

# Validacija spektrofotometrijske metode određivanja nitrata u vodi

---

**Bandić, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:149:218935>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Bandić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

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

Kandidatkinja Ivana Bandić

Predala je izrađen završni rad dana: 20. rujna 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

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

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Martina Biošić, znanstveni suradnik, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Nevenka Vrbos, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

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

Završni ispit održat će se dana: 23. rujna 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Bandić

VALIDACIJA SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA NITRATA U VODI

ZAVRŠNI RAD

Mentor: Sandra Babić, prof. dr. sc.

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, rujan 2021.

*Iskrene zahvale mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na povjerenju, strpljenju, uloženom vremenu i prenesenom znanju. Zahvaljujem se tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na ustupljenim kemikalijama i priboru te mag. ing. oecoing. Alanu Badrovu na suradnji i pomoći tijekom izrade ovoga rada.*

*Zahvaljujem obitelji i prijateljima na strpljenju i moralnoj podršci u lijepim i onim manje lijepim trenucima.*

## SAŽETAK

Nitrati su prisutni u vodi, stoga je potrebno pratiti njihovu razinu u vodi za ljudsku potrošnju budući da velika koncentracija može imati negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Validaciju je potrebno provesti kako bi se utvrdilo je li metoda prikladna namijeni, a može biti potpuna ili djelomična, ovisno o zahtjevima korisnika i namjeni metode. U ovom radu provedena je validacija spektrofotometrijske metode za određivanja nitrata u vodi, a ispitane karakteristike su: linearnost, preciznost (ponovljivost i međupreciznost), istinitost, granica detekcije i granica kvantifikacije, radno područje i robusnost metode. Rezultati ispitivanja potvrđuju linearnost metode u određenom radnom području (0,20 – 7,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), preciznost, istinitost te robusnost. Određene su granica detekcije i granica kvantifikacije (0,20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Analizom realnih uzoraka ustanovljeno je da radno područje odgovara području koncentracija nitrata u realnim uzorcima vodovodne vode.

**Ključne riječi:** nitrati, spektrofotometrija, validacija

## **ABSTRACT**

Nitrates are present in water, so it is necessary to monitor their level in water for human consumption as high concentrations can adversely affect human health. Validation should be performed to determine whether the method is appropriate for the purpose, and may be complete or partial, depending on user requirements and the method purpose. In this research, validation was performed, and the examined characteristics were: linearity, precision (repeatability and intermediate precision), trueness, limit of detection, limit of quantification, working range and robustness of the method. The test results confirmed the linearity of the method in a certain working range (0.20 – 7.0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), precision, trueness and robustness. The limit of detection and the limit of quantification were determined (0.20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). The analysis of real samples established that the working range corresponds to the range of nitrate concentrations in samples of tap water.

**Key words:** nitrates, spectrophotometry, validation

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. VALIDACIJA I IZVEDBENE KARAKTERISTIKE METODA .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Selektivnost i specifičnost metode.....	3
2.1.2. Linearnost .....	3
2.1.3. Osjetljivost .....	4
2.1.4. Točnost .....	4
2.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	6
2.1.6. Radno područje.....	7
2.1.7. Robustnost metode .....	7
<b>2.2. SPEKTROFOTOMETRIJA .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Osnovni dijelovi spektrofotometra .....	9
2.2.2. Lambert-Beer-ov zakon.....	10
<b>2.3. NITRATI .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Nitrati u vodi .....	14
2.3.2. Utjecaj nitrata na ljudsko zdravlje.....	16
2.3.3. Metode određivanja nitrata .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>18</b>
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Uzorci vode .....	18
<b>3.2. INSTRUMENTI .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Analitička vaga.....	18
3.2.2. pH-metar.....	19
3.2.3. „Millipore“ sustav.....	20
3.2.4. Spektrofotometar .....	21
<b>3.3. METODA RADA .....</b>	<b>22</b>
3.3.1. Priprema standardnih otopina .....	22
3.3.2. Priprema otopine kalcijevog karbonata.....	23
3.3.3. Priprema uzoraka vodovodne vode.....	23



3.3.4.	Snimanje na spektrofotometru .....	23
3.3.5.	Izvedbene karakteristike .....	23
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1.	SELEKTIVNOST .....	25
4.2.	LINEARNOST I OSJETLJIVOST .....	26
4.3.	PRECIZNOST .....	28
4.3.1.	Ponovljivost .....	28
4.3.2.	Međupreciznost .....	30
4.4.	ISTINITOST .....	34
4.5.	GRANICA DETEKCIJE I GRANICA KVANTIFIKACIJE .....	34
4.5.1.	Granica detekcije .....	34
4.5.2.	Granica kvantifikacije .....	34
4.6.	RADNO PODRUČJE .....	35
4.7.	ROBUSNOST METODE .....	36
4.8.	SAŽETAK REZULTATA VALIDACIJE .....	38
4.9.	ANALIZA REALNIH UZORAKA .....	40
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOG .....</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>45</b>

## 1. UVOD

Validacija je proces dokazivanja izvedbenih karakteristika metode, njezinih ograničenja i definiranje čimbenika koji mogu utjecati na izvedbene karakteristike. Svrha postupka validacije je utvrditi služi li metoda svrsi. Validirane metode osiguravaju veću pouzdanost i vjerodostojnost rezultata analize, što je jedan od osnovnih ciljeva rada laboratorija, a naručitelju analize i potrošačima osigurava povjerenje u dobivene rezultate [1].

Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju podrazumijeva sve mjere koje laboratorij koristi u svakodnevnom radu kako bi se osigurali pouzdani i vjerodostojni rezultati analize. Osiguranje kvalitete laboratorija postiže se implementacijom sustava kvalitete, kontrolom kvalitete (unutarnjom i vanjskom) te upravljanje kvalitetom. Upravljanje kvalitetom odnosi se na sve mjere i aktivnosti koje laboratorij primjenjuje kako bi se dobili pouzdani i točni podaci, a pogreške u radu spriječile ili svele na minimum. U pogledu upravljanja kvalitetom, validacija čini jedan važan segment za analitičke laboratorije u smislu validacije metoda i validacije analitičkih instrumenata [2].

Voda, pored ostalih namirnica, također podliježe ispitivanjima kvalitete, a u zakonskoj regulativi definirani su opseg ispitivanja, učestalost i maksimalno dozvoljene koncentracije pojedinih parametara sukladnosti [4-7]. Obzirom na to da nije propisana službena metoda za određivanje koncentracije nitrata u vodi, koriste se različite tehnike određivanja kao što su: ionska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, kapilarna elektroforeza, kao i spektrofotometrijske metode. Ionskom kromatografijom se mogu otkriti i drugi ioni, međutim spektrofotometrijske metode su jednostavnije i jeftinije za izvedbu [8].

Cilj rada bio je odrediti izvedbene karakteristike spektrofotometrijske metode za određivanje nitrata u vodi, kako bi se vidjelo služi li metoda svrsi te kako bi se odredila količina nitrata u ispitivanim uzorcima – vodovodnoj vodi.

## **2. TEORIJSKI UVOD**

### **2.1. VALIDACIJA I IZVEDBENE KARAKTERISTIKE METODA**

Validacija je postupak koji služi kao potvrda da su ispunjeni zahtjevi za određenu primjenu pružanjem objektivnih dokaza [9]. Opseg validacije je različit za kvalitativne i kvantitativne metode. Validacija može biti potpuna, u slučaju kada se određuju sve izvedbene karakteristike metode, ili djelomična, ukoliko se određuju samo pojedine izvedbene karakteristike. Metodu treba validirati kada je potrebno dokazati da su njezine izvedbene karakteristike prikladne za upotrebu u određene svrhe. Prilikom odabira opsega validacije, treba uzeti u obzir troškove poput servisa instrumenta, cijene rada, cijene materijala te zaključiti je li bolje provesti klasične i neautomatizirane metode ili instrumentalne i automatske [1].

Izvedbene karakteristike su kvantitativne veličine koje naznačuju doseg kvalitete kemijskog mjernog procesa, pomažu pri izboru optimalne metode i služe pri odlučivanju o njezinoj primjenjivosti pri specifičnim mjerenjima [1]. Izvedbene karakteristike koje se odnose na analit i matricu su: osjetljivost, selektivnost i specifičnost metode, donja granica detekcije i kvantifikacije analita, radno područje, ponovljivost metode, istinitost, robustnost ili mogu biti povezane s dobivenim rezultatom – točnost iskazana kao preciznost i istinitost [1, 10]. Da bi se odabrao plan validacije, odnosno optimalna metoda, potrebno je uzeti u obzir znanje, iskustvo i intuicija analitičara, te dostupnost opreme, educiranost i osposobljenost. Moguće je koristiti već standardiziranu metodu, unijeti male promjene prilikom rada ili razviti potpuno novu metodu [10].

Validaciju je preporučljivo provoditi kada se rezultati normirane metode mijenjaju s vremenom, a ukoliko se rezultati normirane metode ne mijenjaju s vremenom, ne zahtjeva se validacija [1]. Validacija metode provodi se – analizom certificiranog referentnog materijala, standardnih otopina i ispitnih uzoraka - usporedbom s validiranom metodom, unutarlaboratorijskim ispitivanjima ili međulaboratorijskim ispitivanjem [1, 10].

Prilikom provedbe validacije, treba nastojati upotrijebiti dovoljan broj standardnih otopina za kalibracijsku (umjernu) krivulju te da dobiveni odnos bude linearan i reproducibilan, paziti na stabilnost standardnih otopina. Matrica uzorka treba biti što sličnija matrici standarda i validaciju treba provesti educirano osoblje radom na umjerenim uređajima, te korištenjem umjerenog laboratorijskog posuđa [1].

Validacija analitičke metode provodi se ispitivanjem izvedbenih karakteristika:

- specifičnost / selektivnost
- linearnost
- granica detekcije i granica kvantifikacije
- točnost
  - istinitost
  - preciznost
- radno područje
- robusnost (otpornost)

### **2.1.1. Selektivnost i specifičnost metode**

Selektivnost i specifičnost su pojmovi koji se često poistovjećuju, međutim postoji razlika u ta dva pojma.

Selektivnost je svojstvo metode da identificira ili kvantificira željeni analit, ali se pritom moraju ukloniti smetnje koje mogu utjecati na rezultat. U kvalitativnoj analizi selektivan je onaj reagens koji reagira samo s malim brojem sličnih tvari.

Specifičnost je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzoraka kao što su npr. nečistoće ili sastojci matrice. Specifičan je onaj reagens koji u danim uvjetima daje reakciju samo s jednim sastojkom. Ukoliko sastojak matrice utječe na rezultate, moguće je koristiti metodu standardnog dodatka da se smanji utjecaj matrice [1].

