Izvedbene značajke spektrofotometrijske metode određivanja nitrata u vodi za ljudsku potrošnju

Penava, Ariana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:999889

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ariana Penava

IZVEDBENE ZNAČAJKE SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA NITRATA U VODI ZA LJUDSKU POTROŠNJU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, veljača, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Upravljanje kakvoćom u laboratoriju
Tema rada je prihvaćena na X (desetoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 12. srpnja 2016.
Mentor: doc. dr. sc. *Ivana Flanjak*
Pomoć pri izradi:

Izvedbene značajke spektrofotometrijske metode određivanja nitrata u vodi za ljudsku potrošnju

Ariana Penava, 327-DI

Sažetak: (*najviše 200 riječi*)
Validacija jest postupak ispitivanja i prikupljanja objektivnih dokaza s ciljem utvrđivanja da odabrana metoda služi namjeni. Validirane metode osiguravaju veću pouzdanost i vjerodostojnost rezultata analize. Ispitivanje vode na obavezni parametar nitrata zakonski je reguliran s obzirom na dvojbe oko mogućnosti stvaranja kancerogenih spojeva i izravan utjecaj na zdravlje ljudi. U radu je validirana UV spektrofotometrijska metoda, koja se koristi u rutinskom radu u laboratoriju ZZJZ PSŽ. Određene su sljedeće izvedbene značajke: linearnost, preciznost, ponovljivost, istinitost, robusnost, granice detekcije i kvantifikacije. Utvrđeno je da je spektroskopska metoda linearna s prihvatljivim granicama detekcije i kvantifikacije kao i s prihvatljivim iskorištenjem. Preciznost metode izražena kao ponovljivost mjerenja i međupreciznost zadovoljava preporuke granica prihvatljivosti za relativno standardno odstupanje kao i zahtjeve propisa. Izvedbene značajke određene u ovom radu pokazale su da je metoda prikladna namjeni, te je preporuka u daljnjem radu laboratorija koristiti validiranu spektrofotometrijsku metodu određivanja nitrata u vodi za ljudsku potrošnju.

Ključne riječi: validacija, izvedbene značajke, nitrati, voda za ljudsku potrošnju

Rad sadrži: 38 stranica
5 slika
8 tablica
0 priloga
40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Mirna Habuda-Stanić*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Ivana Flanjak*	član-mentor
3.	prof. dr. sc. *Ljiljana Primorac*	član
4.	prof. dr. sc. *Daniela Čačić Kenjerić*	zamjena člana

Datum obrane: 24. veljače 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Food Quality
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food science and nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Laboratory Quality Management
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X (the tenth) held on July 12, 2016.
Mentor: *Ivana Flanjak*, PhD, assistant prof.
Technical assistance:

Method performance characteristics for spectrophotometric determination of nitrate in water intended for human consumption

Ariana Penava, 327-DI

Summary: (*up to200 words*)
Method validation is procedure of fitness for purpose confirmation by examination and provision of objective evidences that the particular requirements are fulfilled. Validated methods provide higher reliability and authenticity in obtained results. Determination of nitrate concentration is obligatory chemical parameter when water quality is evaluated due to the potential effect of nitrates on human health. UV spectrophotometric method, which is used in routine work in laboratory of Croatian Institute of Public Health Pozega-Slavonia County, was validated. Following method performance characteristics were determined: linearity, precision, trueness, robustness, limit of detection and limit of quantification. The results showed that the spectrophotometric method is linear with acceptable limits of detection and quantification as well as acceptable recovery. Method precision was evaluated through measurement repeatability and intermediate precision. Relative standard deviations for both precision parameters are in compliance with proposed recommendations and requirements defined by law. Method performance characteristics determined in this work showed that used method is fit for purpose. Therefore, the validated method should be used in further routine work in laboratory for nitrate determination in water.

Key words: validation, performance characteristics, nitrate, water intended for human consumption

Thesis contains: 38 pages
5 figures
8 tables
0 supplements
40 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Mirna Habuda-Stanić*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Ivana Flanjak*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Ljiljana Primorac*, PhD, prof. — member
4. *Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, prof. — stand-in

Defense date: February 24, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem prvenstveno svojoj obitelji mužu i djeci na strpljivosti, potpori i razumijevanju, svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Flanjak na nesebičnoj pomoći i bezuvjetnom razumijevanju, te neograničenoj raspoloživosti, vjeri i bodrenju. Nadalje zahvaljujem prof. dr. sc. Danieli Čačić Kenjerić na ogromnoj brizi, trudu, raspoloživosti, potpori i poticaju koji je bio snažno sredstvo da dođem do kraja. Zahvaljujem svojoj kolegici Lidiji Šoher na bezgraničnoj pomoći, trudu, nesebičnoj pomoći u svemu od samoga početka do samoga kraja, gđi. Renati Rašić koja je uvijek tu za svakog studenta, koja nesebično odvaja vrijeme pomažući i u beznadnim situacijama te svim divnim profesorima koji su se nesebično trudili i bili uvijek na raspolaganju.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. VALIDACIJA I IZVEDBENE ZNAČAJKE METODA 4

2.1.1. Selektivnost i specifičnost metode 6

2.1.2. Linearnost 6

2.1.3. Preciznost 8

2.1.4. Istinitost 9

2.1.5. Robusnost 10

2.1.6. Granica detekcije i kvantifikacije 11

2.2. VODA 13

2.3. NITRATI 15

2.3.1. Zdravstveni rizik 16

2.3.2. Metode određivanja nitrata 17

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. ZADATAK 20

3.2. UZORCI 20

3.3. METODA 20

3.4. IZVEDBENE ZNAČAJKE 21

4. REZULTATI 23

5. RASPRAVA 28

6. ZAKLJUČCI 32

7. LITERATURA 34

Popis oznaka, kratica i simbola

AOAC	Međunarodna udruga službenih analitičkih kemičara (eng. Association of Offical Analytical Chemists)
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HS	Hrvatski sabor
MZ	Ministarstvo zdravlja
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)

1. UVOD

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 laboratoriju postiže se implementacijom sustava kvalitete, kontrolom kvalitete (unutarnjom i vanjskom) te upravljanjem 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 (Knežević, 2007). Validacija je proces dokazivanja izvedbenih značajki metode, njezinih ograničenja i definiranje čimbenika koji mogu utjecati na izvedbene značajke. Svrha samog postupka validacije jest ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza ustvrditi da odabrana metoda služi 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 (Kaštelan-Macan, 2003; Lazarić, 2012).

Voda, kao i svaka namirnica, podliježe ispitivanjima kvalitete, a u zakonskoj regulativi definirani su opseg ispitivanja, učestalost kao i maksimalno dozvoljene koncentracije pojedinih parametara sukladnosti (HS, 2013; 2015; MZ, 2013b; 2013c; 2015). Smanjivanjem dostupnosti vode za piće nameće se pitanje o postojećim količinama i tvarima koje sadrže s obzirom na velike zagađivače i poljoprivredne proizvodnje. Veliki imperativ se postavlja na nitrite odnosno nitrate i njihovo povezivanje sa pojavom zloćudnih bolesti (Hem, 1985; Mayer, 2008).

Obzirom da nije propisana službena metoda za određivanje koncentracije nitrata u vodi za ljudsku potrošnju, koriste se različite tehnike određivanja kao što su: ionska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, kapilarna elektroforeza, spektrofotometrijske metode kao i različiti sustavi temeljeni na principu analize injektirane u protok (Padarauskas i sur., 1998; Mikuška i Večeřa, 2002; Doane i Horwáth, 2003; APHA, AWWA i WEF, 2005; Kodamatani i sur., 2009).

Cilj rada bio je odrediti izvedbene značajke spektrofotometrijske metode za određivanje nitrata u vodi za ljudsku potrošnju kako bi se procijenila prikladnost metode koja se koristi u laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Požeško-Slavonske županije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VALIDACIJA I IZVEDBENE ZNAČAJKE METODA

Validacija je postupak kojim se određuje prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu i prilikom toga sve dokumentira. Validirane metode osiguravaju veću pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Opseg validacije biti će različit za kvantitativne i kvalitativne metode ovisno o vrsti i pojavnosti analita. Validacija može biti potpuna, u slučaju kada se određuju sve izvedbene značajke metode ili djelomična. Sam opseg validacije određuju na prvom mjestu tehničke mogućnosti kao i troškovi te rizik, upotreba metode u laboratoriju (potpuno nova metoda, ili je metoda već korištena u laboratoriju i karakterizirana međulaboratorijskim ispitivanjima) i učestalost njezine uporabe. Svakom problemu treba pristupiti individualno da bi se dobio dokaz svrhovitosti (Kaštelan-Macan, 2003; Knežević, 2007; Lazarić, 2012).

