

Verifikacija metode za određivanje klorita i klorata

Magić, Dina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:137275>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Dina Magić

VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KLORITA I KLORATA

Diplomski rad

Osijek, 2024

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Dina Magić

VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KLORITA I KLORATA

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Neposredni voditelj: Hrvoje Babić, mag. educ. chem

Osijek, 2024

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanost

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Analitička kemija

VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KLORITA I KLORATA

DINA MAGIĆ

Rad je izrađen u: Laboratoriju za kromatografiju, Nastavni zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Neposredni voditelj: Hrvoje Babić, mag. educ. chem.

Sažetak:

Kloriti i klorati su anorganski ioni koji se pojavljuju u uzorcima vode. Ove ionske vrste nastaju kao nusprodukti dezinfekcije pri korištenju klorova dioksida. Budući da imaju toksičan učinak potrebno ih je na vrijeme identificirati. Ionska kromatografija pogodna je za analizu klorita i klorata zbog svoje specifičnosti, automatizacije, visoke osjetljivosti, preciznosti te ponovljivosti. Također, priprema uzoraka za ionsku kromatografiju je jednostavna i brza, a za analizu je potrebno osigurati male količine uzorka. Još jedna prednost ionske kromatografije je ta što ona omogućuje istovremenu detekciju različitih aniona i kationa u uzorcima. Ovim diplomskim radom provedena je verifikacija već postojeće metode za određivanje klorita i klorata u uzorcima vode ionskom kromatografijom. Kao parametri validacije ispitali su se: linearnost, ponovljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije te koncentracijski raspon. Svi dobiveni rezultati zadovoljili su propisane kriterije prihvatljivosti (koeficijent korelacije $r \geq 0,995$, granica kvantifikacije 0,05 mg/L, ponovljivost RSD $\leq 10\%$ te iskorištenje od $100 \pm 10\%$). Odabrano je osam izvora mjerne nesigurnosti koje su se analizirale: čistoća standarda, mikropipeta 10-100 μL , mikropipeta 100-1000 μL , odmjerne tikvica 10 mL, kalibracijski pravac, ponovljivost mjerenja, iskorištenje te ponovljivost pripreme uzorka. Od svih ispitanih izvora mjerne nesigurnosti, kod oba analita, najveći je utjecaj imao kalibracijski pravac. Izračunate su i sastavljena te proširena mjerna nesigurnost.

Ključne riječi: kloriti, klorati, ionska kromatografija, verifikacija, voda

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Diplomski rad obuhvaća: 60 stranica, 8 slika, 41 tablica, 20 literaturnih navoda

Rad prihvaćen: 19. rujna 2024.

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

- izv.prof.dr.sc. Martina Šrajter Gajdošik, predsjednica
- doc.dr.sc. Olivera Galović, mentor i član
- prof.dr.sc. Natalija Velić, član
- izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University name: **Josip Juraj Strossmayer Univeristy of Osijek – Department of Chemistry**
Name of study program: **University Graduate study programme in Chemistry; research program**
Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Scientific branch: Analytical chemistry

VERIFICATION OF THE METHOD FOR DETERMINING CHLORITE AND CHLORATE
DINA MAGIĆ

The paper was created on: Laboratory for chromatography, Teaching Institute of Public Health OBŽ
Supervisor: Olivera Galović, PhD., assistant prof
Co-supervisor: Hrvoje Babić, mag. educ. chem.

Abstract:

Chlorites and chlorates are inorganic ions that appear in water samples. These ionic species are byproducts of disinfection when chlorine dioxide is used. Since they have toxic effects, it is necessary to identify them in a timely manner. Ion chromatography is suitable for the analysis of chlorites and chlorates due to its specificity, automation, high sensitivity, precision, and repeatability. Additionally, sample preparation for ion chromatography is simple and fast, and only small quantities of the sample are required for analysis. Another advantage of ion chromatography is that it enables the simultaneous detection of different anions and cations in samples. This thesis conducted a verification of an existing method for the determination of chlorites and chlorates in water samples by ion chromatography. The validation parameters examined were: linearity, repeatability, accuracy, detection limit, quantification limit, and concentration range. All obtained results met the prescribed acceptance criteria (correlation coefficient $r \geq 0.995$, quantification limit 0.05 mg/L, repeatability $RSD \leq 10 \%$, and recovery of $100 \pm 10 \%$). Eight sources of measurement uncertainty were selected for analysis: standard purity, micropipette 10-100 μL , micropipette 100-1000 μL , 10 mL volumetric flask, calibration curve, measurement repeatability, recovery and reproducibility of sample preparation. Among all the examined sources of measurement uncertainty, for both analytes, calibration curve had the greatest impact. Combined and expanded measurement uncertainties were also calculated..

Keyword: *chlorites, chlorates, ion chromatography, verification, water*

Original language: Croatian language

Thesis includes: 60 pages, 8 figures, 41 tables, 20 references

Thesis accepted: 14. September 2024.

Reviewers:

1. Martina Šrajer Gajdošik, PhD., associate prof., chairmen
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Natalija Velić, PhD., full prof., member
4. Martina Medvidović Kosanović, PhD., associate prof., alternate member

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

SADRŽAJ:

The paper was created on: Laboratory for chromatography, Teaching Institute of Public Health

OBŽ	4
Supervisor: Olivera Galović, PhD., assistant prof	4
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Dezinfekcija vode i nusprodukti dezinfekcije	2
2.1.1. Kloriranje	3
2.1.2. Klorov dioksid	4
2.1.3. Ostali načini dezinfekcije	6
2.1.4. Regulacije na području Europske unije i Republike Hrvatske	7
2.2. Ionska kromatografija	8
2.2.1. Razvoj ionske kromatografije	9
2.2.2. Ionski kromatograf	10
2.3. Validacija i verifikacija	14
2.3.1. Linearnost	16
2.3.2. Osjetljivost	16
2.3.3. Granica detekcije	17
2.3.4. Granica kvantifikacije	17
2.3.5. Točnost	18
2.3.6. Preciznost	18
2.3.7. Robusnost	19
2.3.8. Selektivnost	19
2.4. Mjerna nesigurnost	19
2.4.1. Sastavljena mjerna nesigurnost	20
2.4.2. Proširena mjerna nesigurnost	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Kemikalije	21
3.2. Pribor i instrumentacija	21
3.3. Uvjeti ionske kromatografije	23
3.4. Kalibracija	24
3.5. Priprema uzoraka	25
3.5.1. MIX	25

3.5.2. Kalibracijski standardi.....	25
3.5.3. Realni uzorci.....	26
3.5.4. <i>Spike</i> za LOQ i MDK.....	26
3.6. Procjena mjerne nesigurnosti.....	27
3.7. Statistička obrada podataka.....	28
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
5.1. Linearnost.....	29
5.2. Ponovljivost	33
5.2.1. Ponovljivost kontrolnog standarda.....	33
5.2.2. Ponovljivost kalibracijskih otopina	35
5.2.3. Ponovljivost <i>spike-a</i>	36
5.3. Točnost.....	38
5.3.1. Točnost kontrolnog standarda.....	38
5.3.2. Točnost <i>spike-a</i>	40
5.4. Granica detekcije	41
5.5. Granica kvantifikacije	43
5.7. Koncentracijski raspon.....	43
5.8. Sažetak rezultata	44
5.9. Mjerna nesigurnost	45
5.9.1. Nesigurnost čistoće standarda.....	46
5.9.2. Nesigurnost mikropipeta	46
5.9.3. Nesigurnost odmjerne tikvice.....	49
5.9.4. Nesigurnost kalibracijskog pravca	50
5.9.5. Nesigurnost ponovljivosti mjerenja i iskorištenja.....	52
5.9.6. Nesigurnost ponovljivosti pripreme uzorka	54
5.9.7. Sastavljena i proširena mjerna nesigurnost svih izvora mjerne nesigurnosti	55
5. ZAKLJUČAK	58
6. LITERATURNI PREGLED.....	59

1. UVOD

Kloriti (ClO_2^-) i klorati (ClO_3^-) su anorganski ioni koji nastaju kao nusprodukti dezinfekcije vode. Njihovo prisustvo u vodi najčešće je povezano s upotrebom klorovog dioksida kao dezinfekcijskog sredstva. Ove ionske vrste imaju toksičan učinak na ljudski organizam te mogu uzrokovati oštećenja crvenih krvnih stanica, nepravilan rad štitnjače te druge zdravstvene probleme. Također, kloriti i klorati imaju negativan utjecaj i na okoliš te na floru i faunu koja u njemu boravi. Sukladno tomu, Europska unija postavlja standarde i smjernice za dezinfekciju vode unutar kojih su propisane maksimalne dopuštene razine koje se moraju poštivati vezano za prisutnost klorita i klorata u vodi. Kloriti i klorati se mogu identificirati i kvantificirati pomoću različitih analitičkih tehnika kao što su spektrofotometrija, kromatografija te elektrokemijskim metodama [1].

Cilj ovog diplomskog rada bio je verificirati metodu za određivanje klorita i klorata u uzorcima vode metodom ionske kromatografije. Za verifikaciju metode bilo je potrebno ispitati nekoliko validacijskih parametara, a odabrani su: linearnost, ponovljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije te koncentracijski raspon. U konačnici se ispitala i mjerna nesigurnost metode kroz osam različitih izvora mjerne nesigurnosti. Izvori mjerne nesigurnosti koji su odabrani: čistoća standarda, volumen mikropipete (10-100 μL), volumen mikropipete (100-1000 μL), volumen odmjerne tikvice (10 mL), kalibracijski pravac, ponovljivost mjerenja, iskorištenje te ponovljivost pripreme uzorka. Verificiranom metodom su zadovoljeni propisani kriteriji prihvatljivosti.

Prvi dio rada, Literaturni pregled, opisuje najčešće načine dezinfekcije vode te nusprodukte koji tim putem nastaju. Potom je detaljno opisana ionska kromatografija te način rada ionskog kromatografa. Također, navedene su i razlike između validacije i verifikacije te su ukratko opisani najznačajniji parametri validacije i mjerne nesigurnosti. U drugom dijelu rada, Eksperimentalni dio, opisane su korištene kemikalije, pribor te instrumenti, opisan je način pripreme uzoraka te je navedeno na koji način se ispitala mjerna nesigurnost i pomoću kojih programa su se rezultati statistički obradili. U trećem dijelu rada, Rezultati i rasprava, prikazani su i objašnjeni dobiveni eksperimentalni rezultati. Najprije su opisani rezultati za parametre validacije, a nakon toga su opisani rezultati za mjernu nesigurnost. Posljednji dio rada, Zaključak, osmišljen je na temelju svih prethodno iskazanih rezultata te je u njemu iskazan konačni zaključak na temu.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Dezinfekcija vode i nusprodukti dezinfekcije

Dezinfekcija vode predstavlja ključni proces kojim se osigurava pitkost vode, eliminacija patogenih mikroorganizama, a samim time i sprječavanje bolesti. Postoji nekoliko metoda dezinfekcije vode, od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke. Koliko je često potrebno obavljati dezinfekciju ovisi o kvaliteti izvorišne vode, uvjetima distribucijskog sustava te o regulatornim zahtjevima. U većini javnih vodoopskrbnih sustava dezinfekcija se provodi kontinuirano kako bi se osigurala stalna kvaliteta vode koja se vodovodnim sustavom distribuira korisnicima. Manji sustavi ili privatni bunari dezinfekcije moraju provoditi periodično ovisno o kvaliteti izvorišne vode i riziku kontaminacije. U nekim se slučajevima dezinfekcija provodi i kao odgovor na specifični događaj ili pojavu indikatora kontaminacije. Ukoliko se otkrije mikrobiološka kontaminacija (npr. prisutnost *E. Coli* ili nekog drugog patogena) mora se provesti intenzivna dezinfekcija kako bi se eliminirali svi prisutni kontaminanti. Također, ukoliko se na temelju rezultata rutinskih analiza kvalitete vode procijeni da voda sadrži povećan broj mikroorganizama ili drugih zagađivača tada je potrebno provesti dodatnu dezinfekciju [2].

Nusprodukti dezinfekcije (engl. *Disinfection By-Product*, DBP) su neposredni sporedni produkti koji nastaju kemijskom reakcijom između dezinfekcijskog sredstva i organske ili anorganske tvari u vodi. Postoji nekoliko čimbenika koji određuju kolika koncentracija nusprodukata nastaje, a neki od njih su: vrsta i koncentracija dezinfekcijskog sredstva, temperatura vode, godišnje doba, koncentracija prisutne organske tvari u vodi, pH vode, veličina distribucijskog sustava te vrijeme zadržavanja vode. Do sada je identificirano preko 600 različitih nusprodukata dezinfekcije koji se klasificiraju na temelju njihove reguliranosti. Regulirani nusprodukti dezinfekcije su oni spojevi koji su predmet zakonskih standarda i propisa. Ove regulative određuju njihovu maksimalnu dopuštenu koncentraciju (MDK) u vodi sa svrhom zaštite javnog zdravstva. Takvi nusprodukti su primjerice: trihalometani, halooctene kiseline, kloriti, klorati i bromati. Neregulirani nusprodukti dezinfekcije su oni spojevi koji nisu predmet specifičnih zakonskih standarda ili propisa. Takvi spojevi često su predmet znanstvenih istraživanja kako bi se rastumačila njihova toksičnost u vodoopskrbnim sustavima. Neki od primjera nereguliranih nusprodukata su: haloamidi, haloaldehidi, jodo-trihalometani, aldehidi, ketoni te halonitrometani [3].

2.1.1. Kloriranje

Kloriranje je najčešća metoda dezinfekcije vode, a temelji se na dodavanju elementarnog klora ili spojeva klora vodi u svrhu uništenja različitih patogenih mikroorganizama poput virusa, bakterija ili protozoa. Klor se može dodati vodi u elementarnom obliku ili u obliku natrijevog ili kalcijevog hipoklorita. Dodatkom u vodu dolazi do kemijske reakcije između klora i vode, a kao rezultat toga nastaje hipokloritna kiselina i hipokloritni anioni koji djeluju kao glavni dezinfekcijski agensi [4].

Pozitivna strana ovakvog načina dezinfekcije je postojanje rezidualnog klora. Rezidualni klor se odnosi na količinu klora koji ostaje u vodi nakon reakcije s organskim i anorganskim tvarima koje su prirodno prisutne u vodi. On pruža kontinuiranu zaštitu od mikrobiološke kontaminacije tijekom skladištenja i distribucije vode, a ujedno je i jedan od ključnih pokazatelja učinkovitosti dezinfekcijskog sredstva. Osim s vodom, klor može reagirati i s cijevima u vodoopskrbnim mrežama što može uzrokovati koroziju i oslobađanje toksičnih metala u vodu. Također, kloriranje se pokazalo neučinkovitim protiv nekih vrsta parazita kao što su *Cryptosporidium* i *Giardia*. Najveći nedostatak ove dezinfekcijske metode jest nastanak toksičnih nusprodukata [4].

Trihalometani (engl. *Trihalomethanes*, THM) su kemijski spojevi koji nastaju kao produkti reakcije između klora i organske tvari prisutne u vodi. Trihalometani su organski spojevi koji imaju jedan centralni ugljikov atom na koji su vezana tri atoma halogena (broma, joda ili klora) te jedan atom vodika. Opća formula trihalometana je CHX_3 gdje X predstavlja halogeni element. U Republici Hrvatskoj je zakonski određeno praćenje koncentracije četiri vrste trihalometana u vodi, a to su: kloroform, bromoform, bromodiklormetan i dibromoklormetan [4]. Trihalometani u organizam ulaze oralnim putem, udisanjem ili apsorpcijom kroz kožu. Jednom kada uđu u organizam mogu se distribuirati kroz čitavo tijelo i akumulirati u različitim tkivima. Dugotrajna izloženost trihalometanima povezuje se s povećanim rizikom od pojave raka mokraćnog mjehura, debelog crijeva te rektuma. Također, sumnja se da visoka izloženost trihalometanima može uzrokovati smanjenu plodnost te povećati učestalost spontanih pobačaja. Trihalometani mogu uzrokovati i oštećenja jetre i bubrega te mogu poremetiti normalan rad živčanog sustava [5].

Haloacetene kiseline (engl. *Haloacetic Acid*, HAA) su organski spojevi opće formule $C_2H_{3-n}X_nCOOH$ u kojoj X predstavlja halogeni element. U Republici Hrvatskoj se zakonski provodi praćenje pet predstavnika haloacetnih kiselina, a to su: monoklorooctena kiselina,

diklorooctena kiselina, triklorooctena kiselina, monobromooctena kiselina i dibromooctena kiselina [5]. Ova skupina spojeva nastaje kada dezinfekcijska sredstva reagiraju s organskim tvarima prisutnim u vodi. Diklorooctena i triklorooctena kiselina klasificirane su u skupinu potencijalnih karcinogenih spojeva za ljude. Haloctene kiseline povezuju se i s oštećenjima genetskog materijala što posljedično dovodi do različitih mutacija, a samim time se povećava i rizik od razvoja raka. Dugotrajna izloženost ovim organskim spojevima može negativno utjecati na reproduktivni sustav, a povezani su i s oštećenjima jetre [6].

2.1.2. Klorov dioksid

Klorov dioksid (ClO_2) snažan je oksidans koji se koristi kao alternativa kloru. Upotrebljava se za dezinfekciju pitke vode, za pročišćavanje otpadnih voda te u industrijskim procesima radi kontrole mikrobiološke kontaminacije u radnim sustavima. Učinkovito eliminira širok spektar mikroorganizama te, za razliku od klora, ne reagira s organskim tvarima u vodi što rezultira manjom količinom štetnih nusprodukata. Oksidacijski potencijal ovog spoja viši je od oksidacijskog potencijala klora što ga čini učinkovitijim dezinfekcijskim sredstvom. Klor dioksid je bezbojan plin pri sobnoj temperaturi, a najčešće se proizvodi na licu mjesta zbog svoje nestabilnosti kao slobodnog plina. Moguće ga je proizvesti na dva načina – kloritnom i kloratnom metodom. Kloritna metoda podrazumijeva reakciju natrijevog klorita s klorom, dok kloratna metoda podrazumijeva reakciju natrijevog klorata s kiselinom i nekim reducirajućim sredstvom [7].

Visoki oksidacijski potencijal klorovog dioksida rezultira uništenjem staničnih stijenki mikroorganizama, denaturacijom njihovih proteina i narušavanjem genetskog materijala. Pokazao se uspješnim i kod uklanjanja biofilma u distribucijskim sustavima čime se poboljšava ukupna higijena vodoopskrbnog sustava. Učinkovit je u pH rasponu između 5 i 10 što ga čini prilagodljivim na različite uvjete vode, a može ukloniti i neugodne mirise i okuse koji nastaju zbog prisutnosti organske tvari u vodi. S druge strane, klorov dioksid je nestabilan plin pa stoga njegova proizvodnja iziskuje specijaliziranu opremu i sigurnosne mjere. Također, troškovi proizvodnje i rukovanja ovim plinom skuplji su u odnosu na tradicionalni klor [7].

