Analiza realnih uzoraka vode ionskom kromatografijom

Malenica, Dajana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:532578

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dajana Malenica

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dajana Malenica

ANALIZA REALNIH UZORAKA VODE IONSKOM KROMATOGRAFIJOM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Šime Ukić
dr. sc. Mirta Čizmić
dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2016.

Ovaj rad rađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta za kemiju i kemijsku tehnologiju Sveučilišta u Ljubljani.

U prvom redu željela bih se zahvaliti prof. dr. sc. Nataši Gros na kvalitetnom vođenju tijekom studentske razmjene u Ljubljani.

Veliko hvala i asistentu Matiji Cvetniću mag. ing. cheming. na uloženom vremenu i nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja dijela eksperimenata provedenih na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Želim zahvaliti i svome mentoru doc. dr. sc. Šimi Ukiću na ukazanom povjerenju i strpljenju prilikom izrade ovog rada.

Na posljetku želim zahvaliti svojim roditeljima i zaručniku što nikad nisu posustali biti podrška na mojem životnom putu.

SAŽETAK

Kromatografija je jedna od najvažnijih metoda u analitičkoj kemiji budući da ima veliku moć separacije, čak i kada se radi o kompleksnim uzorcima, te istovremeno omogućuje odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka u uzorcima.

Ukoliko se u uzorku nalaze ionske čestice i/ili polarne molekule, koristi se ionska kromatografija (eng. *ion chromatography*, IC) u kojoj se odjeljivanje uglavnom temelji na razlici u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni na nepokretnoj fazi.

Poput mnogih drugih modernih kromatografskih tehnika, ionska kromatografija može se koristiti za analizu tvari u poprilično različitim matricama, no najzastupljenije su ipak vodene otopine. Tako je i tema ovog diplomskog rada upravo analiza nekolicine anorganskih aniona u realnim uzorcima voda, bilo da se radi o prirodnim vodama ili komercijalnim vodama dostupnim u prodaji. Samoj analizi prethodio je razvoj metode s detaljno provedenom validcijom.

Ključne riječi: ionska kromatografija, analiza voda, validacija

SUMMARY

Chromatography is one of the most important methods in analytical chemistry due to its great separation power even in cases when complex samples are to be analyzed. At the same time it enables simultaneous separation, identification and quantitative determination of components in samples.

Ion chromatography is used in cases when sample includes ion particles and/or polar molecules. In ion chromatography separation mainly occurs as a consequence of different affinities of components to exchange with the ions from stationary phase.

Ion chromatography can be applied for analysis of different matrices, jet water samples are the most common ones. The analysis of natural water samples and samples of commercial waters are topic of this work also. During the experimental, ion chromatographic method was developed and an extensive validation performed.

Key-words: ion chromatography, water analysis, validation

SADRŽAJ

1 UVOD 1

2 TEORIJSKI DIO 2
2.1 Kromatografija 2
2.1.1 Nepokretna faza 2
2.1.2 Pokretna faza 3
2.2 Podjela kromatografskih metoda 3
2.3 Karakteristične kromatografske veličine 4
2.3.1 Omjeri raspodjele 4
2.3.2 Vrijeme i faktor zadržavanja 5
2.3.3 Razlučivanje 7
2.4 Razvoj kromatografskih metoda 10
2.5 Ionska kromatografija 14
2.5.1 Povijesni razvoj ionske kromatografije 14
2.5.2 Princip ionskog kromatografskog razdvajanja 15
2.5.3 Ionski kromatografski sustav 15
2.5.4 Prednosti IC-a nad ostalim metodama detekcije/kvantifikacije iona 16
2.5.4.1 Brzina 16
2.5.4.2 Osjetljivost 17
2.5.4.3 Selektivnost 17
2.5.4.4 Simultana detekcija više analita 17
2.5.4.5 Stabilnost kolone 18

3 KALIBRACIJA 19
3.1 Metoda vanjskog standarda 19
3.2 Metoda standardnog dodatka 21
3.3 Metoda unutarnjeg standarda 21

4 VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA ... 23
4.1 Regresijska analiza ... 24
4.2 Intervali pouzdanosti ... 24
4.3 Mjerna nesigurnost ... 25
4.4 Statistički važni testovi u analitičkoj kemiji ... 25
4.4.1 *F*-test ... 25
4.4.2 *t*-test ... 26
4.4.3 Analiza varijance ... 26
4.4.4 Testovi za *outliere* ... 27
4.4.4.1 Dixonov test (*Q*-test) ... 27
4.4.4.2 Grubbsov test ... 28
4.5 Izvedbene značajke ... 28
4.5.1 Preciznost ... 29
4.5.2 Točnost ... 29
4.5.3 Granica detekcije i granica kvantifikacije ... 30
4.5.4 Linearnost ... 30
4.5.5 Selektivnost ... 31
4.5.6 Robusnost ... 32