Prikladnost namjeni provjerava se određivanjem izvedbenih značajki koje se odnose na metodu i analit. Izvedbene značajke 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 (Kaštelan-Macan, 2003). Osnovnim izvedbenim značajkama koje se određuju prilikom validacije metoda smatraju se: linearnost, selektivnost i specifičnost metode, granica detekcije i granica kvantifikacije analita, radno područje, preciznost, istinitost te robusnost (Kaštelan-Macan, 2003; Taverniers i sur., 2004; Lazarić, 2012). Postoje i druge izvedbene značajke metoda s obzirom na izabranu analitičku metodu i mjerni instrument kao i broj i vrstu paralelnih određivanja analita te iskoristivost (Kaštelan-Macan, 2003). Da bi se odabrala optimalna metoda važno je nekoliko parametara kao što su iskustvo, znanje, dostupnost opreme te educiranost. Na osnovu tih parametara radi se plan validacije za pojedine metode.

Validaciju treba provoditi pri uvođenju nove metode, za nenormirane metode i one razvijene u vlastitom laboratoriju, te kada se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja ili u različitim laboratorijima kao i u istim laboratorijima, ali ju izvode različiti analitičari na različitim instrumentima, prilikom prenamjene ili modifikacije postojeće metode, odnosno nakon svake promjene ili većeg servisa instrumenta (Taverniers i sur., 2004; Kaštelan-Macan, 2003).

Preporučljivo ju je raditi u određenim vremenskim razdobljima za utvrđivanje standardnog operativnog postupka. U slučaju kada podaci kontrole kvalitete pokazuju da se rezultati dobiveni normiranom metodom s vremenom mijenjaju znak je da je potrebno provesti validaciju (Kaštelan-Macan, 2003). Uvijek postoje dodatni slučajevi koji zahtijevaju postupak validacije kao zamjena proizvodne pošiljke, zamjena reagensa ili u slučaju kada analitičar metodu upotrebljava prvi puta, te nakon uvođenja nove metode u rutinsku uporabu ili ako samo želi upotrijebiti validiranu metoda u koja dugo nije bila u upotrebi. Normirane metode ne zahtijevaju validaciju, ona je provedena prilikom njihovog uspostavljanja stoga je potrebno dokumentima dokazati da je metoda primjenjiva u realnim laboratorijskim uvjetima. Validacija metode provode se na više načina, jedan od tih je međulaboratorijskim ispitivanjem koje uvijek nije prihvatljivo zbog cijene, nedostatka instrumenta ili educiranog osoblja. Nadalje, validacija se može provesti usporedbom sa analizom certificiranog referentnog materijala, usporedbom sa validiranom metodom ili usporedbom sa standardnim otopinama i uzorcima pripremljenim u laboratoriju te unutarlaboratorijskim ispitivanjima (Wood, 1999; Kaštelan-Macan, 2003).

Odabir postupka validacije isključivo ovisi o namjeni metode, stoga se kod okolišnih utjecaja na rezultat (npr. temperatura, tlak) mogu dobiti podaci o obnovljivosti rezultata pri promijenjenim uvjetima (robusnost ili otpornost metode), te mjera njezine točnosti. Ako se uz ispitivanja vrši i kalibracija tada uz određivanje obnovljivosti moguće je odrediti i sustavnu pogrešku, jer ona ovisi o nesigurnosti referentnog materijala. U međulaboratorijskim ispitivanjima mogu sudjelovati samo osposobljeni laboratoriji koji su ovladali ispitnom metodom. Takvim načinom ispitivanja dobivaju se podaci o obnovljivosti podataka, ali ne i o točnosti metode (Kaštelan-Macan, 2003; Trogrlić i sur., 2008).

Da bi validacija bila dobro provedena treba upotrijebiti standardne operativne postupke i protokole. Nastojati da matrica bude ista pri validaciji i pri određivanju realnog uzorka, kod kalibracije treba rabiti dovoljan broj standarda za kalibracijske krivulje. Dobiveni odnos treba biti linearan i reproducibilan. Svakako treba paziti na stabilnost standardnih otopina kao i na sastav matrice koja treba biti što sličnija standardu. Potrebno je ispitati kako matrice i varijable iz procesa utječu na sve korake iz analitičkog sustava počevši od uzorkovanja pa do same interpretacije rezultata. Validaciju treba provoditi educirano osoblje uz rad na

kalibriranim i certificiranim uređajima i korištenjem baždarenog posuđa i referentnih materijala (Lazarić i Gašljević, 2002; Kaštelan-Macan, 2003).

2.1.1. Selektivnost i specifičnost metode

Specifičnost i selektivnost kao parametri validacije koriste se za veliki broj metoda i važni parametri u dokazivanju da metoda služi svrsi. Specifičnost odnosno selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod točno utvrđenim uvjetima ispitivanja (Lazarić, 2012), tako da daju predodžbu o pouzdanosti analitičke metode (Taverniers i sur., 2004). Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona koja može odrediti samo jedan specifični analit, dok selektivnom metodom nazivamo onu metodu kojom se može određivati više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj (Lazarić i Gašljević, 2002). U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku (Huber, 1998; Vessman, 1996; Lazarić, 2012). Kod spektrofotometrijskih metoda se kao prikaz rezultata koriste reprezentativni spektri referentnih materijala, dostupnih onečišćenja, razgrađenih i nerazgrađenih otopina, matriksa i uzorka (Lazarić i Gašljević, 2002).

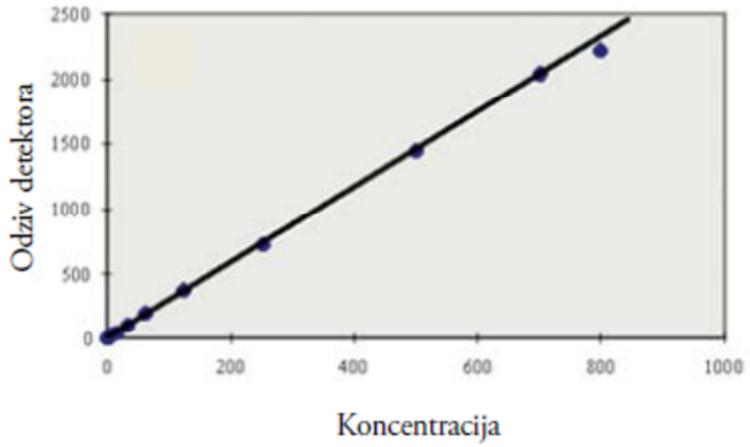
2.1.2. Linearnost

Linearnost se definira kao sposobnost metode da unutar radnog područja osigurava linearnu ovisnost odziva o koncentraciji analita u ispitnom uzorku (Lazarić, 2012). Procjenjuje se najčešće vizualno, ali konačna potvrda dobiva se primjenom statističke obrade (Green, 1996). U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala. Procjenjuje se matematički i grafički. Matematički preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y = a \cdot x + b$) te izračunava koeficijent korelacije (k). Smatra se da je linearnost metode zadovoljena kada je koeficijent korelacije k ≥ 0,99 dok je za vrlo niske koncentracije analita prihvatljiva vrijednost k ≥0,98. Nagib pravca (a) parametar je koji ukazuje na osjetljivost metode (Thompson, 2002; Lazarić, 2012). Odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku (eng. bias). Grafički prikaz ovisnosti

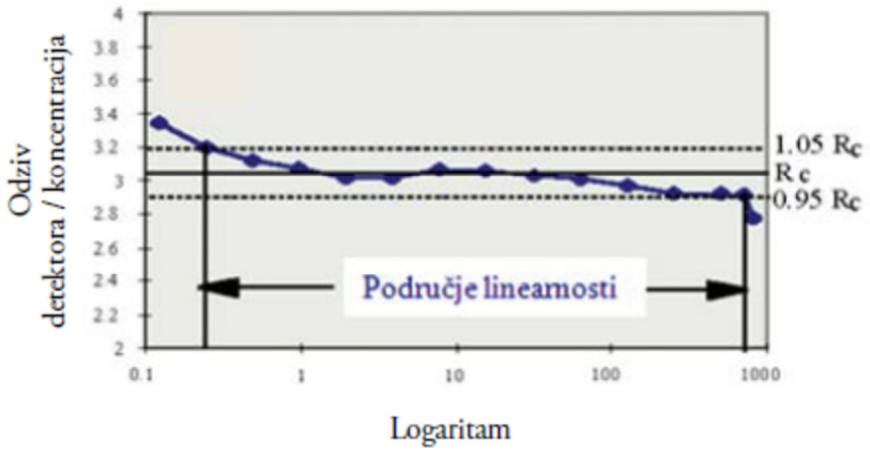
signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora te su najčešće se upotrebljavana dva načina grafičkog prikaza:

a) Grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije za linearna područja odstupanja jednoliko su raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti (**Slika 1**).

b) Grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale. Dobivena linija bi treba biti vodoravna u cijelom linearnom području dok područje linearnosti prestaje pri koncentracijama gdje linija relativnog odziva siječe paralelne linije. Linije odgovaraju 95 postotnoj ili 105 postotnoj koncentraciji (**Slika 2**) (Lazarić, 2012).