### **2.1.2. Linearnost**

Linearnost je sposobnost metode da unutar radnog područja osigura linearnu ovisnost [11] odziva o koncentraciji analita u ispitnom uzorku [1]. Da bi se mogla procijeniti linearnost, potrebno je snimiti odziv minimalno 5 različitih koncentracija. Linearnost se procjenjuje vizualno, iz grafa ovisnosti odziva o koncentraciji analita. Ako postoji linearan odnos, rezultate treba procijeniti izračunavanjem regresijske linije metodom najmanjih kvadrata i zatim se radi statistička obrada [11]. Matematičko procjenjivanje linearnosti se vrši preko jednadžbe pravca:

$$r = f(c) + e \tag{1}$$

gdje je  $r$  odziv instrumenta,  $c$  koncentracija analita, a  $e$  slučajna, odnosno stokastička sastavnica signala [11].

Osim jednadžbe pravca, pri matematičkom procjenjivanju linearnosti, izračunava se koeficijent korelacije,  $R$ , ili koeficijent determinacije,  $R^2$ . Da bi linearnost metode bila potvrđena, uobičajeni uvjet je:  $R^2 \geq 0,99$ , dok je za vrlo niske koncentracije analita prihvatljiva vrijednost  $R^2 \geq 0,98$  [12, 13].

### 2.1.3. Osjetljivost

Osjetljivost je svojstvo metode ili instrumenta da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz definiranu razinu pouzdanosti. U kvantitativnoj instrumentalnoj kemijskoj analizi osjetljivost je nagib umjerne krivulje. Ukoliko je ovisnost linearna, osjetljivost  $a$  je omjer izlaznog signala  $y$  i koncentracije analita  $x$ :

$$a = \frac{y}{x} \quad (2)$$

Međutim, osjetljivost sama po sebi nije dovoljna karakteristika kemijskog mjernog sustava budući da se može mijenjati, npr. dodatkom pojačala izlaznog signala instrumenta.

Preporuka je navoditi je samo za određenu koncentraciju jer je osjetljivost konstantna samo u određenom radnom području [1].

### 2.1.4. Točnost

Točnost predstavlja odstupanje rezultata jednog mjerenja od prave vrijednosti. Kako je prava vrijednost često nepoznata, točnost se može definirati i kao odstupanje rezultata mjerenja od referentne vrijednosti. Točnost obuhvaća i sustavnu i slučajnu pogrešku, te se iskazuje kao istinitost i preciznost.

#### 2.1.4.1. Istinitost

Istinitost je pojam koji označava bliskost slaganja između vrijednosti koja se prihvaća kao referentna ili konvencionalna vrijednost i srednje vrijednosti beskonačnog broja ponovljenih mjerenja. Kako je nemoguće provesti beskonačno mjerenja, istinitost se iskazuje se kao odmak od referentne vrijednosti, a ukazuje na sustavnu pogrešku [11, 10].

Podaci se iskazuju računski (kao iskorištenje ili grafički). Iskorištenje metode ovisi o uzorku, postupku uzorkovanja te koncentraciji analita (**Tablica 1.**) [14]. Nastoji se postići 100 %-tno iskorištenje, međutim zadovoljavajuća je i iskorištenje koje je unutar prihvatljivih granica [1].

**Tablica 1.** Granice prihvatljivosti za iskorištenje metode ovisno o koncentraciji analita [14].

<b>Udio analita</b>	<b>Srednje iskorištenje (%)</b>
<b>100 %</b>	98 – 102
<b>10 %</b>	98 – 102
<b>1 %</b>	97 – 103
<b>0,10 %</b>	95 – 105
<b>100 ppm</b>	90 – 107
<b>10 ppm</b>	80 – 110
<b>1 ppm</b>	80 – 110
<b>100 ppb</b>	80 – 110
<b>10 ppb</b>	60 – 115
<b>1 ppb</b>	40 - 120

#### **2.1.4.2. Preciznost**

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istoga homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Preciznost se iskazuje kao standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD). Preciznost daje podatak o raspršenosti rezultata, koja može nastati kao posljedica slučajne pogreške. Preciznost unutar jednog laboratorija je veća od preciznosti između nekoliko laboratorija. Preciznost je relativan pojam jer ovisi o količini analita u ispitnom uzorku te o veličini uzorka, pa tako za različite koncentracije analita u uzorku postoje različiti kriteriji preciznosti. Prihvatljivo relativno standardno odstupanje za udio analita 1 ppm (1 mg/L) je 16 % [1, 14], dok se primjerice za udio analita 1 ppb (1 µg/L) granica prihvatljivog relativnog standardnog odstupanja povećava na 45 % [1].

Ponovljivost se izražava kao preciznost u istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog perioda. Ponovljivost se može nazvati još i preciznošću unutar ispitivanja [11]. Očekivana je manja

standardno odstupanje u odnosu na rezultate međupreciznosti [10]. Procjenjuje se tako da se napravi minimalno 9 mjerenja 3 različite koncentracije unutar radnog područja [11].

Međupreciznost sadržava varijacije unutar jednog laboratorija, primjerice različiti dani, različiti analitičari ili različita oprema. Procjenjuje se kao i ponovljivost – napravi se minimalno 9 mjerenja 3 različite koncentracije unutar radnog područja [11].

U kvalitativnoj analizi, preciznost se ne može iskazati standardnim odstupanjem i relativnim standardnim odstupanjem, već kao istinite ili lažno pozitivne (ili negativne) mjere.

### 2.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije, odnosno granica dokazivanja, je prema IUPAC-u, ona količina ispod koje se ne može s prihvatljivom pouzdanošću detektirati željeni analit. Može se označavati kao DL (eng. *detection limit*) [11], LOD (eng. *limit of detection*) [10, 14],  $L_D$  [1]. Može se određivati vizualno tako da se odredi analizom uzoraka poznatih koncentracija i utvrđivanjem minimalne razine na kojoj se analit može pouzdano otkriti. Drugi način određivanja granice detekcije je na temelju omjera signala i šuma. Omjer signala i šuma 3:1 ili 2:1 se smatra prihvatljivim za procjenu granice detekcije. Omjer signal / šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom (npr. kromatografske analize). Treći način određivanja granice detekcije je pomoću formule:

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

gdje je SD – standardno odstupanje

$a$  – nagib umjerne krivulje [11]

Granica kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može kvantitativno dokazati, odnosno pouzdano odrediti. Granica kvantifikacije je bitna u analizi ultratragova jer je ispitno područje vrlo blizu granici detekcije i granici kvantifikacije. Granica kvantifikacije je uvijek po svom iznosu veća od granice detekcije. Relativno standardno odstupanje (RSD) granice kvantifikacije ne bi smjelo biti veće od 10 %. [14] Može se odrediti na tri načina:

- vizualno, analizom uzoraka poznatih koncentracija analita i utvrđivanjem minimalne razine na kojoj analit može biti kvantificiran s prihvatljivom točnošću, što obuhvaća prihvatljivu istinitost i preciznost;

- omjer signal / šum treba iznositi barem 10:1
- prema jednadžbi:

$$- GK = \frac{10 SD}{a} \quad (4)$$

gdje je SD – standardno odstupanje

$a$  – nagib umjerne krivulje. [11]

Granica detekcije i granica kvantifikacije su bitne izvedbene karakteristike kod određivanja analita koji u niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš. [13]

### **2.1.6. Radno područje**

Radno područje je interval unutar kojega analitički postupak ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost. U području linearnosti pogreška mjernog instrumenta je unutar određenih granica. Taj je interval omeđen donjom i gornjom granicom, uključivši i granične koncentracije analita, i trebao bi pokrivati 80 – 120 % koncentracije ispitnog uzorka [1, 10, 11]. Donja granica je ograničena na vrijednost granice kvantifikacije (GK), a gornja granica je definirana kao vrijednost koncentracije analita pri kojem su primijećene značajne anomalije [10].

### **2.1.7. Robustnost metode**

Robustnost je otpornost metode, odnosno svojstvo metode da ne reagira na male promjene mjernih parametara i da omogućuje njezinu izvedbu [1]. Promjene koje mogu utjecati na otpornost metode su npr. uvjeti eksperimentalni uvjeti provođenja ekstrakcije, poput trajanja ekstrakcije ili volumena otapala za ekstrakciju. U tekućinskoj kromatografiji promjene mogu biti: promjena pH-vrijednosti pokretne faze, protok, temperatura kromatografske kolone, promjena sastava pokretne faze, različite kromatografske kolone (različiti dobavljači ili različite dimenzije) [11]. Robustnost je bitna izvedbena karakteristika validacije jer ukoliko dođe do promjena eksperimentalnih uvjeta koji mogu utjecati na rezultat analize, bit će poznato na koji dio metode se treba koncentrirati da se smanje promjene ukoliko su nepoželjne [10].

## **2.2. SPEKTROFOTOMETRIJA**

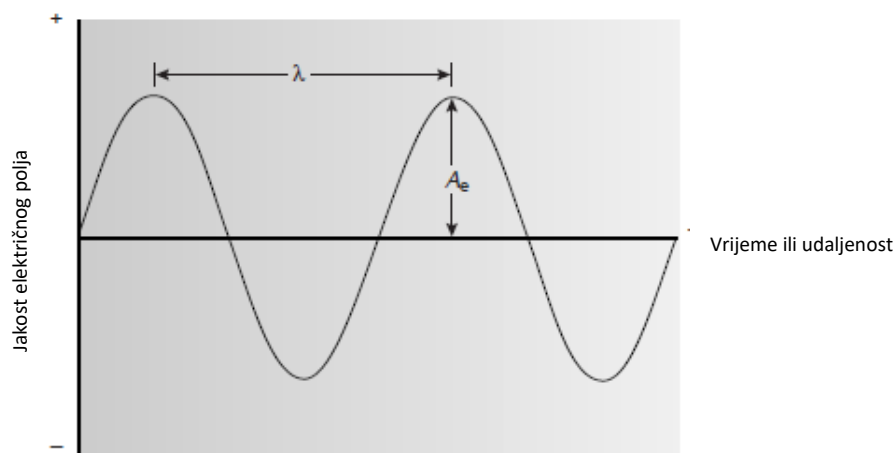
Spektrometrija, ili spektrofotometrija, je grana analitičke kemije koja se prvotno temeljila na mjerenjima interakcije elektromagnetskoga zračenja s česticama (atomima i molekulama), a danas je proširena i na izbijanje manjih čestica iz početnih. Tom tehnikom moguće je mjerenje valne



duljine elektromagnetskoga zračenja ili veličine proporcionalne energiji zračenja (valni broj, frekvencija) te kinetičke energije izbačenih ili preostalih nabijenih čestica. Pomoću ove metode moguće je dobiti informacije o kvantitativnom i kvalitativnom sastavu analiziranih uzoraka. [16]

Elektromagnetsko zračenje, odnosno njegovo ponašanje, može se opisati pomoću svojstava vala i čestica. Optička svojstva elektromagnetskoga zračenja, npr. difrakcija, može se najbolje objasniti ako se elektromagnetsko zračenje promatra kao val. Apsorpcija i emisija se mogu najbolje objasniti ako se ponašanje elektromagnetskoga zračenja promatra kao čestica, odnosno foton.