5 EKSPERIMENTALNI DIO ... 33
5.1 Reagensi i otopine ... 33
5.2 Ionski kromatografski sustav ... 35

6 REZULTATI I RASPRAVA ... 37
6.1 Granica detekcije i granica kvantifikacije ... 37
6.2 Linearnost ... 37
6.3 Točnost ... 39
6.4 Preciznost ... 40
6.5 Analiza realnih uzoraka vode ... 41

7 ZAKLJUČAK ... 47

8 LITERATURA 48

ŽIVOTOPIS 51

1 UVOD

Voda čini više od dvije trećine površine Zemlje, ali ono što ju čini iznimno važnom jest činjenica da je ona bitan sastojak živih organizama i nužna je za njihov život. Iako je voda prirodno bogatstvo o kojem se prije nije razmišljalo u okviru nestašice, danas se susrećemo s velikim problemom nestašice i onečišćenja pitke vode, ali i vode općenito. Da bi se kontrolirala kvaliteta vode i da bi se njome moglo upravljati, potrebni su određeni alati i metode. Osim toga, potreba za sve većom brzinom i učinkovitošću dobivanja informacija o kemijskom sastavu, o njegovoj promjeni tijekom vremena ili o prostornoj razdiobi analita u uzorku rezultirala je nastojanjem za što pouzdanijim i selektivnijim analitičkim postupcima, ali i zahtjevima za određivanjem sve manjih udjela analita. Upravo ovdje iznimno veliku ulogu ima analitička kemija koja nudi širok spektar alata i metoda za analizu voda, ali i analiza općenito. Kakvoća vode se ispituje prema preporukama, smjernicama i pravilnicima mjerodavnih ustanova i zavoda na međunarodnoj i državnoj razini.

Veliki dio uzoraka koji su zanimljivi znanstvenicima, kada je u pitanju njihovo istraživanje, su zapravo vrlo kompleksni po svojoj kemijskoj prirodi. Da bi se pravilno analizirali takvi uzorci, komponente smjese treba razdvojiti neovisno želi li se postići identifikacija ili kvantifikacija. Jedna od najučinkovitijih metoda separacije kompleksnih uzoraka je kromatografija gdje su komponentne smjese organizirane u skupine na temelju kemijskih svojstava.

Za kromatografiju se može reći da je najsvestranija tehnika koju posjeduje današnja kemijska znanost. Iako je doživjela veliki razvoj u odnosu na svoj početak, njezin razvoj i dalje neprekidno traje.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Kromatografija

Kromatografija je opći pojam za razne fizikalno-kemijske separacijske tehnike, a svima im je zajednička raspodjela komponenata između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Kromatografske tehnike su podijeljene s obzirom na fizikalno stanje ovih dviju faza.[1] Faze su odabrane tako da komponente smjese imaju različit afinitet prema njima. Plinovita ili tekuća mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz nepokretnu fazu.

Prvu kromatografsku tehniku izumio je ruski botaničar Mihail Semjonovič Cvet 1903. godine tijekom istraživanja biljnih pigmenata. Primijetio je odjeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Upotrebom istog eluensa, otapala koje nosi sastojke smjese kroz nepokretnu fazu, dobivao je isti raspored boja, što nije mogla biti slučajnost. Odijeljeni sastojci je vidio na koloni kao obojene vrpce po je tehnika dobila ime kromatografija (grč. *chroma* = boja).