Kloriti i klorati su anorganski ioni koji se formiraju kao nusprodukti dezinfekcije klorovim dioksidom. Kloriti (ClO_2^-) su snažni oksidansi koji mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama živih bića što posljedično dovodi do oštećenja stanične membrane, proteina i genetskog materijala organizma. Moguće je da kloriti izazovu i oksidaciju hemoglobina u

crvenim krvnim stanicama pri čemu se stvara methemoglobin koji nije sposoban prenositi kisik. Prekomjerna koncentracija methemoglobina može rezultirati hemolitičkom anemijom, stanjem u kojem se crvene krvne stanice uništavaju brže nego što se stvaraju. Kratkotrajna izloženost većim koncentracijama klorita može rezultirati mučninom, povraćanjem, vrtoglavicom i bolovima u predjelu trbuha. Dugotrajna izloženost će rezultirati općom slabošću organizma, umorom, a moguće je da dođe i do oštećenja jetre i bubrega. Neka istraživanja pretpostavljaju kako kloriti mogu negativno utjecati na plodnost i kod muškaraca i kod žena. Kloriti djeluju i na imunološki sustav pri čemu smanjuju sposobnost organizma da se bori protiv raznih infekcija. Također, mogu uzrokovati i neurološke probleme [8].

Klorati, ClO_3^- mogu ometati normalno funkcioniranje štitnjače jer inhibiraju apsorpciju joda što je ključno za pravilnu sintezu hormona štitnjače. Također mogu oksidirati hemoglobin pri čemu nastaje methemoglobin. Kratkotrajna izloženost visokim razinama klorata rezultirati će iritacijama gastrointestinalnog trakta, bolovima u trbuhu i povraćanjem, umorom, nedostatkom daha. U ekstremnim situacijama moguće je i da dođe do razvoja methemogloninemije koja je popraćena time da koža poprimi plavičastu boju. Dugotrajna izloženost visokim koncentracijama dovest će do oštećenja bubrega, jetre i štitnjače. Neka istraživanja sugeriraju da klorati mogu uzrokovati promjene u hormonskim razinama što može negativno utjecati na reproduktivne funkcije. Udisanje klorata može iritirati dišne putove uzrokujući kašalj, bol u grlu i otežano disanje [9].

Visoke koncentracije klorita i klorata u vodi ili tlu mogu inhibirati rast i razvoj biljaka što može rezultirati smanjenjem bioraznolikosti i narušavanjem ekosustava. Dugotrajna izloženosti ovim anionima može uzrokovati probleme s disanjem, oštećenje škrge i smrt kod vodenih organizama. Također, moguć je razvoj i kroničnih zdravstvenih problema kod vodenih organizama kao što su smanjeni rast, smanjena reproduktivnost i oslabljeni imunološki sustav. Visoke koncentracije mogu uzrokovati smanjenje broja vrsta, promjene u strukturi zajednice te poremećaje u prehrambenom lancu. Djeluju i na biljni vodeni svijet pa tako mogu inhibirati rast i razvoj algi koje su uključene u proizvodnju kisika, filtriranje vode i pružanja staništa za druge manje organizme. Inhibicija rasta algi može rezultirati destabilizacijom vodenih sustava. Kloriti i klorati mogu narušiti prirodne zajednice u tlu i vodi tako što mogu ubiti ili inhibirati rast korisnih mikroorganizama koji su ključni za razgradnju organskih materijala. Dugotrajna prisutnost klorita i klorata u tlu može smanjiti mikrobnu raznolikost što rezultira smanjenom otpornošću ekosustava na stresne uvjete. Prisutnost klorita i klorata u vodi za navodnjavanje ili tlu može biti toksično za poljoprivredne usjeve jer ovi ioni djeluju tako da inhibiraju klijanje

sjemena, rast korijena te ukupni biljni rast što dovodi do smanjenog prinosa i kvalitete samog usjeva [10].

2.1.3. Ostali načini dezinfekcije

Ozoniranje je prvi puta primijenjeno 1893. godine kao način obrade vode za piće. Kao dezinfekcijsko sredstvo koristi se ozon (O_3) koji je učinkovitiji dezinficijens u odnosu na klor. Ozon se stvara direktno na lokaciji te stoga nema potrebe za transportom ili rukovanjem ozonom. Ozon oksidira anorganske i organske spojeve u vodi, a također oksidira i stanične membrane mikroorganizama što rezultira njihovom eliminacijom. Nakon ozoniranja ne dolazi do ponovnog rasta mikroorganizama. Ozon brzo djeluje i u potpunosti se razgrađuje što rezultira znatno manjim brojem nusprodukata u odnosu na kloriranje ili upotrebu klorova dioksida. Ozon ne ostavlja rezidualnu dezinfekciju te je stoga nužno koristiti i dodatni oblik dezinfekcije. Prije nego što se provede ozoniranje potrebna je biološka filtracija za uklanjanje nastalih razgradivih organskih spojeva. Također, sustav za proizvodnju ozona je složen te stoga zahtijeva znatne financijske izdatke u svrhu očuvanja samog sustava te za edukaciju operatera koji će njime raditi [11].

Dezinfekcija ultraljubičastim zračenjem (engl. *ultraviolet*, UV) je učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda za dezinfekciju vode. Ova metoda koristi samo UV-zračenje kako bi se eliminirali mikroorganizmi bez korištenja kemijskih agensa. Najučinkovitiji raspon za dezinfekciju iznosi od 200 do 280 nm, a naziva se UV-C rasponom. Sva voda koja prolazi kroz proces dezinfekcije prolazi kroz UV reaktor unutar kojeg djeluje UV-C zračenje. UV-C fotoni prodiru u stanice mikroorganizama i uzrokuju oštećenje nukleinskih kiselina čime se sprječava njihova daljnja replikacija i transkripcija genetskog materijala. UV-sustav dezinfekcije troši relativno malo energije i jednostavan je za održavanje. Negativna strana ove metode je to što dezinfekcija ovisi o prozirnosti vode. Ukoliko je potrebno dezinficirati vodu visoke mutnoće ili vodu u kojoj postoji veći broj prisutnih suspendiranih čestica tada učinkovitost dezinfekcije neće biti dostatna. Kako bi se to spriječilo voda često mora prolaziti kroz sustav filtera kako bi se što veća količina otopljenih čestica uklonila te kako bi se omogućila što veća efikasnost UV-dezinfekcije. Ovaj oblik dezinfekcije ne pruža dugotrajni oblik zaštite jer ne ostavlja rezidualni agens u vodi što može biti problem u vodoopskrbnim sustavima gdje postoji rizik od ponovne kontaminacije [12].

2.1.4. Regulacije na području Europske unije i Republike Hrvatske

Regulatorne agencije kao što su Agencija za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA) u Sjedinjenim Američkim Državama ili Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) u Europskoj uniji postavljaju standarde i smjernice za dezinfekciju vode. Unutar Europske unije kvaliteta vode za piće regulirana je Direktivom Vijeća 98/83/EC o kvaliteti vode namijenjenu za ljudsku potrošnju. Početkom 2023. godine na snagu je stupila preinaka direktive pod nazivom Direktiva 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2020. godine o kvaliteti vode namijene za ljudsku potrošnju. Ovom direktivom postavljeni su standardi mikrobioloških, kemijskih i indikatorskih parametara vode. Svaka država članica Europske unije mora poštivati i provoditi upute direktive putem nacionalnih zakona i propisa. Države članice moraju poduzeti sve potrebne mjere kako bi se do 12. siječnja 2026. godine osigurala sukladnost s izdanom direktivom. Neki od zahtjeva prikazani su u Tablici 1 [13].

Tablica 1. Zahtjevi nove Direktive Europskog parlamenta i Vijeća za klorite, klorate, haloctene kiseline, trihalometane i kloride [13].

VRSTA PARAMETRA	PARAMETAR KOJI SE PRATI	MAKSIMALNA DOPUŠTENA KONCENTRACIJA, MDK	MJERNA JEDINICA	NAPOMENA	MJERNA NESIGURNOST %
<i>Kemijski parametri</i>	Klorati	0,25	mg/L	Tolerira se vrijednost parametra do 0,70 mg/L kod vodoopskrbnih sustava koji koriste klorov dioksid kao sredstvo dezinfekcije	40
	Kloriti	0,25	mg/L		40
	Haloctene kiseline	60	µg/L		50
	Trihalometani – ukupno	100	µg/L		40
<i>Indikatorski parametri</i>	Kloridi	250	mg/L		15

U Republici Hrvatskoj je kvaliteta vode za piće regulirana Zakonom o vodama (NN 47/2023) te Pravilnikom o parametrima sukladnosti i metodama analize za ljudsku potrošnju (NN 64/2023). Navedenim pravilnikom obuhvaćeni su svi zahtjevi Direktive Vijeća 2013/51/Euratom i Direktive 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća. Vodoopskrbne ustanove dužne su redovito pratiti kvalitetu i analize vode za ljudsku potrošnju kako bi se osigurala sukladnost s propisanim parametrima. Najčešće korištena metoda dezinfekcije u RH je kloriranje te upotreba klor dioksida. UV-dezinfekcija se koristi u modernijim sustavima, a ponajviše u priobalnom području te na turističkim destinacijama. Ozoniranje je najmanje zastupljeno [14].

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ) osnovan je 1926. godine i od tada djeluje kao glavni zdravstveni institut u zemlji kojemu je cilj zaštititi i unaprijediti javno zdravstvo. Između ostalih aktivnosti koje HZJZ provodi, oni prate i nadziru kvalitetu vode za ljudsku potrošnju na nacionalnoj razini te na kraju svake godine objavljuju godišnja izvješća o kvaliteti vode. Tako prema uputama HZJZ-a u vodi za piće mora biti prisutan rezidualni klor u koncentracijama između 0,2 i 0,5 mg/L kako bi se osigurala kontinuirana dezinfekcija duž cijelog distribucijskog sustava. Maksimalne dopuštene koncentracije rezidualnog klora ne smiju prelaziti koncentracije od 0,5 mg/L prema NN 64/2023 [15].

2.2. Ionska kromatografija

Ionska kromatografija (engl. *Ion Chromatography*, IC) je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje i kvantifikaciju iona u uzorcima. Ovom tehnikom moguće je određivati koncentracije širokog raspona aniona i kationa. Pomoću ionske kromatografije moguće je kvantificirati i identificirati kontaminante u prirodnim vodama, otpadnim vodama te u vodi za ljudsku potrošnju. Koristi se i u farmaceutskoj industriji za kontrolu kvalitete i čistoće lijekova dok se u prehrambenoj industriji koristi kako bi se pratile razine organskih i anorganskih iona prisutnih u prehrambenim proizvodima. Kako bi se odredile koncentracije aniona i kationa u vodi za ljudsku potrošnju, prirodnim izvorskim, prirodnim mineralnim, podzemnim, površinskim, bazenskim ili otpadnim vodama propisane su odgovarajuće norme. Metoda za određivanje klorita i klorata putem ionske kromatografije propisana je normom HRN EN ISO 10304-4:2022.

Ionska kromatografija je visoko selektivna analitička tehnika koja razdvaja ionske vrste s obzirom na njihova kemijska svojstva i s obzirom na njihove interakcije sa stacionarnom

fazom. Moguće je razdvojiti i istovremeno analizirati više različitih ionskih vrsta i u kompleksnim uzorcima. Pomoću ionske kromatografije moguće je analizirati i organske i anorganske katione i anione. Ova analitička tehnika je i izuzetno osjetljiva što joj omogućuje detekciju iona i pri vrlo niskim koncentracijama koji se često kreću u rasponu od nekoliko miligrama po litri (mg/L) do nekoliko mikrograma po litri ($\mu\text{g/L}$). Ionska kromatografija pruža visoku razinu preciznosti i točnosti u kvantitativnoj analizi. Vrijeme analize ovisi o vrsti i kompleksnosti samoga uzorka te o broju parametara koji se moraju analizirati. Priprema uzoraka za ionsku kromatografiju je jednostavna, a često se uzorci mogu analizirati direktno bez opsežne pripreme. Također, ionsku kromatografiju krase visok stupanj automatizacije što omogućuje automatsko injektiranje uzoraka, obradu podataka te formiranje konačnog izvještaja [16].

2.2.1. Razvoj ionske kromatografije

Začetnicima ionske kromatografije smatraju se Hermann Staudinger i Arne Tiselius koji su 1940. godine razvili teoriju ionske izmjene čime su postavili temelje za razumijevanje na koji način ioni međudjeluju s ionskim izmjenjivačima. Deset godina kasnije A. Tiselius nagrađen je za svoj rad na elektroforezi i adsorpcijskoj analizi Nobelovom nagradom, a njegov se rad primijenio za daljnji razvoj kromatografskih metoda. Tekućinska kromatografija koja je koristila polimerne ionske izmjenjivače razvila se 1960.-ih godina [16].

Kroz 1970.-e godine pojavljuju se prvi komercijalni instrumenti. Godine 1971. Hamish Small, Timothy S. Stevens i William C. Bauman razvijaju prvi komercijalni ionski kromatografski sustav čime započinje nova era u analitičkoj kemiji. Četiri godine kasnije *Dionex* lansira prvi komercijalni IC-sustav na tržište. Ovaj uređaj koristio je ionske izmjenjivačke kolone i električnu provodljivost za detekciju iona [16].

Ionski supresori razvili su se tijekom 1980.-ih godina, a njihovo uvođenje u IC-sustav rezultiralo je boljom osjetljivošću i selektivnošću metode uz smanjen pozadinski šum i povećan signal za detektirane ione. Elektrokemijskim detektorom omogućena je detekcija iona s visokom osjetljivošću, a prvi takav detektor uveo se 1984. godine. Početak 1990.-ih godina okarakterizirao je razvoj i poboljšanje kolona kako bi razdvajanje bilo što učinkovitije. U ovom periodu isprobavali su se različiti novi materijali za ionske izmjenjivače kako bi se ispitala i omogućila što bolja performansa samih kolona. Kapilarna ionska kromatografija koristi vrlo

tanke kolone kojima je moguće razdvojiti uzorke s visokom rezolucijom, a razvijena je 1995. godine [16].

S početkom 21. stoljeća započela je faza modernizacije u kojoj su se ispitivali i razvijali različiti detektori. Jedan od najznačajnijih događaja je bilo uvođenje masenog detektora u IC-sustav čime je nastala spregnuta analitička tehnika IC-MS. To je moćna analitička tehnika koja omogućuje detaljnu kvantifikaciju i identifikaciju iona u različitim uzorcima, a danas se koristi u mnogim područjima zbog svoje osjetljivosti, specifičnosti i mogućnosti analize kompleksnih matriksa. Godine 2003. uvedeni su visokotlačni IC-sustavi koji koriste visokotlačne pumpe za brže i učinkovitije razdvajanje ionskih vrsta. Optički i fluorescentni detektori razvili su se 2010.-ih godina [16].

Trenutni naponi u smislu nadogradnje IC-sustava usmjereni su na područje nanotehnologije kako bi se razvili još efikasniji i precizniji uređaji. Također, želja je i razvoj multidimenzionalnih kromatografskih metoda u kojima bi se ionska kromatografija kombinirala s drugim analitičkim tehnikama poput plinske kromatografije (engl. *Gas Chromatography*, GC) ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) za poboljšano razdvajanje složenih uzoraka. U svrhu medicinskih i biokemijskih istraživanja razmatra se i razvoj IC-sustava koji bi bili još specijaliziraniji za identifikaciju i kvantifikaciju širokog spektra bioloških molekula.

2.2.2. Ionski kromatograf

Ionski kromatograf je uređaj specijaliziran za provođenje ionske kromatografije. U Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije upotrebljava se sustav za ionsku kromatografiju Dionex ICS-6000 koji je prikazan na Slici 1.



Slika 1. Uređaj za ionsku kromatografiju Dionex ICS-6000. Broj 1 – dualna pumpa, broj 2 – eluens generator, broj 3 – termostatirana komora, broj 4 – autosampler [17].

Ovaj uređaj sastoji se od četiri glavna dijela. Brojem 1 označena je dualna pumpa (engl. *Dual Pump*, DP) koja se sastoji od dvije pumpe za mobilnu fazu (jedna za kationski, a druga za anionski sustav). Dualna pumpa je ključna komponenta IC-sustava koja omogućuje preciznu kontrolu brzine protoka mobilne faze (eluens) kroz kromatografski sustav. Tijekom izokratskog eluiranja sastav mobilne faze ostaje konstantan, a dualne pumpe osiguravaju protok dviju različitih otopina koje se miješaju prije ulaska u samu kolonu čime je moguće održavati konstantne pH vrijednosti. Ukoliko se primjenjuje gradijentno eluiranje tada se sastav mobilne faze tijekom vremena analize mijenja. Ovime se postiže postepena promjena sastava mobilne faze što će omogućiti razdvajanje ionskih vrsta u složenim matriksima sa sličnim retencijskim vremenima. Dualne pumpe poboljšavaju razdvajanje analita, smanjuju vrijeme analize te povećavaju reproducibilnost rezultata [18].

Brojem 2 označen je eluens generator (EG) koji služi za automatsku pripremu zadanih koncentracija mobilne faze. U instrumentu su prisutna dva generatora od kojih jedan proizvodi mobilnu fazu za određivanje aniona (kalijeva lužina, KOH), a drugi za određivanje kationa (metensulfonska kiselina, MSK). Eluens generator sastoji se od naponske jedinice, uređaja za otplinjavanje, spremnika s koncentratom eluensa i kolone koja će otkloniti prisutne nečistoće u eluensu. Naponska jedinica služi za napajanje generatora strujom pri čemu se održava stabilni napon koji je potreban za pravilan rad generatora. Uređaj za otplinjavanje uklanja otopljene plinove iz tekućine (poput kisika ili dušika) čime se smanjuje mogućnost pojave mjehurića koji mogu negativno utjecati na stabilnost protoka, a samim time i na analitičke rezultate. Eluens generator olakšava i poboljšava postupak pripreme eluensa čime se eliminira potreba za ručnim miješanjem, a samim time se minimizira rizik od kontaminacije ili pogrešaka analitičara. Kako bi se pripremila željena koncentracija mobilne faze eluens generator miješa ultračistu vodu i koncentrirane otopine (koje se nalaze u spremniku s koncentratom eluensa) u potrebnim omjerima. Analitičar unosi željene parametre u program sustava, a eluens generator potom proizvodi mobilnu fazu prema zadanim parametrima. U programu je moguće brzo i jednostavno prilagođavati sastav eluensa što znatno ubrzava optimizaciju i prilagodbu različitih metoda specifičnim potrebama analize. Korištenjem eluens generatora omogućena je precizna kontrola koncentracije i sastava same mobilne faze što je neophodno za postizanje dosljednih analitičkih rezultata [18].