Elektromagnetsko zračenje se sastoji od oscilirajućeg električnog i magnetskog polja koja se šire prostorom linearno i s konstantnom brzinom. Električno i magnetsko polje su okomiti međusobno te na smjer širenja vala. Interakcija elektromagnetskoga zračenja s tvari može se objasniti koristeći električno ili magnetsko polje (**slika 1.**)



**Slika 1.** Komponenta električnog polja elektromagnetskoga zračenja [15]

Valna duljina elektromagnetskoga vala,  $\lambda$ , definira se kao udaljenost između susjednih maksimuma ili susjednih minimuma, te ovisi o brzini elektromagnetskoga vala. Za ultraljubičasto i vidljivo elektromagnetsko zračenje valna duljina se obično izražava u nanometrima (nm,  $10^{-9}$  m).

Ako se ponašanje elektromagnetskoga zračenja promatra kao foton, prilikom apsorpcije elektromagnetskoga zračenja, uzorak prolazi kroz promjenu energije. Takve interakcije je najlakše shvatiti ako se pretpostavi da se elektromagnetsko zračenje sastoji od snopa energetske čestice –

fotona. Kada uzorak apsorbira foton, foton se „uništava“ i njegovu energiju apsorbira uzorak. Energija fotona, izražena u džulima J, povezana je s njegovom frekvencijom, valnom duljinom i valnim brojem sljedećim jednadžbama:

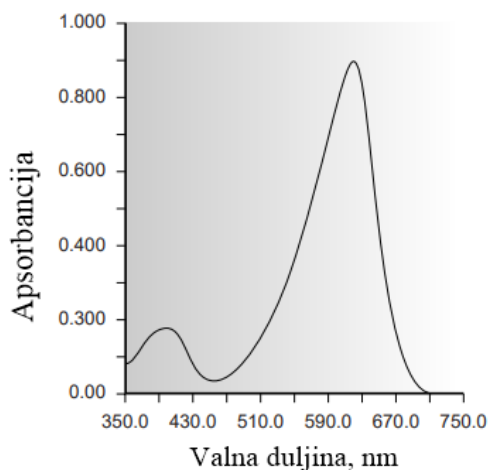
$$E = h\nu \quad (5)$$

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (6)$$

$$E = hc\bar{\nu} \quad (7)$$

gdje je:  $h$  Planckova konstanta,  $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  J s.

U tom slučaju radi se o apsorpcijskoj spektroskopiji. Apsorpcija se događa samo kada se energija fotona podudara s razlikom u energiji,  $\Delta E$ , između dvije razine energije. Grafički prikaz ovisnosti apsorpcije o funkciji energije fotona naziva se apsorpcijskim spektrom (**slika 2.**). [15]



**Slika 2.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbcije o valnoj duljini [15]

### 2.2.1. Osnovni dijelovi spektrofotometra

Spektrofotometri se sastoje od nekoliko uobičajenih komponenti: izvora energije, sredstva za izoliranje uskog raspona valnih duljina (monokromator ili filter), detektora za mjerenje signala i procesora signala za prikaz signala u obliku prikladnom za analitičara.

Izvor energije može biti: elektromagnetsko zračenje, toplinsko zračenje ili kemijski izvori. Izvor elektromagnetskog zračenja mora pružati izlaz koji je istovremeno intenzivan i stabilan u željenom području elektromagnetskog spektra. Klasificiraju se u dvije skupine: kontinuirani i linijski izvori.

Izvor kontinuiranog zračenja emitira zračenje u širokom rasponu valnih duljina, dok izvor linijskog zračenja emitira zračenje u nekoliko odabranih uskih raspona valnih duljina.

Idealna valna duljina za snimanje apsorpcije ima veliku propusnost zračenja i usku efektivnu širinu pojasa. Poželjan je veliki protok jer tada više fotona prolazi kroz selektor valnih duljina i dobiva se jači signal s manje pozadinske buke. Uska efektivna širina pojasa pruža veću razlučivost, odnosno veće razdvajanje dviju značajki spektra – apsorpcijskih i emisijskih linija. Pri kvalitativnoj analizi razlučivost je važnija značajka od propusnosti zračenja, dakle poželjne su manje efektivne širine pojasa. U kvantitativnoj analizi poželjnija je veća propusnost zračenja. Izbor valne duljine se može odrediti pomoću filtera, monokromatora ili interferometra. Filter odabire valnu duljinu koja koristi ili apsorpciju ili konstruktivne, odnosno destruktivne interferencije za kontrolu raspona odabranih valnih duljina. Monokromator koristi difrakcijsku rešetku ili prizmu i to omogućuje kontinuirano mijenjanje nominalnih valnih duljina. Interferometar omogućuje mjerenje svih valnih duljina istovremeno i tako uklanja potrebu za selektorom valnih duljina.

Suvremeni detektori koriste osjetljivi pretvornik za pretvaranje signala od fotona u lako mjerljivi električni signal. Pretvornik je uređaj koji pretvara kemijsko ili fizikalno svojstvo, poput pH ili intenziteta fotona, u lako mjerljivi električni signal poput napona ili struje. Postoje pretvornici fotona i toplinski pretvornici.

Procesor signala je uređaj koji prikazuje signal u obliku koji analitičar može lako protumačiti. Procesori signala mogu biti analogna ili digitalna brojila, snimač, računala opremljena pločama za digitalno prikupljanje. Procesor signala se još može koristiti za kalibriranje odgovora detektora, pojačavanje signala s detektora, uklanjanje šuma filtriranjem ili da matematički transformiraju signal [15].

### **2.2.2. Lambert-Beer-ov zakon**

Prigušenje elektromagnetskog zračenja pri prolasku kroz uzorak je opisano pomoću dva različita, ali povezana pojma: transmitancija i apsorpcija.

Transmitancija, odnosno propusnost, se definira kao omjer snage elektromagnetskog zračenja koja izlazi iz uzorka,  $P_T$ , prema snazi elektromagnetskog zračenja iz izvora zračenja,  $P_0$ :

$$T = \frac{P_T}{P_0} \quad (8)$$

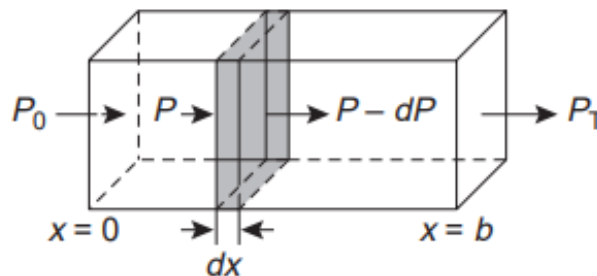
Množenjem transmitancije sa 100, dobije se postotak transmitancije (% T), koji varira između 100 % (bez apsorpcije) i 0 % (potpuna apsorpcija). Sve metode detekcije, bilo da je riječ o ljudskom oku ili modernom fotoelektričnom pretvorniku, mjere propusnost elektromagnetskog zračenja.

Alternativna metoda za izražavanje slabljenja elektromagnetskog zračenja je apsorbancija,  $A$ , koja se definira kao:

$$A = -\log T = -\log \frac{P_T}{P_0} = \log \frac{P_0}{P_T} \quad (9)$$

Apsorbancija je češća jedinica za izražavanje slabljenja zračenja jer je linearna funkcija koncentracija analita.

Kada monokromatsko elektromagnetsko zračenje prolazi kroz beskonačno tanki sloj uzorka, debljine,  $dx$ , dolazi do smanjenja snage,  $dP$  (**slika 3.**).



**Slika 3.** Čimbenici korišteni u izvođenju Lambert-Beer-ovog zakona [15]

Djelomično smanjenje snage proporcionalno je debljini uzorka i koncentraciji analita,  $C$ :

$$\frac{-dP}{P} = \alpha C dx \quad (10)$$

gdje je  $P$  snaga koja pada na tanki sloj uzorka, a  $\alpha$  konstanta proporcionalnosti.

Integriranjem lijeve strane jednadžbe (10) iz  $P = P_0$  u  $P = P_T$  i desne strane jednadžbe iz  $x = 0$  u  $x = b$ , gdje je  $b$  ukupna debljina uzorka:

$$-\int_{P=P_0}^{P=P_T} \frac{dP}{P} = \alpha C \int_{x=0}^{x=b} dx \quad (11)$$

dobije se:

$$\ln\left(\frac{P_0}{P_T}\right) = abc \quad (12)$$

Pretvaranjem ln u log i zamjenom jednadžbe (12) dobije se:

$$A = abc \quad (13)$$

gdje je  $a$  apsorptivnost analita izražena u  $\text{cm}^{-1} \text{konc}^{-1}$ , a kada je koncentracija izražena kao molarna, apsorptivnost se zamjenjuje molarnom apsorptivnošću,  $\varepsilon$  koja se izražava u  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ :

$$A = \varepsilon bc \quad (14)$$

Apsorptivnost i molarna apsorptivnost ovise o valnoj duljini elektromagnetskog zračenja.

Jednadžbe (14) i (15) predstavljaju Lambert-Beer-ov zakon, koji pretpostavlja linearnu vezu između koncentracije analita i apsorbancije. Umjerne krivulje temeljene na Lambert-Beer-ovom zakonu rutinski se koriste u kvantitativnim analizama. Lambert-Beer-ov zakon se može primijeniti i na uzorke koji sadrže nekoliko komponenata koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje pod uvjetom da nema interakcija između komponenti.

