

# Analiza vode za potrebe farmaceutske industrije prema europskoj farmakopeji

---

**Glavaš, Dora**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:762491>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-14**

*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Dora Glavaš

**ANALIZA VODE ZA POTREBE  
FARMACEUTSKE INDUSTRIJE PREMA  
EUROPSKOJ FARMAKOPEJI**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Dora Glavaš

**ANALIZA VODE ZA POTREBE  
FARMACEUTSKE INDUSTRIJE PREMA  
EUROPSKOJ FARMAKOPEJI**

Diplomski rad

mentor: doc.dr.sc. Olivera Galović

neposredni voditelj: Joud Kassab, mag. 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 znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Znanstvena grana:** Analitička kemija

## **ANALIZA VODE ZA POTREBE FARMACEUTSKE INDUSTRIJE PREMA EUROPSKOJ FARMAKOPEJI**

**Dora Glavaš**

**Rad je izrađen u:** Tvornici lijekova, dodataka prehrani i kozmetike Yasenka

**Mentor:** doc. dr. sc. Olivera Galović

**Neposredni voditelj:** Joud Kassab, mag. chem.

### **Sažetak:**

Europska farmakopeja je zbirka tekstova o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu lijekova, o ispitivanjima koja se provode na lijekovima, o sirovinama koje se koriste u samoj proizvodnji lijekova, te o međuproduktima sinteze lijekova i medicinskih pripravaka. Prema europskoj farmakopeji razlikuju se 3 vrste voda: pročišćena voda, voda za injekcije, voda za pripremu ekstrakata. U ovom radu ispitala se voda iz monografija pročišćene vode. Analiziralo se ukupni organski ugljik, električna vodljivost, prisutnost nitrata, sulfata, kalcija i magnezija, klorida, oksidirajućih tvari, kiselost ili lužnatost i ostatak nakon uparavanja. Svi dobiveni rezultati odgovaraju zadanim normama iz europske farmakopeje, te se time može zaključiti kako je voda iz farmaceutске tvrtke Yasenka pogodna za upotrebu u farmaceutskoj industriji.

**Jezik izvornika:** Hrvatski jezik

**Diplomski rad obuhvaća:** 46 stranice, 27 slika, 10 tablica, 23 literaturnih navoda

**Ključne riječi:** *farmakopeja, ukupni organski ugljik, analiza vode.*

**Rad prihvaćen:** 18.09.2024.

### **Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv.prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentor i član
3. prof.dr.sc. Natalija Velić, član
4. izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek - Department of Chemistry**  
Name of study programme: **University graduate study programme in Chemistry; research program**

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Analytical chemistry

## **ANALYSIS OF WATER FOR PHARMACEUTICAL INDUSTRY ACCORDING TO THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA**

**Dora Glavaš**

**This paper was created on:** Medicines, food supplements and cosmetics factory Yassenka

**Supervisor:** Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

**Co-supervisor:** Joud Kassab, mag. chem.

### **Abstract:**

European pharmacopoeia is a collection of texts about qualitative and quantitative composition of drugs, about scanning on drugs, raw materials used in pharmaceutical industry, and about intermediate products in making drugs and medicines. There are 3 types of water in European pharmacopoeia: Purified water, Water for injections, water for preparation of extracts. In this paper was used only purified water. We were testing total organic carbon, conductivity, nitrates, acidity or alkalinity, sulfates, calcium and magnesium, chlorides, oxidisable substances, ammonium and residue on evaporation. Results of analysis are compatible with norms given in pharmacopoeia, and proving us that water from pharmaceutical company Yassenka is suitable for using in pharmaceutical industry.

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 46 pages, 27 figures, 10 tables, 23 references.

**Keywords:** *pharmacopoeia, total organic carbon, water analysis.*

**Thesis accepted:** 18.09.2024

### **Reviewers:**

1. Elvira Kovač-Andrić PhD., associate prof., chairman
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

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	2
<b>2.1 Europska farmakopeja</b> .....	2
<b>2.2. Voda u farmaceutskoj industriji</b> .....	3
2.2.1 Pročišćena voda.....	4
2.2.2. Ultra pročišćena voda.....	6
<b>2.3. Testovi za pročišćenu vodu u rinfuzi</b> .....	6
2.3.1. Ukupni organski ugljik .....	6
2.3.2. Električna vodljivost.....	8
2.3.3. Određivanje nitrata .....	8
<b>2.4. Testovi za pročišćenu vodu iz spremnika</b> .....	9
2.4.1 Kiselost ili lužnatost .....	9
2.4.2. Određivanje sulfata.....	9
2.4.3 Određivanje klorida.....	10
2.4.4. Određivanje oksidirajuće tvari .....	10
2.4.5. Određivanje kalcija i magnezija .....	10
2.4.6. Određivanje amonijaka.....	10
2.4.7. Određivanje ostatka nakon uparavanja.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
<b>3.1. Pročišćena voda u rinfuzi – Ukupni organski ugljik</b> .....	11
3.1.1 Priprema uzorka .....	11
3.1.2. Korištene kemikalije, referentne tvari i instrumenti .....	11
3.1.3 Priprema otopina .....	12
3.1.3. Postupak analize .....	12
<b>3.2. Pročišćena voda u rinfuzi – test na nitrate</b> .....	13
3.2.1. Priprema uzorka .....	13
3.2.2. Korištene kemikalije i instrumenti .....	13
3.2.3. Priprema otopina .....	14
3.2.4. Postupak analize .....	15
<b>3.3. Pročišćena voda u rinfuzi – test električne vodljivosti</b> .....	15
3.3.1 Priprema uzorka .....	15
3.3.2. Korištene kemikalije i instrumenti .....	15
3.3.3. Postupak analize .....	15
<b>3.4. Pročišćena voda u spremnicima – test na kiselost ili lužnatost</b> .....	16
3.4.1 Priprema uzorka .....	16

3.4.2	Korištene kemikalije i instrumenti .....	16
3.4.3.	Priprema otopina .....	16
3.4.4.	Postupak analize .....	17
<b>3.5.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – test na sulfate.....</b>	<b>17</b>
3.5.1	Priprema uzorka .....	17
3.5.2.	Korištene kemikalije i instrumenti .....	17
3.5.3.	Priprema otopina .....	18
<b>3.6.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – određivanje klorida .....</b>	<b>18</b>
3.6.1	Priprema uzorka .....	18
3.6.2.	Korištene kemikalije i instrumenti .....	18
3.6.3.	Priprema otopina .....	19
3.6.4.	Postupak analize .....	19
<b>3.7.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – određivanje oksidirajućih tvari.....</b>	<b>19</b>
3.7.1.	Priprema uzorka .....	19
3.7.2.	Korištene kemikalije i instrumenti .....	19
3.7.3.	Priprema otopina .....	19
3.7.4.	Postupak analize .....	20
<b>3.8.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – određivanje kalcija i magnezija.....</b>	<b>20</b>
3.8.1	Priprema uzorka .....	20
3.8.2.	Korištene kemikalije i instrumenti .....	20
3.8.3.	Priprema otopina .....	21
3.8.4.	Postupak analize .....	21
<b>3.9.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – određivanje amonijaka .....</b>	<b>22</b>
3.9.1.	Priprema uzorka .....	22
3.9.2.	Korištene kemikalije i instrumenti .....	22
3.9.3.	Priprema otopina .....	22
3.9.4.	Postupak analize .....	23
<b>3.10.</b>	<b>Pročišćena voda u spremnicima – analiza ostatka nakon uparavanja .....</b>	<b>24</b>
3.10.1.	Priprema uzorka.....	24
3.10.2.	Kemikalije i instrumentacija.....	24
3.10.3.	Postupak analize .....	24
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ukupni organski ugljik .....</b>	<b>24</b>
4.1.1.	Ispiranje sustava .....	24
4.1.2.	Kalibracija .....	26
4.1.3.	Ispitivanje prikladnosti sustava .....	28

4.1.4. Analiza TOC u uzorcima vode .....	29
<b>4.2. Određivanje nitrata .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3. Određivanje električne vodljivosti .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. Određivanje kiselosti ili lužnatosti .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5. Određivanje sulfata .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6. Određivanje klorida .....</b>	<b>33</b>
<b>4.7. Određivanje oksidirajućih tvari .....</b>	<b>33</b>
<b>4.8. Određivanje kalcija i magnezija .....</b>	<b>34</b>
<b>4.9. Određivanje amonijaka .....</b>	<b>35</b>
<b>4.10. Određivanje ostatka nakon uparavanja .....</b>	<b>36</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>37</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>38</b>



## 1. UVOD

Voda je sveprisutna u našim životima. Još u školi se djecu uči kako bez vode ne bi bio moguć život kakvog danas poznajemo. Voda je tekućina bez boje, okusa i mirisa. Razlikuju se podzemne vode, površinske vode, vode za ljudsku potrošnju i otpadne vode. Ovisno o podrijetlu vode u njoj mogu biti otopljene razne čestice, kao što su minerali, otopljeni plinovi, organske ili anorganske tvari itd., koje mogu utjecati na njezinu kvalitetu [1].

U farmaceutskoj industriji kvaliteta vode je najvažniji parametar. Voda mora biti iznimne kvalitete kako bi gotovi proizvod bio zdravstveno ispravan, ali i kvalitetan i time konkurentan na tržištu. Upravo zbog toga stvorila se potreba za određenim normama koje će davati smjernice o kvaliteti vode. Europska farmakopeja sadrži sve norme i pravila ne samo o vodi nego i o svim ostalim parametrima koji ulaze u farmaceutsku proizvodnju. To podrazumijeva sastav lijekova i medicinskih preparata, te samu čistoću sirovina koje služe za pripremu istih, ispitivanja koja se provode na farmaceutskim preparatima, te podatci o međuproduktima raznih sinteza lijekova [2].

Cilj ovoga rada bio je analizirati vodu koja se koristi u farmaceutskoj tvrtki Yasenka prema postupcima opisanima u europskoj farmakopeji te utvrditi jesu li vrijednosti dobivene za analite u skladu s vrijednostima koje su propisane za farmaceutsku industriju.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 Europska farmakopeja

Farmakopeja je zbirka tekstova o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu lijekova, o ispitivanjima koja se vrše na lijekovima, o sirovinama koje se koriste u samoj proizvodnji lijekova, te o međuproduktima sinteze lijekova i medicinskih pripravaka [1]. Postoji više verzija farmakopeje ovisno o državama, te tako postoji: američka (engl. *US pharmacopeia*, USP-NF), europska (engl. *European pharmacopeia*, Ph. Eur.), njemačka (njem. *Deutsches arzneibuch*, DAB), francuska (engl. *The French pharmacopeia*, Ph. F.), švicarska (engl. *Swiss pharmacopoeia*, Ph. Helvetica), britanska (engl. *British pharmacopoeia*, BP), te japanska (engl. *Japanese pharmacopeia*, JP). U ovom radu korištena su pravila i smjernice iz europske farmakopeje (Ph. Eur.). Europska farmakopeja ima pravno obvezujući karakter i pruža jednake standarde kvalitete u farmaceutskoj industriji cijele Europe. Na taj način daje jednake standarde za kvalitetu sastojaka, oblike doziranja i metode analize lijekova. Standardi europske farmakopeje koriste se za lijekove za ljudsku i veterinarsku uporabu u svih 39 država potpisnica, što uključuje sve države Europske unije pa tako i Hrvatsku. Europska farmakopeja nastala je 1964. godine Konvencijom o izradi Europske farmakopeje koju vodi Vijeće Europe. Objavljuje ju Europska uprava za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb (engl. *European Directorate for the Quality of medicines and Healthcare*, EDQM). Ovo tijelo odgovorno je za komisiju koja utvrđuje osnovna načela europske farmakopeje, ocjenjuje prijedloge za uvrštenje novih tekstova, pregledava ukupni napredak postignut na programu rada, imenuje stručnjake koji su odgovorni za izradu monografija, te prihvaća i usvaja iste [2]. Sjedište je u Strasbourgu u Francuskoj, a vijeće se sastaje 3 puta godišnje (najčešće u ožujku, lipnju i studenom) kako bi usvojilo tekstove koje su predložili stručnjaci. Do veljače 2020. godine, zabilježeno je 39 država članica i Europska unija koje su potpisnice Konvencije o izradi Europske farmakopeje. Osim potpisnica, postoji i 30 država promatrača, od kojih 5 europskih zemalja i 23 neeuropske zemlje, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) i Tajvanska agencija za hranu i lijekove (engl. *Taiwan Food and Drug Administration*, TFDA). Predstavnici država članica uglavnom dolaze iz zdravstvenih tijela, nacionalnih farmakopejskih tijela i uglednih sveučilišta. Prvo izdanje europske farmakopeje tiskano je 1969. godine. Nakon toga novo izdanje objavljuje se svake tri godine, a svake godine se objavljuje dodatak s novim i ispravljenim tekstovima. Trenutno važeće izdanje je 11. izdanje koje je objavljeno u studenom 2023. godine. Monografije zahtijevaju korištenje različitih referenci i referentnih materijala kao

mjerila za analitička ispitivanja [3]. Hrvatska je postala potpisnica konvencije i Protokola o izradi farmakopeje 1994. godine, čime je na sebe preuzela obavezu primjene i poštivanja pravila farmakopeje u svakodnevnoj praksi. Također, potpisom Hrvatska ima pravo biranja delegata koji će sudjelovati u izradi novog izdanja farmakopeje. Postoji i Hrvatska farmakopeja (HRF) koja je usklađena s tekstovima Europske farmakopeje. Izdaje ju Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), a cilj Hrvatske farmakopeje je korištenje i očuvanje stručnih farmaceutskih riječi na hrvatskom jeziku [4,5].