Brojem 3 označena je termostatirana komora unutar koje se nalazi injektorski ventil, predkolona, kolona, elektroanalitički supresor i detektor vodljivosti. Termostatirana komora predstavlja kontroliranu okolinu unutar koje se održava konstantna temperatura. Time se osigurava stabilnost i ponovljivost analiza jer promjena temperature može znatno utjecati na retencijska vremena, razdvajanje ionskih vrsta te učinkovitost cjelokupnog procesa. Također, neke stacionarne faze mogu biti osjetljive na promjene temperature što dovodi do promjena u selektivnost i učinkovitosti samog razdvajanja. Temperaturu komore moguće je automatski podesiti putem softvera u rasponu od 18 do 40 °C. Injektorski ventil služi kako bi se uzorak uveo u protok mobilne faze koja ga potom nosi kroz kolonu za razdvajanje [18].

Prije nego što uzorak dođe do kolone mora proći kroz predkolonu. Predkolone su male kromatografske kolone koje se postavljaju ispred glavnih analitičkih kolona. Primarna funkcija predkolona je zaštita glavne kolone od mogućih onečišćenja koje bi mogle oštetiti ili začepiti glavnu kolonu. Korištenjem predkolona značajno se produžuje vijek trajanja glavne kolone, a samim time se osiguravaju i pouzdani rezultati analize. Analitičke kolone su ključne

komponente koje omogućavaju razdvajanje ionskih vrsta u uzorku na temelju njihove različite interakcije sa stacionarnom fazom. Ove kolone se često nazivaju srcem kromatografskog sustava jer o njima ovisi selektivnost, retencijsko vrijeme i razlučivost analita. Kao stacionarna faza se obično koriste ionski izmjenjivači. Anionski izmjenjivači privlače i zadržavaju anione, dok kationski izmjenjivači privlače i zadržavaju katione. Stacionarna faza može biti izgrađena od polimera, smola ili silicija. Najčešće se primjenjuju polimerni materijali koji imaju visoku stabilnost te mogu izdržati promjene u širokom rasponu pH vrijednosti. Veličina i poroznost čestica stacionarne faze te duljina i promjer same kolone utječu na brzinu prolaska analita. Na stacionarnoj fazi su prisutne aktivne skupine (kationske ili anionske) koje se izmjenjuju s ionima iz uzorka. Ionske vrste iz uzorka natječu se za interakciju s aktivnim skupinama, a jakost interakcije ovisi o naboju i veličini samog iona. Manji ioni s većim nabojem obično se jače vežu za stacionarnu fazu te duže vremena ostaju u koloni. Ravnoteža između adsorpcije iona za stacionarnu fazu i njegovog eluiranja s mobilnom fazom određuje specifično retencijsko vrijeme za svaki ion. Ioni se naizmjenično vežu za stacionarnu fazu i eluiraju mobilnom fazom što rezultira njihovim pomicanjem kroz kolonu [18].

Uloga elektroanalitičkog supresora je smanjenje provodljivosti mobilne faze nakon što je uzorak prošao kroz kolonu. Smanjenje provodljivosti eluenta postiže se zamjenom visoko provodljivih iona (npr. OH^- ili H^+) s molekulama niže provodljivosti (npr. voda ili druge neutralne molekule) što će rezultirati većim omjerom signala i šuma za analitičke ione. Primarna uloga supresora je poboljšanje osjetljivosti i selektivnosti detekcije. Detektor vodljivosti je najčešće korišten detektor u ionskoj kromatografiji. Glavna funkcija detektora je mjerenje električne vodljivosti ionskih vrsta koje izlaze iz kolone čime se omogućuje kvantifikacija i identifikacija prisutnih iona. Detektor se sastoji do dviju ili više elektroda koje su uronjene u protok mobilne faze koja izlazi iz kolone. Kada ioni prođu između elektroda stvara se električna struja koja teče kroz otopinu između elektroda. Promjena vodljivosti pretvara se u električni signal koji odgovara koncentraciji prisutnih iona u otopini. Signal se softverski obrađuje, a konačni rezultat se prikazuje kao pik na kromatogramu. Visina pika odgovara prisutnoj koncentraciji, a položaj odgovara retencijskom vremenu ionske vrste [18].

Brojem 4 označen je autosampler koji automatski uvodi uzorke u analitički sustav. On omogućuje simultano injektiranje uzoraka u svrhu simultanih analiza što uključuje točno doziranje količine uzorka koji se uvodi čime se povećava preciznost same analize. Autosampleri su automatizirani sustavi koji smanjuju mogućnost ljudske pogreške koja potencijalno može nastati pri ručnom ubrizgavanju uzorka. Autosampler, također, omogućuje neprekidan rad

analitičkog sustava što je posebno važno tijekom noćnih sati ili za vrijeme vikenda čime se značajno povećava broj uzoraka koji se mogu analizirati. Ploča za uzorke može biti raspoređena u krugu (rotacijski autosampler) ili u liniji (linerni autosampler), a služi za pozicioniranje vijala ili epruveta unutar kojih se nalaze uzorci. Uzorci se ubrizgavaju putem šprice u injektorski ventil koji će prenijeti uzorak u tok mobilne faze koja će ga potom nositi do kolone. Sustavi za automatsko ispiranje ispiru unutarnje dijelove autosamplera između ubrizgavanja različitih uzoraka kako bi se izbjegla kontaminacija [18].

2.3. Validacija i verifikacija

Validacija, u kontekstu analitičkih metoda i laboratorijskog rada, predstavlja postupak kojim se potvrđuje ispravnost analitičke metode. Definirana je međunarodnom normom ISO/IEC 17025 kako bi se dokazalo da ispunjava predviđene svrhe i zahtjeve. Validacijom se osiguravaju točnost, preciznost i pouzdanost rezultata analitičke analize. Osim same analitičke metode potrebno je validirati i uzorak, instrument, dobivene podatke i niz drugih aspekata kako bi se osigurala cjelokupna točnost postupka. Nije definirano koliko validacija mora biti opsežna, a sam opseg određuju laboratorij ili korisnik. Opseg validacije uglavnom ovisi o tehničkim mogućnostima laboratorija, troškovima, starosti opreme te učestalosti upotrebe metode. Validaciju je moguće provoditi na nekoliko načina, a neki od njih su: međulaboratorijskim ispitivanjima, usporedbom sa certificiranim referentnim materijalom, uspoređujući rezultate s validiranom metodom, usporedbom sa standardnim otopinama te unutarlaboratorijskim ispitivanjima. Metoda koja nije validirana ne pruža nikakvu sigurnost da se njome unutar nekog područja mogu dobiti valjani podaci [19]. Parametre koje je potrebno provoditi u svrhu validacije za kvantitativne i kvalitativne metode navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Parametri validacije za kvalitativne i kvantitativne analitičke metode [19].

	KVALITATIVNE METODE	KVANTITATIVNE METODE
Preciznost		+
Selektivnost	+	+
Granica detekcije	+	+
Granica kvantifikacije		+
Linearnost		+
Raspon		+
Nesigurnost mjerenja	+	+
Robusnost	+	+
Potvrda identiteta	+	+
Točnost		+
Iskorištenje		+
Osjetljivost	+	+

Verifikacija je proces koji se provodi za metode koje su validirane. Verifikacijom se potvrđuje da neki određeni sustav, metodologija, instrument ili metoda ispunjava specifične zahtjeve, standarde ili specifikacije. Validacija je usmjerena na potvrdu toga ispunjava li neka metoda svoje predviđene svrhe i zahtjeve dok verifikacija podrazumijeva provjeru ispravnosti i usklađenost metode s prethodno definiranim specifikacijama. Verifikacija podrazumijeva provođenje niza testova (performansi, sigurnosti, funkcionalnosti i drugih bitnih kriterija) kako bi se potvrdilo da su svi aspekti metode ili sustava u skladu s očekivanjima. Metoda se verificira kako bi se osiguralo da su svi koraci, od pripreme pa sve do analize, u skladu s definiranim standardima i protokolima. Verifikaciju metode potrebno je provesti ukoliko se neka metoda tek uvela u laboratorij, ukoliko se prvi puta primjenjuje za analizu nekog specifičnog analita, ukoliko je došlo do izmjena u validiranoj metodi ili ukoliko su se u laboratoriju promijenili uvjeti koji utječu na provedbu same metode [19].

Proces validacije i verifikacije uključuje iste korake. Najprije je potrebno jasno definirati zahtjeve i specifikacije koje metoda treba ispuniti. Potom je nužno napraviti plan

kojim će se testiranje provesti. Kada je plan napravljen slijedi izvođenje testova koji podrazumijeva obavljanje svih nužnih mjerenja. Nakon testiranja analiziraju se svi prikupljeni podaci kako bi se ustanovilo ispunjavaju li svi aspekti tražene zahtjeve. Nakon toga slijedi dokumentiranje u kojem će biti iskazane sve provjere i rezultati testiranja kako bi se osigurala transparentnost te kako bi se skupili dokazi za buduće revizije. Zadnji korak je izvještavanje u kojemu se sastavlja izvještaj koji uključuje sve bitne informacije i rezultate testiranja te konačni zaključak o tome ispunjava li neka metoda tražene zahtjeve [19].

2.3.1. Linearnost

U kontekstu kromatografije i drugih analitičkih metoda linearnost se odnosi na mogućnost metode da pruži rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost pokazuje da postoji direktna linearna poveznica između koncentracije analita i dobivenog signala u određenom koncentracijskom rasponu. Linearnost je moguće prikazati grafički kao krivulju koja može biti linearna (kada su rezultati unutar linearnog raspona) ili nelinearna (kada su rezultati van linearnog raspona). Na x-os se ucrtava koncentracija, a na y-os se ucrtava analitički signal. Područje linearnosti predstavlja područje unutar kojeg nastaje linearni odziv, a kreće se od granice kvantifikacije (engl. *Limit Of Quantification*, LOQ) pa sve do krajnje točke u kojem više ne postoji linearna poveznica između koncentracije i odziva.

Kako bi se ispitala linearnost potrebno je napraviti kalibraciju. Kalibracija podrazumijeva postupak u kojemu se pripremaju serije standardnih otopina točno poznate koncentracije. Ove otopine potrebno je pripremiti pažljivo kako bi se osigurala točnost i preciznost koncentracija. Kalibraciju bi trebalo provoditi na najmanje pet točaka. Svaka pripremljena otopina se analizira pomoću instrumenta, a svi dobiveni podaci ucrtavaju se na graf. Linearnost se može procijeniti preko koeficijenta determinacije (R^2). Rezultati koeficijenta determinacije kreću se od 0 do 1. Što je R^2 bliže nuli to pokazuje da je veza između odziva i koncentracije prilično slaba ili u potpunosti odsutna. Ako je R^2 blizu jedinici to ukazuje na visoku linearnu povezanost [19].

2.3.2. Osjetljivost

Osjetljivost je mjera sposobnosti instrumenta da prepozna i kvantificira male promjene u koncentraciji analita, odnosno da pravi velike razlike u veličini samog signala za male

promjene koncentracije. Veća osjetljivost znači da je moguće detektirati niže koncentracije ionske vrste s većom točnošću. Često se izražava kao omjer promjene u mjernom signala (Δ Signal) u odnosu na promjene u koncentraciji analita (Δ Koncentracija) što se matematički prikazuje jednadžbom 1:

$$\text{Osjetljivost} = \frac{\Delta \text{ Signal}}{\Delta \text{ Koncentracija}} \quad (1)$$

Na osjetljivost mogu utjecati različiti faktori kao što su vrsta detektora, način pripreme uzoraka, količina uzoraka koji se analizira te omjer signala i šuma. Vrlo je bitno da metoda ima što bolju osjetljivost ukoliko se koristi za detekciju elemenata u tragovima, ukoliko je potrebno detektirati vrlo niske koncentracije različitih zagađivača te u medicinskim analizama za otkrivanje niskih razina biomarkera [19].

2.3.3. Granica detekcije

Granica detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja može biti pouzdano detektirana, ali ne nužno i kvantificirana. LOD predstavlja krajnju točku ispod koje instrument ne može pouzdano razlikovati analit od šuma ili pozadinskog signala. Granicu detekcije moguće je matematički izračunati pomoću različitih statističkih modela.

Granica detekcije ovisi o vrsti metode, osjetljivosti instrumenta, preciznosti analitičara pri pripremi uzoraka te o prisutnosti interferenata. Obično metode koje imaju veću osjetljivost i niski šum imaju i niži LOD [19].

2.3.4. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije predstavlja najnižu koncentraciju analita koju je moguće kvantificirati s prihvatljivom razinom sigurnosti. Granica kvantifikacije ključna je za kvantitativne analize jer se pomoću nje osigurava da su rezultati iznad ovog praga dovoljno pouzdani te da se na temelju njih mogu donositi zaključci o koncentracijama prisutnih ionskih vrsta. U mnogim industrijama LOQ je propisana od strane različitih regulatornih tijela kako bi se osigurale točnost i preciznost analitičkih metoda i rezultata. Mnogi laboratoriji razvijaju vlastite standardne operativne procedure (SOP) unutar kojih su propisane smjernice za određivanje LOQ ovisno o specifičnosti metode ili aplikacije [19].

2.3.5. Točnost

Točnost se odnosi na bliskost između izmjerenih vrijednosti i stvarne (poznate) koncentracije analita, odnosno opisuje koliko je izmjereni rezultat blizu stvarnoj koncentraciji analita u uzorku. U nekim kontekstima se upotrebljava i naziv istinitost. Matematički je točnost (T) moguće iskazati kao omjer izmjerene koncentracije standarda (γ_c) i stvarne koncentracije standarda (γ_r) kao što je prikazano jednadžbom 2:

$$T = \frac{\gamma_c}{\gamma_r} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

Točnost se iskazuje u obliku postotka. Što je dobiveni rezultat bliži vrijednosti od 100 % to je metoda točnija. Što rezultat više odstupa od vrijednosti 100 % to je znak da metoda nije točna te da je potrebno napraviti korekcije. Veći broj sustavnih pogrešaka rezultira manjom točnošću metode [19].

2.3.6. Preciznost

Preciznost se u analitičkom smislu odnosi na dosljednost i ponovljivost rezultata mjerenja. Preko preciznosti je moguće odrediti sličnost analiziranih uzoraka kada se više višestruka mjerenja pod istim uvjetima za isti uzorak. Preciznost se obično izražava u obliku standardne ili relativne standardne devijacije provedenih mjerenja. Standardnom devijacijom mjeri se udaljenost dobivenih rezultata od njihove prosječne vrijednosti. Što je standardna devijacija (SD) manja to je metoda preciznija. Matematički se to može iskazati kao jednadžba 3:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (3)$$

U jednadžbi x_i označava izmjerenu vrijednost, \bar{x} srednju vrijednost rezultata, a N označava broj provedenih mjerenja. Kako bi se usporedila preciznost između različitih skupina podataka koristi se koeficijent varijacije (CV). CV je izražen u postotcima, a predstavlja omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti mjerenja. Matematički se iskazuje jednadžbom 4:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Što je preciznost viša to znači da će rezultati ponovljenih mjerenja biti sličniji jedni drugima. Moguće je ispitivati unutardnevnu preciznost gdje se uspoređuju rezultati istog uzorka

koji je analiziran više puta tijekom istoga dana ili međudnevnu preciznost u kojoj se isti uzorak analizira više puta kroz nekoliko dana [19].

2.3.7. Robusnost

Robusnost metode opisuje koliko je metoda stabilna i otporna na male, ali namjerne promjene koje se događaju u uvjetima rada. Što je metoda robusnija to znači da ona ima bolju sposobnost održavanja točnosti i preciznosti rezultata bez obzira na promjene u uvjetima analize. Kako bi se testirala robusnost potrebno je provesti nekoliko eksperimenata pri različitim uvjetima i analizirati kako navedene promjene utječu na rezultate. Kako bi se ispitala robusnost najčešće se vrše varijacije u području pH, temperaturi ili koncentraciji reagensa [19].

2.3.8. Selektivnost

Selektivnost analitičke metode odnosi se na sposobnost metode da razlikuje i mjeri ciljani analit u složenim uzorcima unutar kojih su prisutni različiti interferenti. Selektivnost opisuje koliko dobro metoda može prepoznati i kvantificirati specifični analit bez obzira na prisutnost drugih vrsta u uzorku. Što je selektivnost metode veća to je manja vjerojatnost od pojave lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata koji nastaju kao uzrok postojanja interferenata. Kako bi se ispitala selektivnost vrši se ispitivanje analita u prisutnosti interferenata. Selektivnost je moguće testirati analizom matriksa ili korištenjem kontrolnih uzoraka [19].

2.4. Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost je svojstvo mjernog rezultata, a predstavlja procjenu potencijalnih pogrešaka i varijacija koje mogu utjecati na točnost i preciznost mjerenja. Ujedno predstavlja i raspon unutar koje se nalazi stvarna vrijednost koncentracije analita. Na mjernu nesigurnost najviše utječu sustavne i slučajne pogreške. Sustavne pogreške su pogreške koje se konstantno provlače kroz čitav postupak, a mogu nastati zbog loše kalibracije, neprikladne metode ili zbog netočnih vrijednosti referentnih materijala. Sustavne pogreške je moguće detektirati i otkloniti nakon čega je potrebno ponoviti cijeli postupak mjerenja. Slučajne pogreške su nepredvidiv tip pogrešaka koje prolaze iz slučajnih varijacija tijekom mjerenja. Uzrok slučajnih pogrešaka mogu biti promjene u laboratorijskoj okolini ili mogu nastati zbog greške analitičara [20].

Kako bi se procijenila ukupna mjerna nesigurnost potrebno je prikupiti podatke iz različitih izvora nesigurnosti. Konačni rezultat izražava se kao vrijednost zajedno s pripadajućim intervalom nesigurnost, a može biti izražena i kao postotak [20].

2.4.1. Sastavljena mjerna nesigurnost

Sastavljena mjerna nesigurnost (u_c) odnosi se na cjelokupnu nesigurnost koja nastaje kombiniranjem svih pojedinačnih izvora nesigurnosti u nekoj metodi ili mjerenju. Ovime se uključuju svi relevantni faktori koji mogu utjecati na rezultat, a neki od njih su pogreške instrumenta, ljudski utjecaj, promjene u uvjetima okoline, pogreške pri pripremi standardnih uzoraka i slično. Sastavljena mjerna nesigurnost računa se preko jednadžbe 5:

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2} \quad (5)$$

Svaki u_i predstavlja nesigurnost iz posebnog izvora [19].

