzetno je važno preciznost odrediti na homogenom uzorku, no u slučaju nemogućnosti pripreve

istog, mogu se koristiti umjetno pripremljeni. Preciznost se iskazuje kao standardna devijacija (jednadžba 7), relativna standardna devijacija (jednadžba 8) ili varijanca.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (7)$$

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (8)$$

gdje je:

n - broj ponovljenih mjerenja uzorka

x_i – vrijednost pojedinog mjerenja

\bar{x} – srednja vrijednost ponovljenih mjerenja uzorka

s – standardna devijacija provedenih mjerenja uzorka

Preciznost se može promatrati na tri razine: ponovljivost (engl. *repeatability*), međupreciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*) te je za svaku potrebno izračunati standardnu devijaciju, relativnu standardnu devijaciju i interval pouzdanosti.

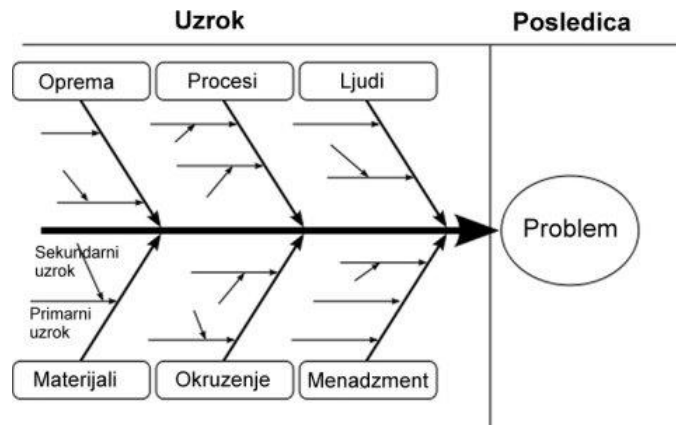
Ponovljivost se iskazuje rasipanjem rezultata tj. kao kratkoročna standardna devijacija koja nam zapravo govori koliko ponovljenih mjerenja možemo napraviti u određenom vremenu kako bismo postigli željenu razinu preciznosti. Uvjeti pri kojima se provodi su da isti analitičar, koristeći isti instrument u istom laboratoriju, dobije odgovarajuću bliskost rezultata ponovljenih uzastopnih mjerenja istom metodom istog uzorka.

Međupreciznost predstavlja dugoročnu standardnu devijaciju rezultata unutar laboratorija u nekom određenom vremenu kao posljedica promjene analitičara, opreme ili reagensa.

Obnovljivost je bliskost rezultata ponovljenih mjerenja istog analita pri promjenjenim uvjetima. Mogu se promijeniti sljedeći uvjeti kao što je analitičar, metoda, instrument, referentni uzorak te vrijeme određivanja.^[26]

Mjerna nesigurnost je brojčana vrijednost kvalitete mjernog rezultata koji prikazuje raspon vrijednosti unutar kojeg se s određenom vjerojatnošću nalazi prava vrijednost rezultata. Moguće nesigurnosti prilikom provođenja mjerenja su uzorkovanje, uvjeti čuvanja uzorka, utjecaj matrice i interferencija, uvjeti mjerenja, čistoća standarda, mjerenja mase i volumena, priprema uzorka te analitičar. Sastavnice mjerne nesigurnosti prikazuju se Ishikawinim

dijagramom (dijagram uzrok-činak, riblja kost – *slika 15*). Prilikom određivanja ukupne nesigurnosti potrebno je uzeti u obzir svaki izvor nesigurnosti te izračunati njegov doprinos. Mjerna nesigurnost iskazuje se standardnom devijacijom.^[52,53]



Slika 15. Shematski prikaz Ishikawinovog dijagrama^[54]

Prvo se određuje standardna mjerna nesigurnost za sve sastavnice, $u(x_i)$, koja predstavlja nesigurnost rezultata mjerenja x_i . Pomoću standardne mjerne nesigurnosti računa se sastavljena standardna mjerna nesigurnost, u_c , koja predstavlja mjernu nesigurnost rezultata y . Sastavljena standardna mjerna nesigurnost računa se prema matematičkom modelu koji je napisan u obliku funkcijske ovisnosti sljedećim izrazom:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (9)$$

gdje je y rezultat mjerenja, a x_1, x_2, \dots, x_n ulazne veličine. Postoje različiti matematički modeli po kojima se računa mjerni rezultat, a shodno tome i sastavljena standardna mjerna nesigurnost prema izrazima:

$$u(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (10)$$

$$u(y) = y * \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (11)$$

Proširena mjerna nesigurnost, U , definira interval unutar kojeg bi se s određenom razinom pouzdanosti trebala nalaziti prava vrijednost. Dobije se množenjem sastavljene mjerne nesigurnosti s obuhvatnim faktorom, k , čiji odabir ovisi o razini pouzdanosti raspona.^[55]

$$U = k * u_c(y) \quad (12)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom djelu opisan je postupak razvoja i validacije metode za određivanje teških metala ICP-MS tehnikom. Postupak validacije proveden je pomoću temeljnih standardnih otopina (TSO) metala (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn) kako bi se osigurala pouzdanost i točnost dobivenih rezultata. Validirana metoda je zatim primijenjena na realne uzorke vode sa ulaza i izlaza hidroelektrane s područja vapnenačkih stijena i na morski sediment iz područja srednjeg i južnog Jadrana.

3.1. Kemikalije i instrumentacija

Kemikalije:

- dušična kiselina, HNO_3 (65%, *p.a.*, T.T.O. d.o.o., Hrvatska)
- dušična kiselina, HNO_3 (65%, *ultra pur*, Carlo Erba, Njemačka)
- fluorovodična kiselina, HF (48%, *p.a.*, Fluka, Austrija)
- klorovodična kiselina, HCl (36,5%, *p.a.*, Fluka, Austrija)
- borna kiselina, H_3BO_3 (*p.a.*, Kemika, Hrvatska)
- destilirana deionizirana voda na TKA-GenPure instrumentu

Temeljne standardne otopine (TSO):

- jednoelementna standardna otopina **Ag**, $1000 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Al**, $1000 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **As**, $100.31 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Ba**, $998 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Cd**, $100.00 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Cr**, $1006 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)

- jednoelementna standardna otopina **Fe**, $100.00 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Hg**, $10.002 \pm 0.052 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **K**, $1000 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Mn**, $1009 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Na**, $1003 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Ni**, $1005 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **P**, $999 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Pb**, $101.01 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **S**, $1003 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Sb**, $998 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Se**, $100.00 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Si**, $99.96 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **V**, $1002 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- jednoelementna standardna otopina **Zn**, $1003 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- višelementna standardna otopina **IV-ICPMS-71A** (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn), $10 \mu\text{g/mL}$ (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- višelementna standardna otopina **IV-ICPMS-71B** (Ge, Hf, Mo, Nb, Sb, Si, Sn, Ta, Te, Ti, W), 10mg/mL (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)
- višelementna standardna otopina **IV-ICPMS-71C** (Au, Ir, Os, Pd, Pt, Re, Rh, Ru), 10mg/mL (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD)

Instrumenti:

- analitička vaga KERN PRJ (*slika 16.*)
- Hirschmann pipeta 500 – 5000 μL (*slika 17.* (lijevo))
- Hirschmann pipea 20 – 200 μL (*slika 17.*(desno))
- DLAB MicroPette Plus 100 – 1000 μL (*slika 18.*)
- Milestone ETHOS 1600 mikrovalna pećnica (*slika 19.*)
- Shimadzu ICPMS-2030LF (*slika 20.*)



Slika 16. Prikaz analitičke vage KERN PRJ



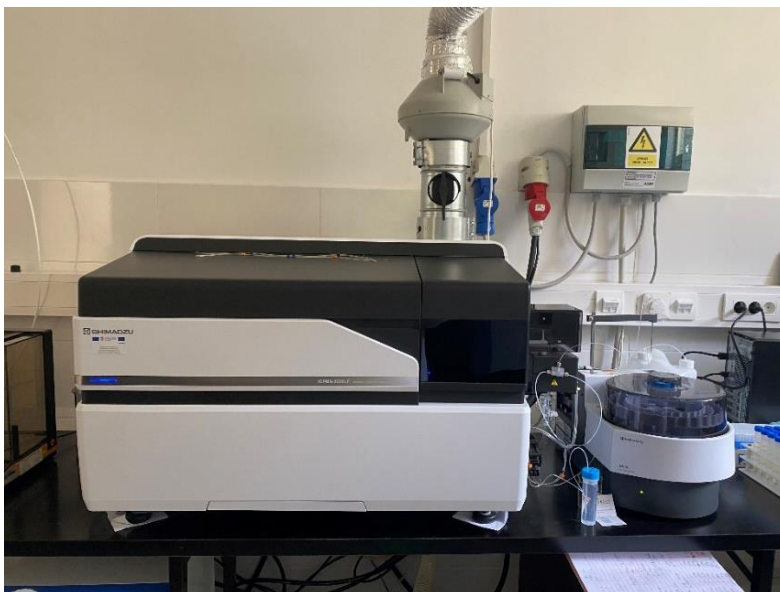
Slika 17. Prikaz Hirschmann pipete od 500 – 5000 μL (lijevo) i od 20 – 200 μL (desno)



Slika 18. Prikaz pipete DLAB MicroPette Plus 100 – 1000 µL



Slika 19. Prikaz Milestone ETHOS 1600 mikrovalne pečnice



Slika 20. Prikaz Shimadzu ICPMS-2030LF uređaja

3.2. Validacija metode

Postupak validacije proveden je pomoću TSO 19 metala (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn) od kojih su pripremljene standardne otopine (SO). Standardne otopine izmjerene su na Shimadzu ICPMS-2030LF uređaju. Parametri validacije koji su se ispitani za svaki metal su linearnost, radno područje, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK), točnost (preciznost i istinitost) i selektivnost.

3.2.1. Postupak pripreme standardnih otopina (SO)

Za pripremu standardnih otopina (SO) korištene su jednoelementne TSO 20 metala navedene u poglavlju 3.1. i 1 % HNO_3 . Pripremljena 1% HNO_3 dobivena je razrijeđenjem 10 mL *ultra pur* 65% HNO_3 s 1000 mL deionizirane H_2O . Svaka TSO prelivena je u plastične falkonice do volumena 10 mL. Zbog osjetljivosti mjerenja ICP-MS, potrebno je bilo razrijediti svaku TSO odnosno pripremiti niže koncentracije svakog pojedinog metala. U falkonicu od 50 mL otpipetirani su točno izračunati volumeni za svaku TSO (vidljivi u *tablici 1*. $V(\text{TSO})$) te preostali volumen do 50 mL nadopunjen je ranije pripremljenom 1% HNO_3 . Prilikom

dodavanja TSO i 1% HNO₃ masa je praćena na analitičkoj vagi radi preciznog određivanja koncentracija metala prisutnih u SO zbog odstupanja volumena prilikom pipetiranja. Na opisani način pripremljene su 3 standardne otopine SO1, SO2 i SO3. U *tablici 1.* prikazani su svi ispitivani metali, njihove maksimalne dopuštene koncentracije u vodi za piće (MDK), pripremljene koncentracije (određena γ), koncentracije TSO ($\gamma(\text{TSO})$), volumeni TSO ($V(\text{TSO})$) te mase TSO pojedinog metala, $m(\text{TSO})$. Maksimalne dopuštene koncentracije (MDK) preuzete su iz Pravilnika o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju. U *tablici 1.* narančastom i crvenom bojom označeni su Mn, Ni, Ag, Cr, Cd, Sb i V koje je bilo potrebno dodatno razrijediti, a zelenom bojom označena je 1 % HNO₃ koja se, kao što je prethodno navedeno, koristila za razrijeđivanje SO.

Tablica 1. Prikaz potrebnih podataka za izradu standardnih otopina

					SO1	SO2	SO3
metal	MDK (γ)	određena γ	$\gamma(\text{TSO})/\text{ppm}$	$V(\text{TSO})/\text{mL}$	$m(\text{TSO})/\text{g}$	$m(\text{TSO})/\text{g}$	$m(\text{TSO})/\text{g}$
Na	200 ppm	100 ppm	1003	4,99	4,900	4,954	4,944
K	12 ppm	100 ppm	1000	5,00	4,915	4,949	4,939
Si	50 ppm	10 ppm	99,96	5,00	4,937	4,948	4,935
S	250 ppm	100 ppm	1003	4,99	4,834	4,960	4,957
Zn	3000 ppb	10 ppm	1003	0,50	0,498	0,491	0,474
Ba	700 ppb	1 ppm	998	0,050	0,048	0,051	0,051
Al	200 ppb	1 ppm	1000	0,050	0,054	0,050	0,049
P	300 ppb	1 ppm	999	0,050	0,043	0,051	0,049
Fe	200 ppb	1 ppm	100	0,50	0,503	0,489	0,477
As	10 ppb	100 ppb	100.31	0,050	0,052	0,051	0,051
Mn	50 ppb	100 ppb	1009	0,0050	/	/	/
Ni	20 ppb	100 ppb	1005	0,0050	/	/	/
Pb	10 ppb	100 ppb	101,01	0,050	0,050	0,052	0,050
Se	10 ppb	100 ppb	100	0,050	0,051	0,052	0,051
Ag	10 ppb	100 ppb	1002	0,0050	/	/	/
Cr	50 ppb	100 ppb	1006	0,0050	/	/	/
Cd	5 ppb	10 ppb	100	0,0050	/	/	/
Sb	5 ppb	10 ppb	998	0,00050	/	/	/
V	5 ppb	10 ppb	1002	0,00050	/	/	/
Hg	1 ppb	10 ppb	10,002	0,050	0,044	0,051	0,053
1% HNO ₃	/	/	/	28,55	28,347	28,357	28,405

Metali Mn, Ni, Ag, Cr i Cd dodatno su razrijeđeni 10x (10 puta) te su zajedno pripremljeni u istoj falkonici od 15 mL. U falkonicu je dodano 1,00 mL TSO od Mn, Ni, Ag, Cr i Cd te je ista nadopunjena 1% HNO₃ do volumena 10 mL. Iz tako pripremljene otopine otpipetiran je alikvot od 0,050 mL i dodan u SO1, SO2 i SO3. U **tablici 2.** prikazan je volumen TSO metala, $V_1(\text{TSO})$, te masa istih, m , i volumen alikvota, V_1^* , koji se dodaje za izradu SO1, SO2 i SO3 te pripadajuće mase istog, m^* .