Primjena kromatografije je značajno porasla posljednjih pola stoljeća, ne samo zbog razvoja nekoliko novih kromatografskih metoda nego i zbog sve veće potrebe za boljim metodama kada je u pitanju analiza kompleksnih uzoraka.[2]

2.1.1 Nepokretna faza

Nepokretna faza je čvrsta tvar ili kapljevina fiksirana u stupcu ili ploči (npr. silikagel u tankoslojnoj kromatografiji; eng. *thin layer chromatography*, TLC), na čijoj se površini određeno vrijeme zadržavaju tvari koje se razdvajaju. Važno je da nepokretna faza bude takva da zadržavanje molekula bude selektivno, odnosno da se različiti sastojci smjese uz nju vežu u različitim vremenskim intervalima kako bi došlo do razdvajanja smjese. S obzirom na kemijsku strukturu i polarnost, sorbensi, koji čine nepokretnu fazu, se dijele na:

- polarne anorganske (hidrofilne) sorbense, čiji su predstavnici silikagel, aluminijev oksid i magnezijev silikat,

- nepolarne anorganske sorbense, kao što su aktivni ugljen i grafit,
- polarne vezane faze, npr. amino propil, cijanopropil, diol,
- nepolarne vezane faze poput alkana, C8 i C18 ugljikovodika i
- polarne organske sorbense koje predstavljaju celuloza, hitin i poliamid.

Izbor nepokretne faze uvjetovan je prirodom ispitivanog spoja, prirodom ravnoteže kromatografskog procesa i vrstom veze koja nastaje između ispitivanog spoja i kromatografske podloge.[3]

2.1.2 Pokretna faza

Mobilna faza je faza koja se kreće u određenom pravcu, odnosno kreće se kroz kolonu noseći uzorak koji se razdvaja. Da bi se, s obzirom na nepokretnu fazu, osigurao optimalan kromatografski sustav za željeno razdvajanje smjese, treba odabrati pogodan sastav pokretne faze. Važno je da pokretna faza bude čista, odnosno da ne sadržava nečistoće koje bi mogle smetati prilikom kromatografskih određivanja. Priroda veze koja se ostvaruje između ispitivanog spoja, nepokretne i pokretne faze važan je čimbenik realnog kromatografskog procesa. Međumolekulske interakcije uglavnom uključuju van der Waalsove sile, međudjelovanja dipol-inducirani dipol, dipol-dipol te vodikove veze.

2.2 Podjela kromatografskih metoda

Postoje različiti kriteriji za podjelu kromatografskih metoda. Prema obliku kromatografske podloge kromatografija može biti:

- kolonska (nepokretna se faza nalazi unutar cijevi odnosno kolone),
- plošna (nepokretna je faza ploha ili se nanosi na plohu).

Prema fizikalnom stanju obiju faza kromatografija se dijeli na:

- plinsko-tekućinsku,
- plinsko-čvrstu,
- tekućinsko-tekućinsku,
- tekućinsko-čvrstu kromatografiju.

S obzirom na fizikalno stanje pokretne faze dijeli se na:

- plinsku,
- tekućinsku,
- fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

Mehanizmi odjeljivanja u kromatografiji mogu biti različiti. Prema prevladavajućem mehanizmu kromatografija se dijeli na:

- adsorpcijsku kromatografiju (odjeljivanje se temelji na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari),
- razdjelnu kromatografiju (kod plinske se kromatografije odjeljivanje temelji na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi),
- ionsku izmjenjivačku kromatografiju (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni),
- kromatografiju isključenjem (do odjeljivanja dolazi zbog razlika u veličini, obliku ili naboju čestica),
- afinitetnu kromatografiju (kao mehanizam odjeljivanja koristi se jedinstvena biološka interakcija analita i liganda).[4]

2.3 Karakteristične kromatografske veličine

2.3.1 Omjeri raspodjele

Uz pretpostavku da su pokretna i nepokretna faza u kontaktu dovoljno dugo da se uspostavi ravnotežno stanje procesa ionske izmjene, raspodjela komponenti između dviju faza može se izraziti konstantom razdjeljenja, K_c, jednakom omjeru koncentracija razdijeljene komponente i u nepokretnoj (c_S) i pokretnoj fazi (c_M):

$$K_{c,i} = \frac{c_{S,i}}{c_{M,i}} \tag{1}$$

Velike vrijednosti K_c predstavljaju komponente s izraženim afinitetom prema nepokretnoj fazi, dok su suprotno tome K_c vrijednosti bliske nuli karakteristika komponenti koje preferiraju pokretnu fazu. Upravo razlike u vrijednostima konstante razdjeljenja pojedinih komponenti preduvjet su koji omogućava njihovu kromatografsku separaciju.