## 2.2. Voda u farmaceutskoj industriji

Ljudi se svakodnevno susreću s vodom i koriste ju u različite svrhe. Osim što se koristi za ljudsku potrošnju, koristi se i za industriju, farmaceutske i medicinske svrhe i mnoge druge. Voda se zbog svog polarnog karaktera, visokog dipolnog momenta, svoje rasprostranjenosti često koristi kao otapalo za razne farmaceutske pripravke i reagense. Osim toga voda, odnosno pročišćena voda, koristi se za pranje, pripremu i ispiranje posuđa u farmaceutskom laboratoriju. Zbog napretka industrije, tržište je zahtijevalo sve veću čistoću vode, te u konačnici kvalitetne proizvode. To je dovelo do potrebe za jasno i precizno definiranje zakona o kvaliteti vode za farmaceutsku upotrebu, te definiranje postupaka koji se koriste pri proizvodnji, čuvanju i distribuciji vode jednakih u cijeloj Europi [6]. U vodi su otopljeni različiti minerali, plinovi i organske tvari. Povećana količina otopljenih tvari može smanjiti kvalitetu vode zbog čega se takva voda mora pročistiti. Za to se mogu koristiti neke tradicionalne metode (npr. filtracija, taloženje, destilacija), no i nove poboljšane metode (npr. reverzna osmoza, elektrodijaliza, primjena ultrazvučnog polja) [7]. S obzirom na namjenu, razlikuje se nekoliko vrsta voda u Europskoj farmakopeji koje se razlikuju po svojim fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim svojstvima a one su opisane u 3 monografije vode za farmaceutsku upotrebu:

- Pročišćena voda (engl. *Water, purified*; lat. *Aqua purificata*)
- Voda za injekcije (engl. *Water for injections WFI*; lat. *Aqua ad iniectabile*)
- Voda za pripremu ekstrakata (engl. *Water for preparation of extracts*; lat. *Aqua ad extracta praeparanda*)

Europska farmakopeja daje samo precizna pravila i smjernice pri korištenju vode, no ne daje upute o tome koju vrstu vode je potrebno koristiti u kojem slučaju i za koju namjenu. Zbog toga je potrebno znanje i iskustvo o određenom proizvodu i procesu kako bi se mogla izabrati

odgovarajuća priprema vode, kako bi ona zadovoljila sve kvalitete za određenu namjenu. U ovom istraživanju korištena je monografija - pročišćena voda na koje ćemo obratiti više pažnje. Te se također u radu spominje ultra čista voda koja je svrstana u „*non monographed waters*“, no i ona ima svoje zahtjeve.

### 2.2.1 Pročišćena voda

Pročišćena voda je prema Europskoj farmakopeji definirana kao voda koja se koristi za pripremu medicinskih preparata (lijekova), osim one koja treba biti sterilna i apirogena, sve dok nije drugačije navedeno i odobreno [8]. Takva voda dobiva se iz vode koja je namijenjena za ljudsku upotrebu procesima destilacije, demineralizacije, reverznom osmozom itd., a čuva se u dobro zatvorenom spremniku, koji ne smije mijenjati sastav vode. Pročišćena voda treba biti prozirna, bistra, bez boje i okusa [9]. U ovoj monografiji razlikuju se dvije vrste pročišćene vode: pročišćena voda u rinfuzi ili na veliko (engl. *Purified water in bulk*) i pročišćena voda u spremnicima (engl. *Purified water in containers*).

Pročišćena voda u rinfuzi priprema se postupcima destilacije, ionske izmjene, reverzne osmoze ili bilo koje druge metode iz vode koja je pogodna za ljudsku upotrebu. Fizikalno-kemijski i mikrobiološki zahtjevi za pročišćenu vodu koje propisuje nadležno tijelo prikazani su u Tablici 1. Takva voda skladišti se i distribuira u određenim uvjetima koji sprječavaju rast mikroorganizama i napravljeni su tako da izbjegnu bilo kakvu kontaminaciju [8].

**Tablica 1.** Parametri za pročišćenu vodu u rinfuzi prema monografiji iz Europske farmakopeje (Eu. Ph. 04/2024:0008). Preuzeto i prilagođeno iz: [8].

Parametar	Pročišćena voda u rinfuzi
	Eu. Ph. 04/2024:0008
Ukupni organski ugljik (TOC)	≤ 0,5 mg/L
Teški metali <sup>1</sup>	≤ 0,1 ppm
pH	-
Vodljivost (pri 25°C)	≤ 5,1 μS/cm
(pri 20°C)	≤ 4,3 μS/cm
Mikrobiološka kontaminacija	
- Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	- ≤ 100 CFU <sup>2</sup> /mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Odsustvo u 100 mL

<b>Mikrobiološki endotoksini</b>	< 0,25 IU <sup>3</sup> /mL
----------------------------------	----------------------------

<sup>1</sup>ukoliko je vodljivost veća od 1,1 μS/cm (20 C°) nije potrebno raditi analitu rizika prema FMEA-001-Elementarna onečišćenja-18.; <sup>2</sup>CFU(engl. *colony forming unit*); <sup>3</sup>IU (engl. *international unit*)

Testovi koji se provode za ovakvu vrstu vode su testovi na nitrata čiji je maksimum 0,2 ppm (engl. *parts per million*) osim ako pročišćena voda u rinfuzi udovoljava zahtjevima za vodljivost propisanim za vodu za injekcije u rinfuzi, tada se test ne mora provoditi. Test na aluminij čiji je maksimum 10 ppb (engl. *parts per billion*) radi se ako se voda koristi u proizvodnji otopina za dijalizu, te test za mikrobiološke endotoksine koji moraju biti ispod 0,25 IU/mL ako se voda koristi za proizvodnju otopina za dijalizu [8].

Pročišćena voda u spremnicima (engl. *Purified water in containers*) je pročišćena voda koja se puni i pohranjuje u uvjetima koji zadovoljavaju potrebnu mikrobiološku kvalitetu. Ne smije sadržavati nikakve dodatne tvari. Zahtjev za izgledom je da je to bistra i bezbojna tekućina. Testovi koji se provode na ovakvoj vrsti vode: kiselost ili alkalnost, oksidirajuće tvari, kloridi, sulfati, amonijak, kalcij i magnezij, ostatak nakon isparavanja te mikrobiološka kontaminacija čiji su kriteriji vidljivi u Tablici 2.[8].

**Tablica 2.** Kriteriji za određene parametre mjerene u pročišćenoj vodi u spremnicima prema monografiji iz europske farmakopeje (Eur. Ph. 04/2024:0008) Preuzeto i prilagođeno iz: [8].

Parametar	Pročišćena voda u spremnicima
	Eu. Ph. 04/2024:0008
<b>Kiselost ili alkalnost</b>	Odsutnost plave/crvene boje
<b>Oksidirajuće tvari</b>	Zadržavanje blijedo - ružičaste boje
<b>Kloridi</b>	Otopina ne pokazuje promjene izgled
<b>Sulfati</b>	Otopina ne pokazuje promjene u izgledu
<b>Amonijak</b>	≤ 0,2 ppm
<b>Kalcij i magnezij</b>	Otopina čisto plave boje
<b>Ostatak nakon isparavanja</b>	≤ 0,001%
<b>Mikrobiološka kontaminacija</b>	≤ 10 <sup>2</sup> CFU/mL

<b>Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (engl. <i>Total aerobic microbial count, TAMC</i>)</b>	
---	--

### 2.2.2. Ultra pročišćena voda

Definicija ultra pročišćene vode prema Europskoj farmakopeji glasi da je to voda koja se koristi u pripremi preparata gdje je potrebna voda s velikom biološkom kvalitetom, osim kada je potrebna voda za injekcije. Takva voda dobiva se iz vode koja služi za ljudsku upotrebu koju propisuje nadležno tijelo. Voda prolazi proces reverzne osmoze u kombinaciji s nekim drugim tehnikama kao što su deionizacija vode i ultrafiltracija. U tom koraku nužna je ispravnost i održavanje sustava rada. Zahtjevi za izgledom su da je voda bistra i bezbojna tekućina. Kako bi se osigurala kvaliteta vode redovito se provode validirani postupci mjerenja električne vodljivosti i vrijednosti ukupnog organskog ugljika (engl. *Total organic carbon, TOC*). Zahtjevi kvalitete vode navedeni su u poglavlju 2.2.44. Europske farmakopeje pod naslovom *TOC Water* i oni su za vodljivosti  $\leq 1,0 \mu\text{S/cm}$  pri  $25^\circ\text{C}$  i TOC  $0,1 \text{ mg/L}$  [10]. Ultra pročišćena voda (*TOC water*) se u ovom diplomskom radu koristila pri pranju i ispiranju korištenog posuđa i pribora, te kao kalibracijska otopina i otapalo pri mjerenju ukupnog organskog ugljika.

## 2.3. Testovi za pročišćenu vodu u rinfuzi

### 2.3.1. Ukupni organski ugljik

Svaka voda, neovisno o tome koliko čista bila, sadrži određenu koncentraciju organske tvari. Razlikuje se ukupni ugljik koji se dobiva kao zbroj organski (vezan s  $\text{O}_2$  ili  $\text{H}_2$ ) i anorganski vezanog ugljika (vezan s karbonatnim ionima) u uzorku vode što uključuje i sam elementarni ugljik, te ukupni organski ugljik u kojem se gleda samo organski vezan ugljik u uzorku vode. U ukupni organski ugljik spadaju i cijanati, tijocijanati i elementarni ugljik. Ukupni organski ugljik (TOC) je vrlo precizna neizravna mjera organskih tvari (otopljenih i neotopljenih) prisutnih u vodi koja se koristi za farmaceutsku upotrebu. Određivanje ukupnog organskog ugljika koristi se kao nespecifični indikator kvalitete vode ili čistoće proizvodne opreme, a može se rabiti i za praćenje učinka različitih postupaka u izradi lijekova [11]. TOC analizator može kvantitativno i kvalitativno odrediti sadržaj ugljika u vodenim sustavima. Zbog toga je prihvaćen kao pokazatelj mjere gradskog i industrijskog otpada. Ova analiza je vrlo bitna u farmaceutskoj industriji jer velika koncentracija organske tvari može biti pokazatelj loše

provedene filtracije, greške u sustavu pročišćavanja vode, koristi se za provjeru čistoće opreme u validacijskim i rutinskim procesima radi sprječavanja križne kontaminacije (engl. *Cross contamination*) proizvodom iz prethodnog proizvodnog ciklusa te neprikladnog skladištenja vode u spremnicima. Takva voda onda može uzrokovati zagađenje instrumenata i kvarove na njima, kao i zagađenje i smanjenje kvalitete samog završnog proizvoda. Za određivanje TOC-a poznato je puno prihvatljivih metoda. Uobičajeni način određivanja TOC-a uključuje uklanjanje anorganskog ugljika, a zatim se mjeri zaostali ugljik. Metoda započinje tako da se standardna otopina analizira na uređaju za određivanje TOC-a u određenim vremenskim razmacima, ovisno o učestalosti mjerenja. Kao standardna otopina koristi se tvar za koju se očekuje da će lako oksidirati (na primjer saharoza) u prilagođenoj koncentraciji. Prikladnost sustava se određuje analizom otopine koja sadrži tvar za koju se smatra da će teško oksidirati (npr. 1,4-benzokinon). Uređaji za određivanje TOC-a većinom rade na način da potpuno oksidiraju organske molekule u uzorku vode, kako bi se stvorio ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) čiju će količinu uređaj izmjeriti, te se na temelju rezultata izračuna koncentracija ugljika u vodi. Pri određivanju TOC koristi se ultra pročišćena voda koja mora zadovoljavati parametar vodljivosti (<1,0 μS/cm<sup>2</sup> na 25 °C) i ukupni organski ugljik (< 0,1 mg/L). Takav opisani postupak može se podijeliti na tri osnovna koraka: 1. Zakiseljavanje, 2. Oksidacija, 3. Detekcija i kvantifikacija [8,12].