Tablica 2. Prikaz podataka za izradu standardnih otopina Mn, Ni, Ag, Cr i Cd

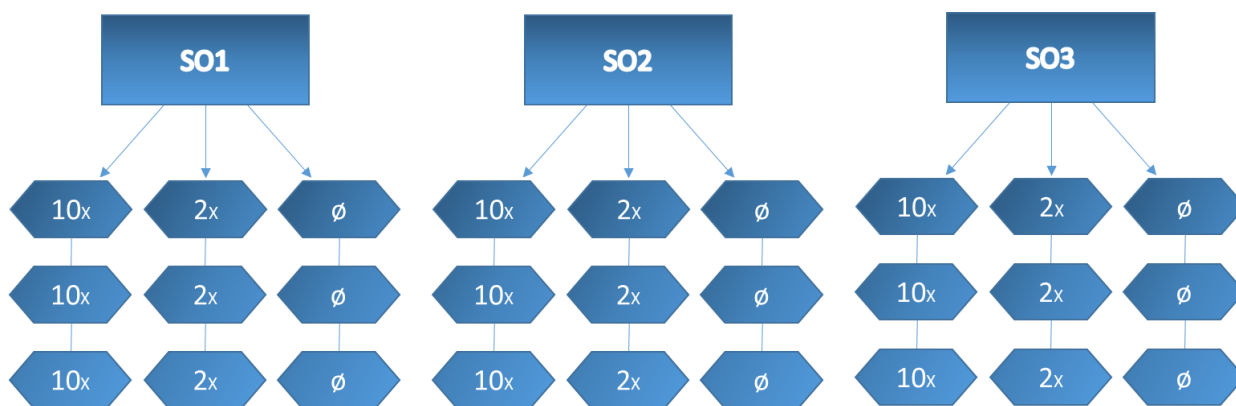
METAL	$V_1(\text{TSO})/\text{mL}$	$m(\text{TSO})/\text{g}$	V_1^*/mL	SO1	SO2	SO1
				m^*/g	m^*/g	m^*/g
Mn	1,00	0,986	0,050	0,047	0,051	0,049
Ni	1,00	0,980				
Ag	1,00	0,999				
Cr	1,00	0,856				
Cd	1,00	0,984				
1% HNO ₃	5,00	4,977	/			

Temeljne standardne otopine (TSO) za Sb i V razrijeđene su 100x te su pripremljene istim postupkom kao i za metale, Mn, Ni, Ag, Cr i Cd. U **tablici 3.** prikazan je volumen TSO metala, $V_1(\text{TSO})$, te masa istih, $m(\text{TSO})$, i volumen alikvota, V_1^* , koji se dodaje za izradu SO1, SO2 i SO3 te pripadajuće mase istog, m^* .

Tablica 3. Prikaz podataka za izradu standardnih otopina Sb i V

metal	$V_1(\text{TSO})/\text{mL}$	m/g	V_1^*/mL	SO1	SO2	SO3
				m^*/g	m^*/g	m^*/g
Sb	0,10	0,098	0,050	0,049	0,051	0,051
V	0,10	0,107				
1% HNO ₃	9,80	9,616	/			

Nakon pripremljenih SO1, SO2 i SO3 od svake su još priređene po tri koncentracijske razine: prva koncentracijska razina razrijeđenje 10x, druga 2x, a treća nerazrijeđena, \emptyset (**slika 21.**). Prva koncentracijska razina, razrijeđenje 10x, pripremljena je uzimanjem 1 mL SO1, SO2 ili SO3 te dodavanjem 9 mL 1% HNO₃. Druga koncentracijska razina, razrijeđenje 2x, pripremljena je uzimanjem 4 mL SO1, SO2 ili SO3 te dodavanjem 4 mL 1% HNO₃, dok se kod zadnje koncentracijske razine uzeo alikvot 7 mL SO1, SO2 i SO3.



Slika 21. Shematski prikaz pripreme koncentracijskih razina

Na ovaj način priređene otopine analizirane su na ICP-MS uređaju pri radnim parametrima navedenim u *tablici 4*. Prije početka mjerenja SO1, SO2 i SO3 bilo je potrebno odrediti koji će se metal mjeriti prema kojem internom standardu što je određeno usporedbom relativnih atomskih masa (A_r) metala internog standarda s metalima koji se određuju. Kao interni standardi korišteni su skandij, $A_r(\text{Sc}) = 45$, itrij, $A_r(\text{Y}) = 89$, i terbij, $A_r(\text{Tb}) = 159$. Iz izračuna aritmetičkih sredina njihovih relativnih atomskih masa dobile su se krajnje granice koje određuju koji će se metal mjeriti prema kojem internom standardu (*tablica 5*).

Tablica 4. Prikaz radnih parametara tijekom mjerenja ICPMS-2030LF uređajem

Spektrometar	ICPMS-2030LF
Plin nosioc	Argon
Snaga radiofrekvencije	1,20 kW
Dubina uzorkovanja	10,0 mm
Protok plazme	9,0 L/min
Protok pomoćnog plina	1,10 L/min
Protok nosećeg plina	0,70 L/min
Protok kroz ćeliju	6,0 mL/min
Napon ćelije	-21,0 V
Baklja (engl. torch)	mini

Tablica 5. Prikaz kranjih granica relativnih atomskih masa internih standarada:

Krajnje granice prema A_r	Interni standard
1 - 67	Sc
68 – 124	Y
124 >	Tb

3.2.2. Kriteriji validacije

Kako bi se provela ispravna validacija metode potrebno je dobivene rezultate usporediti s kriterijima prihvatljivosti za određenu metodu koji su preuzeti iz znanstvenih literatura. U **tablici 6.** navedeni su kriteriji prihvatljivosti za ICP-MS metodu. Dobiveni rezultati validacije prikazani su poglavlju 4.1.

Tablica 6. Prikaz kriterija prihvatljivosti za validaciju ICP-MS metode

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	$R^2 \geq 0,99$ (56)
Istinitost	Analitički povrat: 80 – 120 % (56)
Preciznost	$RSD \leq 20$ % (56)

3.3. Priprema uzorka sedimenta za analizu

Uzorak sedimenta uzet je iz područja srednjeg i južnog Jadrana. U svrhu pripreme uzorka za određivanje metala ICP-MS tehnikom provodila se kisela digestija mikrovalnim zračenjem. Cilj digestije bio je razgradnja uzorka i njegovo prevođenje u topljiv oblik, a ista se provodila u zatvorenom sustavu u mikrovalnoj pećnici Milestone ETHOS 1600. U svrhu potpune razgradnje sedimenta ispitivani su utjecaji temperature i snage mikrovalne pećnice te se mijenjao volumen HCl, HNO₃ i HF kao i duljina trajanja same digestije.

Prva digestija

U prvom ciklusu digestije istraženi su utjecaji jačine snage, temperature i vremena na razgradnju uzorka sedimenta. Na temelju istražene literature postavljeni su početni uvjeti dani u *tablici 7*. U 9 teflonskih posuda odvagano je 50 mg uzorka te je dodano 4 mL HNO₃ (65%, *p.a.*), 1 mL HCl (36,5%, *p.a.*) i 1 mL HF (48%, *p.a.*). U 10. teflonskoj posudi nalazila se slijepa proba koja je sadržavala iste volumene kiselina kao i u posudama s uzorkom. Postavljeno je postupno zagrijavanje 50 minuta do 230 °C pri snazi od 1000 W. Nakon 50 minuta, posude su se ohladile, a zatim se u njih dodalo 6 mL ($\gamma(\text{H}_3\text{BO}_3) = 40 \text{ g L}^{-1}$) pri čemu su se posude vratile u mikrovalnu pećnicu na iste uvjete temperature i snage, ali na vremenski period od 40 minuta (*tablica 7*). Budući da digestiju nije bilo moguće provesti do kraja pristupilo se izmjenama temperature i snage.

Tablica 7. Program prve mikrovalne digestije

KORAK	TEMPERATURA/°C	VRIJEME/min	SNAGA/W
1.	230	50	1000
2.	230	40	1000

Druga digestija

U drugoj digestiji smanjena je temperatura koja je bila konstantna, a praćen je utjecaj vremena i snage mikrovalne pećnice. U 3 teflonske posude odvagana je ista količina uzorka te su dodani isti volumeni HNO₃, HF i HCl, kao i u prvoj digestiji. U 4. teflonskoj posudi nalazila se slijepa proba koja je sadržavala iste volumene navedenih kiselina kao i u posudama s uzorkom. Digestija se provela u 3 koraka pri konstantnoj temperaturi od 175 °C, koja je odabrana prema metodi USA EPA 3051a, a mijenjala se jačina snage.^[6] U prvom koraku bila je 400 W tijekom 6 minuta, u drugom koraku 800 W tijekom 15 minuta te u trećem koraku 0 W tijekom 15 minuta, što je navedeno u *tablici 8*.

Tablica 8. Program druge mikrovalne digestije

KORAK	TEMPERATURA/°C	VRIJEME/min	SNAGA/W
1.	175	6	400
2.	175	15	800
3.	175	15	0

Tijekom prve i druge digestije nije postignuta potpuna razgradnja sedimenta.

Treća digestija

U trećoj digestiji temperatura od 175 °C i snaga od 400 W bile su konstantne, a mijenjani su volumeni kiselina. U ovoj digestiji ispitana je topljivost sedimenta ovisno o promjeni omjera volumena HCl i HNO₃ te o vremenu provedenom u mikrovalnoj pećnici. Odvagana je ista količina sedimenta od 50 mg u 9 teflonskih posuda, a dodani volumeni kiselina prikazani su u **tablici 9**. U 10. posudi nalazila se slijepa proba koja je sadržavala 2 mL HCl, 2 mL HNO₃ i 1 mL HF. Nakon svakih 10 minuta uzimani su uzorci iz tri posude od svakog omjera kiselina koje su označene narančastom, crvenom i zelenom bojom u **tablici 9**. Digestija je provedena do kraja, ali je zaostao neotopljeni talog sedimenta.

Tablica 9. Prikaz podataka za provedbu treće digestije

BROJ POSUDE	MASA SEDIMENTA/g	VRIJEME U MIKROVALNOJ PEĆNICI/min	SNAGA/W	V(HCl)/V(HNO ₃)/mL	V(HF)/mL
1	0,050	10	400	1 : 3	1
2	0,051	20	400	1 : 3	1
3	0,048	30	400	1 : 3	1
4	0,047	10	400	1,6 : 2,4	1
5	0,049	20	400	1,6 : 2,4	1
6	0,052	30	400	1,6 : 2,4	1
7	0,054	10	400	2 : 2	1
8	0,052	20	400	2 : 2	1
9	0,048	30	400	2 : 2	1
10	/	30	400	2 : 2	1

Četvrta digestija

U svrhu potpune razgradnje sedimenta ponovljen je prethodni identičan postupak, ali pri većoj snazi od 500 W (*tablica 10.*). Digestija je provedena do kraja, uzorci su sačuvani za daljnju analizu, a sediment ni sada nije bio potpuno razgrađen.

Tablica 10. Prikaz podataka za provedbu četvrte digestije

BROJ POSUDE	MASA SEDIMENTA /g	VRIJEME U MIKROVALNOJ PEĆNICI/min	SNAGA/W	V(HCl)/V(HNO₃)/mL	V(HF)/mL
1	0,050	10	500	1 : 3	1
2	0,051	20	500	1 : 3	1
3	0,049	30	500	1 : 3	1
4	0,050	10	500	1,6 : 2,4	1
5	0,048	20	500	1,6 : 2,4	1
6	0,051	30	500	1,6 : 2,4	1
7	0,053	10	500	2 : 2	1
8	0,049	20	500	2 : 2	1
9	0,049	30	500	2 : 2	1
10	/	30	500	2 : 2	1

Nakon provedene digestije otpipetirani su volumeni od 0,1 mL bistrog supernatanta koji je vagan te je dodan volumen od 9,9 mL deionizirane vode, koji je također vagan (*tablica 11.*). Vaganje je provedeno radi daljnjeg određivanja točnije koncentracije, a tako pripremljeni uzorci postavljeni su na autosampler za ICP-MS analizu.

Tablica 11. Prikaz mjernih podataka za pripremu uzorka sedimenta za analizu

DRUGA DIGESTIJA		
	<i>m(supernatanta)/g</i>	<i>m(deionizirana voda)/g</i>
Posuda 1	0,109	9,830
Posuda 2	0,109	9,857
Posuda 3	0,110	9,838
Posuda 4 (slijepa proba)	0,110	9,857
TREĆA DIGESTIJA		
Posuda 1	0,113	9,890
Posuda 2	0,115	9,849
Posuda 3	0,110	9,858
Posuda 4	0,111	9,869
Posuda 5	0,114	9,836
Posuda 6	0,114	9,863
Posuda 7	0,110	9,865
Posuda 8	0,112	9,853
Posuda 9	0,112	9,863
Posuda 10 (slijepa proba)	0,114	9,851
ČETVRTA DIGESTIJA		
Posuda 1	0,113	9,795
Posuda 2	0,116	9,865
Posuda 3	0,110	9,842
Posuda 4	0,111	9,878
Posuda 5	0,117	9,852
Posuda 6	0,113	9,857
Posuda 7	0,110	9,856
Posuda 8	0,114	9,835
Posuda 9	0,114	9,821
Posuda 10 (slijepa proba)	0,113	9,841

3.4. Priprema uzorka vode za analizu

Uzorci vode sa ulaza i izlaza hidroelektrane s područja vapnenačkih stijena prije ICP-MS analize pripremljeni su na način da se na 10 mL uzorka doda 100 μ L 65 % HNO_3 . Ovim postupkom zakiseljavanja nastojalo se spriječiti taloženje metala. Ovako priređeni uzorci postavljeni su na autosampler za ICP-MS analizu.