Komponente s većom konstantom razdjeljenja zasigurno će provoditi više vremena u nepokretnoj fazi od onih s manjom konstantom. Kako se komponenta kreće samo dok se nalazi u pokretnoj fazi, prve će sustav napuštati one komponente koje u pokretnoj fazi provedu najviše vremena. Time dolazi do međusobnog razdvajanja komponenti, ovisno o afinitetu prema nepokretnoj fazi.[4,5]

2.3.2 Vrijeme i faktor zadržavanja

Vrijeme koje komponenta provede u sustavu naziva *se vremenom zadržavanja*, t_R, i pri identičnim uvjetima analize karakteristika je pojedine komponente. Pretpostavimo da je promatrani kromatografski sustav kolona obujma V, u kojoj volumen nepokretne faze iznosi V_S, a volumen pokretne V_M. Sve komponente koje se razdvajaju na koloni prolaze identičnim volumenom, jednakim umnošku vremena zadržavanja komponente u koloni i brzine njenog protoka kroz kolonu:

$$V_M = t_{R,i} \cdot v_i = t_0 \cdot v_0 \tag{2}$$

Indeksom 0 označeno je *vrijeme* i *brzina protoka nezadržanog sastojka* (pokretne faze). Brzina protoka komponente *i* kroz kolonu manja je od brzine protoka nezadržanog sastojka, ovisno o vremenu provedenom u nepokretnoj fazi:

$$v_i = v_o \cdot \frac{t_0}{t_{R,i}} = v_o \cdot \frac{t_0}{t_0 + t'_{R,i}} = v \cdot \frac{V_M}{V_{R,i}} = v_o \cdot \frac{V_M}{V_M + V'_R} \tag{3}$$

gdje $t'_{R,i}$ $t'_{R,i}$predstavlja *prilagođeno vrijeme zadržavanja*, odnosno vrijeme koje je komponenta *i* provela u nepokretnoj fazi, $V_{R,i}$ *volumen zadržavanja komponente*, a V'_R dodatni volumen pokretne faze potreban za eluciju komponente *i* uslijed njenog zadržavanja u nepokretnoj fazi (*prilagođeni volumen zadržavanja*). Iznos dodatnog volumena pokretne faze može se prema izrazu (1) povezati s volumenom nepokretne faze u koloni:

$$V'_R = K_c \cdot V_S \tag{4}$$

$$v_i = v_0 \cdot \frac{V_\mathrm{M}}{V_\mathrm{M} + K_\mathrm{c} \cdot V_\mathrm{S}} \tag{5}$$

Uvrštavanjem jednadžbe (5) u jednadžbu (2) dobije se:

$$t_{\mathrm{R},i} \cdot v_0 = V_\mathrm{M} + K_\mathrm{c} \cdot V_\mathrm{S} \tag{6}$$

Umnožak vremena zadržavanja komponente i protoka pokretne faze jednak je volumenu zadržavanja komponente [6,7]:

$$V_{\mathrm{R},i} = V_\mathrm{M} + K_\mathrm{c} \cdot V_\mathrm{S} \tag{7}$$

Uzimajući umjesto omjera koncentracija tvari u dvjema fazama omjer množina (n_S za nepokretnu i n_M za pokretnu fazu), definira se još jedna bitna kromatografska veličina; *faktor* zadržavanja [1,6,7]:

$$k_i = \frac{n_{\mathrm{S},i}}{n_{\mathrm{M},i}} \tag{8}$$

Prikazujući množine kao umnožak koncentracije i volumena dobije se:

$$k_i = \frac{c_{\mathrm{S},i} \cdot V_\mathrm{S}}{n_{\mathrm{M},i} \cdot V_\mathrm{M}} \tag{9}$$

iz čega je, uvrštavajući jednadžbe (1) i (7), lako dobiti najčešće korišteni izraz za faktor zadržavanja:

$$k_i = \frac{V_{\mathrm{R},i} \cdot V_\mathrm{M}}{V_\mathrm{M}} \tag{10}$$

Uz konstantnost protoka, volumni parametri mogu se prevesti u parametre vremena zadržavanja:

$$k_i = \frac{t_{\mathrm{R},i} \cdot t_0}{t_0} \tag{11}$$

Iz izraza (11) jasno se vidi da faktor zadržavanja u biti predstavlja omjer vremena kojeg uzorak provede u nepokretnoj fazi i onog provedenog u pokretnoj fazi. Za razliku od vremena zadržavanja, faktor zadržavanja ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, pa je stoga često prikladniji izraz za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Ujedno, poznavanje faktora zadržavanja različitih komponenti dobar je pokazatelj njihovog razdjeljivanja odabranom kromatografskom metodom.[8] Mjera sposobnosti razdjeljivanja naziva se selektivnost, α, i

definirana je kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi komponenta koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}; \qquad k_2 \geq k_1 \tag{12}$$

Selektivnost, jednako kao i faktor zadržavanja, ovisi o sastavu nepokretne i pokretne faze, ali i o temperaturi sustava.[9] U slučaju kada selektivnost poprima vrijednost 1, razdvajanje komponenti nije moguće, jer pri tim uvjetima analize ne postoji kromatografski bitna razlika između ispitivanih komponenti.