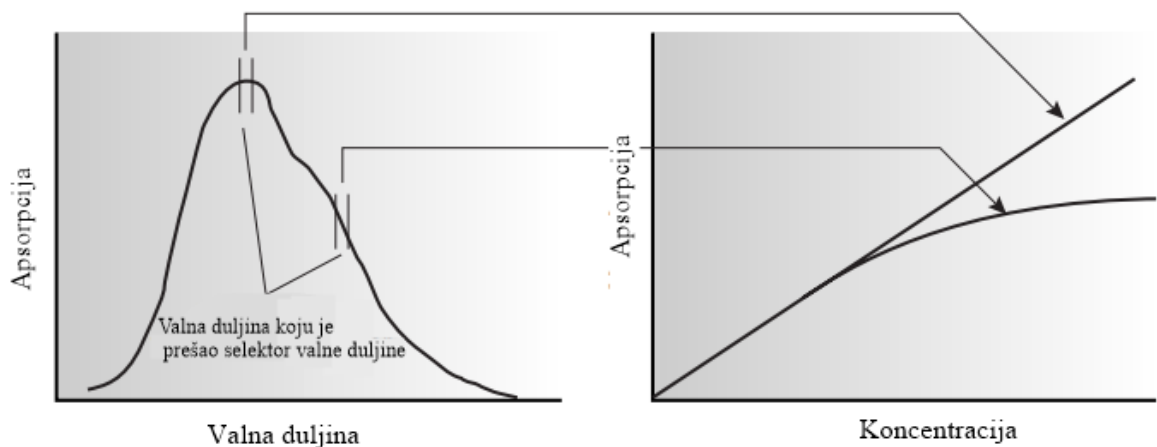
Prema Lambert-Beer-ovom zakonu, umjerna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji analita u nizu standardnih otopina treba biti ravna crta s ishodištem u 0 i nagibom  $ab$  ili  $\varepsilon b$ . Međutim, postoje slučajevi kada umjerne krivulje nisu linearne. Odstupanja od linearnosti podijeljena su u tri kategorije: temeljna, kemijska i instrumentalna odstupanja.

Temeljna odstupanja se odnose na otopine većih koncentracija analita jer u tom slučaju dolazi do interakcija između čestica analita i može se promijeniti vrijednost  $\varepsilon$ . Pri nižim koncentracijama to ne vrijedi i stoga Lambert-Beer-ov zakon vrijedi za otopine niskih koncentracija analita. Druga stvar koja se uzima u obzir je indeks loma uzorka budući da apsorptivnost i molarna apsorptivnost ovise o indeksu loma. Za otopine većih koncentracija indeks loma se može mijenjati, a samim time i vrijednosti  $a$  i  $\varepsilon$ , dok je indeks loma kod otopina nižih koncentracija konstantan te umjerna krivulja ostaje linearna.

Kemijska odstupanja mogu nastati kada je dio uzorka, koji apsorbira elektromagnetsko zračenje, uključen u ravnotežnu reakciju. Treba birati reakciju tako da su molarne apsorptivnosti svih vrsta

jednake i tada će vrijediti Lambert-Beer-ov zakon. U suprotnom mogu nastati pozitivna ili negativna odstupanja od Lambert-Beer-ovog zakona.

Instrumentalna odstupanja se odnose na dva glavna ograničenja zakona. Prvo ograničenje je da Lambert-Beer-ov zakon vrijedi isključivo za zračenje koje se sastoji od samo jedne valne duljine. Poželjno je mjeriti apsorbanciju na širokom vrhu apsorpcijskog maksimuma. Uz to, odstupanja od Lambert-Beer-ovog zakona su manja ako je efektivna širina pojasa od izvora manja od jedne desetine prirodne širine pojasa apsorbirajućih vrsta (**slika 4.**).



**Slika 4.** Učinak valne duljine na linearnost umjerne krivulje Lambert-Beer-ovog zakona [15]

Zalutalo zračenje je drugi doprinos instrumentalnim odstupanjima od Lambert-Beerovog zakona. Nastaje zbog nesavršenosti unutar selektora valnih duljina koji dopušta da strano svjetlo „procuri“ u instrument. Na analite niskih koncentracija, zalutalo zračenje nema utjecaj, međutim na analite većih koncentracija utječe i rezultat je negativno odstupanje od Lambert-Beer-ovog zakona [15].

### 2.3. NITRATI

Nitrati i nitriti su ioni koji se prirodno javljaju i koji su dio ciklusa dušika. Nitratni ion ( $\text{NO}_3^-$ ) je stabilan oblik kombiniranog dušika za oksidirane sustave. Iako je kemijski nereaktivan, mikrobnim djelovanjem može se reducirati. Nitritni ion ( $\text{NO}_2^-$ ) sadrži dušik u relativno nestabilnom oksidacijskom stanju. Kemijski i biološki procesi mogu dodatno reducirati nitrit u razne spojeve ili ga oksidirati u nitrat.

Nitrati se koriste uglavnom u anorganskim gnojivima. Također se koristi kao oksidirajuće sredstvo i u proizvodnji eksploziva, a pročišćeni kalijev nitrat se koristi za izradu stakla. Natrijev nitrit se koristi kao konzervans za hranu, posebno u suhomesnatim proizvodima. Nitrati se prirodno javljaju u biljkama, kojima su ključni hranjivi sastojci. Nitrat i nitrit također se stvaraju endogeno kod sisavaca, uključujući ljude. Nitrat se izlučuje u slini, a zatim se oralnom mikroflorom pretvara u nitrit. Nitrati mogu doći do površinskih i podzemnih voda kao posljedica poljoprivrednih aktivnosti (npr. višak primjene anorganskih dušičnih gnojiva i stajskog gnoja), pročišćavanja otpadnih voda i oksidacije dušičnog otpada iz ljudskih i životinjskih izlučevina. Nitriti također mogu nastati i kemijski u distribucijskim pocinčanim cijevima od strane bakterija *Nitrosomonas* tijekom stagnacije pitke vode koja sadrži nitrate, a siromašna je kisikom.

U tlu, gnojiva koja sadrže anorganski dušik i otpad koji sadrži organski dušik, dušik se prvo razgradi dajući amonijak, koji se zatim oksidira u nitrit i nitrat. Biljke uzimaju nitrat tijekom svog rasta i koriste ga u sintezi organskih dušičnih spojeva.

U aerobnim uvjetima, nitrat može u relativno velikim količinama prodirati u vodonosnik kada nema biljaka koje bi preuzele nitrat. Razgradnja ili denitrifikacija javlja se samo u maloj mjeri u tlu i u stijenama koje tvore vodonosni sloj. U anaerobnim uvjetima, nitrat se može denitrificirati ili razgraditi gotovo u potpunosti u dušik. Prisutnost visokih ili niskih vodostaja, količina kišnice, prisutnost drugog organskog materijala i druga fizikalno-kemijska svojstva su važni faktori u određivanju sudbine nitrata u tlu. U površinskim vodama mogu se dogoditi i nitrifikacija i denitrifikacija, ovisno o temperaturi i pH.

Dušikovi spojevi nastaju u zraku munjom ili su ispušteni iz industrijskih procesa, motornih vozila i intenzivne poljoprivrede. Nitrati su prisutni u zraku prvenstveno kao dušična kiselina i anorganski aerosoli, kao i nitratni radikali i organski plinovi ili aerosoli. Oni se uklanjaju mokrim i suhim taloženjem [18].

### **2.3.1. Nitrati u vodi**

U industrijskim područjima uočene su koncentracije nitrata u kišnici do 5 mg/L. U ruralnim područjima, koncentracije nitrata su niže.

Koncentracija nitrata u površinskoj vodi obično je niska ( 0 – 18 mg/L), ali može doseći visoke razine kao rezultat otjecanja s poljoprivrednih površina ili odlagališta otpada te onečišćenja uzrokovano ljudskim ili životinjskim otpadom. Koncentracija nitrata često varira s godišnjim dobom i može se povećati kada se rijeka napaja vodonosnicima bogatim nitratima. Koncentracije nitrata postupno rastu u brojnim europskim zemljama u posljednjih nekoliko desetljeća i ponekim slučajevima vrijednosti su udvostručene tijekom posljednjih 20 godina.

Prirodna koncentracija nitrata u podzemnoj vodi u aerobnim uvjetima je nekoliko miligrama po litri i jako ovisi o tipu tla i o geološkoj situaciji. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), prirodne razine ne prelaze 4 – 9 mg/L za nitrat i 0,3 mg/L za nitrit. Kao rezultat poljoprivrednih aktivnosti, koncentracija nitrata može lako doseći nekoliko stotina miligrama po litri. Primjerice, u podzemnim vodama u poljoprivrednom području Indije pronađene su koncentracije nitrata do 1500 mg/L. U SAD-u su nitrati prisutni u većini zaliha površinskih i podzemnih voda na razinama ispod 4 mg/L, s razinama većim od 20 mg/L u oko 3 % površinskih i 6 % podzemnih voda.

Sve veća upotreba umjetnih gnojiva, zbrinjavanje otpada i promjene u namjeni zemljišta su glavni odgovorni čimbenici za povećanje razine nitrata u podzemnim vodama tijekom posljednjih 20 godina. U Danskoj i Nizozemskoj se, primjerice, koncentracije nitrata povećavaju za 0,2 – 1,3 mg/L u nekim područjima. Zbog kašnjenja odziva podzemne vode na promjene u tlu, pojedini vodonosnici još uvijek nisu pokazali porast nitrata koji se očekuje od povećane upotrebe dušičnih gnojiva. Jednom kada nitrati dospiju u ove vodonosne slojeve, vodonosnici će i dalje biti onečišćeni desetljećima, čak i ako postoji znatno smanjenje koncentracije nitrata na površini.

U većini zemalja razina nitrata u vodi za piće dobivenoj iz površinskih voda ne prelazi 10 mg/L. Međutim, u nekim su područjima koncentracije više. U 15 europskih zemalja, postotak stanovništva koji je izložen razinama nitrata iznad 50 mg/L je između 0,5 i 10 %, što odgovara brojcima od otprilike 10 milijuna ljudi. Pojedinačni bunari u poljoprivrednim područjima pridonose povećanoj koncentraciji nitrata budući da razina nitrata u bunarskoj vodi često prelazi granicu od 50 mg/L [17].

Maksimalno dopuštena koncentracija nitrata u vodi za ljudsku potrošnju, prema Smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), te europskim i nacionalnim propisima iznosi 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /L [4 – 7].



### 2.3.2. Utjecaj nitrata na ljudsko zdravlje

Nitrati sami po sebi nisu toksični, međutim prilikom redukcije u nitrite mogu postati. Kombinacijom visokog unosa nitrata i čimbenika koji povećavaju endogenu nitrozaciju, nitrati mogu nepovoljno utjecati na zdravlje ljudi [17].