Slika 1 Grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca (Lazarić, 2012)



Slika 2 Grafički prikaz linearnosti (prikaz relativnih signala) (Lazarić, 2012)

2.1.3. Preciznost

Preciznost se izražava kao mjera slaganja između niza mjerenja napravljenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima (Lazarić, 2012). Ova izvedbena značajka ukazuje na slučajne greške u pripremi uzoraka, a koje se mogu izbjeći. Taj parametar je važan za kvalitativne metode, određuje se u homogenim uzorcima.

Ovisno o uvjetima u kojima se određuje, razlikujemo:

a) preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost

   preciznost ostvarena pod istim uvjetima koji podrazumijevaju jedan laboratorij, iste kemikalije, istu aparaturu, istog analitičara, provedbu u kratkom vremenskom razdoblju,

b) međupreciznost ili intermedijarna preciznost

   preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz promjenu određenih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, kemikalije iz različitih boca i različitih dobavljača), važno je da se mjerenje provode u uvjetima u kojima se inače radi

c) preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost

   definira se kao preciznost pod promjenjivim uvjetima koju su proveli različiti laboratoriji. Parametar je rijetko sastavni dio validacije i određuje se u svrhu normiranja metoda (Taverniers i sur., 2004; Lazarić, 2012)

Numerički pokazatelj preciznosti jesu standardno odstupanje (eng. standard deviation, SD), relativno standardno odstupanje (eng. relative stadnard deviation, RSD) ili koeficijent varijacije te raspon pouzdanosti srednje vrijednosti (Lazarić i Gašljević, 2002). Kod rezultata koji ne zadovoljavaju postavljene granice prihvatljivosti (**Tablica 1**) potrebno je otkriti izvor greške i adekvatno ga ukloniti. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, uzorku, koncentraciji, te matrici uzorka (Lazarić, 2012).

Tablica 1 Granice prihvatljivosti za relativno standardno odstupanje (RSD) za preciznost metode ovisno o koncentraciji analita prema procjeni AOAC (Taverniers i sur., 2004)

Analit (%)	Omjer analita	RSD (%)
100	1	1,3
10	10^{-1}	1,8
1	10^{-2}	2,7
0,1	10^{-3}	3,7
0,01	10^{-4}	5,3
0,001	10^{-5}	7,3
0,0001	10^{-6}	11
0,00001	10^{-7}	15
0,000001	10^{-8}	21
0,0000001	10^{-9}	30

2.1.4. Istinitost

Istinitost i točnost metode pojmovi su koji se vrlo često poistovjećuju iako to nije u potpunosti točno. Istinitost (eng. trueness) je definira kao bliskost slaganja srednje vrijednosti velikog broja izmjerenih vrijednosti veličine i prihvaćene referentne (prave) vrijednosti. Iskazuje se kao odmak (bias) od referentne vrijednosti, a ukazuje na sustavnu pogrešku (Taverniers i sur., 2004). Međunarodni savez za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) taj pojam izjednačuje unutar istog laboratorija s pogreškom metode, odnosno s razlikom mjerene vrijednosti ili aritmetičke sredine ograničenog broja mjerenja dobivenih određenom metodom i prave vrijednosti (Kaštelan-Macan, 2003). Pojam točnost (eng. accuracy) osim istinitosti uključuje i preciznost mjerenja (ukazuje na slučajnu pogrešku), i definira se kao bliskost slaganja mjernog rezultata i prihvaćene referentne vrijednost (Taverniers i sur., 2004). Metoda odnosno rezultat je točan kada su male i sustavna i slučajna pogreška.

Procjena točnosti/istinitosti određuje se na dva načina ovisno o tome da li se određuje sadržaj uzorka bez matriksa ili određivanje sadržaja s matriksom. Za određivanje sadržaja bez matiksa procjena se radi analizom uzorka poznate koncentracije i usporedbom izmjerenih i stvarnih vrijednosti ili na način da se uspoređuje ispitivana metoda s rezultatima uhodane referentne metode uz uvjet da je nesigurnost referentne metode poznata. Za procjenjivanje uzorka s matriksom procjena se radi na način da se uzorak obogaćuje poznatim

koncentracijama analita u prethodno određenom području ili usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima referentne metode gdje je nesigurnost referentne metode poznata, a dobiveni rezultati se iskazuju računski (kao iskorištenje) ili grafički. Iskorištenje metode ovisi o uzorku kao i postupku uzorkovanja te koncentraciji analita (**Tablica 2)**, (Taverniers i sur., 2004; Lazarić, 2012).

Tablica 2 Granice prihvatljivosti za iskorištenje metode ovisno o koncentraciji analita prema procjeni AOAC (Taverniers i sur., 2004)

Analit (%)	Omjer analita	Srednje iskorištenje (%)
100	1	98 – 102
10	10^{-1}	98 – 102
1	10^{-2}	97 – 103
0,1	10^{-3}	95 – 105
0,01	10^{-4}	90 – 107
0,001	10^{-5}	80 – 110
0,0001	10^{-6}	80 - 110
0,00001	10^{-7}	80 - 110
0,000001	10^{-8}	60 -115
0,0000001	10^{-9}	40 - 120

2.1.5. Robusnost

Robusnost se definira kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, a namjerne promjene parametara metode i pokazuje koji korak metode je najosjetljiviji (Lazarić, 2012). Ispitivanje robusnosti provodi se kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize. Važan je to dio razvoja metode. Tijekom analize mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata, a prema podacima o robusnosti postavljaju se parametri za ispitivanje prikladnosti sustava (Lazarić, 2012).

2.1.6. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije (eng. limit of detection, LOD) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati. Procijeniti se može i vizualno s pomoću omjera signal/šum ili statistički. Primjenjiva je kod instrumentalnih i neinstrumentalnih metoda i to samo za granicu detekcije. Omjer signal/šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom (npr. kromatografske analize), a prihvatljivi omjer signal/šum je 3:1. Granice dokazivanja mogu biti ometane različitim onečišćenjima koja mogu potjecati od reagensa, vode, gubitaka analita, adsorpcije. Odrediti se može samo onim analitičkim postupcima kojima se dobivaju točni i ponovljivi rezultati (Lazarić, 2012).

LOD se može izračunati i prema **formuli (1):**

$$LOD = 3{,}3\frac{SD}{S} \quad \textbf{(1)}$$

pri čemu je: *LOD* granica detekcije,

SD standardno odstupanje odsječka na ordinati i

S nagib pravca linearne regresije (Lazarić, 2012).

Najniža granica pri kojoj se mjerenim procesom može dobiti dovoljno precizna kvantitativna procjena nepoznate koncentracije, najmanja prava vrijednost koja se može kvantificirati naziva se **granicom kvantifikacije** (eng. limit of quantification, LDQ) (Kaštelan-Macan, 2003). LDQ je po svome iznosu uvijek veći od LOD-a (Taverniers i sur., 2004). Pogreške utvrđivanja granice kvantifikacije i granice dokazivanja ovise o stalnosti analita i osjetljivosti metode. Procjena LOQ provodi se na isti način kao i LOD. Kod analitičkih postupaka s baznom linijom, granicom kvantifikacije smatra se kad omjer signal/šum iznosi 10:1.