3.5. Analiza uzoraka ICP-MS tehnikom

Nakon pripremljenih realnih uzoraka, a prije samog mjerenja potrebno je pripremiti otopine za kalibraciju ICP-MS instrumenta. Kalibracija instrumenta provedna je pomoću dvije odvojene standardne otopine (SOK1 i SOK2), uključujući slijepu probu (1% HNO_3). Korištene su temeljne multielementne standardne otopine 71A, 71B i 71C (Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, SAD), a za određivanje glavnih elemenata Na, Ca, Mg i K korištene su njihove TSO. Kalibracijske otopine pripremljene su u falkonicama od 50 mL razrjeđivanjem TSO, tako da SOK1 sadrži 71A, 71B i 71C u koncentraciji od 20 ppb i Na, Ca, Mg i K u koncentraciji od 20 ppm. SOK2 sadrži 71A, 71B i 71C u koncentraciji od 50 ppb, te Na, Ca, Mg i K u koncentraciji od 50 ppm. Preostali volumen do 50 mL nadopunjen je 1% HNO_3 . Podaci volumena i masa otopina navedeni su u *tablici 12.*, a parametri pri kojima se provodila kalibracija prikazani su u *tablici 4.*

Tablica 12. Prikaz podataka za pripremu SOK1 i SOK2

	SOK1			SOK2		
TSO	V(TSO)/mL	m(TSO)/g	m(HNO ₃)/g	V(TSO)/mL	m(TSO)/g	m(HNO ₃)/g
71A	0,1	0,105	46,291	0,25	0,262	39,478
71B	0,1	0,106		0,25	0,257	
71C	0,1	0,105		0,25	0,267	
K	1,0	1,035		2,5	2,537	
Na	1,0	1,037		2,5	2,534	
Mg	1,0	0,998		2,5	2,550	
Ca	1,0	1,040		2,5	2,551	

Pripremljeni uzorci vode i sedimenta podvrgnuti su multielementnoj analizi na Shimadzu ICPMS-2030LF instrumentu koji je povezan s autosamplerom AS-10. Prije mjerenja realnih uzoraka provedena je kalibracija instrumenta, koji su mjereni pri istim uvjetima pri kojima je provedena i validacija metode, te su navedeni u *tablici 4*.

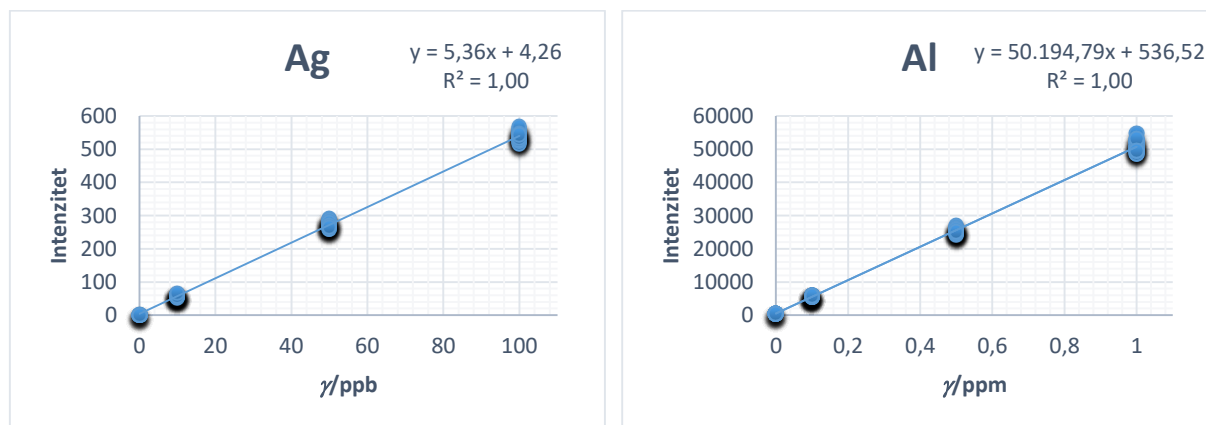
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati validacije

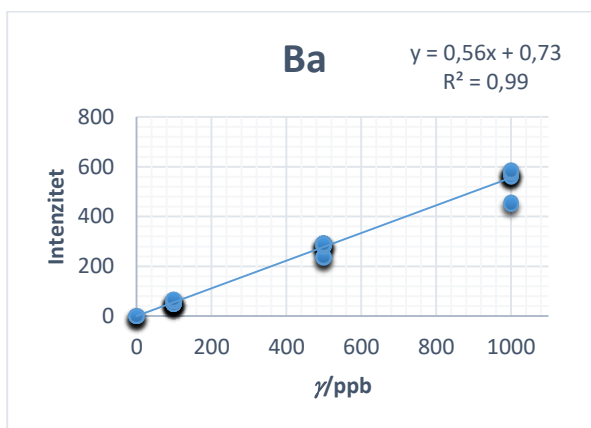
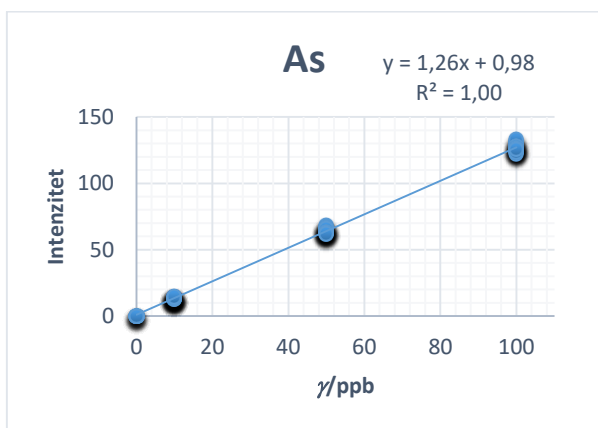
U radu je proveden razvoj i validacija ICP-MS tehnike za mjerenje teških metala. U svrhu validacije metode mjerene su TSO 19 elemenata (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn). Cilj validacije ICP-MS metode je dokazati njezinu prikladnost za vjerodostojnu detekciju i kvantifikaciju ispitivanih metala. Za svaki izmjereni element određene su izvedbene karakteristike validacije od kojih su to linearnost, radno područje, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK), točnost (preciznost i istinitost) i selektivnost. Svaki parametar validacije mora zadovoljiti kriterij prihvatljivosti čije su vrijednosti prethodno navedene u *tablici 6.* u poglavlju 3.2.2.

Provedena mjerenja na Shimadzu ICPMS-2030LF instrumentu pokazala su veliko odstupanje za Si te je izostavljen iz daljnjih ispitivanja.

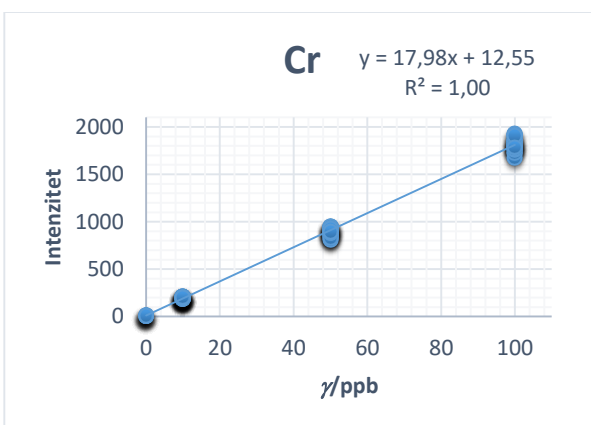
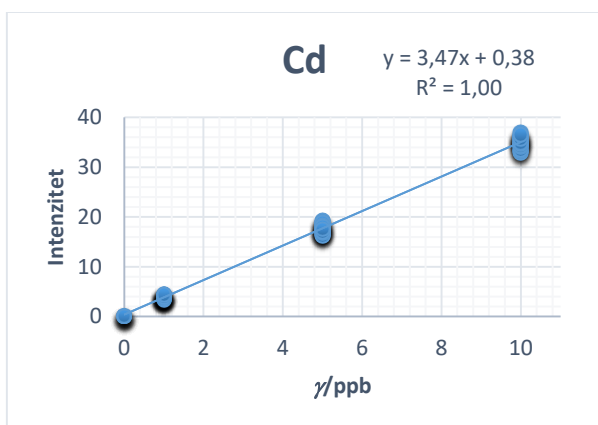
Na *slikama* od *22.* do *32.* prikazane su grafičke ovisnosti koncentracije svakog elementa o intenzitetu signala odnosno umjerne krivulje. Iz dobivenih se grafova pomoću koeficijenta determinacije, R^2 , odredila linearnost metode odnosno dobiveni su umjerni pravci. Za sve izmjerene elemente R^2 zadovoljava kriterij prihvatljivosti, $R^2 > 0,99$. Za Ag, Al, As, Cd, Cr, Fe, K, Mn, Sb, Se, V i Zn R^2 iznosi 1.00, dok za Ba, Hg, Na, Ni, P, ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb i S iznosi 0,99.



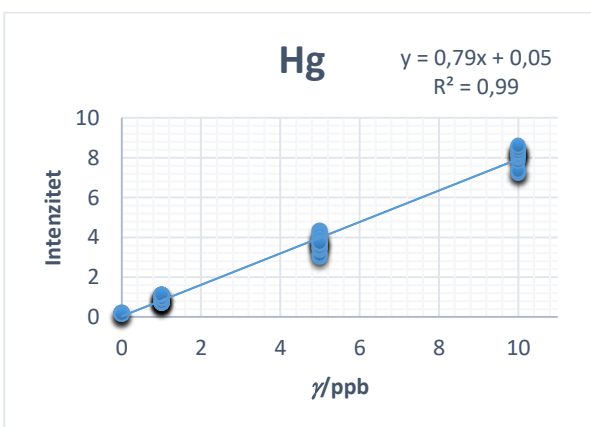
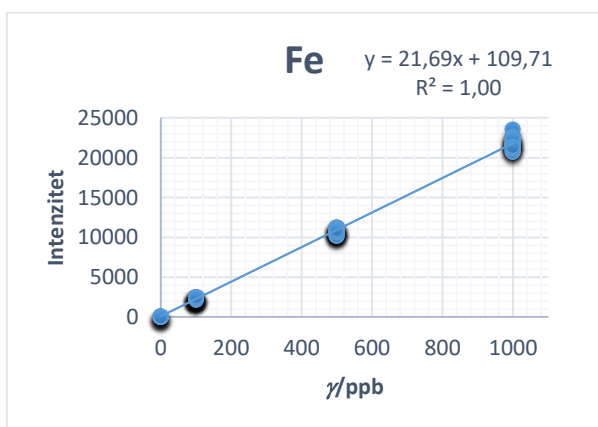
Slika 22. Grafički prikazi umjernih pravaca za Ag i Al



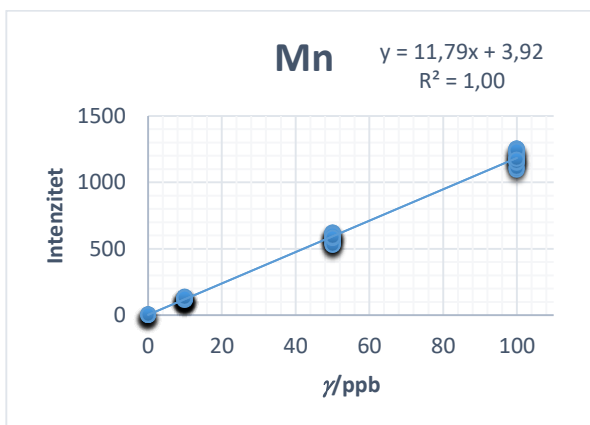
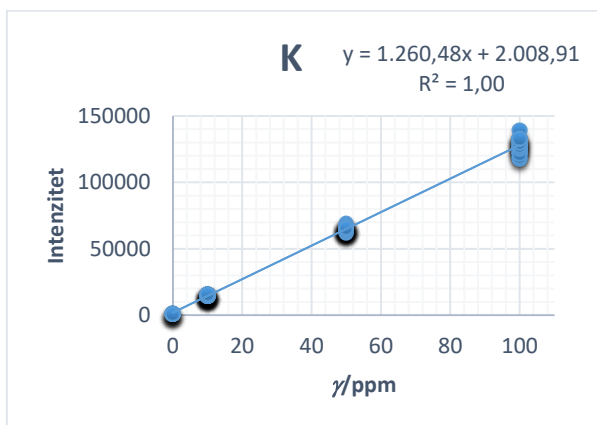
Slika 23. Grafički prikazi umjernih pravaca za As i Ba



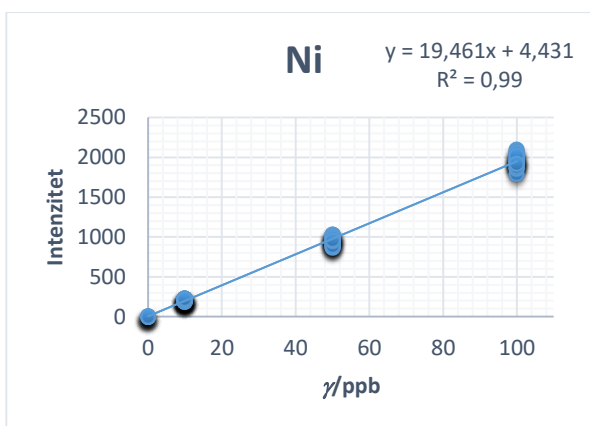
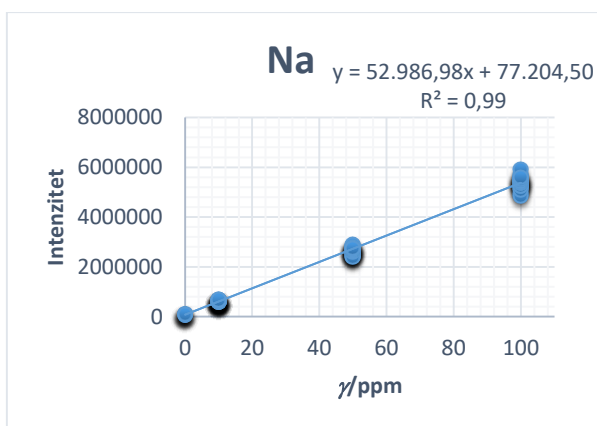
Slika 24. Grafički prikazi umjernih pravaca za Cd i Cr