U kiselim uvjetima u želucu, nitrit se može protonirati u dušikastu kiselinu ( $\text{HNO}_2$ ), potom nastaje dušikov(III) oksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), dušikov(II) oksid ( $\text{NO}$ ) i dušikov dioksid ( $\text{NO}_2$ ). Od otkrića endogenog stvaranja dušikovog oksida, postalo je jasno da je upravo taj spoj uključen u široki raspon fizioloških učinaka posredovanih tim spojem. Neki od primjera su regulacija krvnog tlaka i protoka krvi posredovanjem vazodilatacije, održavanje tonusa krvnih žila i modulacija funkcije mitohondrija.

Metaboliti dobiveni iz nitrata, poput dušikaste kiseline ( $\text{HNO}_2$ ), su moćna nitrozirajuća sredstva za koje je poznato da potiču stvaranje N-nitrozo spojeva, za koje se pretpostavlja da su uzročnici mnogih štetnih zdravstvenih ishoda povezanih s nitratima.

Povećana razina nitrita može dovesti do methemoglobinemije (hematološkog poremećaja) kada nitriti oksidiraju  $\text{Fe}^{2+}$  ion (hemoglobin) u  $\text{Fe}^{3+}$  ion (methemoglobin) koji nema sposobnost prenošenja kisika kroz krv. Smanjen prijenos kisika se klinički može odrediti kada methemoglobin dosegne razinu od 10 % i više. Čimbenici rizika za dojenačku methemoglobinemiju su voda koja sadrži visoku razinu nitrata te hrana i lijekovi s visokom razinom nitrata [17, 18]. Potvrđena je i poveznica između izlaganja trudnica pitkoj vodi s visokom razinom nitrata i spontanih pobačaja [18].

Pojedine epidemiološke studije povezuju povećanu količinu unosa nitrata s rakom jajnika i mjehura, ali ne povezuju s rakom dojke, gušterače, bubrega, pluća, melanoma. Istraživanja su pokazala povezanost veće količine nitrata s rakom debelog crijeva, bolesti štitnjače i središnjeg živčanog sustava kao urođene mane. Međutim, i to ovisi o geografskom položaju ispitivanja te o unosu vitamina C, za kojeg je poznato da djeluje kao inhibitor stvaranja N-nitrozo spojeva [17, 18].

Očekuje se da bi se koncentracija nitrata u budućnosti mogla povećavati zbog rasta broja stanovnika, povećanja upotrebe dušičnih gnojiva i povećanja poljoprivrednih aktivnosti. Ublažavanje količine nitrata u vodama moguće je pomoću lokalnih, nacionalnih i globalnih direktiva [18].

### 2.3.3. Metode određivanja nitrata

Razvoj svih vrsta metoda koje dopuštaju određivanje različitih onečišćujućih tvari različitih elemenata potaknut je potrebom za nužnosti zaštite okoliša. Nitrati se mogu određivati u brojnim matricama, koristeći pritom različite reagense. Neke od najpoznatijih tehnika određivanja nitrata su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC), ionska kromatografija (eng. *ion chromatography*, IC), kapilarna elektroforeza, kemiluminiscencija, kolorimetrija, i neke klasične poput gravimetrijskih, titracijskih, spektrofotometrijskih (UV/VIS, IR, fluorometrijske), elektroanalitičkih (uključujući potenciometrijska mjerenja uz uporabu ion-selektivnih elektroda, voltamperometrijskih, amperometrijskih, kulometrijskih). Mnoge od tih metoda pokazale su se nedovoljno osjetljivima, selektivnima ili točnima, stoga se u posljednje vrijeme velika pažnja posvećuje ionskoj kromatografiji, koja se čini kao najperspektivnija metoda, a koju preporučuje i Američka agencija za zaštitu okoliša (eng. *United States Environmental Protection Agency*, U.S. EPA) za određivanje nitrata [8, 19].

Većina klasičnih metoda puno su dugotrajnije i mukotrpnije od ionske kromatografije, a ponekad zahtijevaju upotrebu skupih i otrovnih reagensa. Međutim, pozitivne strane klasičnih metoda su: relativno niska cijena analize, jednostavnija i jeftinija aparatura te mogućnost uporabe u više laboratorija. Glavne prednosti ionske kromatografije su: znatno kraće vrijeme analize, mogućnost analize uzoraka malog volumena, visoka osjetljivost i selektivnost te mogućnost istodobnog odvajanja i određivanja nekoliko iona ili iona istog elementa različitog oksidacijskog stanja čime se mogu dobiti opsežnije informacije o ispitivanom uzorku [8].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog rada, njihove molekulske formule, čistoća te proizvođači prikazani su u **tablici 2.**

**Tablica 2.** Popis korištenih kemikalija

NAZIV KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Kalijev nitrat	$\text{KNO}_3$	p.a.	T.T.T., Hrvatska
Kalcijev karbonat	$\text{CaCO}_3$	p.a.	E. Merck, Njemačka
Kloroform	$\text{CHCl}_3$	p.a.	Mallinckrodt Chemical, SAD
Kloridna kiselina, 37 %-tna	$\text{HCl}$	p.a.	BDH PROLABO, UK

##### 3.1.2. Uzorci vode

Uzorci vode koji su korišteni za izradu ovog rada su:

- *ultračista voda* (MilliQ)
- *vodovodna voda* – izljevno mjesto slavina na Zavodu za analitičku kemiju, FKIT

#### 3.2. INSTRUMENTI

##### 3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument koji služi da bi se precizno odredila masa tvari. Bez uporabe analitičke vage, nije moguće napraviti niti jednu kvantitativnu kemijsku analizu jer je potrebno

uvijek odvagati uzorak za analizu i potrebne količine reagensa za pripremu otopina. Bitne karakteristike vage su ispravnost i preciznost jer o tome ovisi točnost rezultata. Tijekom izrade ovog rada korištena je analitička vaga AB104 Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) (**slika 5.**)

Specifikacije vage:

- napon: 8 – 14 V

- masa: 0,1 mg – 101 g

- frekvencija: 50 – 60 Hz



**Slika 5.** Analitička vaga AB104 Mettler Toledo

### 3.2.2. pH-metar

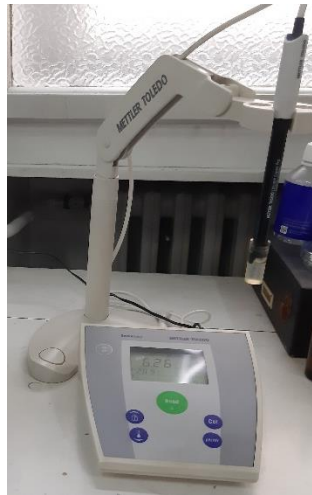
pH-metar je uređaj za potenciometrijsko određivanje pH vrijednosti. Sastoji se od mjerne elektrode koja se uroni u ispitni tekući uzorak te generira napon ( $59 \text{ mV} / \text{pH}$ ) koji je ovisan o pH-vrijednosti. Budući da je pH-vrijednost ovisna o koncentraciji, odnosno aktivitetu vodikovih iona, napon je ovisan o koncentraciji vodikovih iona. Ako je pH-vrijednost manja od 7, radi se o kiseloj otopini, ako je  $\text{pH} = 7$ , onda je otopina neutralna, a ako je pH-vrijednost veća od 7, otopina je lužnata.

pH-metar je potrebno prije svake upotrebe umjeriti puferskim otopinama poznatih pH-vrijednosti (pH vrijednosti 4 i 7).

Za određivanje pH-vrijednosti uzoraka vodovodne vode korišten je pH-metar S20 SevenEasy Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) (**slika 6.**).

Specifikacije pH-metra:

- raspon vrijednosti: 0 – 14
- rezolucija: 0,01
- temperaturni raspon: 5 °C – 105 °C



**Slika 6.** pH-metar S20 SevenEasy Mettler Toledo

### **3.2.3. „Millipore“ sustav**

Za pripremu MilliQ ultračiste vode korišten je Millipore Simplicity UV sustav (Millipore, Francuska) (**slika 7.**).



**Slika 7.** Millipore Simplicity UV Sustav

#### **3.2.4. Spektrofotometar**

Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Svjetlost iz lampe prolazi kroz monokromator, koji „izuzima“ određenu valnu duljinu svjetlosti iz kontinuiranog spektra. Zatim svjetlost prolazi kroz ispitivani uzorak i mjeri se intenzitet zračenja pomoću fotodiode ili drugog svjetlosnog senzora, te se izračunava njezina emisija. Bilježi se intenzitet zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao te nastaje apsorpcijski spektar. Postoje jednozračni i dvozračni spektrofotometri.

U ovom radu korišten je dvozračni UV/VIS spektrofotometar LAMBDA 35, Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, SAD) (**slika 8.**) koji može snimati spektre apsorpcijom ili propusnošću u intervalu valnih duljina od 190 do 1100 nm. Područje u kojem je snimljen apsorpcijski spektar otopina nitrata je od 190 do 300 nm.



**Slika 8.** UV/VIS spektrofotometar Perkin Elmer LAMBDA 35

### **3.3.METODA RADA**

#### **3.3.1. Priprema standardnih otopina**

Standardne otopine nitrata pripremljene su prema standardnoj metodi 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B. [20] Izvagano je 0,1827 g KNO<sub>3</sub> i sol je otopljena u MilliQ vodi u odmjernoj tikvici od 250 mL. Na taj način je pripremljena osnovna otopina nitrata masene koncentracije  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 100 \text{ mg/L}$ . Otopini je dodano 2 mL CHCl<sub>3</sub>/L. Tako pripremljena otopina je stabilna 6 mjeseci.

Radna otopina nitrata koncentracije  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 10 \text{ mg/L}$  pripremljena je tako da je u drugu odmjernu tikvicu od 250 mL otpipetirano 25 mL volumena osnovne otopine nitrata, ponovno je dodano 2 mL CHCl<sub>3</sub>/L i odmjerna tikvica je nadopunjena MilliQ vodom do oznake. Ova otopina je stabilna 6 mjeseci.

Pripremljene su otopine sljedećih masenih koncentracija:  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 \text{ mg/L}$  tako da su sljedeći volumeni radne otopine nitrata automatskom pipetom preneseni u odmjerne tikvice od 25 mL: 0,5; 1,25; 2,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 mL. U tikvice je dodan 1 ml HCl i nadopunjene su do oznake.

### **3.3.2. Priprema otopine kalcijevog karbonata**

Otopina kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) pripremljena je tako da je izvagano 0,2526 g  $\text{CaCO}_3$  i otopljeno je u MilliQ vodi u odmjernoj tikvici od 250 mL da bi se dobila otopina  $\text{CaCO}_3$  masene koncentracije  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$ . Ova otopina korištena je za ispitivanje robusnosti metode.