LOQ se može izračunati i pomoću **formule (2):**

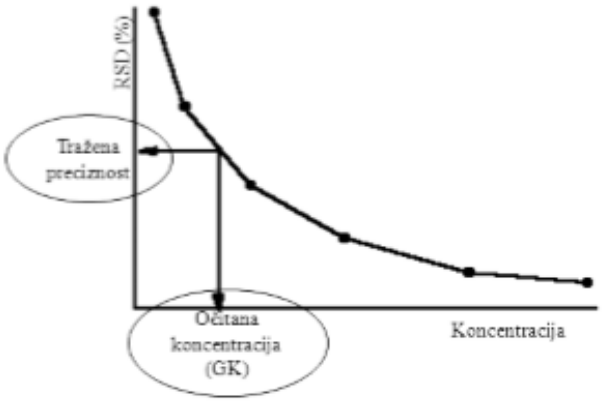
$$LOQ = 10\frac{SD}{S} \quad \textbf{(2)}$$

pri čemu je: *LOQ* granica kvantifikacije,

SD standardno odstupanje odsječka na ordinati i

S nagib pravca linearne regresije (Lazarić, 2012).

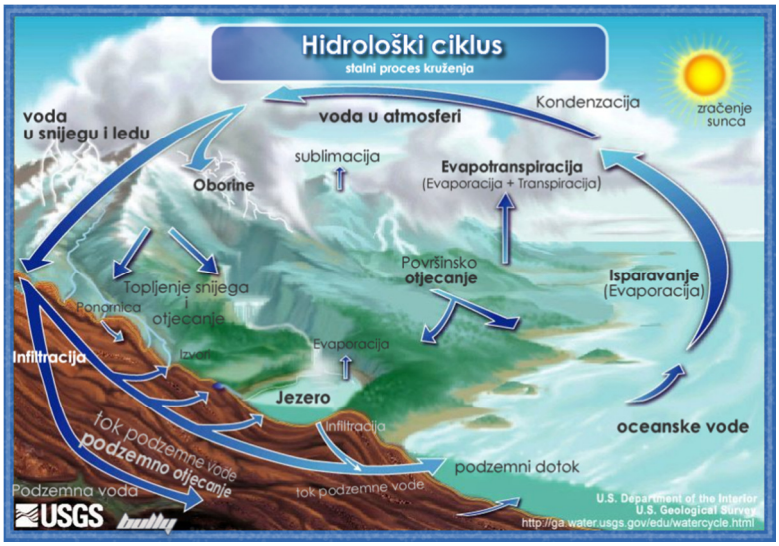
Granice detekcije i kvantifikacije su izvedene značajke koje se obavezno određuju kod metoda koje mjere analite u tragovima kao i kod određivanja analita koji u niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš (Lazarić, 2012.). Ako metoda zahtjeva određenu preciznost na granici kvantifikacije, tada se ista određuje višestrukim mjerenjem otopina poznatih koncentracija oko moguće granice kvantifikacije, te izračunaju relativna standardna odstupanja (RSD) za svaku koncentraciju. Iz grafičkog prikaza odnosa RSD i koncentracija, odredi koncentracija granici kvantifikacije s točno određenom preciznošću (**Slika 3**).



Slika 3 Određivanje granice kvantifikacije sa zadanom preciznošću (Lazarić, 2012)

2.2. VODA

Voda je osnova života, donosi hranjive tvari u organizam i metaboličkim putem uklanja otpad iz stanica tijela, stoga je od velike važnosti za javno zdravlje. Procjenjuje se da u Hrvatskoj 87 % stanovništva opskrbljuje vodom za piće iz javnog vodovoda, 3,5 % iz lokalnog vodovoda i 9,5 % iz bunara, cisterni. Bez vode život nije moguć. U prirodi voda konstantno kola, prelazi iz jednog oblika u drugi (hidrološki ciklus) te kao takva ima značajne obnovljive zalihe (**Slika 4**). Na Zemlji ima 1,4 milijarde km^3 vode, najveći dio su slane vode mora i oceana (Habuda-Stanić i sur., 2014).



Slika 4 Ciklus kruženja vode (Gereš, 2004)

Zaštita okoliša i opskrba pitkom vodom postaju imperativ današnjice, kako zbog porasta stanovništva, promjene životnih navika, životnog standarda te povećanja industrijalizacije tako i poljoprivredne proizvodnje u smislu nekontrolirane uporabe pesticida i ostalih kemikalija. Stanovništvo velikih gradova su najveći potrošači pri čemu se u razvijenim zemljama s dobro razvijenom komunalnom djelatnošću potrošnja vode kreće od 300 – 600 L/sat/dan, dok se kod zemalja u razvoju i nerazvijenih zemalja potrošnja vode kreće od 50 – 100 L/sat/dan (Hem, 1985).

Republika Hrvatska raspolaže sa 32,818 prostornih metara godišnje obnovljive pitke vode po stanovniku, isto tako je među malim brojem zemalja koje svojim građanima jamče isporuku pitke vode. Voda, jezera i rijeke su najpristupačnije za gospodarsko korištenje i jako su važna

za vodene ekosustave. Smanjivanje raspoloživosti vode za piće evidentno je veće u zemljama u razvoju te će problem relativnog manjka vode biti od prioritetnih pitanja, ispred proizvodnje hrane i raspoloživosti energije. Takav problem iziskuje velika financijska ulaganja kao i provođenje mjera kako bi se izbjegli danji deficiti slatke vode. Problem vode je problem raspodjele vode iz čega proizlazi njezin nedostatak (Mayer, 2008).

Pristup zdravstveno ispravnoj vodi, kao važnom faktoru zdravlja i razvoja, važan je ne samo na lokalnoj ili regionalnoj, nego i nacionalnoj razini. U nekim regijama se pokazalo da ulaganje u vodoopskrbu i odvodnju daje višestruke ekonomske koristi, jer bi veličina štetnih učinaka vode na zdravlje i troškove liječenja nadmašili troškove ulaganja (WHO, 2011). Od posljedica bolesti nastalih konzumacijom zdravstveno neispravne vode za piće godišnje umire 15 milijuna ljudi, problem koji najviše pogađa Afriku i Aziju (Tolić, 2015).

Sve tvari koje voda sadrži bile one dobre ili ne, svakako djeluju na organizam, s obzirom prema djelovanju na organizam kemijske zagađivače dijelimo na toksične, kancerogene i mutagene (Rajković, 2003). Za svaku supstancu koja se nalazi ili se može naći u vodi, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je preporučila najviše dopuštene vrijednosti ispod koje neće doći do negativnog učinka na zdravlje (WHO, 2011).

Zdravstvena ispravnost vode kao i njezina kvaliteta u Republici Hrvatskoj regulirani su Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju (HS, 2013), Zakonom o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju (HS, 2015) te Pravilnikom o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (MZ, 2013c) te dopunjenim izdanjima Pravilnika (MZ, 2013b; 2015) koji su usklađeni sa europskom direktivama (Council of the European Union, 1998, 2013). Odredbe Zakona primjenjuju se na sve vode bez obzira na njihovo porijeklo u prirodnom (izvornom) stanju ili nakon obrade, ako se koriste kao voda za ljudsku potrošnju ili u svrhu proizvodnje, prerade, čuvanja i distribucije hrane, predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom i predmetima opće uporabe, neovisno o tome je li isporučena iz razvodne mreže ili u ambalaži koja udovoljava posebnim propisima (HS, 2013). Svaki distributer vode dužan je isporučiti zdravstveno ispravnu vodu što uključuje redovite analize mikrobiološke i kemijske po parametrima navedenim u Pravilnicima (MZ, 2013b; 2013c; 2015) u kojima su navedene i maksimalno dozvoljene koncentracije za pojedine parametre. Jedan od obveznih kemijskih parametara zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju koji se prate prilikom redovnog monitoringa jesu nitrati.

2.3. NITRATI

Dušik je jedan do najčešćih elemenata u prirodi, tvori mnoge anorganske ionske vrste, od kojih su nitrati, nitriti i amonijev ion najvažniji. Kruženje dušika u prirodi opisano je na **Slici 5.** Nitrati su spojevi koji imaju vezan atom dušika na tri atoma kisika, u prirodi lako prelaze iz jednog oblika u drugi. To su anionski spojevi s negativnim nabojem te da bi postigli ravnotežno stanje vežu katione. Primarno se nitrati koriste u obliku gnojiva, u proizvodnji stakla i eksploziva. Najviše se koristi u mesnoj industriji kod konzerviranja. Glavni izvor nitrata u hrani su povrće i voda za piće. U hrani koncentracija nitrata varira zavisno o mnogobrojnim čimbenicima: tipu i količini gnojiva, svjetlu, vremenskim uvjetima, vremenu dozrijevanja itd. Količina nitrata nije ista u svim dijelovima biljke (Hill, 1991). Nitrati su vrlo topivi u vodi, ispiranjem tla koncentracija u površinskim vodama raste. Tome su doprinijele i septičke jame koje nisu sagrađene prema pravilima struke, te stajnjaci i gnojnice. Stoga je određivanje razine nitrita i nitrata u biološkim uzorcima i uzorcima hrane i vode bitno za osiguravanje ljudskog zdravlja i okoliša (Kodamatani i sur., 2009).