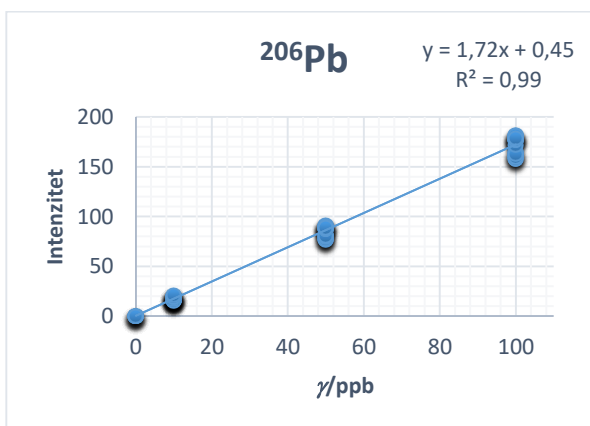
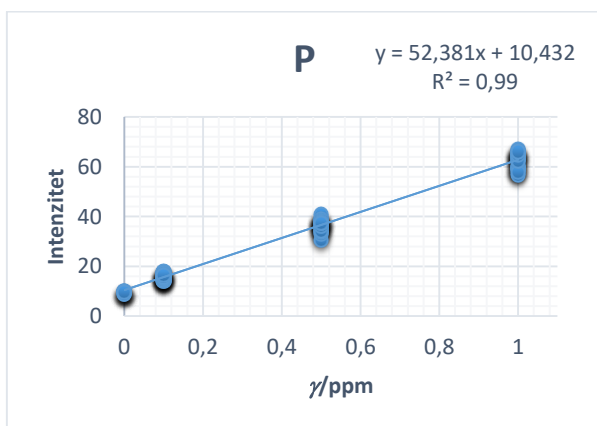
Slika 25. Grafički prikazi umjernih pravaca za Fe i Hg



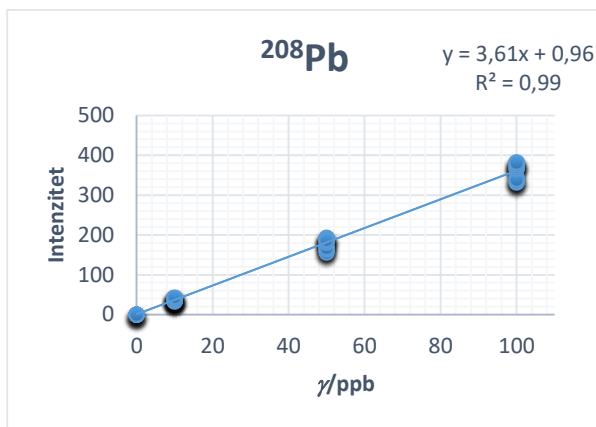
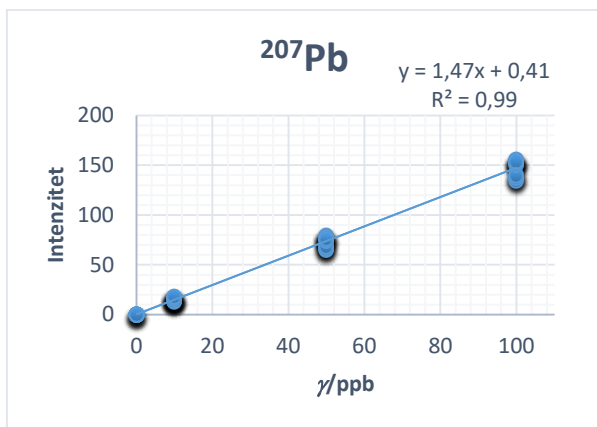
Slika 26. Grafički prikazi umjernih pravaca za K i Mn



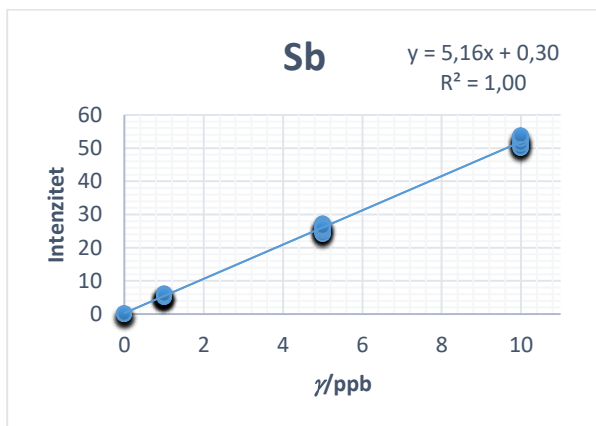
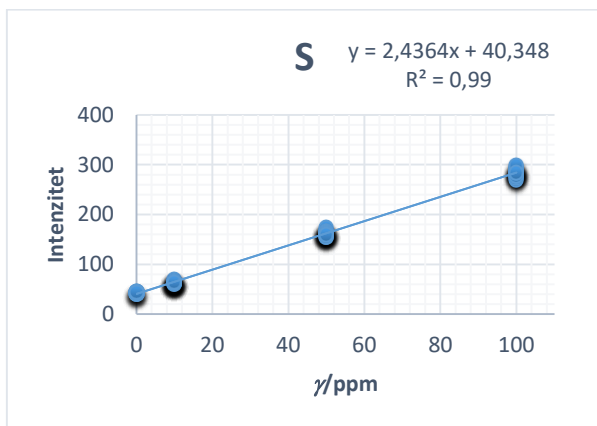
Slika 27. Grafički prikazi umjernih pravaca za Na i Ni



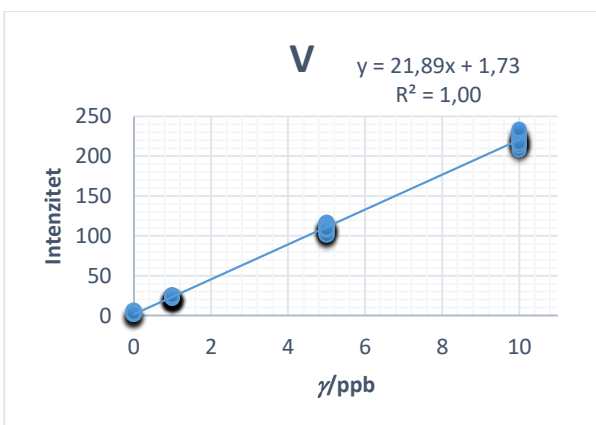
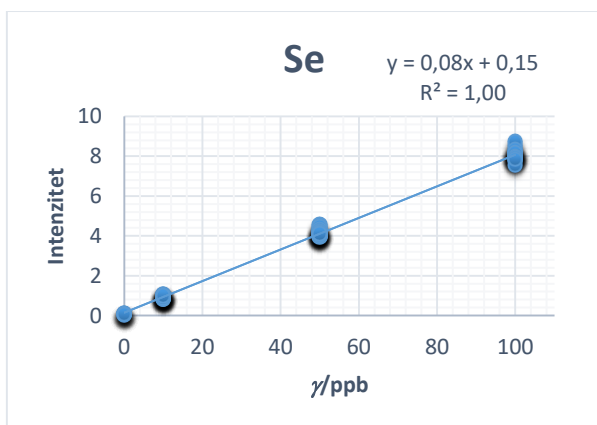
Slika 28. Grafički prikazi umjernih pravaca za P i ²⁰⁶Pb



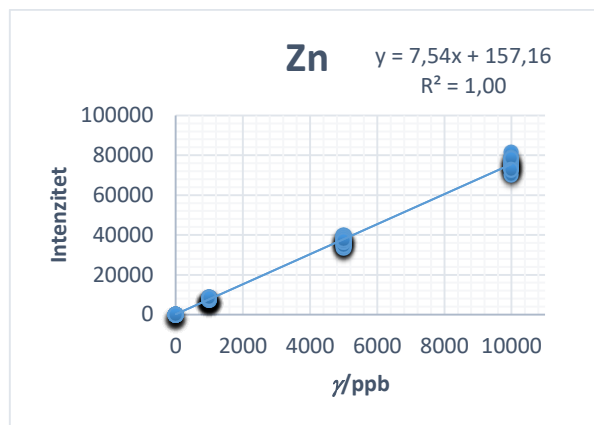
Slika 29. Grafički prikazi umjernih pravaca za ²⁰⁷Pb i ²⁰⁸Pb



Slika 30. Grafički prikazi umjernih pravaca za S i Sb



Slika 31. Grafički prikazi umjernih pravaca za Se i V



Slika 32. Grafički prikaz umjernog pravca za Zn

U *tablicama* od **13.** do **15.** prikazani su dobiveni parametri validacije za sve tri koncentracijske razine SO. Standardno odstupanje (s) govori nam o veličini slučajne pogreške i ponovljivosti rezultata mjerenja. Njegove vrijednosti dobivene su u excel-u funkcijom *stdev*. Pomoću standardnog odstupanja i srednje vrijednosti intenziteta ponovljenih mjerenja uzorka, x_{sr} , određuje se relativno standardno odstupanje (*RSD*) odnosno preciznost metode (jednadžba (8)). Poznata koncentracija elementa u referentnom standardu (SO) označena je slovom T , a različita je za svaki pojedini element.

Tablica 13. Prikaz validacijskih parametara za svaki element za razrjeđenje 10x

ELEMENT	10x			
	s	x_{sr}	<i>RSD</i> /%	T
Ag /ppb	2,124	58,699	3,60	10,0
Al /ppm	139,507	2730,456	2,44	0,1
As /ppb	0,309	13,690	2,27	10,0
Ba /ppb	1,312	57,450	2,22	100,0
Cd /ppb	0,186	3,980	4,69	1,0
Cr /ppb	5,104	200,018	2,57	10,0
Fe /ppb	61,101	2376,057	2,58	100,0
Hg /ppb	0,052	0,943	5,42	1,0
K /ppm	224,141	14962,363	1,50	10,0
Mn /ppb	3,200	126,623	2,54	10,0
Na /ppm	14756,544	635203,659	2,32	10,0
Ni /ppb	6,067	208,565	2,93	10,0
P /ppm	0,698	15,926	4,39	0,1
²⁰⁶ Pb /ppb	0,412	18,210	2,25	10,0
²⁰⁷ Pb /ppb	0,387	15,563	2,45	10,0
²⁰⁸ Pb /ppb	0,923	38,272	2,38	10,0
S /ppm	1,822	63,806	2,85	10,0
Sb /ppb	0,134	5,683	2,33	1,0
Se /ppb	0,068	0,956	7,11	10,0
V /ppb	0,830	23,872	3,48	1,0
Zn /ppb	219,770	8041,992	2,76	1000,0

Tablica 14. Prikaz validacijskih parametara za svaki element za razrjeđenje 2x

ELEMENT	2x			
	<i>s</i>	<i>x_{sr}</i>	<i>RSD/%</i>	<i>T</i>
Ag /ppb	4,487	273,199	1,65	50,0
Al /ppm	660,943	25420,587	2,60	0,5
As /ppb	1,163	64,470	1,80	50,0
Ba /ppb	2,683	270,544	0,97	500,0
Cd /ppb	0,399	17,713	2,25	5,0
Cr /ppb	20,033	899,935	2,26	50,0
Fe /ppb	247,902	10818,329	2,30	500,0
Hg /ppb	0,194	3,705	5,26	5,0
K /ppm	1352,522	65164,706	2,08	50,0
Mn /ppb	13,317	585,860	2,32	50,0
Na /ppm	63744,117	2669452,222	2,41	50,0
Ni /ppb	23,164	962,320	2,45	50,0
P /ppm	1,332	36,704	3,70	0,5
²⁰⁶ Pb /ppb	1,331	85,657	1,59	50,0
²⁰⁷ Pb /ppb	1,521	73,360	2,11	50,0
²⁰⁸ Pb /ppb	3,396	179,598	1,93	50,0
S /ppm	3,834	162,220	2,36	50,0
Sb /ppb	0,412	25,862	1,60	5,0
Se /ppb	0,148	4,145	3,56	50,0
V /ppb	2,717	109,848	2,50	5,0
Zn /ppb	1060,429	37358,697	2,87	5000,0

Tablica 15. Prikaz validacijskih parametara za svaki element za nerazrjeđenje \emptyset

ELEMENT	\emptyset			
	<i>s</i>	<i>x_{sr}</i>	<i>RSD/%</i>	<i>T</i>
Ag /ppb	7,996	539,295	1,48	100,0
Al /ppm	1327,251	50820,519	2,61	1,0
As /ppb	1,538	126,822	1,21	100,0
Ba /ppb	5,066	533,988	0,95	1000,0
Cd /ppb	0,655	35,060	1,88	10,0
Cr /ppb	43,840	1815,979	2,42	100,0
Fe /ppb	570,424	21860,866	2,60	1000,0
Hg /ppb	0,145	7,955	1,80	10,0
K /ppm	2913,087	127955,615	2,29	100,0
Mn /ppb	30,982	1186,522	2,63	100,0
Na /ppm	153889,664	5401639,704	2,86	100,0
Ni /ppb	54,967	1957,188	2,82	100,0
P /ppm	1,191	62,744	1,90	1,0
²⁰⁶ Pb /ppb	2,286	172,703	1,33	100,0
²⁰⁷ Pb /ppb	1,747	147,700	1,20	100,0
²⁰⁸ Pb /ppb	4,848	362,309	1,34	100,0
S /ppm	6,280	284,054	2,21	100,0
Sb /ppb	1,065	51,963	2,05	10,0
Se /ppb	0,198	8,057	2,45	100,0
V /ppb	5,632	221,331	2,55	10,0
Zn /ppb	2146,810	75809,180	2,83	10000,0