2.4.2. Proširena mjerna nesigurnost

Proširena mjerna nesigurnost (U) kombinira sastavljenu mjernu nesigurnost i faktor povjerenja (k) kako bi se obuhvatio širok raspon mogućih izvora nesigurnosti. Proširena mjerna nesigurnost u obzir uzima sve izvore nesigurnosti i pruža veću sigurnost da se stvarna vrijednost rezultata nalazi unutar tog intervala. Faktor povjerenja je broj veći od 1, a bira se na temelju zahtijevane razine pouzdanosti. Najčešće se koristi faktor povjerenja 2 koji odgovara zahtjevu od 95 % povjerenja ili faktor 3 koji odgovara zahtjevu za 99 % povjerenja. Ovaj faktor moguće je odrediti pomoću statističkih tablica. Proširena mjerna nesigurnost računa se kao umnožak sastavljene mjerne nesigurnosti i faktora povjerenja. Rezultat se iskazuje kao mjerena vrijednost uz prošireni interval sigurnosti [20].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

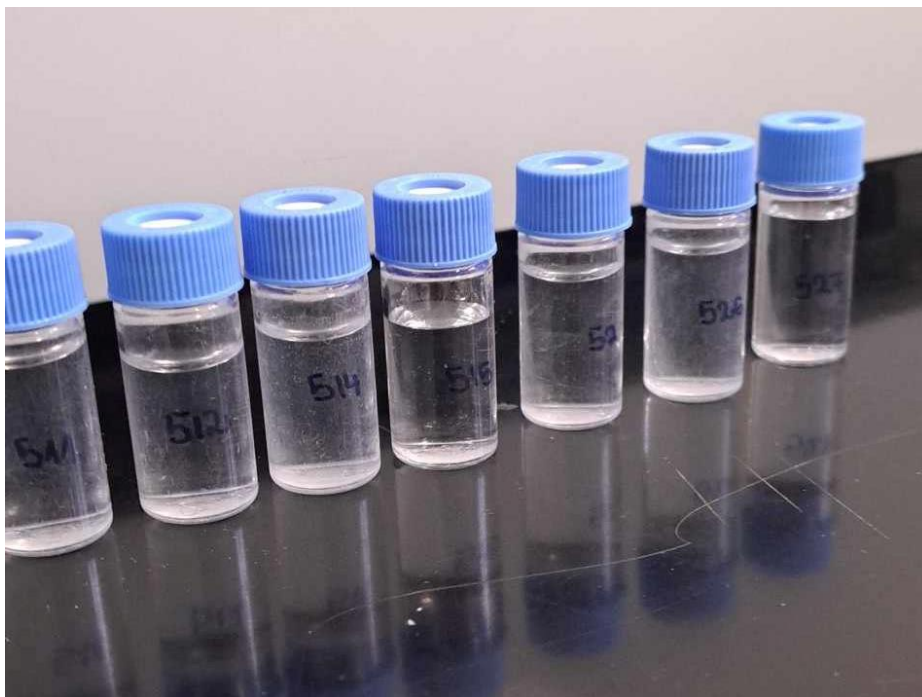
- Ultračista voda (SEP 034, stupanj čistoće 1)
- Kontrolni standard – smjesa aniona (CPA-A-1004136) (CpaChem)
- Standardi za anione (1000 mg/L) (CpaChem)
- Kalijev hidroksid (KOH) automatski pripremljen iz eluens generatora (CpaChem)
- Realni uzorci vode

3.2. Pribor i instrumentacija

- Odmjerne tikvice (Slika 2.)
- Vijale za uzorke (10 mL, Thermo Scientific) (Slika 3.)
- Laboratorijske čaše
- Kapaljka
- Ionski kromatograf DIONEX ICS 6000 (Slika 4.)
 - Kolone: Dionex IonPac AS 19-4 μm , Dionex IonPac CS 16-4 μm
 - Pretkolone: Dionex IonPac AG 16-4 μm
 - Supresori: Dionex SDRS 600 2mm, Dionex CDRS 600 2mm
 - Eluens generatori: Dionex EGC 500 KOH, Dionex EGC 500 MSA
 - Program: Chromeleon
- Laboratorijska vaga (Mettler Toledo)
- Automatske pipete Eppendorf i odgovarajući nastavci
 - Automatska pipeta volumena 10-100 μL
 - Automatska pipeta volumena 100-1000 μL



Slika 2. Odmjerne tikvice u kojima su se pripravile otopine za kalibraciju i *spike*



Slika 3. Vijale s pripremljenim uzorcima



Slika 4. Ionski kromatograf DIONEX ICS 6000

3.3. Uvjeti ionske kromatografije

- Protok: 0,25 mL/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Vrijeme trajanja analize: 32 min
- Duljina petlje: 10 μ L
- Injektirani volumen: 1 mL
- Mobilna faza: kalijev hidroksid (KOH)
 - Gradijentno eluiranje (Tablica 3.)

Tablica 3. Promjena koncentracije mobilne faze tijekom analize

Vrijeme analize (min)	Koncentracija mobilne faze (mM)
1-10	10
10-25	45
25-28	45
28-32	10

3.4. Kalibracija

Kalibracija je provedena u pet točaka za svaku anionsku vrstu koja se analizira u laboratoriju. Pripremljene koncentracije svake pojedine vrste (A1-A5) prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Pripremljene koncentracija za izradu kalibracijskog pravca

				A1	A2	A3	A4	A5
Volumen tikvice (mL)	10	F^-	Koncentracija kalibracijskog standarda (mg/L)	0,1	0,4	0,8	1,6	2
Koncentracija standarda (mg/L)	20		Volumen dodanog standarda (mL)	0,05	0,2	0,4	0,8	1
	MIX 1			Volumen dodanog standarda (μ L)	50	200	400	800
Volumen tikvice (mL)	10	Br^-	Koncentracija kalibracijskog standarda (mg/L)	0,05	0,2	0,5	0,75	1
Koncentracija standarda (mg/L)	10		Volumen dodanog standarda (mL)	0,05	0,2	0,5	0,75	1
	MIX 2			Volumen dodanog standarda (μ L)	50	200	500	750
Volumen tikvice (mL)	10	Cl^-	Koncentracija kalibracijskog standarda (mg/L)	10	25	50	75	100
Koncentracija standarda (mg/L)	1000		Volumen dodanog standarda (mL)	0,1	0,25	0,5	0,75	1
				Volumen dodanog standarda (μ L)	100	250	500	750
Volumen tikvice (mL)	10	SO_4^{2-}	Koncentracija kalibracijskog standarda (mg/L)	10	25	50	75	100
Koncentracija standarda (mg/L)	1000		Volumen dodanog standarda (mL)	0,1	0,25	0,5	0,75	1
				Volumen dodanog standarda (μ L)	100	250	500	750
Volumen tikvice (mL)	10	NO_3^-	Koncentracija kalibracijskog standarda (mg/L)	1	5	10	50	100
Koncentracija standarda (mg/L)	1000		Volumen dodanog standarda (mL)	0,01	0,05	0,1	0,5	1
				Volumen dodanog standarda (μ L)	10	50	100	500

Kalibracijska krivulja se izrađuje prema podacima dobivenim injektiranjem otopina standarda u pet (ili više) različitih koncentracijskih razina unutar radnog područja. Prihvatljivi koeficijent korelacije je $\geq 0,995$. Kalibraciju je potrebno napraviti jednom, a svaki idući put se vrijednosti provjeravaju *check* standardima. Ukoliko odstupanje rezultata ne prelazi 10 % tada se analiza može provesti, a ako prelazi tada je potrebno ponovno napraviti kalibraciju.

3.5. Priprema uzoraka

3.5.1. MIX

Standardi za sve anione imaju koncentraciju 1000 mg/L stoga nije moguće dostupnim automatskim pipetama pripremiti najniže kalibracijske koncentracije za pojedine anionske vrste. Kako bi se pripremile tražene koncentracije potrebno ih je razrijediti tako što se izrađuje smjesa (MIX) odabranih grupa aniona. Fosfati (PO_4^{3-}) i fluoridi (F^-) zajedno čine MIX 1 koji se priprema na način da se otpipetira 200 μL standarda u odmjernu tikvicu od 10 mL kako bi se dobila konačna koncentracija standarda od 20 mg/L. Sadržaj tikvice se do oznake dopuni ultračistom vodom, a potom se iz pripremljenog MIX-a dalje pripremaju kalibracijske otopine. Bromidi (Br^-), nitriti (NO_2^-), kloriti (ClO_2^-) i klorati (ClO_3^-) čine MIX 2. MIX 2 se priprema na isti način kao i MIX 1 samo što se otpipetira 100 μL standarda u odmjernu tikvicu od 10 mL kako bi se dobila konačna koncentracija od 10 mg/L. Sadržaj tikvice se dopuni ultračistom vodom do oznake.

Najniže koncentracije klorida (Cl^-), sulfata (SO_4^{2-}) i nitrata (NO_3^-) mogu se pripremiti direktno iz standarda stoga za njih nije bilo potrebno pripremati MIX.

3.5.2. Kalibracijski standardi

Otopine za kalibraciju pripremaju se iz pripremljenog MIX-a ili direktno iz certificiranog referentnog materijala. Za svaku anionsku vrstu pripremljeno je pet standardnih otopina, a svaka od njih u tri replike. Najprije je priređeno pet odmjernih tikvica od kojih je svaka predstavljala jednu koncentracijsku razinu (A1-A5). U svaku tikvicu su se otpipetirali odgovarajući zadani volumeni svake anionske vrste (prema Tablici 4.), a potom je sadržaj tikvice do oznake dopunjen ultračistom vodom. Pripremljeni kalibracijski standardi se potom prenose u vijale koje se postavljaju u instrument.

3.5.3. Realni uzorci

Uzorci se filtriraju kroz mikro filtere (0,45 μm) u polietilenske vijale koje se postavljaju u autosampler ionskog kromatografa. Prije analize realnog uzorka potrebno je kroz instrument propustiti uzorak ultračiste vode, uzorak *check* standarda za anione i uzorak *check* standarda za katione.

3.5.4. Spike za LOQ i MDK

Spike označava uzorak u kojeg je dodana poznata koncentracija analita u matricu uzorka (u ovom slučaju vode). Kako bi se provjerilo očitava li instrument pravilno niske i visoke koncentracije iona potrebno je pripremiti *spike* za LOQ i *spike* za MDK. Oba *spike*-a se pripremaju na način da se najprije odabire odgovarajući realni uzorak. Za LOQ realni uzorak bi trebao imati što niže koncentracije klorida, sulfata i nitrata, a idealno bi bilo da ostalih aniona ima u vrlo niskoj koncentraciji ili da uopće nisu prisutni. U Tablici 6. prikazane su pripremljene vrijednosti za LOQ za klorite i klorate.

Tablica 5. Pripremljene vrijednosti - *spike* za LOQ

Kloriti	0,05 mg/L	}	MIX 1 - priprema	Spike za LOQ
Klorati	0,05 mg/L			c(standard) = 1000 mg/L
			c(MIX 1, tikvica) = 10 mg/L	V(tikvica) = 25 mL
			V(tikvica) = 10 mL	c(tikvica) = 0,05 mg/L
			V(standard) = 0,1 mL = 100 μL	V(MIX 1) = 0,125 mL = 125 μL

Za MDK bi se trebao izabrati realni uzorak u kojemu prisutne koncentracije iona ne prelaze maksimalne dopuštene koncentracije. U Tablici 6. prikazane su pripremljene vrijednosti za MDK. U uzorku 928 kloriti i klorati nisu bili prisutni pa je pripremljena koncentracija iona od 250 μg/L. U uzorku 926 su ioni bili prisutni stoga je njemu dodana onolika koncentracija iona koja je potrebna da bi konačna koncentracija iznosila 700 μg/L.

Tablica 6. Pripremljene vrijednosti za MDK.

SPIKE - 928			
Kloriti	250 µg/L	1. MIX	2. Spike za MDK
Klorati		c(standard) = 1000 mg/L	c(MIX) = 10 mg/L
		V(tikvica) = 10 mL	V(tikvica) = 10 mL
		c(tikvica) = 10 mg/L	c(tikvica) = 0,25 mg/L
		V(standard) = 0,1 mL = 100 µL	V(MIX) = 0,25 mL = 250 µL
SPIKE - 926			
Kloriti	0,443 mg/L	1. Razrjeđenje	2. Spike za MDK
		c(standard) = 1000 mg/L	c(razrjeđenje) = 10 mg/L
		V(tikvica) = 10 mL	V(tikvica) = 10 mL
		c(tikvica) = 10 mg/L	c(tikvica) = 0,443 mg/L
		V(standard) = 0,1 mL = 100 µL	V(razrjeđenje) = 0,443 mL = 443 µL
Klorati	0,628 mg/L	1. Razrjeđenje	2. Spike za MDK
		c(standard) = 1000 mg/L	c(razrjeđenje) = 10 mg/L
		V(tikvica) = 10 mL	V(tikvica) = 10 mL
		c(tikvica) = 10 mg/L	c(tikvica) = 0,628 mg/L
		V(standard) = 0,1 mL = 100 µL	V(razrjeđenje) = 0,628 mL = 628 µL

U uzorku prisutno
0,257 µg/L klorita

U uzorku prisutno
0,072 µg/L klorata

3.6. Procjena mjerne nesigurnosti

Ukupno je odabrano osam izvora mjerne nesigurnosti koji su se statistički obradili kako bi se vidjelo koji od njih ima najveći utjecaj. Odabrani su sljedeć: čistoća standarda, volumen mikropipete (10-100 µL), volumen mikropipete (100-1000 µL), volumen odmjerne tikvice (10 mL), kalibracijski pravac, ponovljivost mjerenja, iskorištenje te ponovljivost pripreme uzorka.

Kako bi se procijenila mjerna nesigurnost mikropipeta i tikvice bilo ih je potrebno umjeriti. Umjereno posuđe dijeli se na dvije vrste, In-posuđe i Ex-posuđe. In-posuđe je posuđe koje sadrži navedeni volumen (odmjerne tikvice). Odmjerna tikvica se umjerava tako da se najprije važe prazna i u potpunosti suha tikvica, a potom se napuni ultračistom vodom do oznake nakon čega se ponovno važe. Iz dobivenih vrijednosti se potom statistički računa njezina mjerna nesigurnost. Potrebno je ponoviti mjerenje najmanje 10 puta. Ex-posuđe je ono posuđe koje ispušta navedeni volumen (pipete). Pipete se umjeravaju na način da se odaberu tri volumena koja će se ispitati (najniži volumen u radnom raspon pipete koji pipeta može ispustiti, srednji i najveći). Najprije se izvaže prazna posudica, a potom se izvaže masa posudice nakon što je u nju otpipetiran željeni volumen ultračiste vode. Iz dobivenih se podataka potom statistički računa mjerna nesigurnost pipeta. Za svaki odabrani volumen vrši se 10 mjerenja.

3.7. Statistička obrada podataka

Parametri validacije i mjerne nesigurnosti obrađeni su metodom deskriptivne statistike, a sve izračunate vrijednosti prikazane su tablično. Za statističku obradu podataka i prikaz rezultata korišten je računalni program Excel, Microsoft Office. Vrijednosti iz kalibracijskog pravca u Excelu uspoređene su s vrijednostima koje su dobivene u programu Chromeleon.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Linearnost

Linearnost se utvrđuje izradom kalibracijskog pravca, a prikazuje proporcionalnu ovisnost između koncentracije i izmjerene površine (engl. *Area*) analita. Linearnost je ispitana na način da se svaka pripremljena standardna otopina ispitivala tri puta što ukupno čini 15 mjerenja za svaki analit. U Tablici 7. prikazani su dobiveni rezultati analize standardnih otopina klorita, a u Tablici 8. dobiveni rezultati analize standardnih otopina klorata.

Tablica 7. Rezultati analize standardnih otopina klorita u koncentracijskom rasponu od 0,05 do 1 mg/L.

		Konc. (mg/L)	Area (μ S/min)	Rt (min)
1	A 1	0,05	0,0145	7,440
	A 1	0,05	0,0135	7,447
	A 1	0,05	0,0129	7,443
2	A 2	0,20	0,0659	7,450
	A 2	0,20	0,0655	7,447
	A 2	0,20	0,0645	7,443
3	A 3	0,50	0,1804	7,450
	A 3	0,50	0,1807	7,450
	A 3	0,50	0,1799	7,443
4	A 4	0,75	0,2823	7,453
	A 4	0,75	0,2849	7,453
	A 4	0,75	0,2848	7,453
5	A 5	1,00	0,3778	7,457
	A 5	1,00	0,3802	7,447
	A 5	1,00	0,3805	7,453

Tablica 8. Rezultati analize standardnih otopina klorata u koncentracijskom rasponu od 0,05 do 1 mg/L.

		Konc. (mg/L)	Površina (μ s/min)	Rt (min)
1	A 1	0,05	0,0111	13,463
	A 1	0,05	0,0104	13,477
	A 1	0,05	0,0113	13,467
2	A 2	0,20	0,0611	13,473
	A 2	0,20	0,0611	13,470
	A 2	0,20	0,0611	13,460
3	A 3	0,50	0,1644	13,467
	A 3	0,50	0,1644	13,467
	A 3	0,50	0,1644	13,463
4	A 4	0,75	0,2568	13,467
	A 4	0,75	0,2573	13,463
	A 4	0,75	0,2569	13,463
5	A 5	1,00	0,3464	13,457
	A 5	1,00	0,3466	13,450
	A 5	1,00	0,3466	13,460

Kako bi se izračunali koeficijenti kalibracijskog pravca (a i b), koeficijent korelacije (r) i koeficijent determinacije (r^2) bilo je potrebno provesti dodatne izračune koji su prikazani u Tablici 9. (za klorite) i Tablici 10. (za klorate).