Slika 5 Ciklus kruženja dušika (Vasić-Rački, 2010)

2.3.1. Zdravstveni rizik

Nitrati sami po sebi su relativno netoksični, opasnost predstavljaju njihovi metaboliti i reakcijski produkti kao nitriti, N-nitrozo spojevi i dušik-monoksid (NO). Kisela sredina želuca podržava nitrozaciju sekundarnih i tercijarnih amina uz nastanak karcinogenih nitrozamina. Nitriti mogu oksidirati fero željezo hemoglobina te on ne može vršiti prijenos kisika i dolazi do methemoglobinemije, ubrzanog disanja, cijanoze, glavobolje i slabosti. Trudnice u visokom stadiju trudnoće osjetljivije na nitrate zbog prirodno više razine methemoglobina u krvi. Pouzdane epidemiološke studije uglavnom ne povezuju unos nitrata s većom učestalosti raka (Klapec i Šarkanj, 2016). Nitrati i nitriti nemaju izravan kancerogeni učinak, ali se pretpostavlja da formiranje N-nitrozo spojeva može pridonijeti razvoju karcinoma, kako su pokazala istraživanja na životinjama (Michalski i Kurzyca, 2005). Otprilike 25 % nitrata unosimo hranom, od toga većina odlazi na unos povrćem (zeleno i lisnato povrće te cikla) oko 80 %, 10 % na unos vodom, a svega 5 % na suhomesnate proizvode (Pavlinić Prokurica i sur., 2010). Nitrati imaju i neke dobre strane, jer se otprilike 25 % nitrata iz hrane nakon apsorpcije recirkulira, žlijezde slinovnice aktivnim transportom izvlače nitrate iz krvi i izlučuju ih u slinu tako da u ustima djelovanjem mikroflore dolazi do redukcije nitrata u nitrite u kiseloj sredini koju stvaraju bakterije iz zubnog plaka. Nitriti nastali u ustima dospijevaju do želuca gdje se uz kiseli pH prevode u dušik monoksid. Dušik monoksid je snažna mikrobicidna molekula i pomaže u kontroli karijesa (Klapec i sur., 2014). Istraživanja bi morala uključivati sve izvore tih spojeva kako bi se mogla odrediti izloženost nitratima kao i njihov rizik za zdravlje.

Prema Smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) te europskim i nacionalnim propisima (WHO, 2011; Council of th European Union, 1998; MZ, 2013c), maksimalno dopuštena koncentracija nitrata u vodi za ljudsku potrošnju iznosi 50 mg NO_3^-/L.

Kako bi se smanjila koncentracija nitrata u biljkama i vodi, preporuča se primjena načela dobre poljoprivredne prakse vezano uz korištenje umjetnih gnojiva i ostale radnje slijedom kojih dolazi do akumulacije nitrata. Ne preporučuje se koristiti voda iz neispitanih izvora (zdenaca), pogotovo ne za pripremu hrane za najosjetljivije populacije, malu djecu, bolesne i starije osobe. Kod pripreme hrane uočeno je da neki postupci pripreme i prerade hrane mogu znatno utjecati na količinu nitrata u pojedinim vrstama povrća (Klapec i sur., 2014). Uzastopno prekuhavanje povećava sadržaj nitrata koji se u organizmu reduciraju u nitrite te

dalje u karcinogene spojeve (MZ, 2013a). Kod procjene izloženosti utvrđeno je kako kod svega 0,4 % populacije konzumenata dolazi do prekoračenja toksikološke granice čime se može zaključiti da zadovoljavanje potreba organizma za gradivnim, energetskim i zaštitnim tvarima dobivenim iz povrća, u ovom slučaju, ima veću dobrobit u odnosu na štetni utjecaj nitrata (HAH, 2016).

2.3.2. Metode određivanja nitrata

Nužnost zaštite okoliša potaknula je razvoj niza metoda koje omogućuju određivanje različitih onečišćivača u elementima prirodnog okruženja, uključujući metode za određivanje anorganskih dušikovih iona. Klasične metode koje se koriste za ovu namjenu mogu biti podijeljene na gravimetrijske, titracijske, spektrofotometrijske (UV/Vis, IR, fluorimetrijske) i elektroanalitčke (uključujući potenciometriju temeljenu na upotrebi ion selektivnih elektroda, voltamperometriju, amperometriju, kulometriju) (Akyüz i Ata, 2009). Mnoge od navedenih metoda pokazale su nedovoljnu osjetljivost, selektivnost ili točnost, stoga se u zadnje vrijeme sve više pažnje pridaje ionskoj kromatografiji (IC). Američka agencija za zaštitu okoliša (eng. United States Envoronmental Protection Agency, EPA) preporučila je da se za utvrđivanje koncentracije nitratnih i nitritnih iona koriste ionska kromatografija, potenciometrijska metoda i kolorimetrijska metoda. Metode imaju svojih prednosti i mana, potonje se odnose na nisku selektivnost, nisku osjetljivost, lošu reproducibilnost i detekciju (isključujući ionsku kromatografiju). Stoga se traganje za alternativnim novim metodama se nastavlja (Michalski i Kurzyca, 2006).

Ionska kromatografija je tehnika separacije prvenstveno smjese aniona i kationa, te se često koristi za kontrolu kvalitete vode. Njezina glavna prednost je brzina analize, osjetljivost i preciznost. Tipični ioni koji se mogu odrediti ionskom kromatografijom su amonij, litij, kalij, natrij, magnezij, kalcij, barij, stroncij, fluoridi, klorid, sulfat, nitrit, nitrat, fosfat, metali niže organske kiseline, aminokiseline. Uglavnom se koristi u kombinaciji s konduktometrijskim detektorom (Yeh i sur., 2013).

Niske koncentracije nitrata i nitrita u vodi mogu se odrediti tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s

flourimetrijskim detektorom (Kodamatani i sur., 2009) ili različitim sustavima temeljenim na principu analize injektirane u protok (eng. flow analysis) (Mikuška i Večeřa,2002).

Posljednjih godina upotreba kapilarne elektroforeze (CE) za analizu ionskih analita značajno je porasla. Zbog boljeg odjeljivanja, kraćeg vremena analize, manje potrošnje reagensa i jednostavnijeg funkcioniranja u usporedbi s ionskom kromatografijom, CE dobiva sve veću pozornost kod određivanja anorganskih iona. Međutim, odvajanje CE temelji se na razlici u elektroforetskoj mobilnosti analita, stoga je određivanje brzih aniona i kationa u jednoj analizi uobičajenom CE nemoguće. Iz toga razloga predstavljena je modificirana CE koja istovremeno separira anorganske anione i katione. Takva CE temelji se na elektromigraciji uzorka, koji se injektira s oba kraja kapilare i indirektnoj UV detekciji (Padarauskas i sur., 1998).

UV spektrofotometrijska screening metoda koristi se za određivanje koncentracije nitrata u nezagađenim prirodnim vodama te vodi iz slavine. Metoda se temelji na reakciji nitratnog iona i kloridne kiseline, a očitanja koncentracije nitrata vrše se na 220 nm. Koncentracija se izračunava na temelju apsorbancije uz pomoć kalibracijskog pravca (APHA, AWWA i WEF, 2005).

Spektrofotometrijski postupak određivanja nitrata u uzorcima vode koristeći otopinu s jednim reagensom odvija se na temelju redukcije nitrata u nitrite pomoću vanadij(III)-klorida u kiseloj sredini. Nitriti u reakciji sa Griess-ovim reagensom stvaraju obojeni produkt čiji se intenzitet mjeri pri 540 nm (Doane i Horwáth, 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je odrediti izvedbene značajke spektrofotometrijske metode za određivanje nitrata u vodi za ljudsku potrošnju te na osnovu dobivenih rezultata validacije procijeniti prikladnost upotrjebljene metode.