1. Zakiseljavanje se provodi kako bi se uklonio anorganski i hlapljivi organski ugljik.
2. Oksidacija je drugi korak analize u kojem se preostali ugljik u uzorku oksidira do CO<sub>2</sub> oblika. TOC analizatori provode oksidaciju na više načina: oksidacija katalitičkim spaljivanjem na visokoj temperaturi, fotooksidacija, foto-kemijska oksidacija, termokemijska oksidacija. U ovom radu TOC analizator oksidaciju je provodio katalitičkim spaljivanjem, gdje se uzorak spaljuje u atmosferi kisika pri temperaturi od 680-1000 °C. Kao katalizator u pećnici se najčešće koristi platina. Oksidacija se provodi nakon injektiranja, kada je sav uzorak prešao u plinovito stanje. Tada plin nosilac prenosi CO<sub>2</sub> kroz instrument.
3. Detekcija se odvija preko NDIR detektora (engl. *Nondispersive infrared sensor*) koji služi za mjerenje koncentracije plinova, a tehnika se bazira na principu da svaka komponenta plina pokazuje jedinstveni apsorpcijski spektar u infracrvenom području (engl. *Infrared*, IR). Prednost ovakvog detektora je direktno i specifično mjerenje CO<sub>2</sub>. Mjerno područje TOC-a je 0 – 30 ppb, a prihvatljivost rezultata prema Europskoj farmakopeji je: RSD (engl. *Relative standard deviation*) 85-115 % [8,12,13].

### 2.3.2. Električna vodljivost

Električna vodljivost je fizikalna veličina koja opisuje mogućnost tijela da provodi električnu struju, to jest opisuje koliko je tvar propusna za električnu struju. Ta veličina je u analizi vode vrlo bitna jer pokazuje prisutnost iona, te govori o njihovoj koncentraciji i pokretljivosti. Upravo zbog toga otopine anorganskih spojeva pokazuju veću električnu provodnost, dok molekule organskih spojeva nisu dobri vodiči. Najveću električnu provodnost imaju supravodiči, zatim vodiči, poluvodiči, elektroliti, dok najmanju provodnost imaju izolatori. Na vodljivost osim vrste tvari utječe i temperatura, primjese i nečistoće u uzorku, te agregatno stanje. Zbog toga se pri mjerenju uvijek navode očekivani rezultati pri točno određenoj temperaturi. Mjerna jedinica električne vodljivosti je mikrosimens po centimetru ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), a kao instrument za provedbu mjerenja se koristi konduktometar. Pitka voda spremna za ljudsku konzumaciju mora imati vodljivost manju od  $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$  dok pročišćena voda za farmaceutsku industriju mora imati vodljivost manju od  $4,3 \mu\text{S}/\text{cm}$  pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  [8,14].

Konduktometar ili mjerač vodljivosti je instrument koji se koristi za mjerenje otpornosti stupca tekućine između elektroda konduktometrijske ćelije. Takvi uređaji napajaju se izmjeničnom strujom kako bi se izbjegla polarizacija elektrode. Konduktometrijska ćelija sastoji se od dvije platinske elektrode međusobno usporedne i obložene platinskim crnilom. Takve elektrode obložene su zaštitnom cijevi jer su vrlo osjetljive te ih ona štiti od mehaničkih oštećenja i smanjuje mogućnost greške uzrokovane efektom električnog polja. Sama elektroda tj. senzor može biti s dva (za mjerenje niske vodljivosti) i sa četiri (za mjerenje srednje do visoke vodljivosti) pola i izrađena je od robusnog materijala kao što je nehrđajući čelik ili titanij. Za mjerenje niske vodljivosti kao što je za pročišćenu vodu koristi se elektroda niske konstante ćelije. Pri radu s konduktometrom potrebna je tjedna kalibracija i dnevna verifikacija prije upotrebe. Kalibracija konduktometra je empirijsko određivanje konstante ćelije mjerenjem referentne otopine. Provodi se jer se konstanta ćelije može promijeniti s vremenom zbog utjecaja vanjskih kontaminanata ili naslaga. Verifikacija konduktometra je provjera očitavanja vodljivosti provođenjem mjerenja u referentnoj otopini poznate nominalne vrijednosti. Ta dva procesa provode se pod istim uvjetima kao mjerenje vodljivosti ispitivanog uzorka [8,15].

### 2.3.3. Određivanje nitrata

Nitrati, molekulske formule  $\text{NO}_3^-$  su soli dušične (nitratne) kiseline. U svojoj strukturi sadrže tri atoma kisika, a u prirodi se mogu pretvoriti u nitrite koji sadrže dva atoma kisika ( $\text{NO}_2^-$ ). Prisutni su u vodi, zemlji, zraku, a upravo zbog toga mogu dospjeti i u hranu namijenjenu konzumaciji ili neke gotove proizvode. Posebno velika koncentracija nitrata je u zemljištima u



kojima se rabi gnojivo, te je za takve vode potrebna veća i učestalija kontrola. U tlu nastaju raspadom biljne tvari, te služe kao hrana za ostali biljni svijet. Velika koncentracija nitrata smanjuje kvalitetu vode jer ubrzavaju proces eutrofikacije i dolazi do hipoksije, tj. premale količine otopljenog kisika. Takva dugotrajna izloženost može imati za posljedicu izumiranje pojedinih ekosustava. Također, kod ljudi može izazvati neželjene učinke ukoliko dojenčad unese takvu vodu u organizam. U tom slučaju može doći do methemoglobinemije gdje nitrati prekidaju normalne tjelesne procese dojenčadi. Kao i kod živog svijeta, i u farmaceutskoj industriji treba spriječiti prekomjernu koncentraciju nitrata jer postoji mogućnost kontaminacije završnog proizvoda, a samim time i opasnosti po ljudsko zdravlje nakon konzumacije istog. Nitrati se iz vode uklanjaju na više načina: destilacijom, reverznom osmozom i deionizacijom. Prema Europskoj farmakopeji nakon provedenog testa otopina pročišćene vode ne smije pokazivati plavu boju (plava boja ukazuje na prisutnost nitrata), odnosno ne smije prelaziti granicu od 0,2 ppm [17].

## **2.4. Testovi za pročišćenu vodu iz spremnika**

### **2.4.1 Kiselost ili lužnatost**

U kemiji, pH predstavlja koncentraciju vodikovih iona u vodi. Prisutnost tih iona nam daje podatak je li voda kisela ili lužnata. Prema pH ljestvici koja ima raspon od 1 do 14, kisele tvari imaju vrijednost ispod 7, a lužnate imaju vrijednost iznad 7. Neutralna voda je ona voda koja ima  $\text{pH} = 7$ . Prema tome, voda koja je prihvatljiva za ljudsku upotrebu ima pH između 6,5 i 8,5. Vrlo je važno provoditi testove kiselosti ili lužnatosti kako bi se odredila kakvoća vode. Voda s višim ili nižim pH vrijednostima može ukazivati na kemijsko zagađenje ili zagađenje teškim metalima. Lužnata voda može biti neugodnog mirisa ili okusa, te može oštetiti slavinu ili druge aparate koji koriste takvu vodu. Kisela voda može uzrokovati neželjene učinke na ljudsko zdravlje, te izazivati koroziju cijevi i aparature. Testovi za određivanje vrijednosti pH relativno su lagani i brzi. Za određivanje se koriste različiti indikatori, koji promjenom boje pokazuju vrijednost pH [17].

### **2.4.2. Određivanje sulfata**

Sulfati su soli ili esteri sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Kako su oni prirodno prisutni u stijenama i zemlji tako su vrlo često prisutni i u prirodnim vodama. Njihova koncentracija može varirati od nekoliko mg pa sve do nekoliko tisuća mg po litri (mg/L). Prisustvo sulfata u vodi je nepoželjna jer ukazuje na neku vrstu zagađenja vode. Sulfati u vodi za piće mogu dovesti do

zdravstvenih problema ukoliko je njihova koncentracija povišena, a ponajviše ostavljaju posljedice na bebe i dojenčad. Također, prisutnost sulfata može dovesti do korozije cijevi. Zbog toga je vrlo važno određivanje sulfata kako bi se dokazala kvaliteta vode, a testovi su jednostavni i relativno brzi [18,19].

#### 2.4.3 Određivanje klorida

Pojam klorid može se odnositi na negativno nabijeni kloridni ion ( $\text{Cl}^-$ ) ili na neutralni atom klora koji je u molekuli vezan jednostrukom vezom. Klorid je prirodni mineral koji se nalazi u vodovodnoj vodi i nema štetni učinak na zdravlje. Međutim, voda koja ima preveliku koncentraciju klorida može imati slani okus. Također, kao i prethodno navedene tvari, može izazvati koroziju cijevi i smanjiti kakvoću vode. Ispitivanje klorida može se vršiti na samom mjestu uzorkovanja ili u laboratoriju vrlo jednostavnim i brzim metodama [20].

#### 2.4.4. Određivanje oksidirajuće tvari

Voda u kojoj je otopljena veća količina kisika ( $\text{O}_2$ ) može imati manju kakvoću jer je veća prisutnost oksidirajućih tvari. Zbog toga je potrebno provoditi analize koje su relativno brze i jednostavne, a promjene boje ukazuju na prisutnosti ili odsutnosti oksidirajućih tvari [21].

#### 2.4.5. Određivanje kalcija i magnezija

Kalcij i magnezij su biogeni elementi i prirodno su prisutni u vodi. Oni ne mogu štetno utjecati na naše zdravlje, nego upravo obrnuto, poželjan je njihov unos kako bi se održala normalna količina minerala. Tvrdoća vode uzrokovana je prisutnošću soli kalcija i magnezija. Tvrda voda nije poželjna u farmaceutskoj industriji, te se zbog toga provode testovi koji ukazuju na prisutnosti kalcija i magnezija. Testovi su relativno jednostavni a oslanjaju se na indikatore i njihovu promjenu boje [22].

#### 2.4.6. Određivanje amonijaka

Pojam amonijak obuhvaća neionizirani ( $\text{NH}_3$ ) i ionizirani ( $\text{NH}_4^+$ ) oblik. Prirodna koncentracija amonijaka u podzemnim i površinskim vodama ima vrijednost manju od 0,2 mg/L. Povećanje koncentracije amonijaka u vodi može upućivati na pretjeranu bakterijsku aktivnost vode, te veću količinu kanalizacijskog i životinjskog otpada. Takva voda nije pogodna za upotrebu u farmaceutskoj industriji, te je zbog toga potrebno redovno provođenje testova kako bi se osigurala kvaliteta završnog proizvoda farmaceutske industrije [23].

#### 2.4.7. Određivanje ostatka nakon uparavanja

Test na ostatak nakon uparavanja provodi se kako bi se odredio broj otopljenih i suspendiranih čestica ili nečistoća u vodi. Nakon prokuhavanja i uparavanja na posudu ostaje

slaj zaostalih čestica koje su prethodno bile otopljene u vodi. One su također bitan parametar za kakvoću vode. U farmaceutskoj industriji ostatak nakon uparavanja mora biti manji od 0,001 %.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Pročišćena voda u rinfuzi – Ukupni organski ugljik**

##### 3.1.1 Priprema uzorka

Uzorci su uzorkovani s dva ventila za pročišćenu vodu u postrojenju Yasenke, te su označeni s PV-5 i PV-17. Oznake su dodijeljene prema oznaci broja na samome ventilu. Posude u kojima se nalazio uzorak morale su biti iznimne čistoće i isprane s ultra čistom vodom. Posuda se uzorkom puni gotovo do vrha posude kako bi ostalo što manje prostora za zrak i kako bi se na taj način smanjilo onečišćenje. Uzorak je potrebno ispitati što prije kako bi se smanjilo onečišćenje spremnika i čepa, a otvor boce se tijekom mjerenja zatvara parafilmom kako bi se smanjilo povećanje izmjerene TOC vrijednosti zbog utjecaja CO<sub>2</sub> iz zraka. Također, treba paziti na prisutnost mjehurića, koji mogu utjecati na točnost rezultata. Ukoliko se uzorak ne analizira odmah spremnik s uzorkom mora se dobro zatvoriti i čuvati u hladnjaku na temperaturi između 2 – 8 °C, ne dulje od 24 sata.

##### 3.1.2. Korištene kemikalije, referentne tvari i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Klorovodična kiselina, HCl 36%, (Fisher scientific)
- Fosforna kiselina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Fisher scientific)
- Saharozna referentni standard, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (USP)
- 1,4-benzokinon referentni standard, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (USP)
- Ultra čista voda, UPW (Yasenka d.o.o.)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Instrumenti korišteni pri radu su

- Mikrovaga XPE205 (d = 0,001 mg), (Mettler Toledo)
- TOC - L<sub>CPH</sub> analizator, (Shimadzu)
- Uređaj za dobivanje ultra čiste vode (Gen pure UV-TOC/UF s x-Cad-om, Thermo Scientific, Werner).