Tablica 9. Pomoćna tablica za izračun kalibracijskih parametara za klorite.

	x_i	x_i^2	y_i	y_i^2	$x_i \cdot y_i$	$x_i - \bar{x}$
1	0,05	0,0025	0,01363	1,859E-04	0,00068	-0,45
2	0,20	0,0400	0,06530	4,264E-03	0,01306	-0,30
3	0,50	0,2500	0,18033	3,252E-02	0,09017	0,00
4	0,75	0,5625	0,28400	8,066E-02	0,21300	0,25
5	1,00	1,0000	0,37950	1,440E-01	0,37950	0,50
suma	2,5	1,855	0,922766667	0,26164632	0,69640833	0
sr.vr.	0,5	0,371	0,184553333	0,05232926	0,13928167	0

$y_i - \bar{y}$	\hat{y}_i	$\hat{y}_i - \bar{y}$	$(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
-0,17092	0,00973	-0,17483	0,03056	0,02921	0,203	0,0786728
-0,11925	0,06800	-0,11655	0,01358	0,01422	0,090	0,0349660
-0,00422	0,18455	0,00000	0,00000	0,00002	0,000	0,0000000
0,09945	0,28168	0,09712	0,00943	0,00989	0,063	0,0242804
0,19495	0,37880	0,19425	0,03773	0,03800	0,250	0,0971233
2,2204E-16	0,92275	-1,7E-05	0,09131	0,09135	0,605	0,2350425
4,4409E-17	0,18455	-3,3E-06	0,01826	0,01827	0,121	0,0470085

Tablica 10. Pomoćna tablica za izračun kalibracijskih parametara za klorate.

	x_i	x_i^2	y_i	y_i^2	$x_i \cdot y_i$	$x_i - \bar{x}$
1	0,05	0,0025	0,01093	1,195E-04	0,00055	-0,45
2	0,20	0,0400	0,06110	3,733E-03	0,01222	-0,30
3	0,50	0,2500	0,16440	2,703E-02	0,08220	0,00
4	0,75	0,5625	0,25700	6,605E-02	0,19275	0,25
5	1,00	1,0000	0,34653	1,201E-01	0,34653	0,50
suma	2,5	1,855	0,839966667	0,217014459	0,63425	0
sr.vr.	0,5	0,371	0,167993333	0,043402892	0,12685	0

$y_i - \bar{y}$	\hat{y}_i	$\hat{y}_i - \bar{y}$	$(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
-0,15706	0,00861	-0,15939	0,02540	0,02467	0,203	0,0717234
-0,10689	0,06173	-0,10626	0,01129	0,01143	0,090	0,0318784
-0,00359	0,16798	-0,00001	0,00000	0,00001	0,000	0,0000000
0,08901	0,25652	0,08853	0,00784	0,00792	0,063	0,0221316
0,17854	0,34506	0,17707	0,03135	0,03188	0,250	0,0885332
0	0,83989945	-6,7E-05	0,07588	0,07591	0,605	0,2142667
0	0,16797989	-1,3E-05	0,01518	0,01518	0,121	0,0428533

U tablici x_i označava koncentraciju standardne otopine koja je pripremljena, a y_i srednju vrijednost tri replike koja označava površinu pika standardne otopine. Oznaka \bar{x} predstavlja srednju vrijednost koncentracija standardnih otopina dok \bar{y} predstavlja srednju vrijednost

površine pika. Oznaka \hat{y}_i predstavlja predviđenu vrijednost površine pika koja je predviđena na osnovu kalibracijskih funkcija. Pomoću navedenih jednadžbi određeni su nagib pravca (a), odsječak na osi y (b), koeficijent korelacije (r) te koeficijent determinacije (r^2):

Jednadžba pravca:

$$y = ax + b \quad (6)$$

Nagib pravca (a):

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Odsječak na osi y (b):

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (8)$$

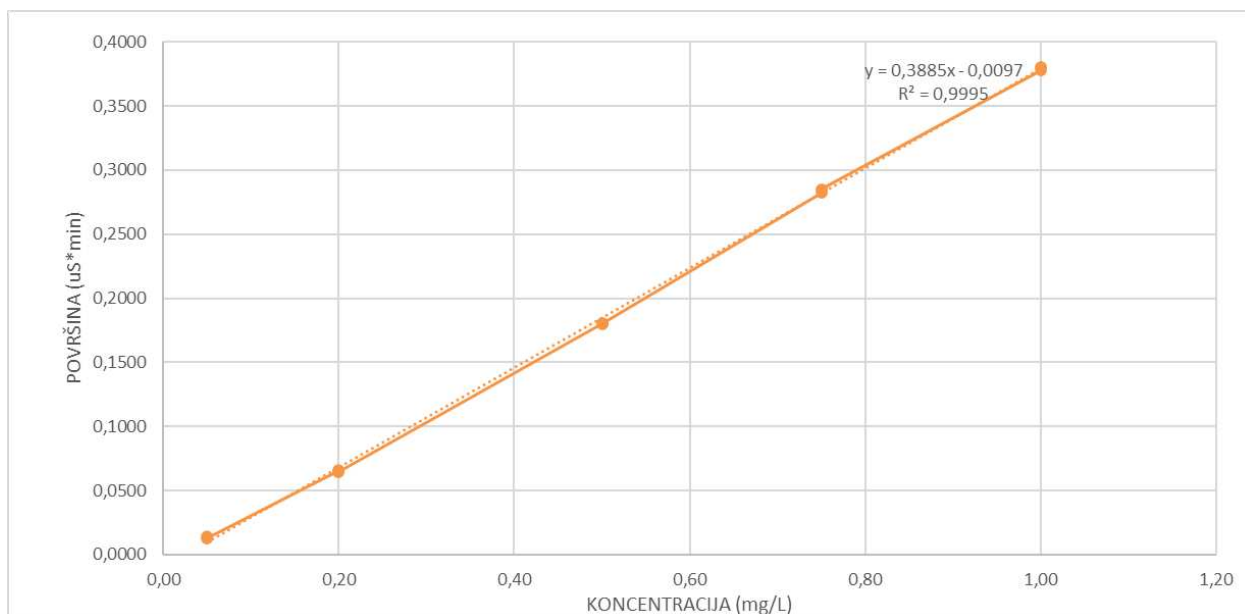
Koeficijent korelacije (r):

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (9)$$

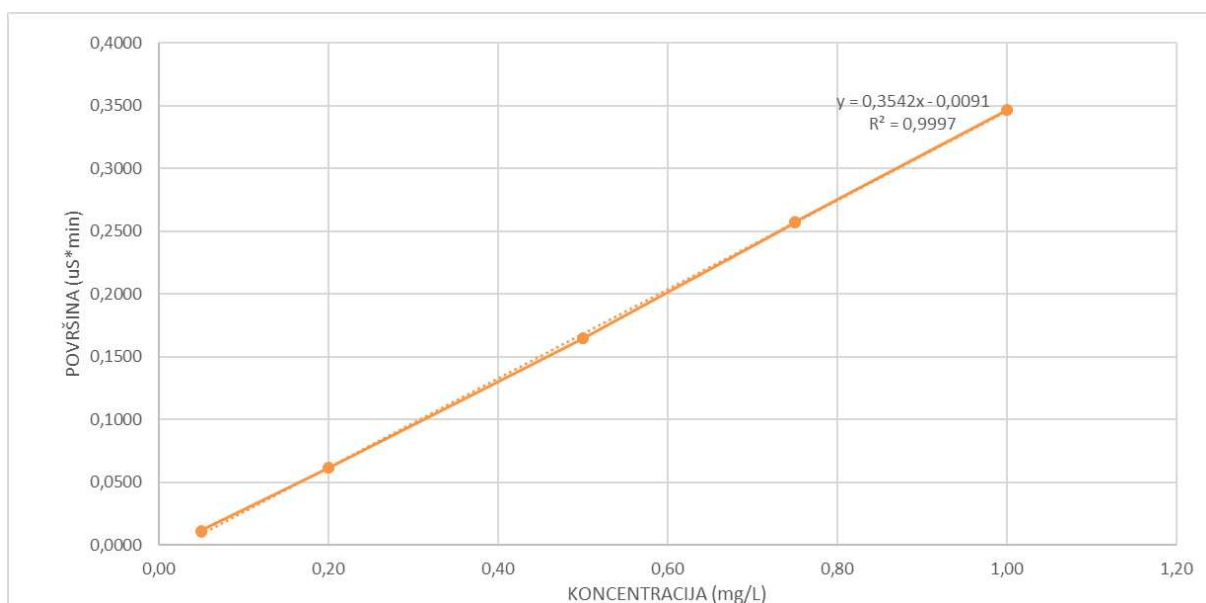
Koeficijent determinacije (r^2):

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \quad (10)$$

Kalibracijske krivulje za klorite i klorate prikazani su na Slici 5. i Slici 6.



Slika 5. Kalibracijska krivulja za klorite



Slika 6. Kalibracijska krivulja za klorate.

Iz podataka koji su navedeni u Tablici 9 i pomoću jednadžbi (8)-(12) izračunati su traženi koeficijenti za klorite:

- Nagib pravca, a : 0,3885
- Odsječak, b : -0,0097
- Koeficijent korelacije, R : 0,9998

- Koeficijent determinacije, R^2 : 0,9995
- Jednadžba pravca: $y = 0,3885x - 0,0097$

I za klorate:

- Nagib pravca, a : 0,3542
- Odsječak, b : -0,0091
- Koeficijent korelacije, R : 0,9999
- Koeficijent determinacije, R^2 : 0,9997
- Jednadžba pravca: $y = 0,3542x - 0,0091$

Iz dobivenih podataka vidljivo je da postoji linearni odnos između površine pikova izmjerenih koncentracija. U oba slučaja koeficijent korelacije zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,995$).

5.2. Ponovljivost

5.2.1. Ponovljivost kontrolnog standarda

Ponovljivost je utvrđena mjerenjem kontrolnog standarda u kraćem vremenskom periodu (kroz jedan dan). Koncentracija obje anionske vrste u standardu iznosi 0,40 mg/L. Isti uzorak standarda analiziran je deset puta na ionskom kromatografu. Rezultati su izraženi preko retencijskog vremena, površine i koncentracije. Za svaku komponentu izračunate su srednja vrijednost, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD). Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 11. za klorite i u Tablici 12. za klorate.

Tablica 11. Ponovljivost mjerenja kontrolnog standarda za klorite.

Standard: CPA-A-1004136		Koncentracija klorita: 0.4 mg/L		
Uzorak	Broj injeckiranja	Rt (min)	Površina (µS/min)	Koncentracija (mg/L)
CPA-A-1004136	1	7,443	0,1555	0,4219
CPA-A-1004136	2	7,443	0,1511	0,4108
CPA-A-1004136	3	7,437	0,1549	0,4204
CPA-A-1004136	4	7,437	0,1552	0,4212
CPA-A-1004136	5	7,443	0,1527	0,4148
CPA-A-1004136	6	7,443	0,1519	0,4129
CPA-A-1004136	7	7,440	0,1572	0,4262
CPA-A-1004136	8	7,440	0,1517	0,4124
CPA-A-1004136	9	7,437	0,1562	0,4235
CPA-A-1004136	10	7,440	0,1511	0,4108
Srednja vrijednost		7,4403	0,1538	0,4175
SD		0,00262679	0,002289226	0,005748323
RSD (%)		0,04%	1,49%	1,38%

Tablica 12. Ponovljivost mjerenja kontrolnog standarda za klorate.

Standard: CPA-A-1004136		Koncentracija klorata: 0.4 mg/L		
Uzorak	Broj injeckiranja	Rt (min)	Površina (µS/min)	Koncentracija (mg/L)
CPA-A-1004136	1	13,460	0,1330	0,3990
CPA-A-1004136	2	13,457	0,1324	0,3973
CPA-A-1004136	3	13,453	0,1360	0,4076
CPA-A-1004136	4	13,453	0,1359	0,4073
CPA-A-1004136	5	13,450	0,1362	0,4081
CPA-A-1004136	6	13,447	0,1359	0,4072
CPA-A-1004136	7	13,457	0,1359	0,4074
CPA-A-1004136	8	13,460	0,1362	0,4080
CPA-A-1004136	9	13,450	0,1358	0,4071
CPA-A-1004136	10	13,457	0,1360	0,4077
Srednja vrijednost		13,4544	0,1353	0,4057
SD		0,0044771	0,001399246	0,003996679
RSD (%)		0,03%	1,03%	0,99%

Iz prikazanih tablica je vidljivo da sve izračunate relativne standardne devijacije zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji iznosi $RSD \leq 10\%$. Za klorite tako ponovljivost retencijskog vremena iznosi 0,04 %, ponovljivost mjerenja površine 1,49 %, a ponovljivost koncentracije 1,38%. Za klorate ponovljivost retencijskog vremena iznosi 0,03 %, površine 1,03 % i koncentracije 0,99 %.

5.2.2. Ponovljivost kalibracijskih otopina

Budući da je svaka pripravljena kalibracijska otopina analizira tri puta određena je i ponovljivost za njih. U Tablici 13. navedeni su rezultati ponovljivosti za pripremljene otopine klorita, a u Tablici 14. za pripremljene otopine klorata.

Tablica 13. Ponovljivost za kalibracijske uzorke klorita.

Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina ($\mu\text{S}/\text{min}$)	Koncentracija (mg/L)
A 1	1	7,440	0,0145	0,0623
	2	7,447	0,0135	0,0597
	3	7,443	0,0129	0,0580
Srednja vrijednost		7,443	0,0136	0,0600
SD		0,004	0,001	0,002
RSD (%)		0,05%	5,93%	3,61%
A 2	1	7,450	0,0659	0,1945
	2	7,447	0,0655	0,1934
	3	7,443	0,0645	0,1909
Srednja vrijednost		7,447	0,0653	0,1929
SD		0,004	0,001	0,002
RSD (%)		0,05%	1,10%	0,96%
A 3	1	7,450	0,1804	0,4892
	2	7,450	0,1807	0,4899
	3	7,443	0,1799	0,4880
Srednja vrijednost		7,448	0,1803	0,4890
SD		0,004	0,0004	0,001
RSD (%)		0,05%	0,22%	0,20%
A 4	1	7,453	0,2823	0,7536
	2	7,453	0,2849	0,7580
	3	7,453	0,2848	0,7579
Srednja vrijednost		7,453	0,2840	0,7565
SD		0,000	0,0015	0,003
RSD (%)		0,00%	0,52%	0,33%
A 5	1	7,457	0,3778	0,9971
	2	7,447	0,3802	1,0035
	3	7,453	0,3805	1,0040
Srednja vrijednost		7,452	0,3795	1,0015
SD		0,005	0,0015	0,004
RSD (%)		0,07%	0,39%	0,38%

Tablica 14. Ponovljivost za kalibracijske uzorke klorata.

Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina ($\mu\text{S}/\text{min}$)	Koncentracija (mg/L)
A1	1	13,463	0,0111	0,0569
	2	13,477	0,0104	0,0550
	3	13,467	0,0113	0,0576
Srednja vrijednost		13,469	0,0109	0,0565
SD		0,007	0,000	0,001
RSD (%)		0,05%	4,32%	2,38%
A2	1	13,473	0,0611	0,1983
	2	13,470	0,0611	0,1981
	3	13,460	0,0611	0,1982
Srednja vrijednost		13,468	0,0611	0,1982
SD		0,007	0,000	0,000
RSD (%)		0,05%	0,00%	0,05%
A3	1	13,467	0,1644	0,4899
	2	13,467	0,1644	0,4900
	3	13,463	0,1644	0,4898
Srednja vrijednost		13,466	0,1644	0,4899
SD		0,002	0,0000	0,000
RSD (%)		0,02%	0,00%	0,02%
A4	1	7,453	0,2823	0,7540
	2	7,453	0,2849	0,7580
	3	7,453	0,2848	0,7580
Srednja vrijednost		7,453	0,2840	0,7567
SD		0,000	0,0015	0,002
RSD (%)		0,00%	0,52%	0,31%
A5	1	13,467	0,2568	0,7506
	2	13,463	0,2573	0,7522
	3	13,463	0,2569	0,7511
Srednja vrijednost		13,464	0,2570	0,7513
SD		0,002	0,0003	0,001
RSD (%)		0,02%	0,10%	0,11%

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je i u ovom slučaju zadovoljen kriterij za relativnu standardnu devijaciju ($RSD \leq 10\%$).

5.2.3. Ponovljivost *spike-a*

Kako bi se utvrdilo da instrument može očitati najnižu propisanu vrijednost za obje anionske vrste pripremljen je *spike* za LOQ. *Spike* za LOQ mjereno je 10 puta iz čega je potom izračunata ponovljivost. U Tablici 15. prikazani su rezultati dobiveni za klorite, a u Tablici 16. rezultati dobiveni za klorate.

Tablica 15. Ponovljivost na spikeu za LOQ - kloriti

SPIKE NA 3021				
Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina ($\mu\text{S}/\text{min}$)	Koncentracija (mg/L)
3021 LOQ	1	7,423	0,0098	0,050
3021 LOQ	2	7,427	0,0098	0,050
3021 LOQ	3	7,427	0,0084	0,047
3021 LOQ	4	7,423	0,0102	0,051
3021 LOQ	5	7,423	0,0087	0,047
3021 LOQ	6	7,420	0,0089	0,048
3021 LOQ	7	7,427	0,0093	0,049
3021 LOQ	8	7,423	0,0089	0,048
3021 LOQ	9	7,427	0,0099	0,051
3021 LOQ	10	7,427	0,0088	0,048
Srednja vrijednost		7,425	0,0093	0,049
SD		0,00258414	0,000614727	0,001599166
RSD (%)		0,03%	6,63%	3,28%

Tablica 156. Ponovljivost na spikeu za LOQ - klorati

SPIKE NA 3021				
Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina ($\mu\text{S}/\text{min}$)	Koncentracija (mg/L)
3021 LOQ	1	13,433	0,1336	0,403
3021 LOQ	2	13,430	0,1330	0,401
3021 LOQ	3	13,433	0,1326	0,400
3021 LOQ	4	13,430	0,1318	0,398
3021 LOQ	5	13,440	0,1319	0,398
3021 LOQ	6	13,437	0,1319	0,398
3021 LOQ	7	13,430	0,1344	0,405
3021 LOQ	8	13,430	0,1344	0,405
3021 LOQ	9	13,440	0,1328	0,401
3021 LOQ	10	13,437	0,1325	0,400
Srednja vrijednost		13,434	0,1329	0,401
SD		0,00416333	0,000970052	0,002732703
RSD (%)		0,03%	0,73%	0,68%

Pripremljen je i *spike* za MDK kako bi se utvrdilo da instrument može očitati maksimalne propisane koncentracije za tražene analite (0,25 mg/L i 0,7 mg/L). *Spike* za MDK je, također, analiziran 10 puta iz čega je potom izračunata ponovljivost za dobivene rezultate. U Tablici 17. i Tablici 18. prikazane su dobivene vrijednosti.