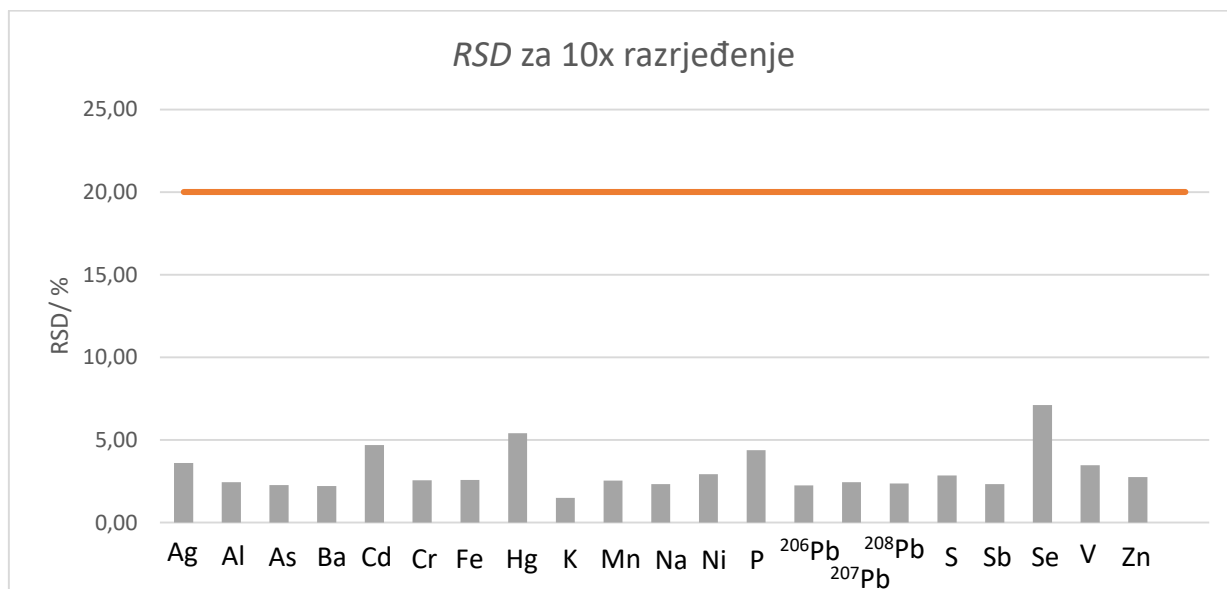
U **tablici 16.** prikazane su srednje vrijednosti standardnog odstupanja, \bar{s} , analitičkog povrata i *RSD* za sve tri SO te GD i GK za svaki element. Vrijednosti za GK i GD izračunate su prema jednadžbama (3) i (5). Najmanja GD dobivena je za Sb i iznosi 0,344 ppb, dok najmanja vrijednost GK za isti element iznosi 1,042 ppb. Najveća GD dobivena je za S i iznosi 5,389 ppm, dok najveća vrijednost GK za isti element iznosi 16,331 ppm.

Tablica 16. Prikaz GD i GK te srednje vrijednosti \bar{s} , analitičkog povrata te *RSD* za svaki element

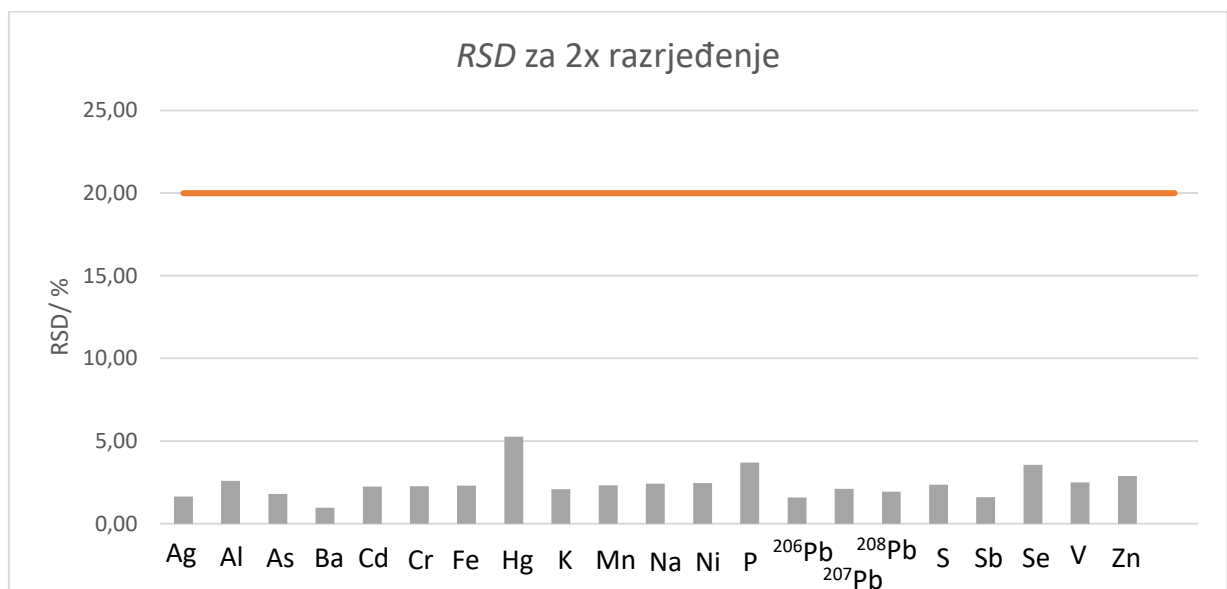
ELEMENT	\bar{s}	GD	GK	Analitički povrat/%	<i>RSD</i> /%
Ag /ppb	4,869	2,997	9,084	100,58	2,25
Al /ppm	709,234	0,053	0,161	100,93	2,55
As /ppb	1,003	2,627	7,962	100,51	1,76
Ba /ppb	3,020	17,780	53,932	99,80	1,38
Cd /ppb	0,413	0,393	1,191	101,19	2,94
Cr /ppb	22,992	4,220	12,788	101,09	2,42
Fe /ppb	293,143	44,560	135,151	101,17	2,50
Hg /ppb	0,130	0,545	1,650	102,67	4,16
K /ppm	1496,583	3,918	11,873	100,96	1,96
Mn /ppb	15,833	4,432	13,429	101,03	2,49
Na /ppm	77463,442	4,824	14,619	101,21	2,53
Ni /ppb	28,066	4,759	14,422	101,23	2,73
P /ppm	1,074	0,068	0,205	101,92	3,33
²⁰⁶ Pb /ppb	1,343	2,577	7,810	100,83	1,72
²⁰⁷ Pb /ppb	1,218	2,735	8,288	100,84	1,92
²⁰⁸ Pb /ppb	3,056	2,793	8,464	100,81	1,88
S /ppm	3,979	5,389	16,331	98,78	2,48
Sb /ppb	0,537	0,344	1,042	101,06	1,99
Se /ppb	0,138	5,685	17,226	99,75	4,38
V /ppb	3,060	0,461	1,398	100,08	2,84
Zn /ppb	1142,337	499,962	1515,035	101,20	2,82

Na **slikama 33., 34. i 35.** grafički je prikazana vrijednost *RSD* u % za svaki element pri različitom razrjeđenju. Na grafovima narančasta linija na 20 % označava kriterij prihvatljivosti za *RSD* koji je naveden u **tablici 6.** u poglavlju 3.2.2. Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da je *RSD* za sve elemente manji od 20 % što znači da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti. Također, moguće je uočiti određene trendove rasta i pada vrijednosti *RSD*. Tako je trend rasta *RSD* od najvećeg razrjeđenja prema manjem, odnosno nerazrjeđenju vidljiv kod Al, K i Na, dok je trend

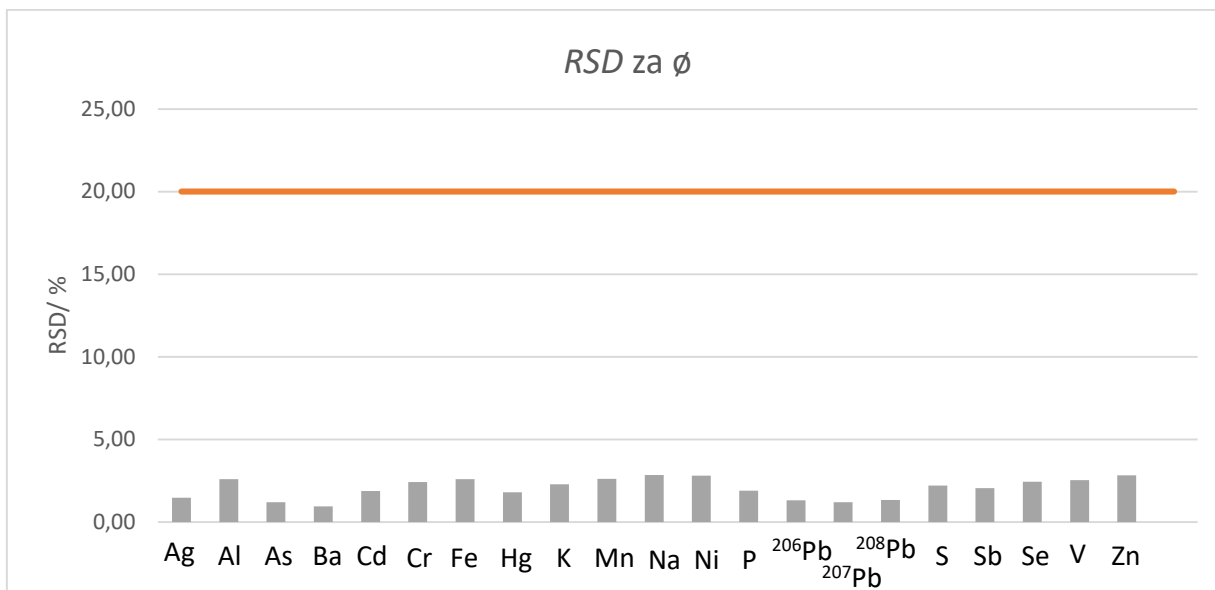
pada vidljiv kod Ag, As, Ba, Cd, Hg, P, ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , S i Se. Kod Cr, Fe, Mn, Ni, Sb i V najmanja vrijednost *RSD* postignuta je za razrjeđenje 2x što predstavlja koncentraciju elementa pri kojoj je postignuta najveća preciznost mjerenja.



Slika 33. Grafički prikaz RSD za svaki element za 10x razrjeđenje

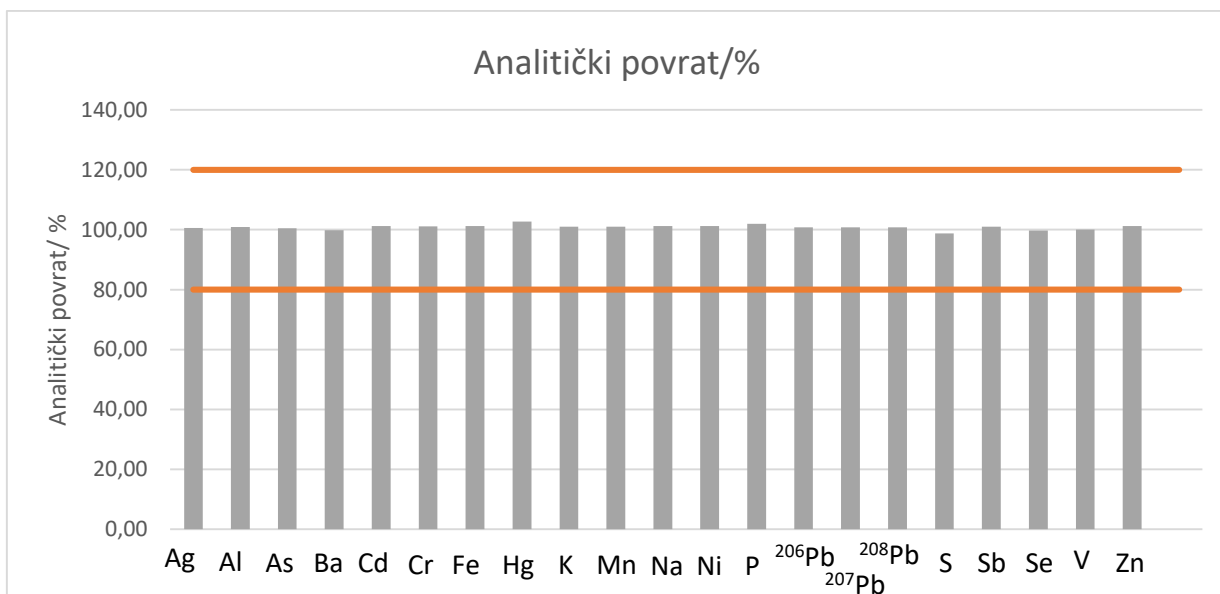


Slika 34. Grafički prikaz RSD za svaki element za 2x razrjeđenje



Slika 35. Grafički prikaz RSD za svaki element za ø

Dobivene vrijednosti za analitički povrat za sve elemente nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti 80 - 120 % (narančasti pravci na 80 % i 120 %), što je vidljivo i na grafičkom prikazu na *slici 36*. Vrijednosti analitičkog povrata za sve elemente kreću se oko 100 % te najviša vrijednost iznosi 102,67 % za Hg, a najmanja 98,78 % za S.



Slika 36. Grafički prikaz analitičkog povrata za svaki element

Za dobivene vrijednosti izvedbenih karakteristika validacije radno područje ICP-MS metode je od 10 ppb do 100 ppm. Prema dobivenim rezultatima ova metoda je pogodna za mjerenje Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb, S, Sb, Se, V i Zn za pripremljene koncentracije.

4.2. Rezultati mjerenja ICP-MS

Mjerenje realnih uzoraka sedimenta i vode provela su se na Shimadzu ICPMS-2030LF instrumentu pri istim uvjetima navedenim u *tablici 4.* pri kojima se provodila i validacija metode.