### 3.1.3 Priprema otopina

Neposredno prije analize potrebno je pripremiti radne otopine saharoze i 1,4-benzokinona. Sve otopine moraju biti pripremljene s ultra čistom vodom.

*Stock* otopina – saharoza (koncentracija 100 mg C /L; 100 000 ppb): U odmjernu tikvicu od 25 mL odvaže se 5,94 mg saharoze, otopi u ultračistoj vodi i nadopuni istom do oznake.

Radna otopina – saharoza (0,5 mg/L ; 500 ppb) priprema se iz *stock* otopine saharoze koja je prethodno pripremljena i može stajati 7 tjedana. U odmjernu tikvicu od 500 mL otpipetira se 2,5 mL *stock* otopine saharoze, razrijedi i nadopuni ultra čistom vodom do oznake.

*Stock* otopina - 1,4-benzokinon (koncentracija 50 mg C/L; 50 000 ppb): U odmjernu tikvicu od 100 mL odvaže se 7,5 mg 1,4-benzokinona, otopi u ultračistoj vodi i nadopuni istom do oznake.

Radna otopina – 1,4-benzokinon (0,5 mg/L ; 500 ppb) priprema se iz *stock* otopine 1,4-benzokinona koja je prethodno pripremljena i može stajati 7 tjedana. U odmjernu tikvicu od 250 mL otpipetira se 2,5 mL *stock* otopine 1,4-benzokinona, razrijedi i nadopuni ultra čistom vodom do oznake.

### 3.1.3. Postupak analize

Prije samog početka analize potrebno je upaliti uređaj i ostaviti da radi minimalno 30 minuta kako bi se stabilizirao prema zadanim uvjetima. Potrebno je provjeriti tlak na ventilu koji mora biti 2 bara. Također, treba provjeriti bocu unutar uređaja je li nadopunjena do oznake ultra čistom vodom, te jesu li fosforna kiselina 25 % i kloridna kiselina 1 M koje služe za zakiseljavanje pri analizi valjanog roka trajanja. Zatim se postavljaju uvjeti TOC analizatora koji su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Uvjeti TOC analizatora.

VRSTA ANALIZE	NPOC
Metoda izračuna	Linearna regresija
Jedinice	ppb
Broj injektiranja ( <i>n</i> )	3/5
Relativna standardna devijacija (CV MAX)	≤ 2%
Broj ispiranja	2
Razrjeđenje	Automatsko
Protok plina	80 mL

Vrijeme propuhivanja	5 min.
Postotak dodane kiseline	1,5 %
Volumen injektiranja	816 $\mu$ L

Nakon što su se uspostavili uvjeti, potrebno je ispiranje sustava s ultra čistom vodom. Ispiranje se provodi u četiri injektiranja, sve dok srednja vrijednost izmjerenih rezultata ukupnog organskog ugljika (*Mean Area*) ne padne ispod 2,5 ppb. Ukoliko u četiri injektiranja ne padne ispod 2,5 ppb, provode se još dva dodatna injektiranja. Zatim se provodi kalibracija na 2 točke: injektira se ultračista voda 0 ppb (bez ukupnog organskog ugljika) i radna otopina saharoze koncentracije 500 ppb koja služi kao tvar koja lako oksidira. Kalibracijska krivulja dobiva se u 5 injektiranja otopine saharoze. Zatim se provodi test prikladnosti sustava (engl. *System suitability test*, SST) pomoću prethodno pripremljene radne otopine 1,4-benzokinona koncentracije 500 ppb koji služi kao tvar koja teško oksidira, te se ista injektira 5 puta. Ukoliko je vrijednost *Recovery* za test ispravnost sustava nakon provedenih 5 injektiranja u rasponu od 85 % do 115 %, prema Europskoj farmakopeji potrebno je obaviti i vizualni test uzorka. Vizualnim testom provjerava se je li uzorak vode bistra i bezbojna tekućina. Ako je vizualni test u redu, uzorci vode su spremni za analizu. Spremnik s uzorcima vode mora biti napunjen do vrha i otvor zatvoren parafilmom.

## 3.2. Pročišćena voda u rinfuzi – test na nitrate

### 3.2.1. Priprema uzorka

Kao i za TOC, priprema uzorka za nitrate vrlo je jednostavna. Za uzorak se uzima pročišćena voda s ventila u postrojenju Yasenke. Svo posuđe je velike analitičke čistoće. U epruvetu koja mora biti uronjena u ledenu vodu, doda se 5 mL uzorka vode koja se ispituje.

### 3.2.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Kalijev klorid, KCl (Fisher scientific)
- Difenilamin, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Acros Organics)
- Sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %-na, (Carlo Erba)
- Ultra čista voda, UPW (Yasenska d.o.o.)
- Kalijev nitrat, KNO<sub>3</sub> (Fisher scientific)
- Pročišćena voda, PW (Yasenska d.o.o.)

Instrumenti korišteni pri radu su:

- Analitička vaga XP56 ( $d=0,01$  mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)
- Vodena kupelj ,WNB 22 (Memmert)

Od pribora korištene su: odmjerne tikvice, epruvete, stalak za epruvete, kapalice i pipete.

### 3.2.3. Priprema otopina

Priprema standardne otopine nitrata (2 ppm  $\text{NO}_3$ ) provodi se u više koraka.

- 1) Prvo je potrebno odvagati 0,163 grama kalijeva nitrata, te se odvagani kalijev nitrat prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, u koju se prenese manji volumen pročišćene vode te se uz primjenu ultrazvučne kupelji otopi. Zatim se odmjerne tikvica nadopuni pročišćenom vodom do oznake.
- 2) Iz dobivene otopine priprema se standardna otopina nitrata (100 ppm  $\text{NO}_3$ ). Pripremljena otopina razrijedi se 10 puta na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 10 mL prethodno pripremljene otopine, a zatim se u odmjernu tikvicu doda pročišćena voda do oznake.
- 3) U trećem koraku pripremljena otopina (100 ppm  $\text{NO}_3$ ) razrijedi se 10 puta na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 10 mL standardne otopine nitrata (100 ppm  $\text{NO}_3$ ), te se tikvica nadopuni pročišćenom vodom do oznake.
- 4) Zadnji korak je pripremanje otopine nitrata (2 ppm  $\text{NO}_3$ ) na način da se pripremljena otopina (10 ppm  $\text{NO}_3$ ) razrijedi 5 puta. U odmjernu tikvicu od 50 mL prenese se 10 mL standardne otopine nitrata (10 ppm  $\text{NO}_3$ ), te se nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Kalijev klorid (100 g/L) priprema se vaganjem 2,5 grama kalijeva klorida koji se otpipetira u odmjernu tikvicu od 25 mL u kojoj se nalazi manji volumen pročišćene vode te se primjeni ultrazvučna kupelji kako bi se kalijev klorid otopio. Nakon otapanja odmjerne tikvica se nadopuni istim otapalom do oznake.

Otopina difenilamina priprema se na način da se u tamnu odmjernu tikvicu od 25 mL stavi 0,025 g odvagane difenilamina i nadopuni 96 % sumpornom kiselinom do oznake. Ukoliko je potrebno može se primijeniti ultrazvučna kupelj radi lakšeg otapanja.

Priprema referentne otopine se radi u isto vrijeme i na isti način kao i otopina uzorka. Referentna otopina je smjesa 4,5 mL vode bez nitrata (ultra čista voda) i 0,5 mL standardne otopine nitrata (2 ppm  $\text{NO}_3$ ).

#### 3.2.4. Postupak analize

U stalak za epruvete poslažu se 3 epruvete (2 za uzorak i jedna za referentnu otopinu). Epruvete moraju biti uronjene u ledenu vodu tijekom dodavanja pripremljenih otopina (priprema otopina objašnjena u poglavlju 3.2.3. Priprema otopina). U epruvete se redom dodaje 0,4 mL otopine kalijeva klorida, zatim 0,1 mL otopine difenilamina i kap po kap, uz miješanje, 5 mL sumporna kiseline 96 %. Zatim se epruvete prenesu u vodenu kupelj na 50 °C i ostave 15 minuta. Prati se promjena boje tijekom 15 minuta.

### 3.3. Pročišćena voda u rinfuzi – test električne vodljivosti

#### 3.3.1 Priprema uzorka

Za ovaj test nije potrebna priprema uzorka. Uzorak se uzorkuje s ventila za pročišćenu vodu u posudu koja mora biti velike čistoće jer sve nečistoće mogu imati utjecaja na vodljivost. Temperatura uzorka mora biti  $19 \pm 2$  °C, te se uzorak zbog toga morao hladiti u hladnjaku na 4 °C par minuta.

#### 3.3.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Certificirana referentna otopina poznate vodljivosti 84  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pri 25 °C, (Mettler Toledo )
- Certificirana referentna otopina za verifikaciju 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pri 25 °C, (Mettler Toledo)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Za mjerenje vodljivosti korišten je konduktometar SevenCompact™ S230 (Mettler Toledo) koji ima točnost  $\geq 0,1$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 3.3.3. Postupak analize

Prije samog početka analize potrebno je provesti kalibraciju i verifikaciju instrumenta. To se radi pomoću certificiranih referentnih otopina poznate vodljivosti pri određenoj temperaturi. Referentne otopine trebaju imati temperaturu 25 °C kako bi pokazivale svoju nominalnu vodljivost. Zatim se na instrumentu odabire kalibracija, te se mjeri vodljivost certificirane referentne otopine poznate vodljivosti. Nakon kalibracije potrebno je provesti verifikaciju, te se ona odabire na uređaju. Mjeri se vodljivost certificirane referentne otopine poznate vodljivosti za verifikaciju. Ukoliko su vrijednosti vodljivosti izmjerene za referentne otopine u skladu s očekivanima, instrument je spreman za rad. Uzorku (prethodno ohlađenom na zadanu temperaturu) mjeri se vodljivost na način da se u spremnik s vodom uroni elektroda

koja ne smije dodirivati stijenke posude. Na uređaju se pritisne tipka OK i uzorak, kao ni elektroda se ne diraju dok se uvjeti ne stabiliziraju, zatim na uređaju očita rezultat.

### **3.4. Pročišćena voda u spremnicima – test na kiselost ili lužnatost**

#### 3.4.1 Priprema uzorka

Priprema uzorka nije potrebna. Uzorak se uzorkovao s ventila u sklopu postrojenja Yasenke. Posuđe je moralo biti velike čistoće, jer svako onečišćenje i kontaminacija može dovesti do pogrešnih rezultata.

#### 3.4.2 Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Metilensko crvenilo, indikator, (Fisher scientific)
- Bromtimolno modrilo, indikator, (Thermo Scientific)
- Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 96 %-tni, (Carlo Erba)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Fisher scientific)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)
- Ultra čista voda, UPW (Yasenka d.o.o.)
- Klorovodična kiselina, HCl 36%, (Fisher scientific)

Od pribora korištene su: odmjerne tikvice, erlenmayerove tikvice, laboratorijske čaše, boca kapalica, kapalice, pipete, tikvica od borosilikatnog stakla.

Od instrumenata korišteni su:

- Analitička vaga XP56 (d=0,01 mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)
- Magnetna miješalica s grijanjem (IKA)

#### 3.4.3. Priprema otopina

Otopina metilenskog crvenila priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 50 mg odvagano metilenskog crvenila i otopi u smjesi 1,86 mL 0,1 M natrijeva hidroksida i 50 mL 96 % etanola. Nakon otapanja, tikvica se nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Otopina bromtimolnog modrila priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 50 mg odvagano bromtimolnog modrila i otopi u smjesi 4 mL 0,02 M natrijeva hidroksida i 20 mL 96 % etanola. Nakon otapanja, odmjerna tikvica nadopuni se pročišćenom vodom do oznake



1 M otopina natrijeva hidroksida (4,2 g NaOH/100 mL) priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 4,2 g odvagano natrijeva hidroksida, otopi u manjem volumenu ultra čiste vode i razrijedi istim otapalom do oznake.

1 M otopina klorovodične kiseline priprema se na način da se izvaže 10,3 g (8,8 mL) klorovodične kiseline i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja sadrži 60 mL pročišćene vode i nadopuni do oznake s istim otapalom.

#### 3.4.4. Postupak analize

Neposredno prije same analize potrebno je napraviti test osjetljivosti za pripremljene indikatore. Test osjetljivosti za metilensko crvenilo provodi se na način da se u otopinu od 0,1 mL metilenskog crvenila i 100 mL ultra čiste vode, doda 0,05 mL 0,02 M klorovodične kiseline, a zatim se doda 0,05 mL 0,02 M natrijevog hidroksida. Prati se promjena boje.