3.2. UZORCI

U radu je korištena voda za ljudsku potrošnju iz javno vodoospkrbnog sustava Požeško – slavonske županije. Prema Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju (HS, 2013), voda namijenjena za ljudsku potrošnju je sva voda koja je u svojem izvornom stanju ili nakon obrade namijenjena za piće, kuhanje, pripremu hrane ili druge potrebe kućanstva, neovisno o njezinom porijeklu te neovisno o tome potječe li iz sustava javne vodoopskrbe, iz cisterni ili iz boca odnosno posuda za vodu, sva voda koja se rabi u industrijama za proizvodnju hrane u svrhu proizvodnje, obrade, očuvanja ili stavljanja na tržište proizvoda ili tvari namijenjenih za ljudsku potrošnju, osim ako nadležno tijelo ne utvrdi da kakvoća vode ne može utjecati na zdravstvenu ispravnost hrane u njezinom konačnom obliku.

Uzorak vode je količina vode uzeta jednokratno na jednom mjestu na propisani način u svrhu laboratorijske analize (HS, 2013).

Za određivanje izvedbenih značajki metode, uzorak vode uzorkovan je u Zavodu za javno zdravstvo Požeško-slavonske županije, Ekološkom laboratoriju, izljevno mjesto slavina u prostoru Kemije voda. Analiza je provedena odmah nakon uzimanja uzorka vode u staklene bočice od 500 mL.

Ostali uzorci korišteni u ovom radu, uzorkovani su na prema propisima (HS, 2013), prikupljeni u staklene bočice od 500 mL te analizirani odmah po primitku u laboratorij.

3.3. METODA

Za određivanje koncentracije nitrata u vodi korištenja je UV spektofotometrijska screening metoda 4500-NO_3^- (APHA, AWWA i WEF, 2005). Metoda je pogodna za određivanje koncentracije nitrata u vodama koje imaju nizak sadržaj organskih tvari te nezagađenim prirodnim vodama. Metoda se rutinski koristi u Ekološkom laboratoriju Zavoda za javno

zdravstvo Požeško-slavonske županije za određivanje koncentracije nitrata u vodi za ljudsku potrošnju. U Erlenmeyer-ovu tikvicu od 100 mL menzurom odmjereno je 50 mL uzorka vode ili standardne otopine i dozatorom dodan 1 mL 1 N HCl. Otopina je prebačena u kvarcne kivete (dimenzije kiveta 1x1 cm) te je izmjerena apsorbancija uzorka ili standardne otopine pri 220 nm na UV/Vis spektrofotometru Lambda 25 (PerkinElmer, SAD) u odnosu na slijepu probu (demineralizirana voda). Za pripremu standardnih otopina za izradu kalibracijske krivulje (0 - 49,6 mg NO_3^-/L) korišten je standard Orion 920706 Nitrate Standard 0.1 M NO_3^- (Thermo Scientific, SAD). Metodom linearne regresije iz očitanih apsorbancija standardnih otopina dobivena je jednadžba pravca korištenjem specijaliziranog računalnog programa UV VINLAB (Version 2.85.04). Koncentracija nitrata izračunava se iz kalibracijske krivulje, a rezultati se izražavaju kao miligrami NO_3^- po litri uzorka (mg NO_3^-/L).

3.4. IZVEDBENE ZNAČAJKE

U svrhu validacije metode određene su sljedeće izvedbene značajke: linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije, preciznost metode temeljem podataka o ponovljivosti mjerenja te međupreciznosti, istinitost te robusnost metode.

Linearnost metode se provjerena je izračunavanjem koeficijenta korelacije (k) na osnovi podataka dobivenih iz kalibracijske krivulje izračunatih matematičkim putem metodom linearne regresije u rasponu koncentracija nitrata od 0 do 49,6 mgNO_3^-/L. Svaka koncentracija izmjerena je 3 puta, a podaci o nagibu pravca linearne regresije i odsječku na ordinati korišteni su za izračun granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ). Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) izračunate su pomoću **formula (1)** i **(2).**

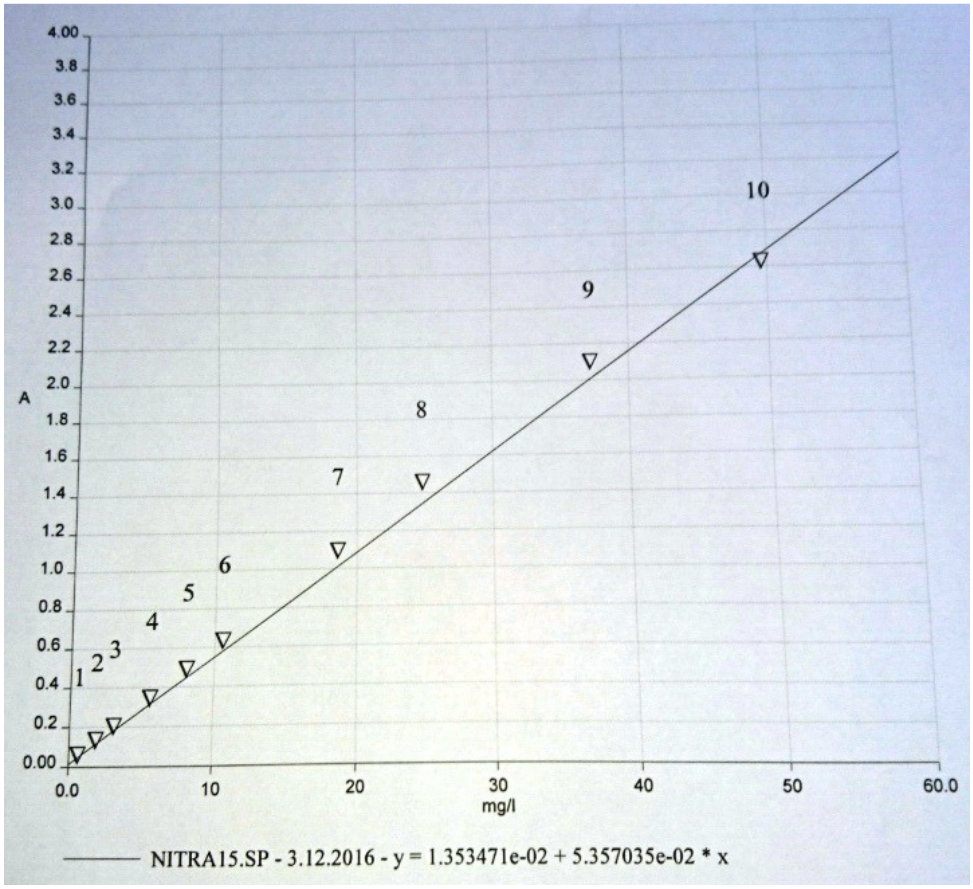
Preciznost metode provjerena je preko ponovljivosti mjerenja i međupreciznosti. Za ispitivanje ponovljivosti mjerenja, otopini istog uzorka vode iz javno vodoopskrbnog sustava izmjerena je apsorbancija 10 puta. Za ispitivanje međupreciznosti, dva analitičara pripremila su isti uzorak vode iz javno vodoopskrbnog sustava te su izvršena višestruka mjerenja (10 ponavljanja). Nakon mjerenja izračunate su srednja vrijednost, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD).

Istinitost je ispitana obogaćivanjem uzorka vode iz javno vodoopskrbnog sustava sa standardom otopinom nitrata poznate koncentracije. Prvo je pripremljen uzorak vode kojem

je očitana apsorbancija u 4 ponavljanja, te su zatim pripremljene otopine obogaćenog uzorka sa poznatim dodanim koncentracijama standarda. Mjerenja apsorbancije obogaćenih uzoraka također su odrađena u 4 ponavljanja. Izračunate su srednje vrijednosti koncentracija nitrata u uzorku i obogaćenim uzorcima, a istinitost metode izražena je kao iskorištenje (%).

Robusnost metode ispitana je na način da je pripremljeni uzorak analiziran odmah po primitku, nakon 24 i 48 sati. Mjerenja apsorbancije provedena su u 5 ponavljanja, te su nakon mjerenja izračunate srednja vrijednost, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD).