4.2.1. Uzorak sedimenta

U *tablici 17.* prikazani su rezultati mjerenja uzorka sedimenta nakon provedene druge digestije. Za sve tri posude izračunato je standardno odstupanje, s , i srednja vrijednost dobivenih koncentracija elemenata, x_{sr} . Vidljivo je da nakon provedene digestije u sedimentu nisu detektirani Ag, As, Ba, Cd, Hg, K, Na, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb, Sb, Se i Zn jer su njihove vrijednosti x_{sr} manje od njihovih vrijednosti GD, ali se ne može sa sigurnošću tvrditi da nisu prisutni zbog nepotpune razgradnje sedimenta. S druge strane, za Cr, Mn i Ni vrijednosti x_{sr} su između njihovih vrijednosti za GD i GK te se iste moraju uzeti s oprezom. Vrijednosti x_{sr} veće od GK imaju Al, Fe, P i V te su mjerenjem detektirani, ali se njihova točna koncentracija u sedimentu ne može odrediti zbog nepotpune razgradnje sedimenta. Za P x_{sr} iznosi 6,33 ppb, koja je znatno niža od MDK vrijednosti od 300 ppb i ne uzrokuje štetan učinak. Za Al i Fe x_{sr} iznosi 201,00 ppm, odnosno 1431,26 ppb, koje su znatno više od njihovih MDK vrijednosti od 200 ppb. Za V x_{sr} iznosi 7,50 ppb, koja je viša od MDK vrijednosti od 5,00 ppb.

Tablica 17. Prikaz rezultata mjerenja za uzorak sedimenta nakon druge digestije

ELEMENT	DRUGA DIGESTIJA				
	posuda 1	posuda 2	posuda 3	s	x_{sr}
$\gamma(\text{Ag})/\text{ppb}$	-0,03	-0,01	0,01	0,02	< GD
$\gamma(\text{Al})/\text{ppm}$	153	363	87	144,12	201,00
$\gamma(\text{As})/\text{ppb}$	1,791	1,841	1,901	0,06	< GD
$\gamma(\text{Ba})/\text{ppb}$	1,97	1,74	1,56	0,21	< GD
$\gamma(\text{Cd})/\text{ppb}$	0,0247	0,3598	0,1058	0,17	< GD
$\gamma(\text{Cr})/\text{ppb}$	5,38	5,59	5,27	0,16	5,41 *
$\gamma(\text{Fe})/\text{ppb}$	1397,88	1327,88	1567,88	123,42	1431,21
$\gamma(\text{Hg})/\text{ppb}$	-0,09	-0,32	0,31	0,32	< GD
$\gamma(\text{K})/\text{ppm}$	0,6505	0,5535	0,4595	0,10	< GD
$\gamma(\text{Mn})/\text{ppb}$	12,009	11,809	13,109	0,70	12,31 *
$\gamma(\text{Na})/\text{ppm}$	1,5445	1,6045	1,0245	0,32	< GD
$\gamma(\text{Ni})/\text{ppb}$	6,9215	6,6815	8,0415	0,73	7,21 *
$\gamma(\text{P})/\text{ppb}$	5,3	0,9	12,8	6,02	6,33
$\gamma(^{206}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,465	1,455	1,475	0,01	< GD
$\gamma(^{207}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,351	1,421	1,351	0,04	< GD
$\gamma(^{208}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,365	1,425	1,425	0,03	< GD
$\gamma(\text{Sb})/\text{ppb}$	0,074	0,066	0,062	0,01	< GD
$\gamma(\text{Se})/\text{ppb}$	0,0366	0,0506	0,0085	0,02	< GD
$\gamma(\text{V})/\text{ppb}$	7,3299	7,2299	7,9399	0,38	7,50
$\gamma(\text{Zn})/\text{ppb}$	4,38	4,18	3,98	0,20	< GD

*vrijednosti koncentracija nalaze se između GD i GK te se moraju uzeti s oprezom

U **tablici 18.** prikazani su rezultati mjerenja uzorka sedimenta nakon provedene treće digestije. Za izmjerene uzorke također je izračunato s i x_{sr} za svih 9 posuda, a iste su grupirane po jednakom trajanju digestije od 10, 20 i 30 minuta. Prema dobivenim rezultatima x_{sr} nakon treće digestije isti elementi, osim Hg, nisu detektirani u sedimentu kao i nakon druge digestije. Razlika kod Hg pojavila se nakon 10 i 20 minuta gdje je x_{sr} između vrijednosti za GD i GK, dok je nakon 30 minuta ona manja od GD. S obzirom, da se vrijednosti između GD i GK ne mogu sa sigurnošću prihvatiti potrebno je provesti dodatna mjerenja. Za Cr, Mn i Ni vrijednosti x_{sr} su također između GD i GK, kao i nakon druge digestije. I nakon treće digestije detektirani su Al, Fe, P i V u uzorku sedimenta. Vidljivo je da je koncentracija Al znatno veća nego nakon druge digestije što znači da su uvjeti pogodniji za njegovo uklanjanje iz sedimenta. Najveća koncentracija određena je u posudi 7 u koju je dodano 2 mL HCl, 2 mL HNO₃ i 1 mL HF i koja se digestirala 10 minuta. I za Fe, P i V koncentracije su veće nakon treće digestije, ali se iste značajno ne mijenjaju ovisno o trajanju digestije.

Tablica 18. Prikaz rezultata mjerenja za uzorak sedimenta nakon treće digestije

TREĆA DIGESTIJA															
TRAJANJE DIGESTIJE	10 min					20 min					30 min				
ELEMENT	posuda 1	posuda 4	posuda 7	s	x_{sr}	posuda 2	posuda 5	posuda 8	s	x_{sr}	posuda 3	posuda 6	posuda 9	s	x_{sr}
$\gamma(\text{Ag})/\text{ppb}$	0,13	0,05	0,01	0,06	< GD	0,05	0,02	0,01	0,021	< GD	0,03	0,02	0,01	0,01	< GD
$\gamma(\text{Al})/\text{ppm}$	1815	1815	2465	375,28	2031,67	1055	1155,00	1325	136,504	1178,33	785	685,00	825	72,111	765,00
$\gamma(\text{As})/\text{ppb}$	1,604	1,514	1,824	0,16	< GD	1,654	1,69	1,684	0,021	< GD	1,544	1,79	1,664	0,12503	< GD
$\gamma(\text{Ba})/\text{ppb}$	2,17	3,19	2,16	0,59	< GD	1,56	2,28	2,41	0,458	< GD	1,17	2,46	1,84	0,64516	< GD
$\gamma(\text{Cd})/\text{ppb}$	0,0146	0,022	0,0256	0,01	< GD	0,0229	0,01	0,0098	0,008	< GD	0,0272	0,02	0,014	0,00671	< GD
$\gamma(\text{Cr})/\text{ppb}$	5,99	5,13	5,9	0,47	5,67 *	6,24	5,61	5,44	0,421	5,76 *	5,81	6,65	5,34	0,66365	5,93 *
$\gamma(\text{Fe})/\text{ppb}$	1696,7	1556,7	2016,7	235,80	1756,70	1696,7	1766,70	1796,7	51,316	1753,37	1526,7	1966,70	1766,7	220,303	1753,37
$\gamma(\text{Hg})/\text{ppb}$	1,756	0,134	0,623	0,83	0,84 *	0,8708	0,24	1,163	0,474	0,76 *	-0,231	0,57	0,634	0,48276	< GD
$\gamma(\text{K})/\text{ppm}$	0,864	0,825	0,989	0,09	< GD	0,791	0,87	0,885	0,051	< GD	0,573	0,82	0,836	0,14718	< GD
$\gamma(\text{Mn})/\text{ppb}$	9,25	9,85	12,15	1,53	10,42 *	8,59	10,25	10,65	1,092	9,83 *	8,75	11,85	10,55	1,55671	10,38 *
$\gamma(\text{Na})/\text{ppm}$	0,369	-0,084	0,344	0,25	< GD	0,127	-0,16	-0,23	0,189	< GD	1,117	0,02	-0,086	0,66656	< GD
$\gamma(\text{Ni})/\text{ppb}$	7,2841	8,6441	8,3941	0,72	8,11 *	7,5241	7,41	7,4741	0,055	7,47 *	7,6741	8,38	7,4441	0,49	7,83 *
$\gamma(\text{P})/\text{ppb}$	12,1	15,2	21,88	5,00	16,39	8,265	22,28	11,77	7,293	14,11	15,62	24,58	15,4	5,23772	18,53
$\gamma(^{206}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,313	1,183	1,423	0,12	< GD	1,353	1,25	1,263	0,055	< GD	1,283	1,44	1,263	0,09866	< GD
$\gamma(^{207}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,146	1,176	1,416	0,15	< GD	1,146	1,27	1,436	0,146	< GD	1,106	1,34	1,136	0,12503	< GD
$\gamma(^{208}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,214	1,184	1,414	0,13	< GD	1,224	1,23	1,264	0,021	< GD	1,144	1,43	1,254	0,1464	< GD
$\gamma(\text{Sb})/\text{ppb}$	0,074	0,066	0,064	0,01	< GD	0,063	0,07	0,06	0,004	< GD	0,067	0,09	0,0737	0,01084	< GD
$\gamma(\text{Se})/\text{ppb}$	-0,0546	-0,0724	-0,0768	0,01	< GD	-0,0764	-0,02	-0,0516	0,029	< GD	-0,0364	-0,03	-0,0538	0,01191	< GD
$\gamma(\text{V})/\text{ppb}$	6,036	5,626	7,466	0,97	6,38	6,256	6,64	6,866	0,308	6,59	6,156	7,35	6,666	0,59702	6,72
$\gamma(\text{Zn})/\text{ppb}$	2,08	2,54	-0,14	1,43	< GD	2,32	-0,18	-0,17	1,440	< GD	2,56	2,80	-0,41	1,78804	< GD

*vrijednosti koncentracija nalaze se između GD i GK te se moraju uzeti s oprezom

U *tablici 19*. prikazani su rezultati mjerenja uzorka sedimenta nakon provedene četvrte digestije. Isti elementi koji nisu detektirani u sedimentu nakon druge i treće digestije nisu ni nakon provedene četvrte digestije (Ag, As, Ba, Cd, Hg, K, Na, ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , Sb, Se i Zn). Također, ovim rezultatima se potvrdilo da su dobivene x_{sr} vrijednosti između GD i GK u trećoj digestiji nepouzdanе te Hg nije detektirana u sedimentu. I dalje su x_{sr} vrijednosti za Cr, Mn i Ni između GD i GK. Neočekivano dobivene x_{sr} vrijednosti za Al su manje od onih nakon treće digestije, što potencijalno može biti posljedica reakcije Al s nekim drugim elementima ili spojevima prisutnim u sedimentu. I dalje su to koncentracije Al u sedimentu koje se mogu detektirati, ali je za precizno određivanje potrebno provesti daljnja istraživanja ponajviše u smjeru potpune digestije sedimenta. U ovoj digestiji uočava se povišena koncentracija ^{206}Pb , ^{207}Pb i ^{208}Pb u posudama nakon 30 minuta, no ona se nalazi između GD i GK te se iste mogu smatrati manje relevantnim u usporedbi sa ostalim dobivenim rezultatima u prethodnim digestijama.

Iz rezultata provedenih digestija može se zaključiti da Ag, Ag, As, Ba, Cd, Hg, K, Na, ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , Sb, Se i Zn nisu detektirani u sedimentu, dok su Al, Fe, P i V detektirani. Za Cr, Mn i Ni ne možemo sa sigurnošću tvrditi jesu li prisutni u sedimentu jer su dobivene koncentracije uvijek između GD i GK, te je potrebno provesti dodatna istraživanja u svrhu potpune razgradnje sedimenta kako bi se preciznije odredila prisutnost i koncentracija svih elemenata. Također, prema dobivenim rezultatima kao najoptimalnija digestija pokazala se treća digestija koja pruža dobivanje većih vrijednosti koncentracija odnosno uzorak sedimenta se učinkovitije razgradio. Četvrta digestija također daje zadovoljavajuće rezultate, no ona se provodi pri snazi od 500 W tako da je s ekonomskog stajališta pogodnija treća digestija pri 400 W. Za preciznije određivanje koncentracija elemenata u sedimentu preostali talog koji se nije razgradio može se podvrgnuti XRF metodi.