### **3.3.3. Priprema uzoraka vodovodne vode**

Uzorkovanje vodovodne vode provedeno je na Zavodu za analitičku kemiju, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu tako da je mlaz vode pušten da teče dvije minute, a zatim je izravno napunjena u tikvice od 50 mL, zatim je uzorku dodano 1 mL 1 M HCl. pH-vrijednost vodovodne vode potrebno je sniziti ispod 2 kako bi se onemogućile moguće interferencije hidroksida i karbonata. Kloridi nemaju utjecaj na određivanje nitrata ovom metodom. Ako uzorak vode sadrži talog, potrebno ga je filtrirati [20]. Uzorci nisu sadržavali talog, pa filtriranje nije bilo potrebno, a pH-vrijednost nakon dodatka HCl-a snižena je na vrijednost  $\text{pH} \approx 1,9$ . Potom je uzorak prebačen u odmjernu tikvicu od 25 mL. Sva tri uzorkovanja su provedena na isti način. Prvo uzorkovanje provedeno je 22.03.2021., drugo uzorkovanje 08.04.2021., a treće uzorkovanje 12.04.2021.g.

### **3.3.4. Snimanje na spektrofotometru**

Snimanje na UV/VIS LAMBDA 35 Perkin Elmer spektrofotometru se provodilo u odnosu na slijepu probu (ultračista voda). Otopine su prenesene u staklene kivete (dimenzije 1x1 cm) te je na računalnom programu LAMBDA 35 snimljen apsorpcijski spektar standardnih otopina i izmjerena je apsorbancija standardnih otopina i uzoraka vodovodne vode pri valnoj duljini 220 nm [20].

### **3.3.5. Izvedbene karakteristike**

U svrhu validacije metode ispitane su sljedeće izvedbene karakteristike: selektivnost, linearnost, osjetljivost, granica kvantifikacije i granica detekcije, preciznost (ponovljivost i međupreciznost), istinitost, radno područje te robusnost metode.

S obzirom da je u ovom radu korištena standardna metoda kojoj je selektivnost ispitana i potvrđena tijekom postupka standardizacije, selektivnost nije bilo potrebno provjeriti. Ipak je provjerena snimanjem i usporedbom apsorpcijskih spektara standardnih otopina nitrata i uzorka vodovodne vode.



Linearnost metode provjerena je izračunavanjem koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) metodom linearne regresije na temelju eksperimentalnih podataka. Pri tome izmjerena je apsorbancija otopina različitih koncentracija nitrata. Svaka otopina izmjerena je 3 puta. Na temelju nagiba umjernog pravca određena je osjetljivost metode, a na temelju nagiba i odsječka pravca na ordinati, izračunate su granica kvantifikacije (GK) i granica detekcije (GD) prema formulama (3) i (4).

Preciznost metode ispitana je kao ponovljivosti i međupreciznosti. Kako bi se ispitala ponovljivost mjerenja, pripremljene su standardne otopine pri tri koncentracije unutar radnog područja (najniža, srednja i najviša koncentracija) te je napravljeno 10 mjerenja svake otopine. Međupreciznost je ispitana tako da su ponovno pripremljene standardne otopine nitrata (vaganje kalijevog nitrata na analitičkoj vagi, otapanje – pripremanje osnovne otopine nitrata, zatim pripremanje radne otopine) pri tri koncentracije unutar radnog područja (najniža, srednja i najviša koncentracija) idući dan i ponovno je izmjerena apsorbancija otopina. Svaka otopina izmjerena je 10 puta. Nakon mjerenja izračunate su: srednja vrijednost, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD).

Istinitost je ispitana tako da je izmjerena apsorbancije triju standardnih otopina različitih koncentracija unutar radnog područja te su srednje vrijednosti apsorbancija uspoređene s teoretskom vrijednosti apsorbancije (dobivene iz jednadžbe umjernog pravca).

Ponovljivost i istinitost ispitane su pri koncentraciji granice kvantifikacije (GK) na isti način kao i za tri koncentracije iz radnog područja. Apsorbancija je mjerena 10 puta.

Radno područje je određeno tako da pokriva barem 80 – 120 % koncentracije ispitivanog uzorka, te da bude omeđen granicama koje imaju zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost.

Robustnost je ispitana tako da je srednjoj koncentraciji unutar radnog područja dodan određen volumen kalcijevog karbonata. Kalcijev karbonat je dodan za ispitivanje robusnosti zato što prema metodi ispitivanja, moguće su interferencije karbonata [20]. Apsorbancija je mjerena 10 puta, a nakon mjerenja bilo je potrebno izračunati srednju vrijednost, standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) i iskorištenje.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

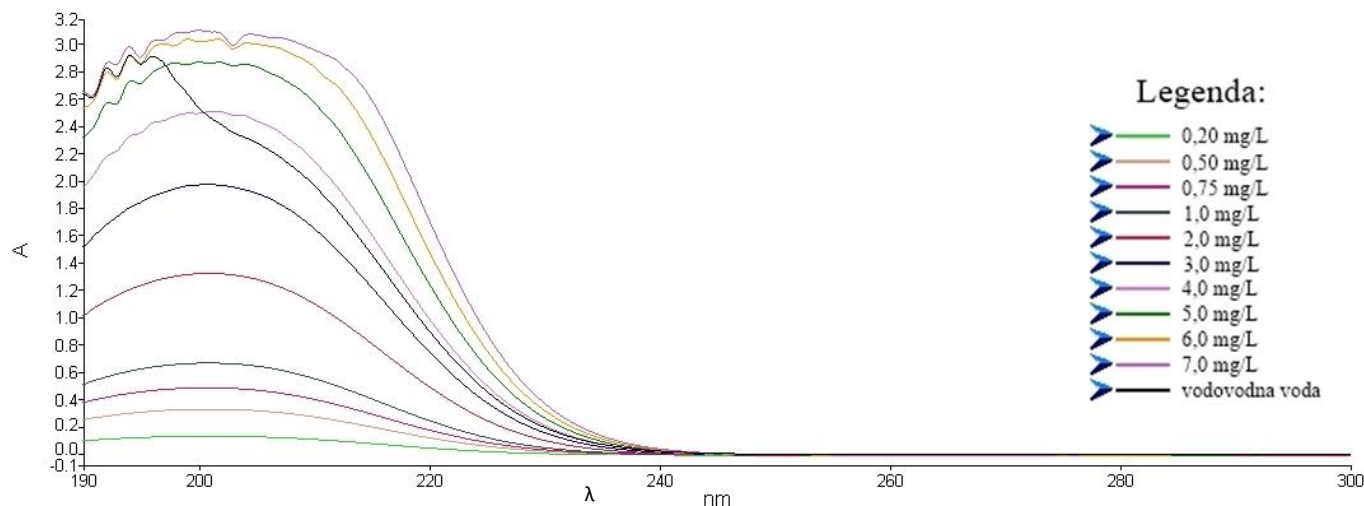
Prvi korak pri validaciji metode je definirati kriterije prihvatljivosti pojedinih izvedbenih karakteristika. Oni se mogu definirati prema vrijednostima definiranim u samoj metodi ili na temelju dobre laboratorijske prakse. S obzirom da u standardnoj metodi primijenjenoj u ovom radu nisu navedene vrijednosti koje bi se mogle postaviti kao kriteriji prihvatljivosti, oni su definirani na temelju dobre laboratorijske prakse (**Tablica 3.**).

**Tablica 3.** Kriteriji prihvatljivosti

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti
Specifičnost/selektivnost	
Linearnost	$R^2 > 0,99$
Preciznost	
Ponovljivost	RSD < 10 %
Medupreciznost	RSD < 15 %
Istinitost	90 % < $I$ < 110 %
Granica kvantifikacije (GK) (mg L <sup>-1</sup> )	
Granica detekcije (GD) (mg L <sup>-1</sup> )	
Radno područje	

### 4.1. SELEKTIVNOST

Prvo su snimljeni apsorpcijski spektar otopina nitrata različitih koncentracija, odnosno ovisnost apsorbancije,  $A$ , o valnoj duljini,  $\lambda$  (nm) (**slika 9.**). Iako je maksimum apsorbancije standardnih otopina na približno 200 nm, apsorbancija je mjerena pri 220 nm – prema standardnoj metodi 4500 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B. Preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da se mjerenjem apsorbancije pri 220 nm postiže bolja linearna povezanost apsorbancije s koncentracijom ( $R^2$  bliži 1). Rezultati preliminarnih mjerenja prikazani su u **tablici P1.** i na **slici P1.** u prilogu.



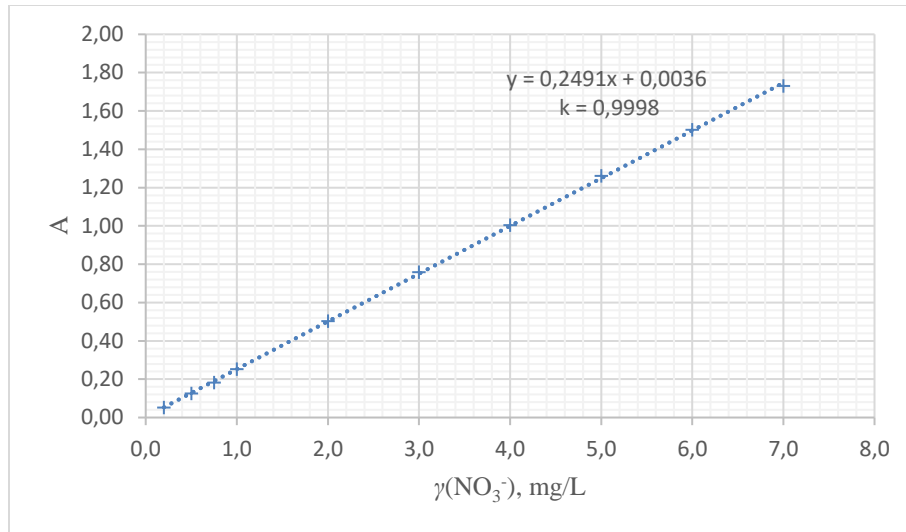
**Slika 9.** Apsorpcijski spektar standardnih otopina nitrata koncentracije 0,20 – 7,0 mg/L i uzorka vodovodne vode

Prema već spomenutoj metodi, ukoliko uzorak vode sadrže otopljene organske tvari, mjerenje apsorbancija potrebno je provesti i pri 275 nm, te dobivenu vrijednost pomnožiti s 2, a zatim oduzeti od apsorbancije uzorka kako bi se odredila apsorbancija nitrata. Dodatno mjerenje pri 275 nm provodi se iz razloga što organska tvar apsorbira i pri 220 nm kao i nitrati. Međutim, nitrati ne apsorbiraju zračenje valne duljine 275 nm. Iz apsorpcijskog spektra (**slika 9.**), vidljivo je da je apsorpcija pri 275 nm jednaka nuli, te u ovom radu nije provedena navedena korekcija.