Test osjetljivosti za bromtimolno modrilo provodi se na način da se 0,3 mL otopine bromtimolnog modrila pomiješa sa 100 mL ultra čiste vode. Zatim se doda 0,1 mL 0,02 M natrijevog hidroksida, te se prati promjena boje.

Kada su završeni testovi osjetljivosti može se krenuti s analizom.

- 1) U 10 mL svježe prokuhane i ohlađene vode u tikvici od borosilikatnog stakla, prenese se 0,05 mL otopine metilenskog crvenila, te se ponovno prati promjena boje.
- 2) U 10 mL svježe prokuhane i ohlađene vode u tikvici od borosilikatnog stakla, prenese se 0,1 mL otopine bromtimolnog modrila, te se prati promjena boje.

### 3.5. Pročišćena voda u spremnicima – test na sulfate

#### 3.5.1 Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

#### 3.5.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Klorovodična kiselina, HCl 36%, (Fisher scientific)
- Barijev klorid dihidrat,  $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Od instrumenata korišteni su:

- Analitička vaga XP56 ( $d=0,01$  mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)

Od pribora korištene su odmjerne tikvice, erlenmayerove tikvice, laboratorijske čaše, pipete i boca kapalica.

### 3.5.3. Priprema otopina

Razrijeđena klorovodična kiselina priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL u kojoj se nalazi 60 mL pročišćene vode prenese 16,91 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Zbog egzotermne reakcije otopina se ohladi, a zatim nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Otopina barijeva klorida priprema se neposredno prije upotrebe. U odmjernu tikvicu od 100 mL prenese se 6,1 g odvagano barijeva klorida, te otopi u malo pročišćene vode. Nakon otapanja, tikvica se nadopuni pročišćenom vodom do oznake. Otopina se čuva u posuđu izrađenom od tamnog stakla.

### 3.5.4. Postupak analize

U 10 mL uzorka dodaju se prethodno pripremljene otopine (priprema opisana u poglavlju 3.5.3. Priprema otopina). Dodaje se 0,1 mL razrijeđene klorovodične kiseline i 0,1 mL otopine barijeva klorida. Prati se promjena boje otopine tokom sat vremena.

## **3.6. Pročišćena voda u spremnicima – određivanje klorida**

### 3.6.1 Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

### 3.6.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Dušična kiselina (nitratna kiselina),  $\text{HNO}_3$  min. 65 %, (Fisher scientific)
- Srebrov nitrat,  $\text{AgNO}_3$ , (Fisher scientific)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Od instrumenata korišteni su:

- Analitička vaga XP56 ( $d=0,01$  mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)

Od pribora korištene su odmjerne tikvice, erlenmayerove tikvice, laboratorijske čaše i pipete.

### 3.6.3. Priprema otopina

Neposredno prije analize priprema se razrijeđena dušična kiselina na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira 14,4 mL dušične kiseline u 60 mL pročišćene vode. Zbog egzotermne reakcije otopinu je potrebno ohladiti, a zatim se tikvica nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Otopina srebrova nitrata priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira 1,7 g srebrova nitrata, te otopi u malo pročišćene vode, a zatim nadopuni istim otapalom do oznake. Pripremljenu otopinu potrebno je čuvati u posuđu izrađenom od tamnog stakla.

### 3.6.4. Postupak analize

U 10 mL uzorka dodaju se prethodno pripremljene otopine (priprema otopina opisana u poglavlju 3.6.3. Priprema otopina). Dodaje se 1 mL razrijeđene dušične kiseline i 0,2 mL otopine srebrova nitrata. Otopina stoji 15 minuta i prati se promjena boje.

## 3.7. Pročišćena voda u spremnicima – određivanje oksidirajućih tvari

### 3.7.1. Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

### 3.7.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %, (Carlo Erba)
- Kalijev permanganat, KMNO<sub>4</sub> (KEFO)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Od instrumenata korišteni su:

- Analitička vaga XP56 (d=0,01 mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)
- Magnetna miješalica s grijanjem (IKA)

Od pribora korištene su odmjerne tikvice, erlenmayerove tikvice, laboratorijske čaše, pipete i boca kapalica.

### 3.7.3. Priprema otopina

Razrijeđenu sumpornu kiselinu priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL u kojoj se nalazi 60 mL pročišćene vode prenese 5,5 mL koncentrirane sumporne kiseline.

Dolazi do egzotermne reakcije pa je otopinu potrebno ohladiti. Nakon hlađenja, odmjerne tikvica nadopuni se pročišćenom vodom do oznake.

Otopina kalijeva permanganata (0,02 M) pripremi se na način da se u odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira 160 mg odvagano kalijeva permanganata, otopi u manjem volumenu pročišćene vode i zatim nadopuni do oznake. Otopinu je potrebno zagrijavati sat vremena nakon čega se otopina hladi i naposljetku filtrira.

#### 3.7.4. Postupak analize

U 100 mL uzorka otpipetira se 10 mL prethodno pripremljene razrijeđene sumporne kiseline i 0,1 mL 0,02 M kalijevog permanganata. Otopina se stavi na magnetnu miješalicu s grijačem i pusti da vrije 5 minuta. Tijekom tih 5 minuta prati se promjena boje.

### **3.8. Pročišćena voda u spremnicima – određivanje kalcija i magnezija**

#### 3.8.1 Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

#### 3.8.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Amonijev klorid,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (Gram mol)
- Amonijak,  $\text{NH}_3$  (konc.), (Fisher scientific)
- Natrijev klorid,  $\text{NaCl}$  (Merck)
- Indikator eriokrom crno T (Carlo Erba)
- Natrijev edetat,  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_8$  (Fisher scientific)
- Natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$  1 M, (Gram mol)
- Magnezijev sulfat,  $\text{MgSO}_4$ , (Acros Organics)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Od instrumenata korištene su:

- Analitička vaga XP56 ( $d=0,01$  mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)
- Mikrovaga XPE205 ( $d = 0,001$  mg), (Mettler Toledo)

Od pribora odmjerne tikvice, laboratorijske čaše, pipete i boca kapalica.

### 3.8.3. Priprema otopina

Potrebno je pripremiti više otopina neposredno prije same analize. Puferska otopina amonijeva klorida pH =10 priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 50 mL odvaže 2,7 g amonijeva klorida, prenese u odmjernu tikvicu i otopi u 10 mL pročišćene vode. Zatim se doda 17,5 mL amonijaka i nadopuni pročišćenom vodom do oznake na odmjernoj tikvici. Otopinu je potrebno sonificirati 10 minuta, a pH nije potrebno dodatno mjeriti jer za to ne postoji zahtjev u Europskoj farmakopeji.

Za pripremu otopina amonijaka , potrebno je dodati 14,8 mL koncentriranog amonijaka u odmjernu tikvicu od 20 mL, te nadopuniti pročišćenom vodom do oznake.

Indikator triturat mordant crnilo 11 priprema se na način da se pomiješa 0,99 g natrijeva klorida s 10 mg eriochrom crno T indikatora. Indikator se čuva u tamnoj hermetički zatvorenoj posudi.

Otopina natrijeva edeteata 0,01 M priprema se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL koja sadrži 50 mL pročišćene vode i 10 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida prenese 0,375 g odvaganog natrijeva edeteata. Otopina se zatim nadopuni do oznake pročišćenom vodom.

Otopina natrijeva hidroksida 1 M priprema se na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 4,2 g natrijeva hidroksida i otopi u manjem volumenu ultra čiste vode. Ukoliko je potrebno otapanje se može potpomognuti ultrazvučnom vodenom kupelji. Nakon toga, tikvica se nadopuni ultra čistom vodom do oznake.

### 3.8.4. Postupak analize

Prije same analize prema Europskoj farmakopeji potrebno je provesti test osjetljivosti za triturat mordant crnilo 11. Potrebno je otopiti 50 mg pripremljenog indikatora u 100 mL pročišćene vode. Zatim se dodaje 0,3 mL pripremljenog razrijeđenog amonijaka. Na posljetku se u istu otopinu dodaje 0,1 mL 10 g/L otopine magnezijeva sulfata. Pri svakom koraku prati se promjena boje.

Kada je indikator prošao test osjetljivosti može se krenuti na samu analizu. U 100 mL uzorka prenese se 2 mL puferske otopine amonijeva klorida pH = 10, 50 mg triturat mordant crnila 11 i 0,5 mL 0,01 M natrijeva edeteata. Prati se promjena boje.

### 3.9. Pročišćena voda u spremnicima – određivanje amonijaka

#### 3.9.1. Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

#### 3.9.2. Korištene kemikalije i instrumenti

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- Kalijev jodid , KI, (Fisher scientific)
- Živin(II) jodid (crveni), HgI<sub>2</sub>, (Acros Organics)
- Natrijev hidroksid , NaOH, (Fisher scientific)
- Sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %, (Carlo Erba)
- Amonijev klorid, NH<sub>4</sub>CL, (Gram mol)
- Pročišćena voda, PW (Yasenka d.o.o.)

Od instrumentacije korištena su:

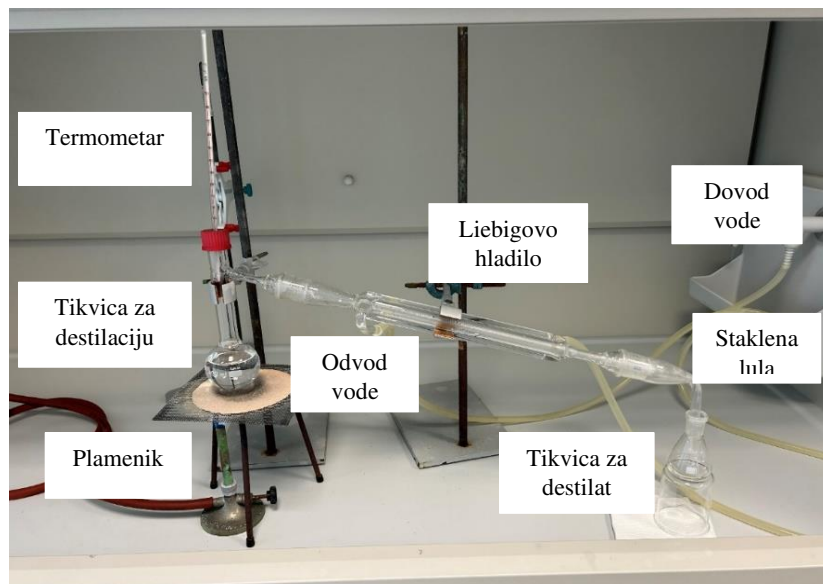
- Analitička vaga XP56 (d=0,01 mg), (Mettler Toledo)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digitec dt 514h (Bandelin)
- Aparatura za destilaciju

Korišteni pribor: odmjerne tikvice, laboratorijske čaše, pipete i boce kapalice.

#### 3.9.3. Priprema otopina

Potrebno je pripremiti otopinu amonijeva klorida (0,0741 g/100 mL) na način da se odvaži 0,0741 g amonijeva klorida i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, te otopi u malo pročišćene vode uz primjenu ultrazvučne kupelji. Nakon što se amonijev klorid otopio tikvica se nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Za pripremu vode bez amonijaka prvo je potrebno složiti aparaturu za destilaciju kao što je vidljivo na Slici 1. Zatim se u 100 mL pročišćene vode doda 0,075 mL koncentrirane sumporne kiseline, te se otopina destilira. Prvih 10 mL destilata se odbaci, a zatim sakupi 50 mL preostalog destilata.



**Slika 1.** Aparatura za destilaciju.

Priprema standardne otopine amonijaka (1 ppm  $\text{NH}_4$ ) provodi se u više koraka:

Prvo se pripremi standardna otopina amonijaka (2,5 ppm  $\text{NH}_4$ ) na način da se neposredno prije upotrebe razrijedi 100 puta prethodno pripremljena otopina amonijevog klorida. U odmjernu tikvicu od 100 mL prenese se 1 mL pripremljene otopine i odmjerne tikvica nadopuni se pročišćenom vodom do oznake. Zatim se pripremljena otopina (2,5 ppm  $\text{NH}_4$ ) razrijedi 2,5 puta. U odmjernu tikvicu od 50 mL prenese se 20 mL standardne otopine amonijaka (2,5 ppm  $\text{NH}_4$ ) i nadopuni pročišćenom vodom do oznake.

Otopina natrijeva hidroksida (25 g/100 mL) priprema se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 25 g odvagane natrijeva hidroksida, te se otopi u malo pročišćene vode uz primjenu ultrazvučne kupelji. Zatim se otopina ohladi i nadopuni istim otapalom do oznake.

Potrebno je pripremiti i lužnату otopinu kalijeva tetrajodomerkurata, tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL prenese 11 g odvagane kalijeva jodida i 15 g živina(II) jodida, te otopi u malo pročišćene vode uz pomoć ultrazvučne kupelji. Nakon otapanja tikvica se nadopuni istim otapalom do oznake. Neposredno prije upotrebe, pomiješa se 10 mL ove otopine s 10 mL pripremljene otopine natrijeva hidroksida.