Tablica 19. Prikaz rezultata mjerenja za uzorak sedimenta nakon četvrte digestije

ČETVRTA DIGESTIJA															
TRAJANJE DIGESTIJE	10 min					20 min					30 min				
ELEMENT	posuda 1	posuda 4	posuda 7	s	x_{sr}	posuda 2	posuda 5	posuda 8	s	x_{sr}	posuda 3	posuda 6	posuda 9	s	x_{sr}
$\gamma(\text{Ag})/\text{ppb}$	-0,01	-0,02	-0,01	0,01	< GD	-0,02	0,00	-0,02	0,01	< GD	-0,02	-0,01	-0,01	0,005774	< GD
$\gamma(\text{Al})/\text{ppm}$	610	830	1060	225,02	833,33	30	1300,00	500	642,11	610,00	-270	-629,00	20	325,1108	< GD
$\gamma(\text{As})/\text{ppb}$	1,686	1,816	1,766	0,07	< GD	1,716	1,66	1,646	0,04	< GD	1,636	1,92	1,776	0,14	< GD
$\gamma(\text{Ba})/\text{ppb}$	1,58	2,16	2,59	0,51	< GD	2,76	2,87	2,51	0,18	< GD	1,7	1,68	1,77	0,047258	< GD
$\gamma(\text{Cd})/\text{ppb}$	0,0134	0,0076	0,0341	0,01	< GD	0,0136	0,02	0,0141	0,00	< GD	0,0418	0,02	0,0283	0,011464	< GD
$\gamma(\text{Cr})/\text{ppb}$	5,13	5,22	5,67	0,29	5,34 *	5,49	5,51	5,3	0,12	5,43 *	5,18	6,13	5,61	0,47571	5,64 *
$\gamma(\text{Fe})/\text{ppb}$	1775,6	1825,6	1885,6	55,08	1828,93	1745,6	1775,60	1735,6	20,82	1752,27	1555,6	1985,60	1825,6	217,3323	1788,93
$\gamma(\text{Hg})/\text{ppb}$	-0,5638	-1,637	-0,342	0,69	< GD	-1,557	1,27	-0,358	1,42	< GD	-1,977	-0,90	-0,077	0,952781	< GD
$\gamma(\text{K})/\text{ppm}$	0,843	0,879	0,918	0,04	< GD	0,813	0,80	0,84	0,02	< GD	0,62	0,47	0,657	0,099027	< GD
$\gamma(\text{Mn})/\text{ppb}$	8,81	10,31	11,31	1,26	10,14 *	8,23	10,31	10,41	1,23	9,65 *	10,81	11,71	10,61	0,585947	11,04 *
$\gamma(\text{Na})/\text{ppm}$	0,1565	0,0205	-0,0856	0,12	< GD	0,1775	0,07	-0,02	0,10	< GD	1,0185	-0,08	-0,1442	0,653383	< GD
$\gamma(\text{Ni})/\text{ppb}$	8,637	7,937	7,977	0,39	8,18 *	7,887	7,61	7,397	0,25	7,63 *	7,127	8,30	7,487	0,59925	7,64 *
$\gamma(\text{P})/\text{ppb}$	6,91	8,71	13,31	3,30	9,64	6,01	2,71	2,31	2,03	3,68	-3,1	16,01	23,71	13,80373	12,21
$\gamma(^{206}\text{Pb})/\text{ppb}$	-0,88	-0,79	-0,71	0,09	< GD	-0,69	-0,89	-0,79	0,10	< GD	11,42	3,67	-0,69	6,133572	4,80 *
$\gamma(^{207}\text{Pb})/\text{ppb}$	-1,01	-0,9	-0,88	0,07	< GD	-0,98	-1,05	-0,97	0,04	< GD	11,55	3,44	-1	6,363807	4,66 *
$\gamma(^{208}\text{Pb})/\text{ppb}$	-0,81	-0,77	-0,73	0,04	< GD	-0,93	-0,84	-0,87	0,05	< GD	11,46	3,36	-0,85	6,256599	4,66 *
$\gamma(\text{Sb})/\text{ppb}$	0,03	0,052	0,037	0,01	< GD	0,038	0,04	0,051	0,01	< GD	0,1137	0,13	0,056	0,039785	< GD
$\gamma(\text{Se})/\text{ppb}$	-0,052	-0,0295	-0,0384	0,01	< GD	0,0409	0,07	-0,0448	0,06	< GD	0,0399	-0,07	0,0319	0,063634	< GD
$\gamma(\text{V})/\text{ppb}$	6,576	6,816	7,356	0,40	6,92	6,706	6,75	6,816	0,06	6,76	6,436	7,27	7,106	0,440341	6,94
$\gamma(\text{Zn})/\text{ppb}$	1,72	2,37	2,34	0,37	< GD	3,42	1,56	2,24	0,94	< GD	4,69	2,83	3,28	0,970412	< GD

*vrijednosti koncentracija nalaze se između GD i GK te se moraju uzeti s oprezom

4.2.2. Uzorak vode

Uzorci vode za analizu prikupljeni su sa uređaja za pročišćavanje voda na ulazu i izlazu sa akumulacijskog jezera hidroelektrane (HE) vapnenačkog područja (radi zaštite podataka nije imenovana HE) u razdoblju od siječnja do svibnja 2024. Rezultati mjerenja koncentracije elemenata za uzorke vode prikazani su u *tablici 20*. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nisu prisutne povećane koncentracije elemenata Al, As, Ba, Cd, Cr, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb, Sb, Se i V. Povećana koncentracija Fe je očekivana budući da se u postupku pročišćavanja dodaje kao koagulant. Povećane koncentracije S uočljive su na ulazu dana 14.3. i 24.4.2024. te prilikom doziranja s Fe. Spomenute koncentracije veće su od MDK vrijednosti za S (MDK = 250 ppm) te iznose 265 ppb i 349 ppb, no iste su smanjene na izlazu uređaja. Kod Zn je također vidljivo da su koncentracije na izlazu iz uređaja u siječnju i ožujku. veće od MDK vrijednosti za Zn (1 ppb) i iznose 1,41 ppb i 213 ppb. Poželjno je provesti dodatna istraživanja kako bi se otkrio mogući uzrok povećanja koncentracije.

Tablica 20. Prikaz rezultata mjerenja za uzorak vode

ELEMENT	siječanj ulaz	siječanj izlaz	14.3. ulaz	14.3. izlaz	12.4. ulaz	12.4. izlaz	24.4. ulaz	24.4. izlaz	8.5. ulaz	8.5. doziranje Fe	8.5. izlaz
$\gamma(\text{Al})/\text{ppb}$	0,267	4,03	0,743	5,09	2,05	5,98	-2,85	-0,518	8,93	22,6	9,67
$\gamma(\text{As})/\text{ppb}$	-0,216	-0,204	-0,212	-0,201	-0,177	-0,221	-0,220	-0,182	-0,143	-0,157	-0,149
$\gamma(\text{Ba})/\text{ppb}$	8,25	8,10	8,19	8,14	8,44	8,45	8,08	8,82	8,76	9,36	9,00
$\gamma(\text{Cd})/\text{ppb}$	-0,213	-0,181	-0,215	0,0130	-0,227	-0,228	-0,237	-0,224	-0,194	-0,195	-0,208
$\gamma(\text{Cr})/\text{ppb}$	0,195	-0,0412	0,254	0,0317	0,459	0,106	0,509	0,233	1,41	2,10	0,397
$\gamma(\text{Fe})/\text{ppb}$	-2,15	-0,894	-2,70	2,49	2,11	7,25	-2,47	1,36	15,4	508	11,6
$\gamma(\text{Hg})/\text{ppb}$	-0,872	0,925	-1,34	-0,718	-1,56	-0,426	-1,09	0,293	-1,44	-0,625	-0,585
$\gamma(\text{K})/\text{ppm}$	0,336	0,360	0,308	0,359	0,428	0,331	0,487	1,55	0,567	0,535	0,541
$\gamma(\text{Mn})/\text{ppb}$	-0,369	-0,379	-0,281	0,205	0,0489	2,54	-0,369	1,78	5,07	9,86	3,13
$\gamma(\text{Na})/\text{ppm}$	5,51	6,24	4,14	5,30	6,08	4,06	5,44	54,1	8,74	8,61	62,7
$\gamma(\text{Ni})/\text{ppb}$	-0,576	-0,498	-0,291	1,76	-0,488	-0,106	-0,656	-0,503	-0,560	2,56	-0,501
$\gamma(\text{P})/\text{ppb}$	-7,01	-17,3	-16,2	17,4	9,34	-7,15	-14,0	-1,22	52,0	18,8	-0,647
$\gamma(^{206}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,09	1,03	1,04	1,15	1,04	1,06	1,03	4,47	1,63	4,67	1,19
$\gamma(^{207}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,03	1,02	0,949	1,07	1,02	0,985	0,964	4,06	1,52	4,61	1,16
$\gamma(^{208}\text{Pb})/\text{ppb}$	1,04	1,01	0,962	1,12	0,977	0,969	0,986	4,33	1,59	4,72	1,16
$\gamma(\text{S})/\text{ppb}$	219	63,4	265	60,0	128	108	349	11,8	197	293	-2480
$\gamma(\text{Sb})/\text{ppb}$	0,0923	0,0855	0,0658	0,130	0,0811	0,0870	0,0815	0,0873	0,0866	0,117	0,0945
$\gamma(\text{Se})/\text{ppb}$	0,0148	0,164	0,0003	0,0668	0,183	0,0426	0,138	0,0780	0,0824	0,0915	0,0998
$\gamma(\text{V})/\text{ppb}$	0,126	0,386	0,292	0,446	0,409	0,404	0,327	0,362	0,417	0,446	0,402
$\gamma(\text{Zn})/\text{ppb}$	2,02	1,41	0,0154	213	1,25	-1,60	-2,68	-1,51	12,1	58,5	-0,832

5. ZAKLJUČAK

U radu je proveden razvoj i validacija ICP-MS tehnike za mjerenje teških metala. U svrhu validacije metode mjerene su TSO 19 elemenata (Ag, Al, As, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, V i Zn). Za svaki element određene su izvedbene karakteristike validacije od kojih su to linearnost, radno područje, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK), točnost (preciznost i istinitost) i selektivnost. Dobiveni rezultati izvedbenih karakteristika validacije zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti, stoga je ova metoda pogodna za mjerenje navedenih elemenata.

Validirana metoda primijenjena je na realne uzorke vode sa ulaza i izlaza hidroelektrane s područja vapnenačkih stijena i na morski sediment iz područja srednjeg i južnog Jadrana. Uzorak sedimenta pripremljen je pomoću kisele mikrovalne digestije kojom se nastojala postići potpuna razgradnja. U tu svrhu mijenjali su se uvjeti digestije, pri čemu nije postignuta potpuna razgradnja sedimenta. Optimalni uvjeti razgradnje uzorka sedimenta postignuti su u trećoj digestiji nakon 10 minuta, pri snazi od 400 W i volumenima kiselina; 1 mL HCl, 3 mL HNO₃ i 1 mL HF. Prema rezultatima u uzorku sedimenta detektirani su Al, Fe, P i V. Uzorci vode pokazuju povećane koncentracije S i Zn, ali su ispitivani elementi (Al, As, Ba, Cd, Cr, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb, S, Sb, Se, V i Zn) uspješno uklonjeni prije ulaska vode u samu hidroelektranu.

6. POPIS SLIKA

Slika 1. Shematski prikaz strukture metalotioneina kod sisavaca. Prikazane su C-terminalna α -domena s 4 klastera i N-terminalna β -domena s 3 klastera. Crvene kuglice predstavljaju metalni atom (npr. Cu), dok žute kuglice atome S. ^[38]	8
Slika 2. Konceptualni biogeokemijski ciklus žive ^[28]	10
Slika 3. Prikaz epigenetskog mehanizma ^[1]	14
Slika 4. Shematski prikaz dijelova ICP-MS instrumenta ^[49]	20
Slika 5. Prikaz raspršivača (a) i komore za raspršivanje (b) ^[49]	20
Slika 6. Prikaz ICP plazme ^[49]	21
Slika 7. (a) Prikaz vakuumnog sučelja ICP-MS uređaja i (b) konus za izdvajanje iona iz plazme (lijevo) i konus za izdvajanje iona iz središnjeg ionskog snopa (desno) ^[49]	22
Slika 8. Prikaz položaja i rada ionske leće ^[49]	23
Slika 9. Reakcijski način rada s jednostrukom kvadrupolnom ICP-MS konfiguracijom ^[49] ...	24
Slika 10. Reakcijski način rada s trostrukom kvadrupolnom ICP-MS konfiguracijom ^[49]	24
Slika 11. Shema kvadrupolnog masenog filtera koji se koristi u većini ICP-MS instrumenata ^[49]	25
Slika 12. Prikaz elektronskog multiplikatora (EM) koji pokazuje nakupljanje kaskade elektrona niz detektorske dinode za generiranje ionskog pulsa ^[49]	25
Slika 13. Shematski prikaz rada masenog spektrometra ^[51]	26
Slika 14. Validacijski proces: od postavljenog analitičkog problema do odluke laboratorija može li se problemu pristupiti odabranom metodom ^[26]	27
Slika 15. Shematski prikaz Ishikawinovog dijagrama ^[54]	32
Slika 16. Prikaz analitičke vage KERN PRJ	35
Slika 17. Prikaz Hirschmann pipete od 500 –5000 μ L (lijevo) i od 20 – 200 μ L (desno)	35
Slika 18. Prikaz pipete DLAB MicroPette Plus 100 – 1000 μ L	36
Slika 19. Prikaz Milestone ETHOS 1600 mikrovalne pećnice	36
Slika 20. Prikaz Shimadzu ICPMS-2030LF uređaja	37
Slika 21. Shematski prikaz pripreme koncentracijskih razina	40
Slika 22. Grafički prikazi umjernih pravaca za Ag i Al	48
Slika 23. Grafički prikazi umjernih pravaca za As i Ba	49
Slika 24. Grafički prikazi umjernih pravaca za Cd i Cr	49
Slika 25. Grafički prikazi umjernih pravaca za Fe i Hg	49

Slika 26. Grafički prikazi umjernih pravaca za K i Mn.....	50
Slika 27. Grafički prikazi umjernih pravaca za Na i Ni.....	50
Slika 28. Grafički prikazi umjernih pravaca za P i ²⁰⁶ Pb.....	50
Slika 29. Grafički prikazi umjernih pravaca za ²⁰⁷ Pb i ²⁰⁸ Pb.....	51
Slika 30. Grafički prikazi umjernih pravaca za S i Sb.....	51
Slika 31. Grafički prikazi umjernih pravaca za Se i V	51
Slika 32. Grafički prikaz umjernog pravca za Zn.....	52
Slika 33. Grafički prikaz RSD za svaki element za 10x razrjeđenje	55
Slika 34. Grafički prikaz RSD za svaki element za 2x razrjeđenje	55
Slika 35. Grafički prikaz RSD za svaki element za σ	56
Slika 36. Grafički prikaz analitičkog povrata za svaki element	56

7. POPIS KRATICA

AAS - *Atomic absorption spectrometry*

Acetil CoA - acetil koenzim A

ALAD - delta aminolevulinska kiselina dehidrataza

CRC - *Collision/reaction cell*

Cys – cistein

DDEM - *Discrete dynode electron multiplier*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EM – elektronski multiplikator

GC-MS - *Gas chromatography/mass spectrometry*

GD – granica detekcije

GK – granica kvantifikacije

GR - glutation reduktaza

GSH – reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

HPLC - *High-performance liquid chromatography*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

ICP-MS - *Inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-OES - *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