Usporedbom spektra vodovodne vode sa spektrima otopina nitrata različitih koncentracija može se potvrditi selektivnost metode.

#### 4.2. LINEARNOST I OSJETLJIVOST

Pri 220 nm snimljena je apsorbancija za standardne otopine koncentracije  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,20 - 7,0$  mg/L te su rezultati prikazani na **slici 10.**



**Slika 10.** Umjerni pravac

Koeficijent determinacije,  $R^2$  iznosi 0,9998, te budući da je  $0,9998 > 0,99$ , potvrđena je linearna ovisnost apsorbancije,  $A$ , o masenoj koncentraciji nitrata,  $\gamma(\text{NO}_3^-)$  (mg/L).

Jednadžba ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji je:  $A = 0,2491 \cdot \gamma(\text{NO}_3^-, \text{mg/L}) + 0,0036$ . Budući da jednadžba umjernog pravca sadrži odsječak na ordinati, smatra se da je u mjerenje uključena sustavna pogreška, koja može biti uzrokovana pogreškom instrumenta, metode ili analitičara. No, vrijednost odsječka je vrlo mala, te i sustavnu pogrešku možemo smatrati zanemarivom.

Osjetljivost metode,  $a$ , iznosi  $0,2491 \text{ L/mg NO}_3^-$  u rasponu koncentracija  $0,2 - 7,0 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$ .

Prema Lambert-Beer-ovom zakonu i jednadžbi (13), apsorpcijski koeficijent nitrata,  $a$ , iznosi:

$$a = \frac{A}{bc} = \frac{0,126}{1 \text{ cm} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}} = 252 \text{ L/g cm}$$

Molarni apsorpcijski koeficijent,  $\varepsilon$ , prema Lambert-Beer-ovom zakonu i jednadžbi (14) iznosi:

$$\varepsilon = \frac{A}{bc} = \frac{A}{b \cdot \frac{\gamma}{M}} = \frac{0,126}{1 \text{ cm} \cdot \frac{0,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}}{62 \text{ g/mol}}} = 15624 \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 15624 \text{ l/M cm}$$

### 4.3. PRECIZNOST

#### 4.3.1. Ponovljivost

Prilikom ispitivanja ponovljivosti rezultata mjerenja izmjerene su apsorbancije otopina nitrata koncentracije 0,20; 3,4 i 7,0 mg/L. Rezultati su prikazani u **tablicama 3. – 5.**

**Tablica 3.** Rezultati ponovljivosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,20 \text{ mg/L}$

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
1	0,052
2	0,054
3	0,053
4	0,050
5	0,050
6	0,055
7	0,054
8	0,056
9	0,056
10	0,052
Srednja vrijednost	0,053
Standardno odstupanje, SD	0,0022
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)	4,1

**Tablica 4.** Rezultati ponovljivosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 3,4 \text{ mg/L}$

<b>Broj mjerenja</b>	<b>Apsorbancija, A</b>
1	0,865
2	0,874
3	0,875
4	0,865
5	0,868
6	0,857
7	0,868
8	0,867
9	0,872
10	0,865
<b>Srednja vrijednost</b>	0,868
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,00525
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	0,606

**Tablica 5.** Rezultati ponovljivosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 7,0 \text{ mg/L}$

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
1	1,794
2	1,783
3	1,796
4	1,792
5	1,791
6	1,798
7	1,804
8	1,785
9	1,795
10	1,797
Srednja vrijednost	1,794
Standardno odstupanje, SD	0,006169
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)	0,3440

Rezultati ispitivanja ponovljivosti su u skladu s definiranim kriterijem prihvatljivosti (**tablica 3.**). Relativno standardno odstupanje (RSD) kod navedenih koncentracija ne prelazi granicu prihvatljivosti od 10 %.

#### **4.3.2. Međupreciznost**

U svrhu određivanja međupreciznosti, ispitane su otopine istih masene koncentracije nitrata kao za određivanje ponovljivosti, a rezultati međupreciznosti prikazani su u **tablicama 6. – 8.**

**Tablica 6.** Rezultati međupreciznosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,20 \text{ mg/L}$ 

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
<b>Prvi dan</b>	
1	0,056
2	0,056
3	0,052
4	0,054
5	0,053
6	0,055
7	0,053
8	0,054
9	0,054
10	0,055
<b>Drugi dan</b>	
1	0,056
2	0,056
3	0,052
4	0,054
5	0,053
6	0,055
7	0,053
8	0,054
9	0,054
10	0,055
<b>Srednja vrijednost</b>	0,054
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,0018
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	3,4



**Tablica 7.** Rezultati međupreciznosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 3,4 \text{ mg/L}$ 

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
<b>Prvi dan</b>	
1	0,898
2	0,893
3	0,898
4	0,904
5	0,903
6	0,902
7	0,901
8	0,892
9	0,909
10	0,902
<b>Drugi dan</b>	
1	0,898
2	0,893
3	0,898
4	0,904
5	0,903
6	0,902
7	0,901
8	0,892
9	0,909
10	0,902
<b>Srednja vrijednost</b>	0,884
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,0174
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	1,98

**Tablica 8.** Rezultati međupreciznosti za  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 7,0 \text{ mg/L}$ 

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
<b>Prvi dan</b>	
1	1,809
2	1,797
3	1,799
4	1,787
5	1,813
6	1,829
7	1,818
8	1,823
9	1,816
10	1,796
<b>Drugi dan</b>	
1	1,809
2	1,797
3	1,799
4	1,787
5	1,813
6	1,829
7	1,818
8	1,823
9	1,816
10	1,796
<b>Srednja vrijednost</b>	1,801
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,0128
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	0,713

Rezultati dani u **tablicama 6. – 8.** pokazuju da su relativna standardna odstupanja u skladu s prihvatljivim relativnim standardnim odstupanjem od 15 % prema **tablici 3.**

#### 4.4. ISTINITOST

U **tablici 9.** prikazani su rezultati dobiveni ispitivanjem istinitosti te su izraženi kao iskorištenje (%).

**Tablica 9.** Istinitost rezultata ispitivanja

Koncentracija nitrata, $\gamma(\text{NO}_3^-)$ , mg/L	Apsorbancija, <i>A</i> (izmjerena)	Apsorbancija, <i>A</i> (teoretska)	Iskorištenje, <i>I</i> (%)
0,20	0,053	0,053	100,0
3,4	0,868	0,851	102,0
7,0	1,794	1,747	102,7

Rezultati potvrđuju istinitost mjerenja jer je iskorištenje u rasponu od 100,0 – 102,7 %, što je u skladu s kriterijem prihvatljivosti iz **tablice 3.**, prema kojem iskorištenje, *I*, treba biti u rasponu između 90 i 110 %.

#### 4.5. GRANICA DETEKCIJE I GRANICA KVANTIFIKACIJE

##### 4.5.1. Granica detekcije

Granica detekcije (GD) izračunata je prema formuli (1) i iznosi:  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,029$  mg/L.

##### 4.5.2. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (GK) izračunata je prema formuli (2) i iznosi:  $\gamma(\text{NO}_3^-) = 0,088$  mg/L.

Za granicu kvantifikacije ispitana je ponovljivost, a rezultati su prikazani u **tablici 10.**

**Tablica 10.** Rezultati ponovljivosti za GK = 0,088 mg/L

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
1	0,015
2	0,011
3	0,011
4	0,008
5	0,005
6	0,002
7	0,002
8	0,001
9	0
10	0
<b>Srednja vrijednost</b>	0,0055
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,0054
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	98
<b>Iskorištenje (%)</b>	21

Preciznost mjerenja pri računski određenoj granici kvantifikacija, iskazana kao relativno standardno odstupanje (RSD) iznosi 98 %, a iskorištenje iznosi 20 %. Prema definiranim kriterijima prihvatljivosti, vrijednosti RSD i iskorištenja za granicu kvantifikacije ne ispunjavaju zahtjeve. Stoga je za granicu kvantifikacije postavljena najmanja koncentracija linearnog područja 0,2 mg/L.

#### **4.6. RADNO PODRUČJE**

Raspon koncentracija unutar kojega je dokazana linearnost, te su potvrđene točnost (iskazana kao preciznost i istinitost) je radno područje. Donja granica radnog područja iznosi 0,2 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a gornja granica radnog područja iznosi 7,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Dakle, radno područje je interval između 0,20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i 7,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### 4.7. ROBUSTNOST METODE

Rezultati ispitivanja robustnosti metode prikazani su u **tablicama 11. – 13.** Robusnost metode je ispitivana tako da je u otopinu nitrata koncentracije 3,4 mg/L dodano: 0,5 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$  (**tablica 11.**), 1,0 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$  (**tablica 12.**) i 2,5 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$  (**tablica 13.**).

**Tablica 11.** Ispitivanje robustnosti metode prilikom dodatka 0,5 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$ .

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
1	0,904
2	0,906
3	0,898
4	0,915
5	0,908
6	0,916
7	0,904
8	0,912
9	0,918
10	0,939
Srednja vrijednost	0,912
Standardno odstupanje, SD	0,0114
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)	1,25
Iskorištenje (%)	107

**Tablica 12.** Ispitivanje robusnosti metode prilikom dodatka 1,0 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$ .

<b>Broj mjerenja</b>	<b>Apsorbancija, A</b>
1	0,915
2	0,909
3	0,912
4	0,929
5	0,900
6	0,903
7	0,907
8	0,947
9	0,904
10	0,914
<b>Srednja vrijednost</b>	0,914
<b>Standardno odstupanje, SD</b>	0,0142
<b>Relativno standardno odstupanje, RSD (%)</b>	1,55
<b>Iskorištenje (%)</b>	107

**Tablica 13.** Ispitivanje robusnosti metode prilikom dodatka 2,5 mL  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$ .

Broj mjerenja	Apsorbancija, A
1	0,892
2	0,912
3	0,894
4	0,921
5	0,878
6	0,891
7	0,904
8	0,887
9	0,892
10	0,889
Srednja vrijednost	0,896
Standardno odstupanje, SD	0,0127
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)	1,42
Iskorištenje (%)	105

Na temelju rezultata u **tablicama 11. – 13.** može se potvrditi da je metoda otporna na male promjene, odnosno da je robusna jer prilikom dodatka malih volumena (0,5; 1,0 i 2,5 mL) kalcijevog karbonata masene koncentracije  $\gamma(\text{CaCO}_3) = 1000 \text{ mg/L}$ , relativno standardno odstupanje (RSD) ne prelazi granicu od 10 %, te iskorištenje ne prelazi gornju granicu od 110 %. Međutim, promjene su vidljive jer je relativno standardno odstupanje (RSD) pri istoj koncentraciji (3,4 mg/L  $\text{NO}_3^-$ ) (**tablica 4.**) veće prilikom dodatka kalcijevog karbonata, što ukazuje na to da su se dogodile promjene.