4. REZULTATI



Slika 5 Kalibracijska krivulja

Tablica 3 Linearnost[a], granica detekcije (LOD)[b] i granica kvantifikacije (LOQ)[b] ispitivane metode

Jednadžba pravca	k	LOD (mg NO_3^-/L)	LOQ (mg NO_3^-/L)
A = 0,0537035 · γ(mg NO_3^-/L) + 0,01353471	0,9987	0,3098	0,9388

[a]linearnost izražena preko koeficijenta korelacije k
[b]LOD i LOQ dobivene pomoću odsječka na ordinati i nagiba pravca linearne regresije

Tablica 4 Ponovljivost mjerenja

Broj mjerenja	Izmjerena apsorbancija	Koncentracija nitrata (mg NO_3^-/L)
1	0,3680	6,6178
2	0,3679	6,6155
3	0,3679	6,6142
4	0,3680	6,6163
5	0,3679	6,6157
6	0,3681	6,6183
7	0,3680	6,6172
8	0,3680	6,6178
9	0,3683	6,6219
10	0,3681	6,6192
Srednja vrijednost		**6,6174**
Standardno odstupanje, SD		**0,0022**
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)		**0,0329**

Tablica 5 Međupreciznost

Broj mjerenja	Izmjerena apsorbancija		Koncentracija nitrata (mg NO_3^-/L)	
	Analitičar 1	Analitičar 2	Analitičar 1	Analitičar 2
1	0,3760	0,3765	6,7656	6,7757
2	0,3771	0,3764	6,7859	6,7744
3	0,3768	0,3764	6,7813	6,7738
4	0,3767	0,3764	6,7785	6,7727
5	0,3766	0,3763	6,7770	6,7721
6	0,3765	0,3765	6,7764	6,7749
7	0,3764	0,3764	6,7731	6,7400
8	0,3762	0,3764	6,7703	6,7734
9	0,3764	0,3763	6,7738	6,7725
10	0,3765	0,3762	6,7749	6,7703
Srednja vrijednost			**6,7757**	**6,7734**
Standardno odstupanje, SD			**0,0057**	**0,0016**
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)			**0,0834**	**0,0229**

Tablica 6 Istinitost metode

Otopina	Dodano standarda ($mgNO_3^-/L$)	Izmjerena apsorbancija	Dobivena konc. ($mg\ NO_3^-/L$)	Srednja dobivena konc. ($mgNO_3^-/L$)	Očekivane vrijednosti ($mgNO_3^-/L$)	Iskorištenje (%)
Uzorak	0	0,3632	6,5278	6,5248		
		0,3633	6,5291			
		0,3630	6,5227			
		0,3628	6,5194			
Uzorak+std1 (1:1)	1,86	0,2411	4,2487	4,2499	4,1924	**101**
		0,2410	4,2465			
		0,2413	4,2521			
		0,2413	4,2523			
Uzorak+std2 (1:1)	8,06	0,4241	7,6640	7,6654	7,2924	**105**
		0,4245	7,6709			
		0,4241	7,6644			
		0,4240	7,6622			
Uzorak+std3 (1:1)	37,20	1,2112	22,3570	22,3800	21,8624	**102**
		1,2115	22,3610			
		1,2136	22,4010			
		1,2136	22,4010			

Tablica 7 Robusnost metode

	Izmjerena apsorbancija			**Koncentracija nitrata ($mgNO_3^-/L$)**		
Broj mjerenja	Po primitku	Nakon 24h	Nakon 48h	Po primitku	Nakon 24 h	Nakon 48h
1	0,3726	0,3726	0,3688	6,7034	6,7031	6,6310
2	0,3725	0,3736	0,3696	6,7003	6,7223	6,6463
3	0,3724	0,3743	0,3727	6,6988	6,7352	6,7044
4	0,3723	0,3735	0,3739	6,6969	6,7189	6,7277
5	0,3723	0,3731	0,3737	6,6991	6,7124	6,7234
Srednja vrijednost				**6,6991**	**6,7184**	**6,6866**
Standardno odstupanje, SD				**0,0029**	**0,0119**	**0,0449**
Relativno standardno odstupanje, RSD (%)				**0,0427**	**0,1773**	**0,6720**

Tablica 8 Koncentracija nitrata u vodi za ljudsku potrošnju u sklopu redovitog monitoringa županije Požeško-slavonske izračunata iz kalibracijske krivulje prije provedene validacije (a) i nakon validacije spektrofotometrijske metode (b)

Uzorak vode	Lokacija	Izmjerena apsorbancija[a]	Koncentracija nitrata[a] (mg NO_3^-/L)	Izmjerena apsorbancija[b]	Koncentracija nitrata[b] (mg NO_3^-/L)
1	VRTIĆ PAKRAC	0,2005	3,9324	0,1336	2,7603
2	VRTIĆ LIPIK	0,2329	4,5672	0,1360	2,8112
3	OŠ BRESTOVAC	0,2047	4,0136	0,1203	2,4856
4	OŠ ČAGLIN	0,1696	3,3250	0,0877	1,8124
5	DOM ZA STARE POŽEGA	0,5689	10,1701	0,4546	8,2121
6	OŠ PLETERNICA	0,7525	13,4521	0,6143	10,9828
7	KTC KUTJEVO	0,6642	11,8745	0,5042	9,0128
8	DOM ZA STARE VELIKA	0,5585	9,9841	0,4325	7,8124
9	OŠ VELIKA	0,5661	10,1205	0,4361	7,8781
10	VRTIĆ POŽEGA	0,5587	9,9879	0,3581	6,6701

5. RASPRAVA

Različite spektrofotometrijske metode za određivanje nitrata u vodi za ljudsku potrošnju i otpadnim vodama dostupne su u literaturi. U ovom radu korištena je UV spektrofotometrijska screening metoda koja se rutinski koristi u Ekološkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Požeško-slavonske županije za određivanje koncentracije nitrata u vodi za ljudsku potrošnju. Obzirom da metoda nije prethodno validirana, zadatak ovog rada bio je odrediti izvedbene značajke i procijeniti prikladnost metode za određivanje nitrata u vodi za ljudsku potrošnju.

Linearnost je provjerena pripremom otopina standarda u rasponu koncentracija 0 – 49,6 mg NO_3^-/L, obzirom na koncentracije koje se mogu očekivati u vodi za ljudsku potrošnju i maksimalnoj dopuštenoj granici (M.D.K.) koja prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (u daljnjem tekstu: Pravilnik) iznosi 50 mg NO_3^- /L (MZ, 2013c). Na osnovi dobivenih vrijednosti apsorbancija u ovisnosti o upotrjebljenim koncentracijama napravljena je kalibracijska krivulja (**Slika 5**), iz koje je matematičkim putem metodom linearne regresije dobivena jednadžba pravca, te izračunat koeficijent korelacije (k) (**Tablica 3**). Iz kalibracijske krivulje vidljivo je da je metoda linearna u ispitivanom području koncentracija, a potvrdu linearnosti metode pokazuje i koeficijent korelacije koji iznosi 0,9987. Dobiveni koeficijent korelacije zadovoljava preporuke za validaciju analitičkih metoda (Lazarić i Gašljević, 2002).

Granica detekcije i granica kvantifikacije dobivene su računski iz podataka kalibracijskog pravca i prikazani u **Tablici 3**. Granica detekcije iznosi 0,31 mg NO_3^-/L, a granica kvantifikacije 0,94 mg NO_3^-/L što je značajno ispod granice detekcije propisane u Pravilniku (MZ, 2013c). Naime, prema navedenom Pravilniku, nije propisana službena metoda za određivanje koncentracije nitrata već se mogu koristiti različite metode s odgovarajućim područjem mjerenja, istinitošću, preciznošću i granicom detekcije. Granica detekcije nitrata prema zahtjevima Pravilnika (MZ, 2013c) treba iznositi 10 % od M.D.K., odnosno 5 mg NO_3^-/L.

Preciznost metode ispitana je preko ponovljivosti mjerenja i međupreciznosti. Ponovljivost mjerenja ispitana je višestrukim mjerenjem (10 mjerenja) istog homogenog uzorka vode za piće. Mjerenje je izvršio jedan analitičar, a rezultati su prikazani u **Tablici 4**. Standardna devijacija iznosila je 0,0022 mg NO_3^-/L, dok je relativna standardna devijacija iznosila 0,0329 %. Međupreciznost je ispitana višestrukim mjerenjem istog uzorka vode za piće (10 puta) koji su provela dva analitičara. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 5.** Relativno standardno

odstupanje (RSD) rezultata analitičara 1 iznosilo je 0,0834 %, a analitičara 2 RSD bio je 0,0229 %. Obje RSD vrijednosti značajno su niže od vrijednosti propisane u Pravilniku koja iznosi 10 % od M.D.K. (MZ, 2013a) i granicama prihvatljivosti za RSD vrijednosti prema procjeni AOAC ovisno o koncentraciji analita (Taverniers i sur., 2004).