#### 3.9.4. Postupak analize

U isto vrijeme pripremaju se dvije otopine za analizu: uzorak i referentna otopina. Kao referentna otopina koristi se smjesa 4 mL standardne otopine amonijaka (1 ppm  $\text{NH}_4$ ) i 16 mL vode bez amonijaka, te se istovremeno s uzorkom u referentnu otopinu prenese 1 mL lužnate otopine kalijeva tetrajodomerkurata. Druga epruveta s uzorkom sadrži 20 mL uzorka vode i 1 mL lužnate otopine tetrajodomerkurata. U obje epruvete prati se promjena boje prema okomitoj osi epruvete kroz 15 minuta.

### 3.10. Pročišćena voda u spremnicima – analiza ostatka nakon uparavanja

#### 3.10.1. Priprema uzorka

Za ovu analizu nije potrebna priprema uzorka. Uzorak je uzorkovan u bocu koja je iznimne čistoće kako ne bi došlo do kontaminacije i pogreške u rezultatu.

#### 3.10.2. Kemikalije i instrumentacija

Za ovu analizu nisu bile potrebne kemikalije, samo uzorak. Od instrumenata koristila se

- Analitička vaga XP56 (d=0,01 mg), (Mettler Toledo)
- Sušionik (Binder)
- Magnetna miješalica s grijanjem (IKA)

Od pribora bile su potrebne laboratorijske čaše, posuda za uparavanje, pinceta i eksikator.

#### 3.10.3. Postupak analize

Prije početka analize, posudicu za uparavanje potrebno je izžariti na 105 °C u sušioniku, te temperirati u eksikatoru i zatim izvagati. Nakon toga u posudicu se prenese 100 mL uzorka i posudica s uzorkom zatim se stavlja u vodenu kupelj. Nakon uparavanja, posudica se prenosi u sušionik na temperaturu 100-105 °C. Nakon što se posudica s uzorkom osušila i ohladila, ponovno se važe. Rezultat je razlika mase posudice prije i nakon uparavanja.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ukupni organski ugljik

#### 4.1.1. Ispiranje sustava

Rezultati dobiveni ispiranjem sustava koje je provedeno u 4 injektiranja prikazani su u Tablici 4 te Slikama 2 i 3. Sustav je pogodan za rad ako je srednja vrijednost koncentracija CO<sub>2</sub> koja je oslobođena i izmjerena nakon injektiranja 4 otopine (*Mean Area*) ispod 2,5. Kako je vidljivo na Slici 2 vrijednost *Mean Area* u prvom ispiranju bila je 3,245 što ne zadovoljava uvjete zbog čega se ispiranje provelo još jednom.

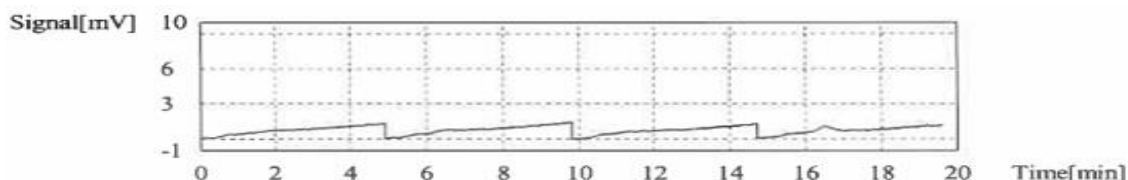
**Tablica 4.** Prikaz rezultata dobivenih prvim ispiranjem sustava nakon 4 injektiranja.

No.	Area	Conc.	Inj. Vol.	Aut. Ds.	Ex.	Cal. Curve	Date / Time
1	2,483	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 8:45:48
2	3,824	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 8:52:14
3	2,062	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 8:58:40
4	4,613	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 9:05:06



Acid Add.	1,500%
Sparge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	3,245
Mean Conc.	0,000ppb
SD Area	1,181
CV Area	36,40%
SD Conc	0,000
CV Conc	0,00%

**Slika 2.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 4.



**Slika 3.** Graf dobiven mjerenjem signala mV/min za vrijeme prvog ispiranja.

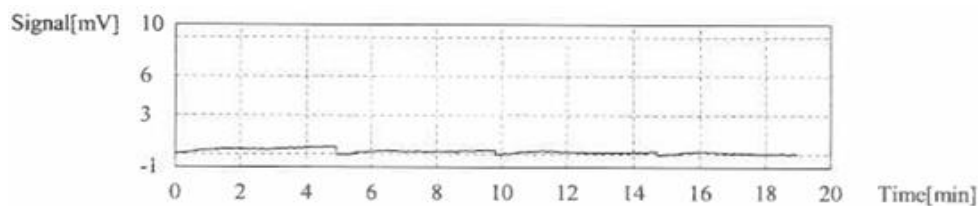
Kako rezultati nakon prvog ispiranja nisu zadovoljavali uvjete potrebne za određivanje TOC u uzorcima vode, sustav je ispran drugi put. Rezultati dobiveni nakon drugog ispiranja prikazani su u Tablici 5 te na Slikama 4 i 5. Na Slici 4 vidljivo je da je vrijednost *Mean area* 2,181 što zadovoljava uvjet da je vrijednost *Mean Area* ispod 2,5. Na Slici 5 vidljivo je da nema značajnih promjena u signalu. Uređaj se nakon drugog ispiranja mogao koristiti za određivanje ukupnog organskog ugljika.

**Tablica 5.** Prikaz rezultata dobivenih drugim ispiranjem sustava nakon 4 injektiranja.

No.	Area	Conc.	Inj. Vol.	Aut. Dil	Ex.	Cal. Curve	Date / Time
1	2,243	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 9:20:54
2	2,492	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 9:27:20
3	1,399	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 9:33:54
4	2,590	0,000ppb	816uL	1,000			25.3.2024. 9:39:42

Acid Add.	1,500%
Sparge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	2,181
Mean Conc.	0,000ppb
SD Area	0,5414
CV Area	24,82%
SD Conc	0,000
CV Conc	0,00%

**Slika 4.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 5.



**Slika 5.** Graf dobiven mjerenjem signala mV/min za vrijeme drugog ispiranja.

#### 4.1.2. Kalibracija

Kako bi konstruirali kalibracijsku krivulju s dvije točke kao što je prethodno objašnjeno u poglavlju 3.1.3, prvo se provelo 5 injektiranja vode ali se kao prosjek uzela su se samo 3 mjerenja (dobiveni rezultati prikazani u Tablici 6 i Slikama 6 i 7). Prva dva rezultata zanemarena su jer prelaze maksimalnu vrijednost standardne devijacije i koeficijenta varijacije, *Mean Area* za vodu iznosi 1,620. Na Slici 7 jasno je vidljivo kako je signal za vodu oko 0 tijekom vremena.

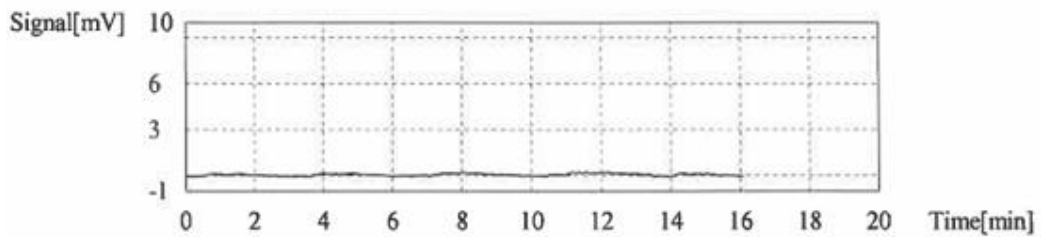
**Tablica 6.** Prikaz rezultata dobivenih injektiranjem vode kao standardnu otopinu za nultu točku kalibracije.

Conc: 0,000ppb

No.	Area	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Rem.	Ex.	Date / Time
1	1,159	816uL	1,000	*****	E	25.3.2024. 9:55:33
2	2,121	816uL	1,000	*****	E	25.3.2024. 10:02:23
3	1,678	816uL	1,000	*****		25.3.2024. 10:09:02
4	1,788	816uL	1,000	*****		25.3.2024. 10:14:44
5	1,394	816uL	1,000	*****		25.3.2024. 10:23:46

Acid Add.	1,500%
Sparge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	1,620
SD Area	0,2033
CV Area	12,55%

**Slika 6.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 6.



**Slika 7.** Graf dobiven mjerenjem signala mV/min za vrijeme injektiranja vode kao standardne otopine za nultu točku kalibracije.

Standardna otopina saharoze injektirala se samo 3 puta i izračunao se prosjek, no ukoliko rezultati injektiranja prelaze maksimalnu vrijednost standardne devijacije i koeficijenta varijacije može se napraviti i više injektiranja (maksimalno 5) za potvrdu rezultata. Kako je vidljivo na Slici 8 *Mean Area* za saharozu iznosio je 33,76, a na Slici 9 jasno se vide pikovi saharoze u jednakim amplitudama kroz jednako vrijeme.

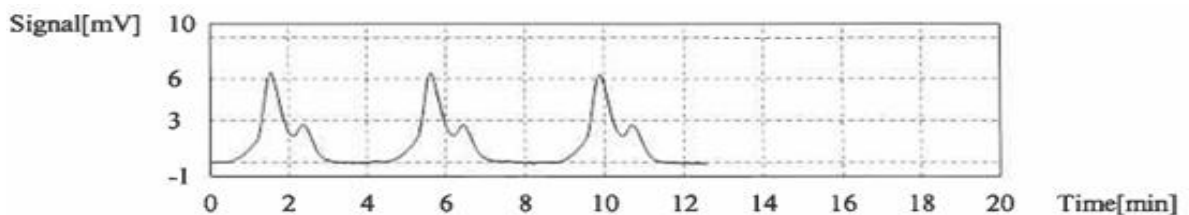
**Tablica 7.** Prikaz rezultata dobivenih injektiranjem otopine saharoze kao standardne otopine za drugu točku kalibracije.

Conc: 500,0ppb

No.	Area	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Rem.	Ex.	Date / Time
1	33,44	816ul	1,000	*****		25.3.2024. 10:37:37
2	33,85	816ul	1,000	*****		25.3.2024. 10:44:15
3	34,00	816ul	1,000	*****		25.3.2024. 10:50:38

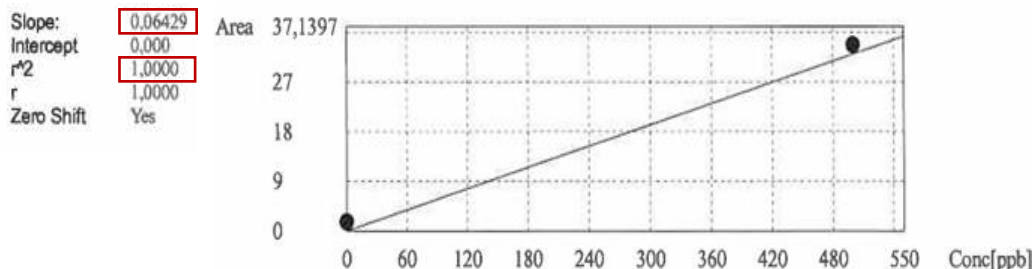
Acid Add.	1,500%
Spurge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	33,76
SD Area	0,2899
CV Area	0,86%

**Slika 8.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 7.



**Slika 9.** Graf dobiven mjerenjem signala mV/min za vrijeme injektiranja otopine saharoze kao standardne otopine za drugu točku kalibracije.

Nakon izmjerenih koncentracija obje kalibracijske otopine, konstruirana je kalibracijska krivulja čiji koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosi 1,0000 što zadovoljava uvjete Europske farmakopeje. Nagib ima vrijednost 0,06429. Rezultati i graf vidljivi su na Slici 10.



**Slika 10.** Kalibracijska krivulja.

#### 4.1.3. Ispitivanje prikladnosti sustava

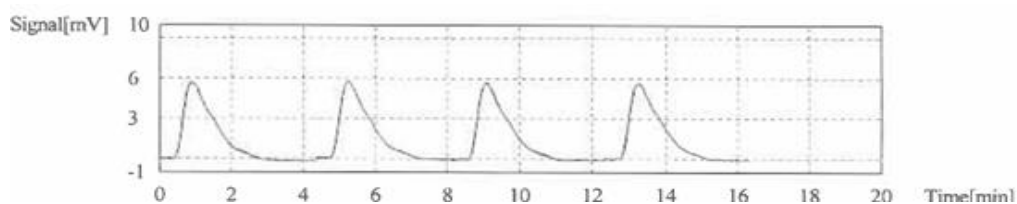
Nakon saharoze analizirana je standardna otopina 1,4 – benzokinona kako bi se svelo ispitivanje prikladnosti sustava. Uređaj je vršio 4 injektiranja, gdje je rezultat za jedno injektiranje (2. injektiranje) malo odstupao od ostalih, te ga je uređaj zanemario kod računanja prosjeka (Tablica 8). Na Slici 11 vidljivo je da je izračunata vrijednost *Mean Area* za 1,4 – benzokinon iznosila 33,67. Na Slici 12 može se jasno vidjeti kako je signal izlazio u jednakim amplitudama, te su pikovi podjednake veličine. Učinkovitost odgovora (engl. *Recovery*, RSD) iznosio je 99,71 % što zadovoljava zahtjeve Europske farmakopeje koji nalažu da RSD iznosi između 85 -115 %. Time je pokazano kako je sustav prošao test prikladnosti.