#### **4.8.SAŽETAK REZULTATA VALIDACIJE**

Rzultati validacije spektrofotometrijske metode za određivanje nitrata u uzorcima vode sažeto su prikazani u **tablici 14.**

**Tablica 15.** Rezultati validacije metode

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljen kriterij DA / NE
<b>Specifičnost/selektivnost</b>			DA
<b>Linearnost</b>	$R^2 > 0,99$	$R^2 = 0,9998$	DA
<b>Preciznost</b>			
<b>Ponovljivost</b>	RSD < 10 %		DA
<b>0,20 mg/L</b>		RSD = 4,1 %	DA
<b>3,4 mg/L</b>		RSD = 0,61 %	DA
<b>7,0 mg/L</b>		RSD = 0,34 %	DA
<b>Međupreciznost</b>	RSD < 15 %		DA
<b>0,20 mg/L</b>		RSD = 3,4 %	DA
<b>3,4 mg/L</b>		RSD = 1,98 %	DA
<b>7,0 mg/L</b>		RSD = 0,71 %	DA
<b>Istinitost</b>	$90 \% < I < 110 \%$		DA
<b>0,20 mg/L</b>		$I = 100,0$	DA
<b>3,4 mg/L</b>		$I = 102,0$	DA
<b>7,0 mg/L</b>		$I = 102,7$	DA
<b>Granica kvantifikacije (GK) (mg/L)</b>		0,20 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
<b>Granica detekcije (GD) (mg/L)</b>		0,029 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
<b>Radno područje</b>		0,20 mg/L – 7,0 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	

Usporedbom rezultata validacije s postavljenim kriterijima, može se potvrditi da je metoda prihvatljiva za određivanje nitrata u uzorcima vode jer je zadovoljen kriterij selektivnosti, linearnosti, te je potvrđena ponovljivost i međupreciznost, istinitost. Za granicu detekcije (GD) određena je koncentracija 0,029 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a kao granica kvantifikacije (GK) određena je koncentracija 0,20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Radno područje je određeno kao interval između koncentracija nitrata 0,20 i 7,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



#### 4.9. ANALIZA REALNIH UZORAKA

Validirana metoda primijenjena je za određivanje nitrata u uzorcima vodovodne vode. Rezultati analize prikazani su u **Tablici 15**.

**Tablica 15.** Rezultati analize uzoraka vodovodne vode

Uzorak vodovodne vode	Apsorbancija, $A$	Srednja apsorbancija, $\bar{A}$	Koncentracija nitrata, $\gamma(\text{NO}_3^-)$ , mg/L	Standardno odstupanje, SD	Relativno standardno odstupanje, RSD (%)
1	0,950	0,950	3,80	0,000577	0,0608
	0,950				
	0,951				
2	0,902	0,902	3,61	0	0
	0,902				
	0,902				
3	0,796	0,796	3,18	0	0
	0,796				
	0,796				

Na temelju rezultata iz **tablice 15.** može se primijetiti da koncentracije nitrata u uzorcima vodovodne vode iznose između 3,18 i 3,80 mg/L  $\text{NO}_3^-$ , što je znatno ispod granice dopuštene koncentracije nitrata po litri vode, koja 50 mg/L  $\text{NO}_3^-$  prema Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe [21].

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata provedenih istraživanja u ovom radu, može se zaključiti da je metoda 4500 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B spektrofotometrijskog određivanja nitrata pri valnoj duljini od 220 nm selektivna i linearna u području koncentracija 0,20 – 7,0 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije,  $R^2$ , iznosa 0,9998. Osjetljivost metode u ovom području koncentracija iznosi 0,2491 L/mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Određene su granica detekcije (GD) koja iznosi 0,029 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, te granica kvantifikacije (GK) koja iznosi 0,20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Obje koncentracije su znatno ispod propisanih vrijednosti što ukazuje na visoku osjetljivost metode. Prvotno određena granica kvantifikacije (GK) koja iznosi 0,088 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> je odbačena jer ne zadovoljava kriterij preciznosti i istinitosti.

Potvrđena je preciznost metode ispitivanjem ponovljivosti i međupreciznosti. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za koncentracije 0,20 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3,4 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i 7,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ne pokazuju veliko rasipanje, relativna standardna odstupanja (RSD) ne prelaze granicu od 10 %. Međupreciznost je potvrđena pri istim koncentracijama jer relativna standardna odstupanja (RSD) spomenutih koncentracija ne prelaze kriterij od 15 %.

Istinitost metode je potvrđena preko iskorištenja koje je u skladu s postavljenim kriterijem ±10 %.

Metoda je robusna jer prilikom malih promjena, ne dolazi do značajnih promjena. Očekivano je da bi relativno standardno odstupanje (RSD) moglo biti veće od prihvatljivih 10 % dodatkom karbonata, budući da oni mogu stvarati interferencije. Međutim, relativno standardno odstupanje je i dalje bilo ispod granice od 10 %, tako da se može zaključiti da ne dolazi do značajnih promjena.

Analizom realnih uzoraka vodovodne vode, određeno je da maksimalna količina nitrata u vodovodnoj vodi iznosi 3,84 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, što je značajno ispod granice koju je odredilo Ministarstvo zdravlja.

Na temelju svih dobivenih podataka, može se zaključiti da je metoda prikladna za određivanje nitrata u vodovodnoj vodi.

## 6. LITERATURA

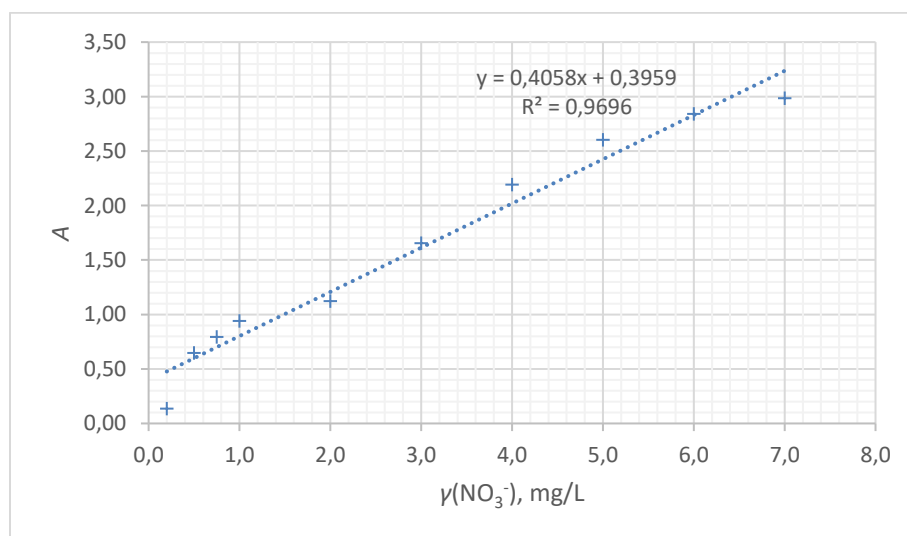
1. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 241 – 308.
2. Z. Knežević, Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 3(10) (2007) 1 - 5.
3. Zakon o vodi za ljudsku potrošnju, Narodne novine 56/13, 2013.
4. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju, Narodne novine 64/15, 2015.
5. Pravilnik o izmjenama Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, Narodne novine 141/13, 2013.
6. Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, Narodne novine 125/13, 2013.
7. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, Narodne novine 128/15, 2015.
8. R. Michalski, I. Kurzyca, Determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography, *Polish Journal of Environmental Studies* 15(1) (2006) 5 – 18.
9. ISO 9000, Quality management systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva, 2005.
10. Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, B. Magnusson, U. Örnemark (ur.), 2. izdanje, 2014., 7 – 40.
11. European Medicines Agency, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, London, 1995.
12. M. Thompson, S: L. R. Ellison, R. Wood R, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report), *Pure and Applied Chemistry* 74(5) (2002) 835- 855.
13. K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda-osnovna načela, *Svijet po mjeri* 1 (2012) 61 – 64.
14. I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry* 23(8) (2004) 535 – 552.

15. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry, Spectroscopic Methods of Analysis*, McGraw-Hill, 2000., str. 369 – 388.
16. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=57377> (pristup 26. 06. 2021.)
17. World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality*, 2. izdanje, dodatak Vol. 2. Health criteria and other supporting information, Geneva, 1998.
18. M. H. Ward, R. R. Jones, J. D. Brender, T. M. de Kok, P. J. Weyer, B. T. Nolan, C. M. Villanueva, S. G. van Breda, Drinking water nitrate and human health: an updated review, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(7) (2018) 1557.
19. M. Akyüz, S. Ata, Determination of low level nitrite and nitrate in biological, food and environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection, *Talanta* 79(3) (2009) 900 – 904.
20. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 21. izdanje, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, 2005.
21. Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe, Narodne novine 125/2017, 2017.

## 7. PRILOG

**Tablica P1.** Rezultati preliminarnog mjerenja apsorbancije pri 200 nm

Koncentracija, $\gamma(\text{NO}_3^-)$ , mg/L	Apsorbancija, A
0,20	0,135
0,50	0,646
0,75	0,793
1,0	0,939
2,0	1,121
3,0	1,655
4,0	2,191
5,0	2,602
6,0	2,841
7,0	2,986



**Slika P1.** Umjerni pravac preliminarnog mjerenja apsorbancije pri 200 nm

## 8. ŽIVOTOPIS

Školovanje sam započela 2005.g. u OŠ Šimuna Kožičića Benje u Zadru. 2013.g. upisala sam Gimnaziju Franje Petrića u Zadru koju sam završila s odličnim uspjehom te sam 2017.g. nastavila školovanje na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, na smjeru Kemija i inženjerstvo materijala.

Stručnu praksu odradila sam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Tomislava Jednačka, gdje sam analizirala asfaltene iz uzoraka nafte pomoću spektroskopije NMR.

Od 2019.g. sudjelujem u „Buddy“ projektu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Od stranih jezika koristim se engleskim (C1) i njemačkim (B1) u govoru i pismu. Aktivno koristim Microsoft Office programski paket, te sam upoznata s radom u Matlabu, OriginPro 8, Bruker Topspin.