Tablica 17. Ponovljivost na *spike-u* za MDK - kloriti

SPIKE NA 01 0928					SPIKE NA 01 0926 → koncentracija do 0,70 mg/L				
Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina (μS/min)	Koncentracija (mg/L)	Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina (μS/min)	Koncentracija (mg/L)
01 0929 LOQ	1	7,767	0,0892	0,2544	01 0926 MDK	1	7,780	0,2758	0,735
01 0929 LOQ	2	7,767	0,0883	0,2522	01 0926 MDK	2	7,777	0,2766	0,737
01 0929 LOQ	3	7,767	0,0895	0,2552	01 0926 MDK	3	7,780	0,2764	0,736
01 0929 LOQ	4	7,770	0,0854	0,2447	01 0926 MDK	4	7,767	0,2773	0,739
01 0929 LOQ	5	7,770	0,0896	0,2554	01 0926 MDK	5	7,777	0,2775	0,739
01 0929 LOQ	6	7,770	0,0876	0,2504	01 0926 MDK	6	7,773	0,2779	0,740
01 0929 LOQ	7	7,773	0,0882	0,2519	01 0926 MDK	7	7,773	0,2822	0,751
01 0929 LOQ	8	7,770	0,0879	0,2510	01 0926 MDK	8	7,773	0,2819	0,750
01 0929 LOQ	9	7,770	0,0876	0,2505	01 0926 MDK	9	7,773	0,2817	0,750
01 0929 LOQ	10	7,767	0,0865	0,2474	01 0926 MDK	10	7,773	0,2819	0,751
Srednja vrijednost		7,769	0,0880	0,251	Srednja vrijednost		7,775	0,2789	0,743
SD		0,002024846	0,001321447	0,003384753	SD		0,003949684	0,002654054	0,006830983
RSD (%)		0,03%	1,50%	1,35%	RSD (%)		0,05%	0,95%	0,92%

Tablica 18. Ponovljivost na *spike-u* za MDK – klorati

SPIKE NA 01 0928 → koncentracija do 0,25 mg/L					SPIKE NA 01 0926 → koncentracija do 0,70 mg/L				
Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina (μS/min)	Koncentracija (mg/L)	Uzorak	Broj injektiranja	Rt (min)	Površina (μS/min)	Koncentracija (mg/L)
01 0928 MDK	1	14,333	0,0716	0,243	01 0926 MDK	1	14,347	0,2252	0,691
01 0928 MDK	2	14,337	0,0715	0,243	01 0926 MDK	4	14,333	0,2255	0,691
01 0928 MDK	3	14,337	0,0714	0,242	01 0926 MDK	5	14,340	0,2255	0,691
01 0928 MDK	4	14,337	0,0714	0,243	01 0926 MDK	6	14,340	0,2265	0,694
01 0928 MDK	5	14,340	0,0717	0,243	01 0926 MDK	7	14,337	0,2277	0,698
01 0928 MDK	6	14,340	0,0725	0,246	01 0926 MDK	8	14,340	0,2266	0,695
01 0928 MDK	7	14,343	0,0712	0,242	01 0926 MDK	9	14,340	0,2285	0,700
01 0928 MDK	8	14,343	0,0712	0,242	01 0926 MDK	10	14,337	0,2279	0,698
01 0928 MDK	9	14,340	0,0715	0,243	01 0926 MDK	11	14,337	0,2276	0,698
01 0928 MDK	10	14,340	0,0715	0,243	01 0926 MDK	12	14,333	0,2282	0,699
Srednja vrijednost		14,339	0,0716	0,243	Srednja vrijednost		14,338	0,2269	0,696
SD		0,00305505	0,000368932	0,001154701	SD		0,004060651	0,001221838	0,003566822
RSD (%)		0,02%	0,52%	0,48%	RSD (%)		0,03%	0,54%	0,51%

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je kriterij za relativnu standardnu devijaciju zadovoljen i kod *spike-a* za LOQ i kod *spike-a* za MDK, odnosno niti jedna od dobivenih RSD vrijednosti ne prelazi vrijednost od 10 %.

5.3. Točnost

5.3.1. Točnost kontrolnog standarda

Kako bi se provjerila točnost metode provedeno je deset uzastopnih mjerenja kontrolnog standarda u kojemu koncentracije i klorita i klorata iznose 0,4 mg/L. Vrijednosti koncentracije dobivene instrumentalno su uspoređene s teorijskom vrijednosti koncentracije koja je zapisana na bočici standarda i potom je računato iskorištenje (engl. *recovery*). Iskorištenje se računa prema jednadžbi 11:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{konc.eksperimentalno}}{\text{konc.teorijski}} \times 100\% \quad (11)$$

U Tablici 19. prikazane su vrijednosti kontrolnog standarda za klorite, a u Tablici 20. vrijednosti za klorate.

Tablica 19. Iskorištenje kontrolnog standarda za klorite

Standard: CPA-A-1004136				
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)
CPA-A-1004136	1	0,40	0,4129	103%
CPA-A-1004136	2	0,40	0,4108	103%
CPA-A-1004136	3	0,40	0,4204	105%
CPA-A-1004136	4	0,40	0,4212	105%
CPA-A-1004136	5	0,40	0,4148	104%
CPA-A-1004136	6	0,40	0,4129	103%
CPA-A-1004136	7	0,40	0,4262	107%
CPA-A-1004136	8	0,40	0,4124	103%
CPA-A-1004136	9	0,40	0,4235	106%
CPA-A-1004136	10	0,40	0,4108	103%
Srednja vrijednost			0,4166	104%
SD			0,005685352	1,42%
RSD (%)			1,36%	1,36%

Tablica 20. Iskorištenje kontrolnog standarda za klorate

Standard: CPA-A-949168				
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)
CPA-A-1004136	1	0,40	0,3990	100%
CPA-A-1004136	2	0,40	0,3973	99%
CPA-A-1004136	3	0,40	0,4076	102%
CPA-A-1004136	4	0,40	0,4073	102%
CPA-A-1004136	5	0,40	0,4081	102%
CPA-A-1004136	6	0,40	0,4072	102%
CPA-A-1004136	7	0,40	0,4074	102%
CPA-A-1004136	8	0,40	0,4080	102%
CPA-A-1004136	9	0,40	0,4071	102%
CPA-A-1004136	10	0,40	0,4077	102%
Srednja vrijednost			0,4057	101%
SD			0,003996679	1,00%
RSD (%)			0,99%	0,99%

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da srednja vrijednost iskorištenja za klorite iznosi 104 % dok za klorate iznosi 101 %. U oba slučaja zadovoljen je kriterij prihvaćenosti koji iznosi 100 ± 10 %.

5.3.2. Točnost *spike-a*

Kako bi se dodatno utvrdila točnost metode izračunato je iskorištenje u slučaju *spike-a* za LOQ i *spike-a* za MDK. U Tablici 21. prikazane su izračunate vrijednosti za LOQ klorita, a u Tablici 22. vrijednosti dobivene za LOQ klorata.

Tablica 21. Iskorištenje *spike-a* za LOQ (kloriti)

SPIKE NA 3021				
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)
3021 LOQ	1	0,05	0,050	100%
3021 LOQ	2	0,05	0,050	100%
3021 LOQ	3	0,05	0,047	93%
3021 LOQ	4	0,05	0,051	103%
3021 LOQ	5	0,05	0,047	95%
3021 LOQ	6	0,05	0,048	96%
3021 LOQ	7	0,05	0,049	98%
3021 LOQ	8	0,05	0,048	96%
3021 LOQ	9	0,05	0,051	101%
3021 LOQ	10	0,05	0,048	95%
Srednja vrijednost			0,0488	98%
SD			0,001599166	3,20%
RSD (%)			3,28%	3,28%

Tablica 22. Iskorištenje *spike-a* za LOQ (klorati)

SPIKE NA 3021					
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Konc.izmjereno konc.uzorak (mg/L)	Recovery (%)
3021 LOQ	1	0,05	0,403	0,053	106%
3021 LOQ	2	0,05	0,401	0,051	102%
3021 LOQ	3	0,05	0,400	0,050	100%
3021 LOQ	4	0,05	0,398	0,048	96%
3021 LOQ	5	0,05	0,398	0,048	96%
3021 LOQ	6	0,05	0,398	0,048	96%
3021 LOQ	7	0,05	0,405	0,055	110%
3021 LOQ	8	0,05	0,405	0,055	110%
3021 LOQ	9	0,05	0,401	0,051	101%
3021 LOQ	10	0,05	0,400	0,050	100%
Srednja vrijednost			0,4009	0,0509	102%
SD			0,002732703	0,002732703	5,47%
RSD (%)			0,68%	5,37%	5,37%

Iz tablica je vidljivo kako je srednja vrijednost iskorištenja na *spike-u* za klorite iznosila 98 %, a za klorate 102 % što znači da je u oba slučaja zadovoljen kriterij prihvatljivosti. U Tablicama 23. i 24. prikazane su izračunate vrijednosti za iskorištenje na *spike-u* za MDK.

Tablica 23. Iskorištenje *spike*-a za MDK (kloriti)

SPIKE NA 01 0928 → koncentracija do 0,25 mg/L					SPIKE NA 01 0926 → koncentracija do 0,70 mg/L				
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)	Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)
01 0929 LOQ	1	0,250	0,254	102%	01 0926 MDK	1	0,700	0,735	105%
01 0929 LOQ	2	0,250	0,252	101%	01 0926 MDK	2	0,700	0,737	105%
01 0929 LOQ	3	0,250	0,255	102%	01 0926 MDK	3	0,700	0,736	105%
01 0929 LOQ	4	0,250	0,245	98%	01 0926 MDK	4	0,700	0,739	106%
01 0929 LOQ	5	0,250	0,255	102%	01 0926 MDK	5	0,700	0,739	106%
01 0929 LOQ	6	0,250	0,250	100%	01 0926 MDK	6	0,700	0,740	106%
01 0929 LOQ	7	0,250	0,252	101%	01 0926 MDK	7	0,700	0,751	107%
01 0929 LOQ	8	0,250	0,251	100%	01 0926 MDK	8	0,700	0,750	107%
01 0929 LOQ	9	0,250	0,251	100%	01 0926 MDK	9	0,700	0,750	107%
01 0929 LOQ	10	0,250	0,247	99%	01 0926 MDK	10	0,700	0,751	107%
Srednja vrijednost			0,2513	101%	Srednja vrijednost			0,7428	106%
SD			0,003384753	1,35%	SD			0,006830983	0,98%
RSD (%)			1,35%	1,35%	RSD (%)			0,92%	0,92%

Tablica 24. Iskorištenje *spike*-a za MDK (klorati)

SPIKE NA 01 0928 → koncentracija do 0,25 mg/L					SPIKE NA 01 0926 → koncentracija do 0,70 mg/L				
Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)	Uzorak	Broj injektiranja	Koncentracija pripremljeno (mg/L)	Koncentracija izmjereno (mg/L)	Recovery (%)
01 0928 MDK	1	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	1	0,70	0,691	99%
01 0928 MDK	2	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	4	0,70	0,691	99%
01 0928 MDK	3	0,25	0,242	97%	01 0926 MDK	5	0,70	0,691	99%
01 0928 MDK	4	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	6	0,70	0,694	99%
01 0928 MDK	5	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	7	0,70	0,698	100%
01 0928 MDK	6	0,25	0,246	98%	01 0926 MDK	8	0,70	0,695	99%
01 0928 MDK	8	0,25	0,242	97%	01 0926 MDK	9	0,70	0,700	100%
01 0928 MDK	9	0,25	0,242	97%	01 0926 MDK	10	0,70	0,698	100%
01 0928 MDK	11	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	11	0,70	0,698	100%
01 0928 MDK	12	0,25	0,243	97%	01 0926 MDK	12	0,70	0,699	100%
Srednja vrijednost			0,2430	97%	Srednja vrijednost			0,6955	99%
SD			0,001154701	0,46%	SD			0,003566822	0,51%
RSD (%)			0,48%	0,48%	RSD (%)			0,51%	0,51%

I u ovom slučaju je zadovoljen kriterij prihvatljivosti koji iznosi 100 % ± 10 %. Za nižu koncentraciju MDK (0,25 mg/L) za klorite iskorištenje iznosi 101 %, a za klorate 97 % dok za višu koncentraciju MDK (0,70 mg/L) za klorite iskorištenje iznosi 106 %, a za klorate 99 %.

5.4. Granica detekcije

Granica detekcije matematički se računa prema jednadžbi 12:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_y}{a} \quad (12)$$

gdje je a nagib kalibracijskog pravca, a S_y rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca. S_y se računa prema jednadžbi 13 u kojoj n predstavlja broj uzoraka:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (13)$$

Kako bi se izračunalo rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca potrebno je napraviti dodatne matematičke izračune koji su prikazani u Tablici 25. za klorite i Tablici 26. za klorate.

Tablica 25. Pomoćna tablica za izračunavanje S_y za klorite

	Konc., x_i	Pov. (stvarna), y_i	Pov. (procjena), \hat{y}_i	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	0,05	0,01363	0,00973	0,00391	0,00002
2	0,20	0,06530	0,06800	-0,00270	0,00001
3	0,50	0,18033	0,18455	-0,00422	0,00002
4	0,75	0,28400	0,28168	0,00232	0,00001
5	1,00	0,37950	0,37880	0,00070	0,00000
sr.vr.	0,5	0,18455	sum	0,00002	0,00005
			sr.vr.	0,00000	0,00001

Uz pomoć Tablice 25. i jednadžbi (12) i (13) moguće je izračunati granicu detekcije za klorite koja iznosi:

- Nagib pravca, $a = 0,3885$
- Rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca, $S_y = 0,001886$
- Broj mjerenja, $n = 15$
- Granica detekcije, $LOD = 0,01602$ mg/L

Tablica 26. Pomoćna tablica za izračunavanje S_y za klorate

	Konc., x_i	Pov. (stvarna), y_i	Pov. (procjena), \hat{y}_i	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	0,05	0,01093	0,00861	0,00233	0,00001
2	0,20	0,06110	0,06173	-0,00063	0,00000
3	0,50	0,16440	0,16798	-0,00358	0,00001
4	0,75	0,25700	0,25652	0,00048	0,00000
5	1,00	0,34653	0,34506	0,00147	0,00000
sr.vr.	0,5	0,16799	sum	0,00007	0,00002
			sr.vr.	0,00001	0,00000

Pomoću Tablice 26. i jednadžbi (12) i (13) izračunata je granica detekcije za klorate koja iznosi:

- Nagib pravca, $a = 0,3542$
- Rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca, $S_y = 0,001272$
- Broj mjerenja, $n = 15$
- Granica detekcije, $LOD = 0,011849$ mg/L

5.5. Granica kvantifikacije

Granicu kvantifikacije moguće je izračunati pomoću jednadžbe 14:

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_y}{a} \quad (14)$$

Ponovno, a predstavlja nagib kalibracijskog pravca dok S_y rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca koji se računa prema jednadžbi (13).

Pomoću jednadžbe (14) i pomoćne Tablice 25. izračunat je LOQ za klorite:

- Nagib pravca, $a = 0,3885$
- Rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca, $S_y = 0,001886$
- Granica kvantifikacije, $LOQ = 0,04854$ mg/L

I za klorate:

- Nagib pravca, $a = 0,3542$
- Rezidualno standardno odstupanje kalibracijskog pravca, $S_y = 0,001272$
- Granica kvantifikacije, $LOQ = 0,03591$ mg/L

U oba se slučaja teoretsko izračunati LOQ se poklapa s eksperimentalno dobivenim LOQ vrijednostima na instrumentu koja iznosi 0,05 mg/L (vrijednost pripremljena za *spike* na LOQ). Teoretski LOQ daje okvirnu vrijednost na temelju modela i danih pretpostavki dok eksperimentalni LOQ osigurava potvrdu vrijednosti kroz provedena stvarna mjerenja.

5.7. Koncentracijski raspon

Koncentracijski raspon podrazumijeva koncentracijski raspon analita unutar kojeg analitička metoda daje pouzdane i točne rezultate. Odnosno, to je koncentracijski interval unutar kojeg je metoda validna i unutar kojeg pokazuje dobru linearnost, preciznost, točnost te ponovljivost.

Za klorite se koncentracijski raspon nalazi od 0,04854 mg/L (teoretska vrijednost LOQ) do 1 mg/L (najviša koncentracija kalibracijske otopine). Dok se za klorate ona nalazi između 0,0359 mg/L (teoretska vrijednost LOQ) i 1 mg/L (najviša koncentracija kalibracijske otopine).

5.8. Sažetak rezultata

Sažetak rezultata verifikacije metode kojim je moguće zaključiti da je metoda primjenjiva namijenjenoj svrsi prikazani su u Tablici 27. za klorite te u Tablici 28. za klorate.

Tablica 27. Sažeti rezultati verifikacije za klorite

Parametar validacije	Rezultat	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljen kriterij (DA/NE)
Linearnost			
Koeficijent korelacije	0,9998	$r \geq 0,995$	DA
Granica detekcije			
LOD	0,01602 mg/L	Informacija	-
Granica kvantifikacije			
Teorijski LOQ	0,0485 mg/L	$\leq 0,5$ mg/L	DA
Eksperimentalni LOQ	0,051 mg/L	0,05 mg/L	DA
Ponovljivost (kontrolni standard)			
Vrijeme retencije, Rt	0,04%	$RSD \leq 10\%$	DA
Površina	1,49%	$RSD \leq 10\%$	DA
Koncentracija	1,38%	$RSD \leq 10\%$	DA
Točnost (kontrolni standard)			
Iskorištenje	104%	$100 \pm 10\%$	DA
Koncentracijski raspon			
0,0485 mg/L – 1,00 mg/L			

Tablica 28. Sažeti rezultati verifikacije za klorate

Parametar validacije	Rezultat	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljen kriterij (DA/NE)
Linearnost			
Koeficijent korelacije	0,9999	$r \geq 0,995$	DA
Granica detekcije			
LOD	0,0119 mg/L	Informacija	-
Granica kvantifikacije			
Teorijski LOQ	0,0359 mg/L	$\leq 0,5$ mg/L	DA
Eksperimentalni LOQ	0,051 mg/L	0,05 mg/L	DA
Ponovljivost (kontrolni standard)			
Vrijeme retencije, Rt	0,03%	$RSD \leq 10\%$	DA
Površina	1,03%	$RSD \leq 10\%$	DA
Koncentracija	0,99%	$RSD \leq 10\%$	DA
Točnost (kontrolni standard)			
Iskorištenje	101%	$100 \pm 10\%$	DA
Koncentracijski raspon			
0,0359 mg/L – 1,00 mg/L			

5.9. Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost omogućava procjenu pouzdanosti i točnosti rezultata koji su dobiveni analizom. Pomoću mjerne nesigurnosti moguće je odrediti okvir unutar kojeg se očekuju stvarne vrijednosti izmjerenih veličina. Također, pomoću nje je moguće identificirati i kvantificirati izvore pogrešaka koje se javljaju prilikom provođenja metode.

Za potrebe verifikacije metode za određivanje klorita i klorata kao izvori mjerne nesigurnosti promatrali su se: čistoća standarda, volumen mikropipete 10-100 μ L, volumen mikropipete 100-1000 μ L, volumen tikvice 10 mL, kalibracijski pravac, ponovljivost mjerenja, iskorištenje te ponovljivost pripreme uzoraka.

5.9.1. Nesigurnost čistoće standarda

Nesigurnost čistoće standarda odnosi se na nesigurnost koja proizlazi iz neizvjesnosti u vezi stvarnog stupnja čistoće referentnog materijala koji se koristi u analitičkim mjerenjima. U ovom se slučaju nesigurnost čistoće standarda određivala preko certifikata za referentni materijal unutar kojeg je navedena čistoća i pripadajuća nesigurnost (U). U Tablici 29. prikazani su izračunati parametri za standard klorita i klorata.

Tablica 29. Izračunati parametri za određivanje nesigurnosti čistoće standarda za klorite (lijevo) i klorate (desno)

Analit	Kloriti	Analit	Klorati
Broj standarda	ICS006-100ML	Broj standarda	73166
Lot no.	LRAD1114	Lot no.	BCCG8597
c_s (mg/L)	1001	c_s (mg/L)	1000
U (mg/L)	41	U (mg/L)	4
U_c	11,83568052	U_c	1,15470
U_{cs}	0,01182	U_{cs}	0,00115

Broj standarda, jedinstveni broj standarda (engl. *Lot number*), c_s i U očitavaju se iz certifikata dok se preostale vrijednosti moraju matematički izračunati. U_c se računa prema jednadžbi 15, a U_{cs} prema jednadžbi 16:

$$U_c = \frac{\left(\frac{U}{2}\right)}{\sqrt{3}} \quad (15)$$

$$U_{cs} = \frac{U_c}{c_s} \quad (16)$$

U navedenoj tablici te jednadžbama c_s označava koncentraciju analita u standardu, U čistoću standarda, U_c nesigurnost čistoće standarda i U_{cs} relativnu standardnu nesigurnost čistoće standarda. Vrijednosti U_{cs} se uzimaju u obzir pri izračunu sastavljene i proširene mjerne nesigurnosti.