**Tablica 8.** Rezultati dobiveni ispitivanjem prikladnosti sustava.

No.	Area	Conc.	Inj. Vol.	Aut. Di.	Ex.	Cal. Curve	Date / Time
1	34,33	534,0ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024 03 25 09 44 17.cal	25.3.2024. 11:17:52
2	34,73	540,2ppb	816ul	1,000	E	Standard saharoza.2024 03 25 09 44 17.cal	25.3.2024. 11:23:47
3	33,30	518,0ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024 03 25 09 44 17.cal	25.3.2024. 11:30:33
4	33,38	519,2ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024 03 25 09 44 17.cal	25.3.2024. 11:36:48

Acid Add.	1,500%
Spurge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	33,67
Mean Conc.	523,7ppb
SD Area	0,5730
CV Area	1,70%
SD Conc	8,913
CV Conc	1,70%

**Slika 11.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 8.



**Slika 12.** Rezultati TOC uređaja dobiveni ispitivanjem prikladnosti sustava

#### 4.1.4. Analiza TOC u uzorcima vode

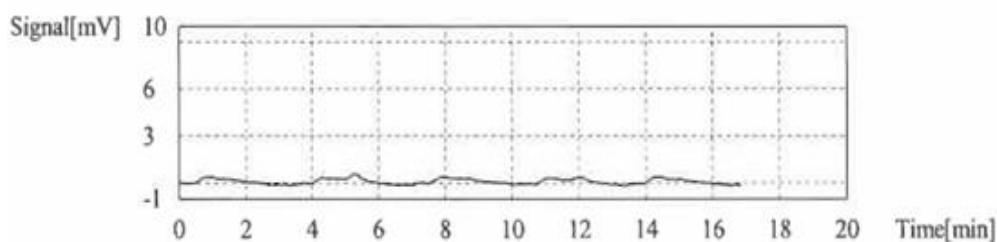
Rezultati za prvi uzorak vode (uzorak PV-5) prikazani su u Tablici 9 i Slikama 13 i 14. Iz rezultata je vidljivo kako je ukupna prosječna koncentracija organskog ugljika u uzorku 61,68 ppb (Slika 13), što zadovoljava zahtjeve Europske farmakopeje koji nalažu da koncentracija mora biti manja od 500 ppb (0,5 mg/L). Uređaj je injektirao uzorak 5 puta, no samo su 3 ulazila u prosjek (1., 2. i 4. injektiranje). Ovim testom pokazalo se kako je ispitivana voda prikladna za korištenje u farmaceutske svrhe.

**Tablica 9.** Rezultati TOC uređaja dobiveni za uzorak PV-5.

No.	Area	Conc.	Inj. Vol.	Aut. Dil.	Ex.	Cal. Curve	Date / Time
1	3,473	54,02ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024. 11:52:09
2	4,124	64,15ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024. 11:58:38
3	2,541	39,53ppb	816ul	1,000	E	Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024. 12:04:40
4	4,298	66,86ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024. 12:11:09
5	2,320	36,09ppb	816ul	1,000	E	Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024. 12:20:58

Acid Add.	1,500%
Sparge Gas Flow	80ml
Sp. Time	300,0sec
Mean Area	3,965
Mean Conc.	61,68ppb
SD Area	0,4349
CV Area	10,97%
SD Conc	6,765
CV Conc	10,97%

**Slika 13.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 9.



**Slika 14.** Graf dobiven mjerenjem TOC za uzorak PV-5.

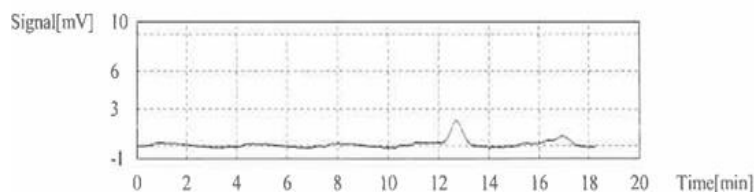
Uzorak PV-17 također je pokazao dobre rezultate. Provedeno je 5 injektiranja, od kojih je samo 3 ušlo u prosjek (1., 2. i 3. injektiranje). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 10 te na Slikama 15 i 16. Ukupna prosječna koncentracija organskog ugljika u uzorku iznosila je 36,34 ppb (Slika 15) što također zadovoljava uvjete Europske farmakopeje. Pokazalo se kako je voda iz uzorka PV-17 prikladna za korištenje u farmaceutske svrhe.

**Tablica 10.** Rezultati TOC uređaja dobiveni za uzorak PV-17.

No.	Area	Conc.	Inj. Vol.	Aut. Dif.	Ex.	Cal. Curve	Date / Time
1	2,233	34,74ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024, 12:34:32
2	2,903	45,16ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024, 12:40:47
3	1,872	29,12ppb	816ul	1,000		Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024, 12:47:11
4	9,828	152,9ppb	816ul	1,000	F	Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024, 12:54:34
5	6,478	100,8ppb	816ul	1,000	E	Standard saharoza.2024_03_25_09_44_17.cal	25.3.2024, 13:04:39

Acid Add. 1,500%  
 Sparge Gas Flow 80ml  
 Sp. Time 300,0sec  
 Mean Area 2,336  
 Mean Conc. 36,34ppb  
 SD Area 0,5232  
 CV Area 22,40%  
 SD Conc 8,138  
 CV Conc 22,40%

**Slika 15.** Prikaz statistički obrađenih rezultata iz Tablice 10.



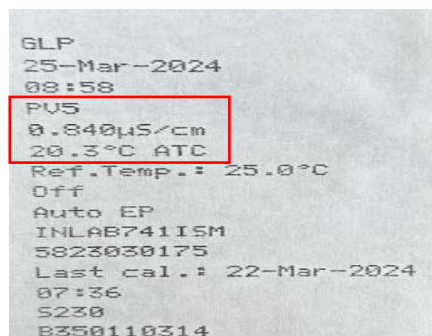
**Slika 16.** Graf dobiven mjerenjem TOC za uzorak PV-17.

## 4.2. Određivanje nitrata

Prvo je bilo potrebno napraviti vizualni test uzorka kojim se utvrdilo da je to bistra, bezbojna otopina. Epruveta u kojoj se nalazila referentna otopina gotovo odmah nakon dodavanja otopine nitrata promijenila je boju u svijetlo plavu, a s vremenom u vodenoj kupelji ona poprima sve jaču boju što ukazuje na prisutnost nitrata. Niti uzorak PV-5 ni PV-17 nisu poprimili plavu boju što ukazuje na odsutnost nitrata. S time je dokazano kako je voda iz uzoraka PV-5 i PV-17 pogodna za uporabu u farmaceutskoj industriji prema Europskoj farmakopeji.

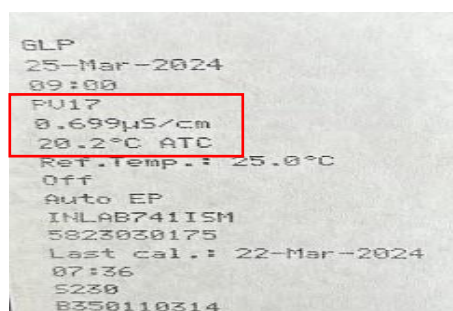
## 4.3. Određivanje električne vodljivosti

Prema Europskoj farmakopeji temperatura otopine idealno bi trebala biti 20 °C, no priznaje se  $19 \pm 2$  °C. Temperatura uzorka PV-5 bila je 20.3 °C. Pri toj temperaturi izmjerena vodljivost bila je 0,840  $\mu\text{S}/\text{cm}$  što dokazuje kako je ovaj uzorak prošao test prema europskoj farmakopeji čiji je zahtjev da vodljivost bude manja od 4,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pri 20°C. Rezultati ovog testa vidljivi su na Slici 17.



*Slika 17.* Rezultati uređaja za određivanje električne vodljivosti za uzorak PV-5.

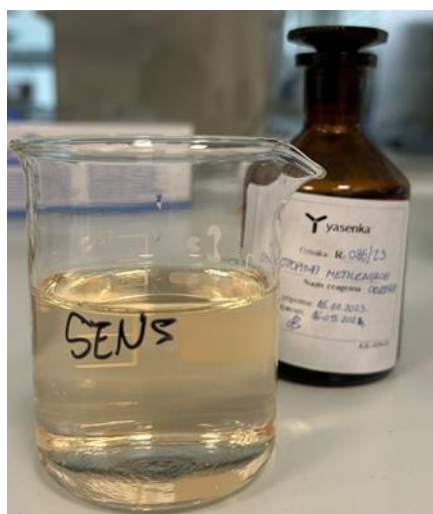
Za uzorak PV-17 postignuta temperatura iznosila je 20.2 °C, i pri toj temperaturi električna vodljivost bila je 0,699  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Također, i ovaj uzorak kao i prethodni, prolazi test, što znači da je voda u uzorku pogodna za upotrebu u farmaceutskoj industriji. Rezultati mjerenja vidljivi su na Slici 18.



*Slika 18.* Rezultati uređaja za određivanje električne vodljivosti za uzorak PV-17.

#### 4.4. Određivanje kiselosti ili lužnatosti

Indikatori su prvo morali proći test osjetljivosti. Otopina metilenskog crvenila treba nakon dodavanja NaOH postati žuta. Došlo je do promjene boje u žutu kao što je vidljivo na Slici 19, što znači da je indikator metilensko crvenilo dovoljno osjetljiv za nastavak analize. Također, indikator bromtimolno modriilo prošao je isti test. Nakon dodavanja NaOH otopina je poprimila blijedo plavu/zelenkastu boju kao što je vidljivo na Slici 20, to znači da je i indikator bromtimolno modriilo prošao test osjetljivosti i moguće ga je koristiti u nastavku analize.



*Slika 19.* Test osjetljivosti za metilensko crvenilo.



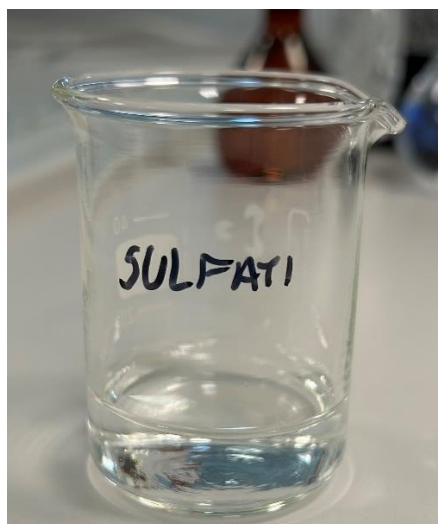
*Slika 20.* Test osjetljivosti za bromtimolno modriilo.

Rezultati analize pokazali su kako nakon dodavanja metilenskog crvenila u uzorak nije došlo do promjene boje u crvenu, a pri dodatku bromtimolnog modrila u uzorak nije došlo do promjene boje u plavu. Takvi rezultati ukazuju kako je uzorak prošao test na kiselost i lužnatost i moguće ga je koristiti u daljnjim procesima u farmaceutskoj industriji prema Europskoj farmakopeji.

#### 4.5. Određivanje sulfata

Početni uzorak bio je bistra, bezbojna tekućina. Nakon dodavanja razrijeđene kloridne kiseline i otopine barijeva klorida boja uzorka se nije mijenjala tijekom jednog sata (Slika 21). To je dokaz kako u toj vodi nema prisutnih sulfata, te kako je ona pogodna za upotrebu u farmaceutskoj industriji.

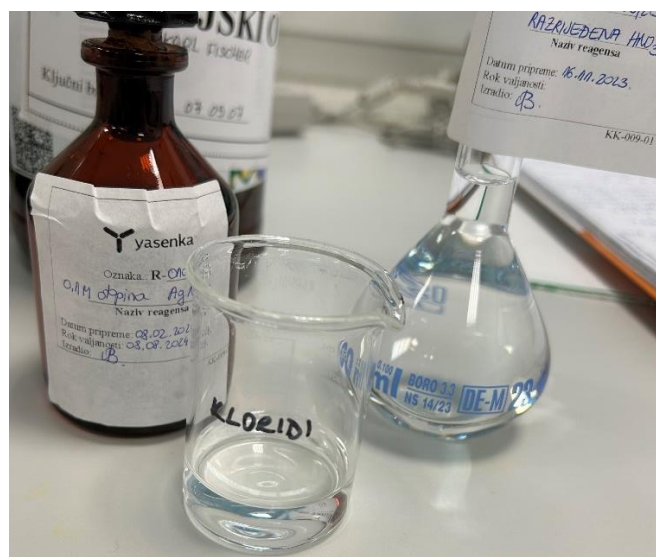




*Slika 21.* Rezultati testa na sulfate.