KED - *Kinetic energy discrimination*

MDK – maksimalna dopuštena koncentracija

MS – masena spektrometrija

MT – metalotionein

PCB - poliklorirani bifenili

PVC – polivinil klorid

RNA - *Ribonucleic acid*

RNS - *reactive nitrogen species*

ROS - *reactive oxygen species*

RSD – relativno standardno odstupanje

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

TEM - transmisijska elektronska mikroskopija

U.S. EPA - *United States Environmental Protection Agency*

XRF - *X-ray Fluorescence*

8. LITERATURA

- [1] X. Wu, S. J. Cobbina, G.Mao, H. Xu, Z. Zhang, L.Yang, A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environ Sci Pollut Res*, **23**(9) (2016) 8244-8259. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- [2] R. Allan, Introduction: Mining and metals in the environment, *Journal of Geochemical Exploration*, **58**(2-3) (1997) 95-100. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(97\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00004-6)
- [3] M.B. Elamin, L. M. Alhaidari, A.Chrouda, M.Jabli, S. M.Ahmed Ali , R.M. Alrouqi, N.J.Renault, Electrochemical sensor based on gum Arabic nanoparticles for rapid and in-situ detection of different heavy metals in real samples, *Heliyon*, **10**(4) (2024) e26364. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26364>
- [4] L. FANG, N. ZHAO, M. MA, D. MENG, Y.JIA, X. HUANG, W.LIU, J. LIU, Detection of heavy metals in water sample by laser-induced breakdown spectroscopy combined with annular groove graphite flake, *Plasma Sci. Technol.*, **21**(3) (2019) 034002. DOI: 10.1088/2058-6272/aae7dc
- [5] A. Ene, L. Georgescu, A. Bosneaga Sion, Determination of heavy metals in soils using XRF technique, *Romanian Journal of Physics*, **55**(7-8) (2010)815-820
- [6] Y. J. A. Bezerra da Silva, C. W. Araújo do Nascimento, C. M. Biondi, Comparison of USEPA digestion methods to heavy metals in soil samples, *Environment Monitoring and Assessment*, **186**(1)(2014) 47-53. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3354-5>
- [7] D.C. Crominski da Silva Medeiros, F. Piechontcoski, E. R. Lovo da Rocha Watanabe, E. Sidinei Chaves, S. Delezuk Inglez, Fast and effective simultaneous determination of metals in soil samples by ultrasound-assisted extraction and flame atomic absorption spectrometry: assessment of trace elements contamination in agricultural and native forest soils from Paraná-Brazil, *Environ Monit Assess*, **192**(2)(2020) 111. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8065-0>
- [8] F. Pan, Y. Yu, H.Lin, Y. Wang, L. Zhang, D. Pan, R. Zhu, Quantitative assessment on soil concentration of heavy metal–contaminated soil with various sample pretreatment techniques and detection methods, *Environ Monit Assess*, **192**(800) (2020) 2-8. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08775-4>
- [9] K.M. Dimpe, J.C. Ngila, N. Mabuba, P.N. Nomngongo, Evaluation of sample preparation methods for the detection of total metal content using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in wastewater and sludge, *Physics and Chemistry of the Earth* **76-78** (2014) 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2014.11.006>

- [10] T. Jakovljević, L. Lovreškov, J. Medak, I. Sirovica, K. Bulešić, G. Stjepić, Prisutnost teških metala u tlu na području JU Kamenjak, hrvatski šumarski institut, **48**(1)(2022) 15-27. <https://hrcak.srce.hr/306994>
- [11] G. Winfred Ashong, B. Adu Ababio, E. E. Kwaansa-Ansah, E. Gyabeng, S. Owusu Nti, Human and ecotoxicological risk assessment of heavy metals in polymer post treatment sludge from Barekese Drinking Water Treatment Plant, Kumasi, *Toxicology Reports* **12**(12) (2024) 404-413. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.03.010>
- [12] A. Turek, K. Wiczorek, W. M. Wolf, Digestion Procedure and Determination of Heavy Metals in Sewage Sludge—An Analytical Problem, *Sustainability*, **11**(6)(2019) 1753. <https://doi.org/10.3390/su11061753>
- [13] J. Ščančar, R. Milačič, M. Stražar, O. Burica, Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge, *The Science of the Total Environment*, **250**(1-3) (2000) 9-19. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00478-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00478-7)
- [14] J. A. Nóbrega, M. C. Santos, R. A. Sousa, S. Cadore, R. M. Barnes, M. Tatro, Sample preparation in alkaline media, *Spectrochimica Acta Part B*, **61** (2006) 465-495. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.02.006>
- [15] V. Sandroni, C. M. M. Smith, Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **468**(2) (2002) 335–344. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00655-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00655-4)
- [16] N. M. Hassan, P. E. Rasmussen, E. Dabek-Zlotorzynska, V. Celo, H. Chen, Analysis of Environmental Samples Using Microwave Assisted Acid Digestion and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Maximizing Total Element Recoveries, *Water Air Soil Pollut*, **178** (2007); 323–334. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9201-3>
- [17] A.K. Mohammed, A.T. Hameed, M. A. Alhamdany, K. M. Al Azzam, G. A. A. Talk, Characterization and screening of metals, metalloids and biomarkers in crude oil by ICP–MS/OES, and GC–MS techniques after digestion by microwave-induced combustion, *Wiley Biomedical Chromatography*, **33**(4) (2019) e4481. <https://doi.org/10.1002/bmc.4481>
- [18] M. De la Guardia, S. Garrigues, Strategies for the rapid characterization of metals and organic pollutants in solid wastes and contaminated soils by using mass spectrometry, *Trends in analytical chemistry*, **17**(5) (1998) 263-272. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00104-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00104-0)

- [19] Q. Hu, G. Yang, Y. Zhao, J. Yin, Determination of copper, nickel, cobalt, silver, lead, cadmium, and mercury ions in water by solid-phase extraction and the RP-HPLC with UV-Vis detection, *Anal Bioanal Chem* **375** (2003) 831-835. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1828-y>
- [20] G. Xing, M. R. Sardar, B. Lin, J. Lin, Analysis of trace metals in water samples using NOBIAS chelate resins by HPLC and ICP-MS, *Talanta* **204** (2019) 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.041>
- [21] M. J. Shaw, P. R. Haddad, The determination of trace metal pollutants in environmental matrices using ion chromatography, *Environment International* **30**(3) (2004) 403-431. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.09.009>
- [22] N.T. Basta, M. A. Tabatabai, Determination of Total Metals in Sewage Sludges by Ion Chromatography, *J. Environ. Qual.*, **20**(1)(1991) 79-88. <https://doi.org/10.2134/jeq1991.00472425002000010013x>
- [23] A. Campos-Ramos, A. Aragón Piña, Xavier Querol, Andrés Alastuey, Methodology for the characterization and identification by sem-eds of atmospheric particles from different pollutions emission, *FORMATEX* (2010). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:73561222>
- [24] G. Nemeth, L. Mlinarik, A. Torok, Adsorption and chemical precipitation of lead and zinc from contaminated solutions in porous rocks: Possible application in environmental protection, *Journal of African Earth Sciences*, **122** (2016) 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2016.04.022>
- [25] S. Utsunomiya, K. A. Jensen, G. J. Keeler, R. C. Ewing, Direct Identification of Trace Metals in Fine and Ultrafine Particles in the Detroit Urban Atmosphere, *Environmental science & technology*, **38**(8) (2004) 0013-936X. <https://doi.org/10.1021/es035010p>
- [26] “B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. www.eurachem.org.
- [27] S. Nuchdang, W. Kingkam, U. Tippawan, W. Sriwiang, R. Funklin, D. Rattanaphra, Metal Composition and Source Identification of PM_{2.5} and PM₁₀ at a Suburban Site in Pathum Thani, Thailand, *Atmosphere*, **14**(4) (2023) 659. <https://doi.org/10.3390/atmos14040659>
- [28] P. K. Singh, Toxic metals and environmental issues, New Delhi, 1st edition 2005, ISBN: 81-7625-549-1

- [29] E. H. Rybicka, Impact of mining and metallurgical industries on the environment in Poland, *Applied Geochemistry*, **11**(1-2) (1996) 3-9. [https://doi.org/10.1016/0883-2927\(95\)00083-6](https://doi.org/10.1016/0883-2927(95)00083-6)
- [30] A. Haghizadeh, O. Rajabi, A. Nezarat, Z. Hajyani, M. Haghmohammadi, S. Hedayatikhah, S. Delnabi Asl, A. Aghababai Beni, Comprehensive analysis of heavy metal soil contamination in mining Environments: Impacts, monitoring Techniques, and remediation strategies, *Arabian Journal of Chemistry* **17**(6) (2024) 105777. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105777>
- [31] L. Rani, K. Thapa, N. Kanojia, N. Sharma, S. Singh, A. Singh Grewal, A. L. Srivastav, J. Kaushal, An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment, *Journal of Cleaner Production*, **283**(2021) 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>
- [32] T.L. Ataikiru, C. A. Ajuzieogu, Enhanced bioremediation of pesticides contaminated soil using organic (compost) and inorganic (NPK) fertilizers, *Heliyon*, **9**(12) (2023) e23133. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23133>
- [33] J. Hu, Z. Wang, G. D. Z. Williams, G. S. Dwyer, L. Gatiboni, O. W. Duckworth, A. Vengosh, Evidence for the accumulation of toxic metal(loid)s in agricultural soils impacted from long-term application of phosphate fertilizer, *Science of The Total Environment*, **907** (2024), 167863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167863>
- [34] F. P. Perera, Multiple Threats to Child Health from Fossil Fuel Combustion: Impacts of Air Pollution and Climate Change, *Environmental Health Perspectives*, **125**(2) (2016) 141-148. <https://doi.org/10.1289/EHP299>
- [35] V. Kumar, S. Kumar Tyagi, K. Kumar, R. Singh Parmar, Heavy Metal-Induced Pollution in the Environment through Waste Disposal, *International Journal of Research Publication and Reviews*, **4**(7) (2023) 1205-1210.
- [36] R.G. Garrett, Natural Sources of Metals to the Environment, *Human and Ecological Risk Assess*, **6**(6) (2000) 945-962. <https://doi.org/10.1080/10807030091124383>
- [37] M. Beldowska, J. Beldowski, U. Kwasigroch, M. Szubska, A. Jędruch, Coastal cliff erosion as a source of toxic, essential and nonessential metals in the marine environment, *Oceanologia*, **64**(4) (2022) 553-566. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2022.04.001>

- [38] B. Ruttkay-Nedecky, L. Nejd, J. Gumulec, O. Zitka, M. Masarik, T. Eckschlager, M. Stiborova, V. Adam, R. Kizek, The Role of Metallothionein in Oxidative Stress, *Int. J. Mol. Sci.*, 14(3) (2013) 6044-6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
- [39] Z. Wang, H. Guo, H. Liu, W. Zhang, Source, migration, distribution, toxicological effects and remediation technologies of arsenic in groundwater in China, *China Geology*, 6(3) (2023) 476-493. <https://doi.org/10.31035/cg2022086>
- [40] F. González-Martínez, B. Johnson-Restrepo, L. A. Quiñones, Arsenic inorganic exposure, metabolism, genetic biomarkers and its impact on human health: A mini-review, *Toxicology Letters*, 398 (2024) 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.06.008>
- [41] P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh, A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters, *Applied Geochemistry* 17(5) (2002) 517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- [42] URL: <https://www.teledynelabs.com/markets/what-is-sample-preparation> (pristupljeno 2.9.2024.)
- [43] K. Schöne, S. Schweizer, Analyzing Drinking Water by ICP-MS for Heavy Metal Detection, Syringe Filters Used in Sample Preparation, (2017) 1-2.
- [44] G. Xing, M. R. Sardar, B.Lin, J. Lin, Analysis of trace metals in water samples using NOBIAS chelate resins by HPLC and ICP-MS, *Talanta*, 204 (2019) 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.041>
- [45] William T. "Jerry" Winberry, Jr., Determination of metals in ambient particulate matter using inductively coupled plasma/mass spectrometry (ICP/MS), Compendium Method IO-3.5, *EnviroTech Solutions*, (1999).
- [46] J.T. Creed, C.A. Brockhoff, T.D. Martin, Method 200.8 – Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry, Revision 5.4 EMMC Version, *Environmental monitoring systems laboratory office of research and development*, Cincinnati, Ohio, (1994) 6-8.
- [47] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005).

- [48] M. Medić-Šarić, I. Jasprica, Ž. Debeljak, Uvod u validaciju metoda analize lijekova, *Farmaceutski glasnik*, **62**(2006) 1-7.
- [49] URL: <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/what-is-icp-ms-icp-ms-faqs> (pristupljeno 18.7.2024.)
- [50] B. Calabrese, Experimental Platforms for Extracting Biological Data: Mass Spectrometry, Microarray, Next Generation Sequencing, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, **1** (2019) 126-129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20412-3>
- [51] URL: https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf (pristupljeno 12.7.2024.)
- [52] S.R.L. Ellison, A. Williams, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 2nd Edition, Eurachem (2011)
- [53] I. Radić, a M. Runje, M. Cvetnić, M. Halužan, M.-L. Jeličić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, V. Prevarić, Š. Ukić, T. Bolanča, Validation of the ICP-MS Method for Determination of Trace Elements Provided by ICH Q3D Guideline in Fosamprenavir Calcium, *Kem. Ind.* **70**(11-12) (2021) 701–709. <https://doi.org/10.15255/KUI.2021.004>
- [54] URL: <https://kvalitet.org.rs/infrastruktura/alati-kvaliteta/dijagram-uzroka-i-posledice> (pristupljeno 3.9.2024.)
- [55] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
- [56] C. Nassour, Z. Zacharuskas, S. Nabhani-Gebara, S.J. Barton, J. Barker, Development and Validation of an ICP-MS Method for the Detection of Platinum in the Lebanese Aquatic Environment, *Water* 2022, **14**, 2631. <https://doi.org/10.3390/w14172631>