5.9.2. Nesigurnost mikropipeta

Mikropipete su ključni instrumenti u laboratorijima koji služe za precizno doziranje tekućina. Nesigurnost mikropipeta provodi se kako bi se osigurale preciznost i točnost volumetrijskih mjerenja koja se provode. Također, izračun nesigurnosti pomaže u procjeni toga koliko su volumeni dozirani mikropipetom blizu stvarnoj vrijednosti.

Za verifikaciju ove metode ispitala se nesigurnost dvije mikropipete – jedna volumena 10-100 μL , a druga 100-1000 μL . Za svaku mikropipetu odabrana su tri volumena koja su se ispitivala. Kod mikropipete 10-100 μL odabrani su volumeni 10, 50 i 100 μL , dok su za mikropipetu 100-1000 μL odabrani volumeni 100, 500 i 1000 μL . Za svaki izabrani volumen provelo se 10 uzastopnih mjerenja. Način na koji su se provela mjerenja opisan je u poglavlju 3.6..

Kako bi se odredila nesigurnost mikropipeta vrlo je bitno prije svakog mjerenja očitati temperaturu vode kako bi se mogla uvrstiti njezina odgovarajuća gustoća. Gustoće vode pri temperaturama na kojima su se provela mjerenja navedene su u Tablici 30.

Tablica 30. Gustoća vode pri različitim temperaturama

Temperatura vode ($^{\circ}\text{C}$)	Gustoća vode (g/mL)
24	0,99732
24,5	0,99720
25	0,99707
25,5	0,99694
26	0,99681

U Tablici 31. prikazano je na koji su se način vršili izračuni za određivanje nesigurnosti mikropipete od 10-100 μL pri volumenu od 10 μL i temperaturi vode od 24 $^{\circ}\text{C}$. Na isti su se način vršila mjerenja i za preostala dva izabrana volumena ove mikropipete te za izračunavanje nesigurnosti mikropipete 100-1000 μL .

Tablica 31. Mjerna nesigurnost mikropipete 10-100 μL (pri volumenu od 10 μL)

Volumen: 10 μL											
Temperatura vode: 24 $^{\circ}\text{C}$											
Mjerenje:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
M_2 (g), s vodom	1,11319	1,12541	1,1058	1,13919	1,13085	1,11763	1,13894	1,12602	1,11126	1,11905	
M_1 (g), prazno	1,10258	1,11521	1,09547	1,12873	1,12029	1,10777	1,12848	1,11507	1,10025	1,10774	
Masa vode (g), $M_2 - M_1$	0,01061	0,01020	0,01033	0,01046	0,01056	0,00986	0,01046	0,01095	0,01101	0,01131	
Gustoća vode, Tablica 5.	0,99732										
$V_i = \frac{M_2 - M_1}{\rho_{\text{vode}}}$	0,010638511	0,010227409	0,010357759	0,010488108	0,010588377	0,009886496	0,010488108	0,010979425	0,011039586	0,011340392	
$\bar{V} = \sum V_i / 10$	0,010603417										
$V_i - \bar{V}$	3,50941E-05	-0,000376008	-0,000245658	-0,000115309	-1,50403E-05	-0,000716921	-0,000115309	0,000376008	0,000436169	0,000736975	
$(V_i - \bar{V})^2$	1,23159E-09	1,41382E-07	6,0348E-08	1,32962E-08	2,26211E-10	5,13976E-07	1,32962E-08	1,41382E-07	1,90243E-07	5,43132E-07	
$s(V_i) = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1}\right) \cdot \sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}$	0,000424069										
$s(\bar{V}) = \frac{s(V_i)}{\sqrt{n}} = u_v$	0,000134103				$U = 2 \cdot u_v$			2,68E-04			
$\bar{V} \pm U$	0,01060 mL \pm 2,68E-04 mL										

U navedenoj tablici M_1 označava masu prazne posudice, a M_2 označava masu posudice nakon što je u nju dodano 10 μL ultračiste vode. V_i označava izmjereni volumen (mL) i on se računa za svako pojedinačno mjerenje, a nakon toga se izračunava srednja vrijednost volumena, \bar{V} . Standardna devijacija volumena $s(V_i)$ mjeri raspršenost ponovljenih mjerenja volumena oko njegove srednje vrijednosti. Pomoću nje moguće je izračunati i standardnu devijaciju srednje vrijednosti $s(\bar{V})$ koja se za broj mjerenja $n \geq 10$ može smatrati kao standardna mjerna nesigurnost, u_v . Proširena mjerna nesigurnost računa se kao umnožak standardne mjerne nesigurnosti i faktora pokrivanja, k . Kao k je odabrana vrijednost 2 što odgovara vjerojatnosti pokrivanja za oko 95 %. Jednadžbe po kojima su računati svi navedeni parametri prikazani su u Tablici 31.

U Tablici 32. prikazane su izračunate vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti za obje mikropipete uz pripadajući volumen na kojem su se vršila mjerenja.

Tablica 32. Izračunati parametri za određivanje nesigurnosti mikropipeta

Parametar	Mikropipeta 10-100 μL			Mikropipeta 100-1000 μL		
	10	50	100	100	500	1000
V (μL)	10	50	100	100	500	1000
U	2,68E-04	1,29E-04	2,22E-04	8,26E-05	1,17E-03	1,32E-03
U_c	7,74E-05	3,72E-05	6,41E-05	2,38E-05	3,38E-04	3,81E-04
U_{cs}	7,74E-06	7,75E-07	6,41E-07	2,38E-07	6,75E-07	3,81E-07

Ponovno, U u Tablici 32. označava proširenu mjernu nesigurnost, U_c nesigurnost mjerenja mikropipete, a u konačnici je izračunata relativna standardna nesigurnost mjerenja, U_{cs} . Relativnu standardnu nesigurnost mjerenja moguće je izračunati prema jednadžbi 17:

$$U_{cs} = \frac{U_c}{V} \quad (17)$$

5.9.3. Nesigurnost odmjerne tikvice

Nesigurnost odmjerne tikvice odnosi se na nesigurnost u točnosti volumetrijskog mjerenja koja se provode pomoću odmjerne tikvice. Nesigurnost povezana s njihovom upotrebom može utjecati na točnost analitičkih rezultata stoga je potrebno provesti njezino umjeravanje. Svaka odmjerna tikvica ima određenu toleranciju što znači da stvarni volumen može odstupati od nominalnog volumena označenog na tikvici. Pri pripremi otopina koristila se tikvica volumena 10 mL s odstupanjem od $\pm 0,02$ mL. Mjerenja su se vršila jednom dnevno kroz 10 dana kako bi se tikvica uspjela u potpunosti osušiti u međuvremenu. Nepotpuno osušena tikvica pokazivala je prevelika odstupanja. Prije svakog mjerenja izmjerena je temperatura ultračiste vode kako bi se mogla uvrstiti odgovarajuća vrijednost gustoće.

Za izračunavanje mjerne nesigurnosti odmjerne tikvice računaju se isti parametri kao i za određivanje nesigurnosti mikropipeta. U Tablici 33. iskazane su vrijednosti dobivene za izračunavanje nesigurnosti odmjerne tikvice od 10 mL.

Tablica 33. Mjerna nesigurnost odmjerne tikvice od 10 mL

Volumen: 10 mL											
Temperatura vode: 24°C											
Mjerenje:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
M2 (g), s vodom	27,12932	27,25961	27,18965	27,13002	27,12011	27,13006	27,20215	27,11126	27,20013	27,13002	
M1 (g), prazno	17,13643	17,23987	17,19947	17,12981	17,00563	17,14121	17,10496	17,12010	17,21602	17,13123	
Masa vode (g), M2-M1	9,99289	10,01974	9,99018	10,00021	10,11448	9,98885	10,09719	9,99116	9,98411	9,99879	
Gustoća vode, Tablica 5.	0,99745										
$V_i = \frac{M2 - M1}{\rho_{vode}}$	10,01843701	10,04535566	10,01572009	10,02577573	10,14033786	10,01438669	10,12300366	10,01670259	10,00963457	10,0243521	
$\bar{V} = \sum V_i / 10$	10,0433706										
$V_i - \bar{V}$	-0,024933581	0,001985062	-0,02765051	-0,01759487	0,096967267	-0,028983909	0,079633064	-0,026668003	-0,033736027	-0,019018497	
$(V_i - \bar{V})^2$	0,000621683	3,94047E-06	0,000764551	0,000309579	0,009402651	0,000840067	0,006341425	0,000711182	0,00113812	0,000361703	
$s(V_i) = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1}\right) \cdot \sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}$	0,047720135										
$s(\bar{V}) = \frac{s(V_i)}{\sqrt{n}} = u_v$	0,015090432			$U = 2 \cdot u_v$				0,030180863			
$\bar{V} \pm U$	10,04337 ± 0,030181										

U Tablici 34. prikazani su izračuni dobiveni za određivanje proširene mjerne nesigurnosti (U), nesigurnost mjerenja odmjerne tikvice (U_c), a u konačnici je izračunata i relativna standardna nesigurnost mjerenja (U_{cs}).

Tablica 34. Parametri za određivanje nesigurnosti odmjerne tikvice

Parametar	Odmjerna tikvica, 10 mL
V (μL)	10
U	0,03018
U_c	0,00871
U_{cs}	0,00087

5.9.4. Nesigurnost kalibracijskog pravca

Nesigurnost kalibracijskog pravca odnosi se na nesigurnosti koje su povezane s rezultatima koji su dobiveni pomoću kalibracijskog pravca. Svaka točka na kalibracijskom pravcu ima svoju mjernu nesigurnost, a ta nesigurnost uključuje nesigurnosti pripreme standarda, ponovljivosti mjerenja te nesigurnost samog instrumenta. Ako kalibracijski pravac nije u potpunosti linearan ili ako postoje vrijednosti koje imaju visoka odstupanja tada su nesigurnosti veće. Manji broj točaka kalibracije, također, može dovesti do povećane

nesigurnosti. Ukupna nesigurnost kalibracijskog pravca procjenjuje se izračunavanjem svih relevantnih nesigurnosti. U Tablici 35. prikazani su izračunati parametri nesigurnosti kalibracijskog pravca za klorite, a u Tablici 36. izračunati parametri nesigurnosti kalibracijskog pravca za klorate.

Tablica 35. Parametri nesigurnosti kalibracijskog pravca za klorite

Analit: KLORITI							
Koncentracija (mg/L)	Površina	Srednja vrijednost površine	Izmjerena koncentracija	STDEV	F-parametar	(ci-csr)^2	
0,05	0,0145	0,0136	0,062	0,00200	1,53E-05	0,2025	
	0,0135		0,060				
	0,0129		0,058				
0,2	0,0659	0,0653	0,195	0,00200	7,29E-06	0,09	
	0,0655		0,193				
	0,0645		0,191				
0,5	0,1804	0,1803	0,489	0,00100	1,78E-05	0	
	0,1807		0,490				
	0,1799		0,488				
0,75	0,2823	0,2840	0,754	0,00231	5,41E-06	0,0625	
	0,2849		0,758				
	0,2848		0,758				
1	0,3778	0,3795	0,997	0,00404	4,90E-07	0,25	
	0,3802		1,004				
	0,3805		1,004				
Srednja vrijednost konc.	0,5	Csr	0,5001	Suma:	0,01135	0,000046	0,605
		Co	0,75667		RSD, s	0,001886	
					(Co-Csr)^2	0,0658	
					U(co)	0,0036	
					U(co)/csr	0,0072	

Tablica 36. Parametri nesigurnosti kalibracijskog pravca za klorate

Analit: KLORATI							
Koncentracija (mg/L)	Površina	Srednja vrijednost površine	Izmjerena koncentracija	STDEV	F-parametar	(ci-csr)^2	
0,05	0,0111	0,0109	0,057	0,00135	5,40E-06	0,2025	
	0,0104		0,055				
	0,0113		0,058				
0,2	0,0611	0,0611	0,198	0,00010	4,10E-07	0,09	
	0,0611		0,198				
	0,0611		0,198				
0,5	0,1644	0,1644	0,490	0,00010	1,30E-05	0	
	0,1644		0,490				
	0,1644		0,490				
0,75	0,2568	0,2570	0,751	0,00082	2,03E-07	0,0625	
	0,2573		0,752				
	0,2569		0,751				
1	0,3464	0,3465	1,004	0,00044	2,05E-06	0,25	
	0,3466		1,004				
	0,3466		1,004				
Srednja vrijednost konc.	0,5	Csr	0,5000	Suma:	0,00280	0,000021	0,605
		Co	0,75130		RSD, s	0,001272	
					(Co-Csr)^2	0,0632	
					U(co)	0,00265	
					U(co)/csr	0,00529	

Vrijednosti površine i izmjerene koncentracije dobiveni su provedbom mjerenja na instrumentu. Standardna devijacija (STDEV) predstavlja mjeru raspršenosti skupa podataka oko njihove srednje vrijednosti, odnosno ona pokazuje koliko su pojedinačna mjerenja udaljena od srednje vrijednosti. Ona se računa za sve tri dobivene vrijednosti izmjerene koncentracije. F -parametar se koristi za procjenu razlikovanja između i unutar skupine podataka kako bi se identificirao i kvantificirao izvor nesigurnosti u mjerenju. Ukoliko je vrijednost F -parametra velika to znači da postoje značajna odstupanja između skupina podataka, a ako je F -parametar niža vrijednost to znači da nema značajnih razlika između skupina. Vrijednost c_{sr} označava srednju vrijednost izmjerenih koncentracija dok c_o predstavlja srednju vrijednost izmjerenih koncentracija četvrte kalibracijske točke (potrebno je uzeti kalibracijsku točku koja se nalazi oko središnje vrijednosti).

5.9.5. Nesigurnost ponovljivosti mjerenja i iskorištenja

Nesigurnost ponovljivosti mjerenja odnosi se na mjeru odstupanja rezultata kada se više uzastopnih mjerenja provode pod istim uvjetima (isti instrument, isti analitičar te isti uzorak). Nesigurnost ponovljivosti mjerenja je jedna od ključnih komponenti mjerne nesigurnosti jer ona govori o tome koliko su rezultati konzistentni kada se ponavljaju u identičnim uvjetima. Nesigurnost ponovljivosti mjerenja obuhvaća četiri komponente, a to su: instrumentalna nesigurnost (odstupanja zbog samog mjernog instrumenta), operativna nesigurnost (razlike koje nastaju zbog načina rukovanja instrumentom ili metodom), uvjeti okoline (male promjene u temperaturi, vlažnosti ili drugih parametara) te uzorkovanje (razlike u uzorkovanju i pripremi uzoraka). U Tablici 37. prikazane su izračunati parametri nesigurnosti ponovljivosti mjerenja za klorite i klorate.

Tablica 37. Nesigurnost ponovljivosti mjerenja za klorite i klorate

Parametar	Kloriti	Parametar	Klorati
STDEV	0,006	STDEV	0,002
Pooling STDEV	0,0010	Pooling STDEV	0,0007
c_{sr}	0,5001	c_{sr}	0,5000
U_{PU}	0,003	U_{PU}	0,001
U_{PU}/c_{sr}	0,007	U_{PU}/c_{sr}	0,002
U_{PM}	0,0003	U_{PM}	0,0002
U_{PM}/c_{sr}	0,0005	U_{PM}/c_{sr}	0,0004
R_n	1,0140	R_n	0,9946
U_i	0,00404	U_i	0,00156
U_i/R_n	0,00398	U_i/R_n	0,00157

U navedenoj tablici STDEV označava standardnu devijaciju. *Pooling* STDEV označava kombiniranu standardnu devijaciju koja se koristi za procjenu zajedničke standardne devijacije većeg broja uzoraka koje imaju različite srednje vrijednosti, a za koje se pretpostavlja da dolaze iz populacije s istom varijancom. Standardna nesigurnost povezana s razlučivošću mjernog instrumenta označava se s U_{PU} . Ova komponenta nesigurnosti u obzir uzima ograničenja koja proizlaze iz toga što mjerni instrument ne može razlikovati vrijednosti između svojih najmanjih jedinica. U_{PU} se računa prema formuli 18:

$$U_{PU} = \frac{STDEV}{\sqrt{3}} \quad (18)$$

Standardna nesigurnost povezana s ponovljivosti mjerenja označava se s U_{PM} . Ova komponenta nesigurnosti se koristi za izračunavanje relativne standardne nesigurnosti ponovljivosti mjerenja. U_{PM} uzima u obzir odstupanja rezultata mjerenja kada se mjerenja provode pod istim uvjetima, a računa se prema formuli 19:

$$U_{PM} = \frac{pooled\ STDEV}{\sqrt{15}} \quad (19)$$

Srednja vrijednost iskorištenja, R_n predstavlja prosječnu vrijednost rezultata iskorištenja dobivenih iz nekoliko ponovljenih mjerenja ili analiza, a iskazuje se kao postotak. Standardna nesigurnost pojedinačnog mjerenja označava se s U_i . Ova komponenta nesigurnosti koristi se za izračunavanje relativne standardne nesigurnosti iskorištenja, a moguće ju je izračunati prema formuli 20:

$$U_i = ABS(0,5 \cdot (1 - \frac{Rn}{100})/\sqrt{5}) \quad (20)$$

U formuli (20) *ABS* označava apsolutnu vrijednost broja, 0,5 označava konstantu, a broj 100 koristi se kako bi se postotak Rn -a preveo u decimalni oblik. Relativna standardna nesigurnost, U_{CS} računa se prema formuli 21:

$$U_{CS} = \frac{U_i}{R_n} \quad (21)$$

5.9.6. Nesigurnost ponovljivosti pripreme uzorka

Pomoću ponovljivosti pripreme uzorka moguće je pokazati konzistentnost rezultata koji se dobivaju nakon ponovne pripreme istog uzorka pod istim uvjetima. Ponovljivost pripreme uzorka ključna je za osiguranje pouzdanosti i točnosti rezultata analize. Kako bi se ispitala ova nesigurnost pripremljene su tri serije otopina čija je koncentracija iznosila 0,05 mg/L (vrijednost LOQ) za obje anionske vrste. U Tablici 38. prikazani su rezultati ponovljivosti pripreme uzorka za klorite, a u Tablici 39. za klorate.