#### 4.6. Određivanje klorida

Uzorak je na početku bio bezbojna prozirna tekućina, a nakon dodavanja reagensa pratila se promjena boje. Nakon 15 minuta nije došlo do promjene boje (Slika 22). To dokazuje kako u uzorku nisu prisutni kloridi, te je otopina pogodna za korištenje u farmaceutskoj industriji prema Europskoj farmakopeji.

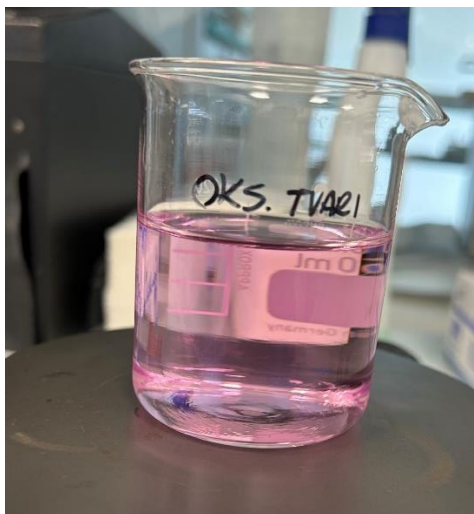


*Slika 22.* Rezultati testa na kloride.

#### 4.7. Određivanje oksidirajućih tvari

Uzorak je bio prozirna bezbojna tekućina, a nakon dodavanja reagensa došlo je do promjene boje. Do promjene boje u blijedo ružičastu došlo je odmah nakon dodavanja reagens.

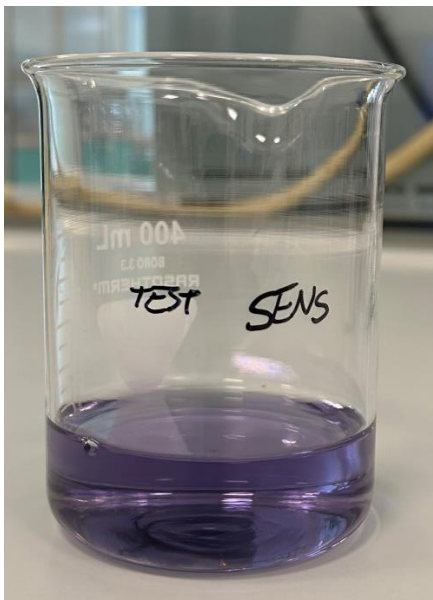
Uzorak s reagensom zagrijavan je 5 minuta nakon čega je promjena boje postala intenzivnija (Slika 23). Time je dokazano da u vodi nisu prisutne oksidirajuće tvari pa je ta voda pogodna za korištenje u farmaceutskoj industriji prema načelima Europske farmakopeje.



*Slika 23.* Rezultati testa oksidirajućih tvari.

#### 4.8. Određivanje kalcija i magnezija

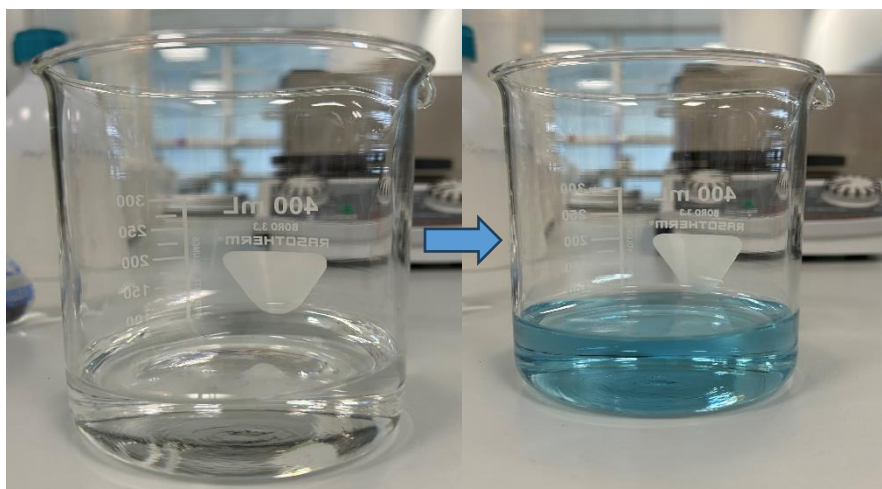
Rezultati testa osjetljivosti indikatora triturat mordant crnila 11 pokazali su intenzivnu promjenu boje. Otopina je postala intenzivno ljubičaste boje (Slika 24), što ukazuje na to da je indikator prošao test osjetljivosti i moguće ga je koristiti u daljnjem radu.



*Slika 24.* Rezultati testa osjetljivosti za indikator triturat mordant crnilo 11.

Prema zahtjevima Europske farmakopeje nakon dodavanja puferske otopine amonijeva klorida, triturat mordant crnila 11 i natrijeva edeteata otopina mora pokazivati čisto plavu boju. Rezultati

su pokazali kako je uzorak koji je proziran, bezbojna tekućina, promijenio boju u plavo odmah nakon dodavanja reagensa. Promjenu se može vidjeti na Slici 25. Ta promjena pokazuje kako je uzorak prošao test na kalcij i magnezij, te ga je moguće koristiti u farmaceutskoj industriji.



*Slika 25.* Rezultati određivanja kalcija i magnezija u uzorku vode.

#### 4.9. Određivnje amonijaka

Rezultat ovog testa dobije se uspoređivanjem dvije otopine: referentne i otopine uzorka. Referentna otopina je poprimila žutu boju odmah nakon dodavanja standardne otopine amonijaka, što ukazuje na prisustvo amonijaka. Prema Europskoj farmakopeji zahtjev je da otopina uzorka ne smije imati intenzivnije žuto obojenje nego referentna otopina. Rezultati su to i pokazali. Otopina uzorka bila je bezbojna dok je referentna otopina ostala žuta (Slika 26). To dokazuje kako je uzorak prošao test na amonijak i pogodan je za upotrebu u farmaceutskoj industriji.



*Slika 26.* Rezultati određivanja amonijaka za uzorak PV-5.

#### 4.10. Određivanje ostatka nakon uparavanja

Prvo vaganje posudice bez uzorka pokazalo je masu 93.3799 g , a nakon uparavanja uzorka izvagana masa posude iznosila je 93.3806 g. Iz razlike ta dva broja dobiven je rezultat 0,0007 g, što pretvoreno u postotak iznosi 0,0007 % (Slika 27). S obzirom da je prema Europskoj farmakopeji dopušteni ostatak  $\leq 0,001$  %, pokazalo se kako uzorak PV-5 prolazi ovaj test i moguće ga je koristiti za potrebe farmaceutske industrije.

----- Weighing -----		----- Weighing -----	
YASENKA		YASENKA	
23.Apr 2024	9:33	23.Apr 2024	12:47
User Name	IVANA	User Name	IVANA
Balance Type	XPE205DR/M	Balance Type	XPE205DR/M
WeighBridge SNR:		WeighBridge SNR:	
	B411382935		B411382935
Terminal SNR:	B411382935	Terminal SNR:	B411382935
Balance ID	L-U-001	Balance ID	L-U-001
IME UZORKA	POSUDA	IME UZORKA	POSUDA
LOT	X_prije uparavanja	LOT	Y_nakon uparavanja
	93.379(9 ) g		93.380(6 ) g

Slika 27. Rezultati vaganja za test ostatka nakon uparavanja.

## 5. ZAKLJUČAK

Voda je sveprisutna u svim aspektima života i djelatnosti. U farmaceutskoj industriji prožima se kroz sve etape proizvodnje od pranja korištenog posuđa, kao otapalo u pripremi otopina pa sve do gotovog proizvoda. Upravo zbog toga vrlo su važne norme i pravila kako bi voda, a samim time i farmaceutski proizvod bili zdravstveno ispravni i kvalitetni. U ovom radu pratile su se norme iz Europske farmakopeje, te se vršilo ispitivanje prikladnosti vode iz farmaceutske tvrtke Yasenka u Vukovaru za upotrebu u analizi sirovina i gotovih proizvoda te proizvodnji farmaceutskih pripravaka.

Ispitivao se ukupni organski ugljik (koncentracija ukupnog organskog ugljika za dva uzorka je iznosila: PV-5 61,68 ppb, PV-17 36,31 ppb), nitrati (nije došlo do promjene boje u plavu), električna vodljivost (za uzorak PV-5 vodljivost iznosi 0,840  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , a za PV-17 iznosi 0,699  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), kiselost i lužnatost (nije došlo do obojenja uzorka u crveno ili plavo), sulfati (nije došlo do promjena izgleda uzorka kroz sat vremena), kloridi (nije došlo do promjena izgleda uzorka kroz 15 minuta), oksidirajuće čestice (došlo je do promjene i zadržavanje boje u ružičastu), kalcij i magnezij (promjena boje uzorka u plavu), amonijak (uzorak je bio svijetlije žuto obojan nego referentna otopina), te ostatak nakon uparavanja (ostatak je iznosio 0,0007%). Ispitivanja su pokazala kako je voda iz laboratorija i proizvodnje prošla sve zahtjeve Europske farmakopeje i kako je kao takva pogodna za daljnje korištenje u farmaceutskoj industriji.

## 6. POPIS LITERATURE

1. European medicines agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/european-pharmacopoeia> (6.7.2024.)
2. EDQM. URL: <https://www.edqm.eu/en/the-european-pharmacopoeia-commission> (6.7.2024.)
3. A. S. Bouin, M. Wierer, Quality standards of European Pharmacopoeia, *Journal of Ethnopharmacology*, **2014**, *158*, 454-457
4. Hrvatska enciklopedija. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/farmakopeja> (7.7.2024.)
5. HALMED. URL: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Farmakopeja/Europska-farmakopeja/> (7.7.2024.)
6. B. Čalija, D. Krajišnik, J. Milić, Voda za farmaceutsku upotrebu-značaj, vrste i zahtevi za kvalitet, Stručni rad – Sveučilište u Beogradu, Farmaceutski fakultet, 2019.
7. M. Belkachem, K. Bensadok et al., Water produce for pharmaceutical industry: role of reverse osmosis stage, *Desalination*, **2008**, *221*, 298-302
8. Council of Europe, European Pharmacopoeia, 8th ed. Strassbourg: Council of Europe, 2019., 3555-3562
9. SCRIBD. URL: <https://www.scribd.com/document/421306845/Voda-Za-Industrijsku-Proizvodnju-Farmaceutskih-Proizvoda> (8.7.2024.)
10. European Pharmacopoeia, URL: <http://www.uspbpep.com/ep50/Water,%20highly%20purified.pdf> (23.7.2024.)
11. SCIMED. URL: <https://www.scimed.co.uk/education/what-is-total-organic-carbon/> (23.7.2024.)
12. M. Damjanović, Validacija analitičke metode za određivanje ukupnog organskog ugljika u vodi, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2018.
13. SHIMADZU. URL: <https://www.shimadzu.com/an/products/total-organic-carbon-analysis/index.html> (23.7.2024.)
14. Hrvatska enciklopedija. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/elektricna-provodnost> (23.7.2024.)
15. Kemolab. URL: <https://kemolab.hr/proizvod/konduktometri/> (23.7.2024.)
16. L. Gajski, Određivanje nitrata u vodi za ljudsku potrošnju, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet, Zagreb, 2023.
17. Aquafilter. URL: <https://aquafiltersrbija.rs/o-vodi/ph-vrednost-vode/> (25.7.2024.)
18. Eurolab. URL: <https://www.eurolab.com.tr/bs/testler/su-analizleri> (25.7.2024.)
19. Hrvatska enciklopedija. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/sulfati> (25.7.2024.)

20. ZZJZ Dubrovačko – neretvanske županije. URL:  
<https://www.zzjzdnz.hr/hr/naslovna/pelud/569-ch-0> (25.7.2024.)
21. Hrvatski normativni dokument URL:  
<https://repositorij.hzn.hr/norm/HRN+EN+25813%3A2003> (25.7.2024.)
22. Varcom. URL: <https://www.varkom.hr/stranica/sve-sto-vas-je-ikada-zanimalo-o-vodi-za-pice> (25.7.2024.)
23. HydroLux. URL: <https://www.hydrolux.info/english/06%20problemi/amonijak-u-vodi.html> (25.7.2024.)