Procjena istinitosti spektrofotometrijske metode provedena je obogaćivanjem uzorka vode otopinama standarda poznatih koncentracija u cijelom području linearnosti, a izražena je preko iskorištenja (%). U homogenom uzorku vode srednja vrijednost koncentracije nitrata iznosila je 6,5248 mg NO_3^-/L, dok su srednje vrijednosti koncentracija nitrata u obogaćenim uzorcima iznosile 4,2499; 7,6654 i 21,8624 mg NO_3^-/L (**Tablica 6**). Iz dobivenih rezultata izračunata su iskorištenja koja su iznosila 101, 105 i 102 %. Srednja vrijednost iskorištenja u skladu je s granicama prihvatljivosti za iskorištenje metode ovisno o koncentraciji analita prema procjeni AOAC (Taverniers i sur., 2004) te zahtjevu Pravilnika za istinitost metode (MZ, 2013c).

Robusnost je parametar unutar laboratorijskog ispitivanja gdje na postupak ispitivanja mogu utjecati male promjene u okruženju ili samom postupku. Uzorak je analiziran odmah po primitku, nakon 24 h i nakon 48 h kako bi se provjerila stabilnost uzorka. Srednje vrijednosti koncentracija nitrata u uzorku vode analiziranog po primitku, nakon 24 i 48 sati iznosile su 6,70; 6,72 i 6,69 mg NO_3^-/L (**Tablica 7**). Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da uzorak stabilan i nakon 48 sati nakon uzorkovanja te da je metoda robusna.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da metoda udovoljava kriterijima prihvatljivosti i da je prikladna namjeni.

Kod analiziranih uzoraka vode za piće iz javno vodoopskrbnog sustava Požeško-slavonske županije u sklopu sustava redovitoga monitoringa izvršene su kemijske analize koje obuhvaćaju i analizu na parametar nitrata. Monitoring se obavlja prema planu monitoringa svaki mjesec tako da su uspoređene vrijednosti koncentracije nitrata sa različitih lokacija javnih ustanova koristeći kalibracijski pravac prije validacije i nakon validacije metode. Rezultati mjerenja prikazani su u **Tablici 8**, iz koje je vidljivo da su rezultati dobiveni korištenjem validirane metode nešto niži od vrijednosti dobivenih koristeći kalibracijski pravac prije validacije. Koncentracija nitrata u ispitivanim uzorcima vode kretala se od 3,33 mg NO_3^-/L do 13,45 mg NO_3^-/L koristeći kalibracijski pravac nevalidirane metode, i od 1,81 mg NO_3^-/L do 10,98 mg NO_3^-/L. Sve dobivene vrijednosti značajno su ispod maksimalno

dopuštene koncentracije (M.D.K. 50 mg NO_3^-/L) što ukazuje na dobru kvalitetu vode u javnoj vodoopskrbi Požeško-slavonske županije gledajući kemijski parametar nitrati. Obzirom da su izvedbene značajke određene u ovom radu pokazale da je metoda prikladna namjeni, preporuka je u daljnjem radu koristiti validiranu spektrofotometrijsku metodu određivanja nitrata u vodi za ljudsku potrošnju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ispitivana spektrofotometrijska metoda linearna je u području ispitivanih koncentracija.
- Granica detekcije i granica kvantifikacije značajno su ispod propisane vrijednosti što ukazuje na visoku osjetljivost metode.
- Ispitivana spektrofotometrijska metoda pokazala se istinitom, preciznom i robusnom.
- Na temelju dobivenih podataka izvedbenih značajki može se zaključiti da je metoda prikladna namijeni.

7. LITERATURA

Akyüz M, Ata S: Determination of low level nitrite and nitrate in biological, food and enviromental samples by gas cromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* 79(3):900-904, 2009.

APHA, American Public Health Association, AWWA, American Water Works Association, WEF, Water Environment Federation: *Standard Methods for the examination of water & wastewater*, 21th Edition, American Public Health Association, Washington, 2005.

Council of the European Union: Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of European Community* L330:32-54, 1998.

Council Directive 2013/51/Euratom of 22 October 2013 laying down requirements for the protection of the health of the general public with regard to radioactive substances in water intended for human consumption. *Official Journal of European Community* L296:12-21, 2013.

Doane AT, Horwáth WR: Spectrophotometric Determination of Nitrate with a Single Reagent. *Analytical Letters* 36(12):2713-2722, 2003.

Gereš D: Ciklus kruženja vode u prirodi. *Građevinar* 56(6):355-365, 2004.

Green JM: A Partical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry* 68:305A-309A, 1996.

Habuda-Stanić M, Kalajdžić B, Nujić M: *Tehnologija vode i obrada otpadnih voda*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2014.

HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Znanstveno mišljenje o riziku od nitata iz povrća*, HAH, 2016.http://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/znanstveno-misljenje-o-riziku-od-nitrata-iz-povrca.pdf [15.12.2016.]

Hem JD: Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water, United States Government printing Office, Dallas, 1985.

Hill MJ: *Nitrates and Nitrites in Food and Water*. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1991.

HS, Hrvatski sabor: *Zakon o vodi za ljudsku potrošnju*. Narodne novine 56/13, 2013.

HS, Hrvatski sabor: Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o vodi za ljudsku potrošnju. Narodne novine 64/15, 2015.

Huber L: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press, 1998.

Kaštelan-Macan M: *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*. Školska knjiga, Zagreb, 2003.

Klapec T, Šarkanj B, Banjari I: *Fiziologija probave*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2014.

Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.

Knežević Z: Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* 3 (10):1-5, 2007.

Kodamatani H, Yamazaki S, Saito K, Tomiyasu T, Komatsu Y: Selective Determination Method for Measurement of Nitrite and Nitrate in Water Samples Using High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Reaction and Chemiluminescence Detection. *Journal of Chromatography A* 1216(15):3163–3167, 2009.

Lazarić K: Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri* 1:61-64, 2012.

Lazarić K, Gašljević V: *Validacija analitičkih metoda*. Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 2012.

Mayer D: Svjetske zalihe vode na početku XXI. stoljeća. U *Geopolitički aspekti nafte i vode*, str. 133-154, Centar za politološka istraživanja, Zagreb, 2008.

Michalski R, Kurzyca I: Determination of Nitrogen Species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in Environmental Samples by Ion Chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(1):5-18, 2006.

Mikuška P, Večeřa Z: Chemiluminescent flow-injection analysis of nitrates in water using on-line ultraviolet photolysis. *Analytica Chimica Acta* 474:99-105, 2002.

MZ, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske: *Nacionalne smjernice za prehranu učenika u osnovnim školama*, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske, 2013a. http://www.hdnd.hr/wp-content/uploads/2015/05/Nacionalne_smjernice_za_prehranu_ucenika_u_osnovnim_skolama.pdf [15.12.2016]

MZ, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske: Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju. Narodne novine 128/15, 2015.

MZ, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske: Pravilnik o izmjenama Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju. Narodne novine 141/13, 2013b.

MZ, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske: Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju. Narodne novine 125/13, 2013c.

Padarauskas A, Olsauskaite V, Paliulionyte V: Simultaneous determination of inorganic anions and cations in waters by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 829(1-2):359-365, 1998.

Pavlinić Prokurica I, Bevardi M, Medić H, Vidaček S, Marušić N, Kolarić Kravar S: Nitriti i nitrati kao prekursori N-nitrozamina u paštetama u konzervi. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* 12(6):322-332, 2010.

Rajković MB: Neke neorganske supstance koje se mogu naći u vodi za piće i posledice po zdravlje ljudi. *Hemijska industrija* 57(1):24-34, 2003.

Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E: Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* 23(8):535-552, 2004.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report). *Pure and Applied Chemistry* 74(5):835-855, 2002.

Tolić S: *Značaj vode i vodnih resursa za opstanak planete Zemlje*, 2015. http://www.stampar.hr/hr/povodom-svjetskog-dana-voda-22-ozujka-2015-znacaj-vode-i-vodnih-resursa-za-opstanak-planete-zemlje [15.12.2016.]

Trogrlić E, Strineka A, Sekulić D: Međulaboratorijska ispitivanja i njihova primjena. *Građevinar* 61(7):643-654, 2009.

Vasić-Rački Đ: Nitriti i nitrati. U K*emijske i fizikalne opasnosti u hrani,* str. 77-81. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.

Vessman J: Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharamaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14:867-869, 1996.

WHO, World Health Organisation: *Guidelines for Drinking-water Quality*. WHO, Geneva, 2011.

Wood R: How to validate analytical methods. *Trends in analytical chemistry* 18:624-632, 1999.

Yeh TS, Liao SF, Kuo CY, Hwang WI: Investigation of the Nitrate and Nitrite Contents in Milk and Milk Powder in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 21:73-79, 2013.