Tablica 38. Ponovljivost pripreme uzorka za klorite (0,05 mg/L)

Analit	Dodana koncentracija	Priprema uzorka	Retencija (min)	Površina	Koncentracija
KLORITI	0,05 mg/L	1. priprema	7,753	0,0153	0,058
			7,750	0,0156	0,058
			7,757	0,0150	0,053
			7,751	0,0143	0,052
			7,750	0,0148	0,056
		Srednja vrijednost	7,7522	0,0150	0,0554
		SD	0,0029	0,0005	0,0028
		2. priprema	7,770	0,0190	0,063
			7,767	0,0198	0,065
			7,773	0,0175	0,058
			7,763	0,0189	0,060
			7,763	0,0195	0,063
		Srednja vrijednost	7,7672	0,0189	0,0618
		SD	0,0044	0,0009	0,0028
		3. priprema	7,423	0,0198	0,050
			7,427	0,0198	0,050
			7,427	0,0184	0,050
			7,423	0,0182	0,051
			7,423	0,0187	0,049
		Srednja vrijednost	7,4246	0,0190	0,0501
		SD	0,0022	0,0008	0,0008
Average			0,0558		
SD			0,0054		
RSD (%)			9,69%		

Tablica 39. Ponovljivost pripreme uzorka za klorate (0,05 mg/L)

Analit	Dodana koncentracija	Priprema uzorka	Retencija (min)	Površina	Koncentracija
KLORATI	0,05 mg/L	1. priprema	14,323	0,0069	0,054
			14,323	0,0072	0,055
			14,327	0,0071	0,055
			14,326	0,0071	0,055
			14,325	0,0070	0,054
		Srednja vrijednost	14,3248	0,0071	0,0546
		SD	0,0018	0,0001	0,0005
		2. priprema	14,450	0,0085	0,056
			14,453	0,0086	0,056
			14,447	0,0080	0,055
			14,553	0,0079	0,053
			14,547	0,0082	0,053
		Srednja vrijednost	14,4900	0,0082	0,0546
		SD	0,0549	0,0003	0,0015
		3. priprema	14,347	0,0078	0,056
			14,350	0,0079	0,057
			14,347	0,0081	0,060
			14,343	0,0084	0,061
			14,337	0,0079	0,057
		Srednja vrijednost	14,3448	0,0080	0,0582
		SD	0,0050	0,0002	0,0022
Average			0,0558		
SD			0,0023		
RSD (%)			4,08%		

Iz prikazanih je rezultata vidljivo kako je RSD koncentracija kod klorita 9,69 %, a kod klorata 4,08 %. Obje vrijednosti nalaze se unutar prihvatljivog raspona.

5.9.7. Sastavljena i proširena mjerna nesigurnost svih izvora mjerne nesigurnosti

Sastavljena i proširena mjerna nesigurnost su dva ključna pojma koja se koriste za kvantificiranje nesigurnosti povezane s mjerenjima. Sastavljena mjerna nesigurnost označava standardnu nesigurnost koja se dobiva kombinacijom svih pojedinačnih nesigurnosti koje proizlaze iz različitih izvora nesigurnosti. Proširena mjerna nesigurnost pruža širu procjenu nesigurnosti koja u obzir uzima potrebni stupanj pouzdanosti rezultata mjerenja, a dobiva se množenjem sastavljene mjerne nesigurnosti s faktorom proširenja, k . U ovom slučaju je za faktor proširenja odabrana vrijednost 2 kojom se dobiva pokrivenost od oko 95 %.

U Tablici 40. sažete su vrijednosti relativnih standardnih nesigurnosti svih izvora mjerne nesigurnosti za klorite, a u Tablici 41. vrijednosti relativnih standardnih nesigurnosti svih izvora mjerne nesigurnosti za klorate. Pomoću vrijednosti koje su sažete u ovim tablicama izračunate su sastavljena i proširena mjerna nesigurnost.

Tablica 40. Izvori mjernih nesigurnosti za klorite

Kloriti					
Br.	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost, U	U ²		
1	Čistoća standarda	0,00115	0,00001333		
2	Volumen mikropipete 10-100 uL	7,74E-06	0,00000000		
3	Volumen mikropipete 100-1000 uL	6,75E-07	0,00000000		
4	Volumen tikvice 10 mL	0,00087	0,000000759		
5	Kalibracijski pravac	0,00720	0,000051787		
6	Ponovljivost mjerenja	0,0003	0,000000072		
7	Iskorištenje	0,0040	0,000016320	koncentracija (mg/L)	0,25
8	Ponovljivost pripreme uzorka	0,001	0,000001440	suma U ²	0,000071711
	Sastavljena mjerna nesigurnost, U _c		0,002117061	U _c	0,002117061
	Proširena mjerna nesigurnost (k=2), U		0,004234121	k*U _c	0,004234121

Tablica 41. Izvori mjernih nesigurnosti za klorate

Klorati					
Br.	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost, U	U ²		
1	Čistoća standarda	0,00115	0,00001333		
2	Volumen mikropipete 10-100 uL	7,74E-06	0,00000000		
3	Volumen mikropipete 100-1000 uL	6,75E-07	0,00000000		
4	Volumen tikvice 10 mL	0,00087	0,00000759		
5	Kalibracijski pravac	0,00529	0,000027995		
6	Ponovljivost mjerenja	0,0002	0,00000032		
7	Iskorištenje	0,0016	0,000002439	koncentracija (mg/L)	0,25
8	Ponovljivost pripreme uzorka	0,003	0,000011479	suma U ²	0,000044038
	Sastavljena mjerna nesigurnost, U _c		0,001659026	U _c	0,001659026
	Proširena mjerna nesigurnost (k=2), U		0,003318052	k*U _c	0,003318052

U obje je tablice kao relativna standardna nesigurnost mikropipeta uzeta ona vrijednost koja je imala najveći utjecaj. Kao koncentracija je odabrano 0,25 mg/L (niža vrijednost za MDK). Sastavljena mjerna nesigurnost, U_c izračunata je prema jednadžbi 22:

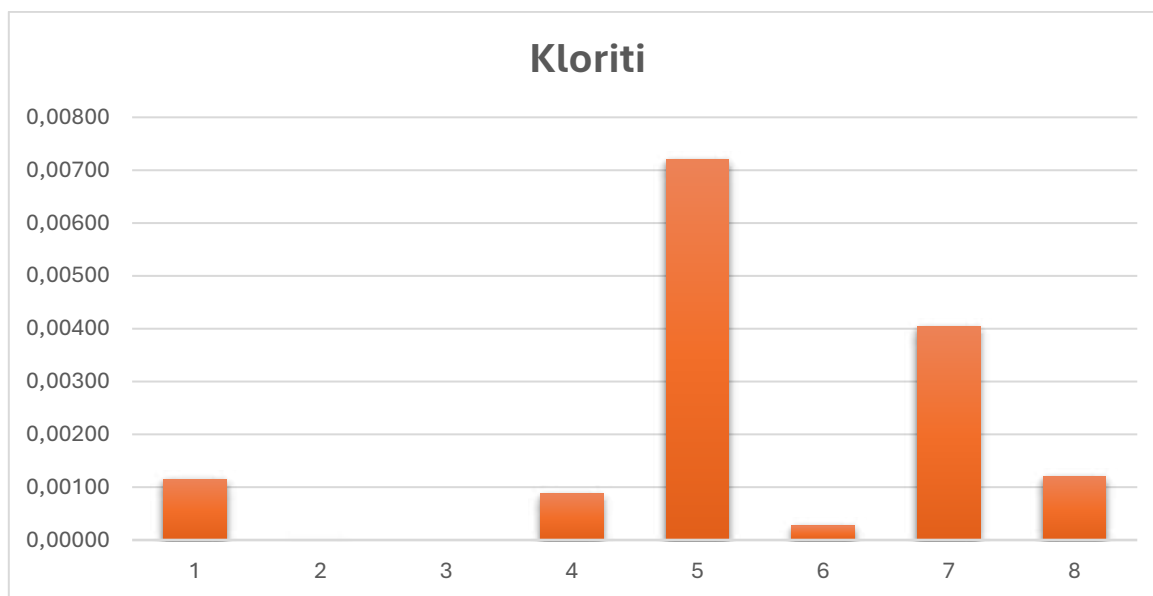
$$U_c = \text{koncentracija} \cdot \sqrt{\sum U^2} \quad (22)$$

Za klorite dobivena vrijednost sastavljene mjerne nesigurnosti iznosi 0,00212 što se može interpretirati kao standardna devijacija koja opisuje koliko se mjerena veličina može očekivano razlikovati od prave vrijednosti zbog izvora nesigurnosti. Odnosno, dobiveni rezultat označava da bi se rezultati koji se dobiju nakon ponovljenih mjerenja pod istim uvjetima trebali nalaziti u rasponu $\pm 0,00212$ mg/L od srednje vrijednosti. Za klorate vrijednost sastavljene mjerne nesigurnosti iznosi 0,00166, odnosno rezultati nakon ponovljenih mjerenja bi se trebali nalaziti u rasponu $\pm 0,00166$ od srednje vrijednosti. Kao srednja vrijednost se u oba slučaja uzima odabrana koncentracija od 0,25 mg/L. Proširena mjerna nesigurnost izračunata je prema jednadžbi 23 u kojoj k predstavlja faktor proširenja:

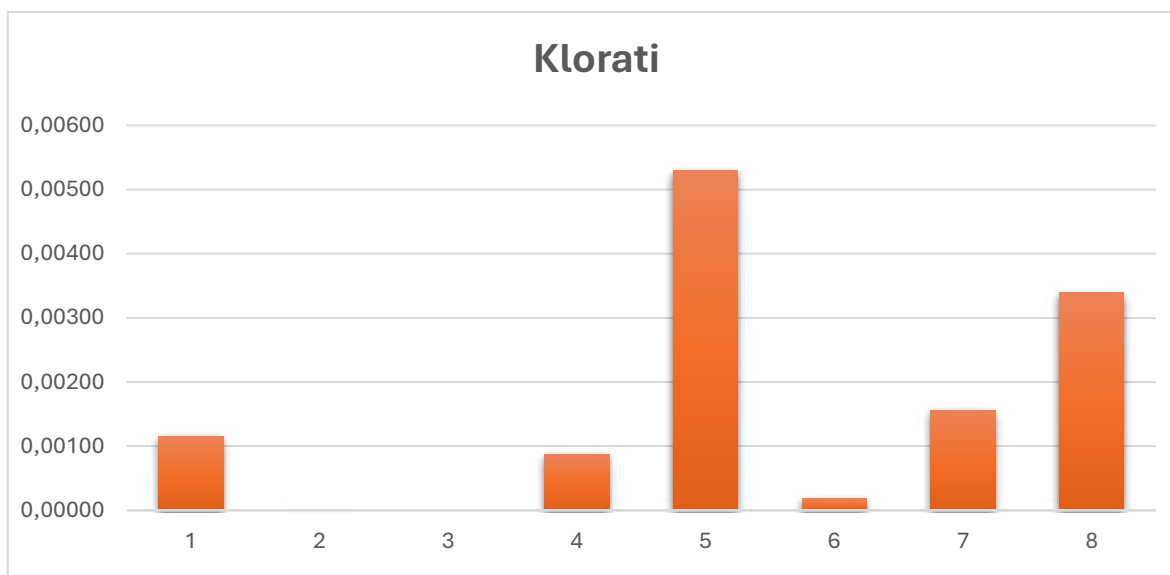
$$U = U_c \cdot k \quad (23)$$

Za klorite izračunata vrijednost proširene mjerne nesigurnosti iznosi 0,00423 što znači da se pravi rezultat mjerenja, s određenim stupnjem povjerenja (u ovom slučaju $k = 2$) nalazi unutar intervala od $\pm 0,00423$ oko izmjerene vrijednosti. Odnosno, ako je kao izmjerena vrijednost odabrana koncentracija od 0,25 mg/L tada se rezultat s proširenom mjernom nesigurnosti može iskazati kao 0,25 mg/L \pm 0,00423. Za klorate izračunata vrijednost proširene mjerne nesigurnosti iznosi 0,00332 što znači da se pravi rezultati mjerenja nalaze unutar intervala od $\pm 0,00332$ mg/L.

Na Slici 7. prikazan je grafički prikaz u kojemu je vidljiv utjecaj svake sastavnice mjerne nesigurnosti za klorite, a na Slici 8. za klorate.



Slika 7. Grafički prikaz utjecaja svakog izvora mjerne nesigurnosti za klorite.



Slika 8. Grafički prikaz utjecaja svakog izvora mjerne nesigurnosti za klorate.

Na grafičkim prikazima navedeni su izvori mjernih nesigurnosti od 1 do 7 (redosljedom kako su navedeni u Tablicama 40. i 41.). Vidljivo je kako najveći utjecaj ima nesigurnost kalibracijskog pravca kod oba analita.

5. ZAKLJUČAK

Kloriti i klorati su anorganske ionske vrste koje se pojavljuju u vodi kao nusprodukti dezinfekcije. Kloriti i klorati dokazano imaju toksičan učinak na ljudske i životinjske organizme te na okoliš i stoga je vrlo bitno pravovremeno dokazati njihovu prisutnost u vodi. Ionska kromatografija jedna je od najučinkovitijih analitičkih metoda kojom je moguće identificirati i kvantificirati klorite i klorate u uzorcima vode. Ionska kromatografija nudi visoku osjetljivost, preciznost i specifičnost uz minimalnu pripremu uzoraka. Također, budući da se radi o realnim uzorcima vode ionska kromatografija pokazuje prednost jer je pomoću nje moguće istovremeno identificirati i kvantificirati više različitih vrsta prisutnih aniona i kationa.

Verifikacija metode predstavlja ključan korak u analitičkom procesu pomoću kojega se osiguravaju točni i pouzdani rezultati koji su u skladu s propisanim direktivama i standardima. Verifikacijom analitičke metode za određivanje klorita i klorata pomoću ionske kromatografije potvrđeno je kako su svim ispitanim validacijskim parametrima (linearnost, ponovljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije te koncentracijski raspon) zadovoljeni propisani kriteriji prihvatljivosti. Time je dokazano da je verificirana metoda pouzdana i prikladna svojoj namjeni te da se može koristiti za rutinske analize.

Mjerna nesigurnost pomaže u procjeni pouzdanosti rezultata mjerenja, a identifikacija i analiza izvora nesigurnosti mogu pomoći u optimizaciji mjernih procesa i metoda. U ovom je radu ispitano osam izvora mjerne nesigurnosti (čistoća standardna, mikropipeta 10-100 μL , mikropipeta 100-1000 μL , volumen odmjerne tikvice, kalibracijski pravac, ponovljivost, iskorištenje te ponovljivost pripreme uzoraka). Od svih izvora mjerne nesigurnosti kod oba aniona najveći utjecaj imao je kalibracijski pravac. Mjerna nesigurnost kalibracijskog pravca može proizaći iz promjena u okolišnim uvjetima, zbog pogrešaka pri pripremi kalibracijskih otopina, zbog prisutnih interferenata ili zbog samog instrumenta. Mjerna nesigurnost iskorištenja kod oba analita, također je imala visoki utjecaj, a razlog tome je taj što i mala nesigurnost u iskorištenju može značajno povećati ukupnu nesigurnost mjerenja ukoliko se iskorištenje množi ili dijeli s drugim veličinama koje su ključne za izračun konačne vrijednosti (što je i bio slučaj).

6. LITERATURNI PREGLED

1. F. Al-Otoum, M. A. Al-Ghouti, T. A. Ahmed, M. Abu-Dieyeh, M. Ali, Disinfection by-products of chlorine dioxide (chlorite, chlorate, and trihalomethanes): Occurrence in drinking water in Qatar. *Chemosph.* **2016**, *164*, 649-656.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Izvještaj o zdravstvenoj ispravnosti vode za ljudsku potrošnju u Republici Hrvatskoj za 2023. godinu, **2024**. URL: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2024/07/IZVJESTAJ_Voda-za-ljudsku-potrosnju_2023.pdf (27.7.2024.)
3. X. F. Li, W. A. Mitch, Drinking Water Disinfection Byproducts (DBPs) and Human Health Effects: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 1681-1689.
4. M. Lindmark, K. Cherukumilli, Y. S. Crider, P. Marcenac, M. Lozier, L. Voth-Gaeddert, D. S. Lantagne, J. R. Mihelcic, Q. M. Zhang, C. Just, A. J. Pickering, Passive In-Line Chlorination for Drinking Water Disinfection: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56*, 9164-9181.
5. L. Castro Medeiros, F. L. Souza de Alencar, V. Souza do Amaral, Toxicological aspects of trihalomethanes: a systematic review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 5316-5332.
6. T. Bond, E. H. Goslan, S. A. Parson, B. Jefferson, A critical review of trihalomethane and haloacetic acid formation from natural organic matter surrogates, *Environ. Technol. Rev.* **2012**, *1*, 93-113.
7. S. Sorlini, F. Gialdini, M. Biasibetti, C. Collivignarelli, Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Res.*, **2014**, *54*, 44-52.
8. G. S. Moore, E. J. Calabrese, Toxicological Effects of Chlorite. *Environ. Health Persp.* **1982**, *46*, 31-37.
9. S. A. Snyder, R. C. Pleus, B. J. Vanderfor, J. C. Holady, Perchlorate and chlorate in dietary supplements and flavor enhancing ingredients. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *567*, 26-32.
10. World Health Organization, WHO. URL: <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/chemical-hazards-in-drinking-water/chlorine-dioxide-chlorate-and-chlorite> (22.7.2024.)

11. C. Wei, F. Zhang, Y. Hu, C. Feng, H. Wu, Ozonation in water treatment: the generation, basic properties of ozone and its practical application. *Rev. Chem. Eng.*, **2016**, *33*, 49-89.
12. Y. Lester, C. M. DSharpless, H. Mamane, K. G. Linden, Production of Photo-oxidants by Dissolved Organic Matter During UV Water Treatment. *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, *47*, 11726-11733.
13. Direktiva (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2020. o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju (preinaka), 2020. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hr/TXT/?uri=CELEX%3A32020L2184> (27.7.2024.)
14. Narodne novine – Službeni list Republike Hrvatske (27.7.2024.)
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. URL: <https://www.hzjz.hr/zavod/> (26.7.2024.)
16. T. Bolanča, Š. Ukić. Ionska kromatografija. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, **2015**. 164.
17. Thermo Fisher Scientific. URL: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/chromatography/ionchromatography-ic/ion-chromatography-systems/instrument-selection/ics-6000.html> (24.7.2024.)
18. Thermo Scientific. Dionex ICS-6000 Ion Chromatography System – *Operator's Manual*. Sjedinjene Američke Države: Thermo Fisher Scientific Inc., **2024**. 480.
19. M. E. Swartz, I. S. Krull. Handbook of Analytical Validation. Sjedinjene Američke Države: CRC Press, **2012**. 206.
20. Državni zavod za mjeriteljstvo. Vrednovanje mjernih podataka – Upute za iskazivanje mjerne nesigurnosti. URL: https://dzm.gov.hr/UserDocsImages/Zakonsko%20mjeriteljstvo/Publikacije/mjerna_nesigurnost.pdf (28.7.2024.)