2.3.3 Razlučivanje

Osim selektivnosti, koja je više kvalitativna mjera razdvajanja, kao mjera kvantitativnog razdvajanja koriste se razlučivanje, R_S, i broj teorijskih odsječaka, N.

Putovanjem uzorka kroz kolonu dolazi do njegove raspodjele oko središnje maksimalne vrijednosti.[7,9-11] Područje raspodjele naziva se zonom komponente i, prema teoriji odsječaka, širi se s udaljenošću uzorka od ulaza u kolonu, odnosno s vremenom koje komponenta provede u koloni. Širina zone određuje kromatografsku djelotvornost kolone; uža zona – djelotvornija kolona. Djelotvornost kolone može se pak izraziti bilo *brojem teorijskih odsječaka* (eng. *number of theoretical plates*; *N*), bilo *visinom ekvivalentnom teorijskom odsječku* (eng. *height equivalent to a theoretical plate*; *HETP*). Prema definiciji, teorijski odsječak je hipotetska zona unutar koje dolazi do potpune ravnoteže između dviju faza.

Uz pretpostavku idealne elucije, raspodjela unutar kromatografskih zona biti će Gaussova normalna raspodjela, a odzivi analize simetrične Gaussove funkcije. Tada se djelotvornost kolone može izraziti u terminima vremena zadržavanja komponente i standardne devijacije njene raspodjele oko centra zone. Broj teorijskih odsječaka u tom slučaju jednak je:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \tag{13}$$

Standardna devijacija Gaussove krivulje raspodjele odgovara njenoj poluširini u točkama infleksije[12] (Slika 1). U kromatografskoj praksi ponekad se, umjesto vrijednosti standardne devijacije, rabe vrijednosti širina, kako u točki infleksije tako i u nekim drugim točkama;

primjerice na poluvisini kromatografske krivulje ili pak pri baznoj liniji. Uzimajući u obzir odnose tih širina i standardne devijacije funkcije raspodjele:

$$w_{ti} = 2\sigma \tag{14}$$

$$w_b = 4\sigma \tag{15}$$

$$w_{0,5} = 2,355\sigma \tag{16}$$

broj teorijskih odsječaka može se izraziti kao:

$$N = 4\left(\frac{t_R}{w_{ti}}\right)^2 = 5,54\left(\frac{t_R}{w_{0,5}}\right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \tag{17}$$

Simbolom w_{ti} označena je širina krivulje u točkama infleksije, w_b označava širinu krivulje pri baznoj liniji, a $w_{t0,5}$ onu na polovici visine kromatografske krivulje.

Ponekad se za izračunavanje broja teorijskih odsječaka može koristiti omjer visine kromatografske krivulje, *h*, i površine ispod krivulje, *A*:

$$N = 2\pi\left(t_R \frac{h}{A}\right)^2 \tag{18}$$

Visina ekvivalentna teorijskom odsječku računa se pak kao omjer duljine kromatografske kolone, *L*, i broja teorijskih odsječaka:

$$HETP = \frac{L}{N} \tag{19}$$

odnosno, izraženo preko standardne devijacije raspodjele mase komponente unutar kromatografske zone[7]:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L} \tag{20}$$

Ukoliko se umjesto vremena zadržavanja, pri izražavanju djelotvornosti kolone koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja, t'_R, u obzir se uzima širenje zone do kojeg dolazi isključivo na nepokretnoj fazi. Tako izražen broj odsječaka naziva se *brojem efektivnih teorijskih odsječaka* (engl. *number of effective theoretical plates*; N_{ef}):

$$N_{\text{ef}} = \left(\frac{\sigma^2}{L} \right)^2 \tag{21}$$

Odnos između broja efektivnih teorijskih odsječaka i broja teorijskih odsječaka dan je izrazom:

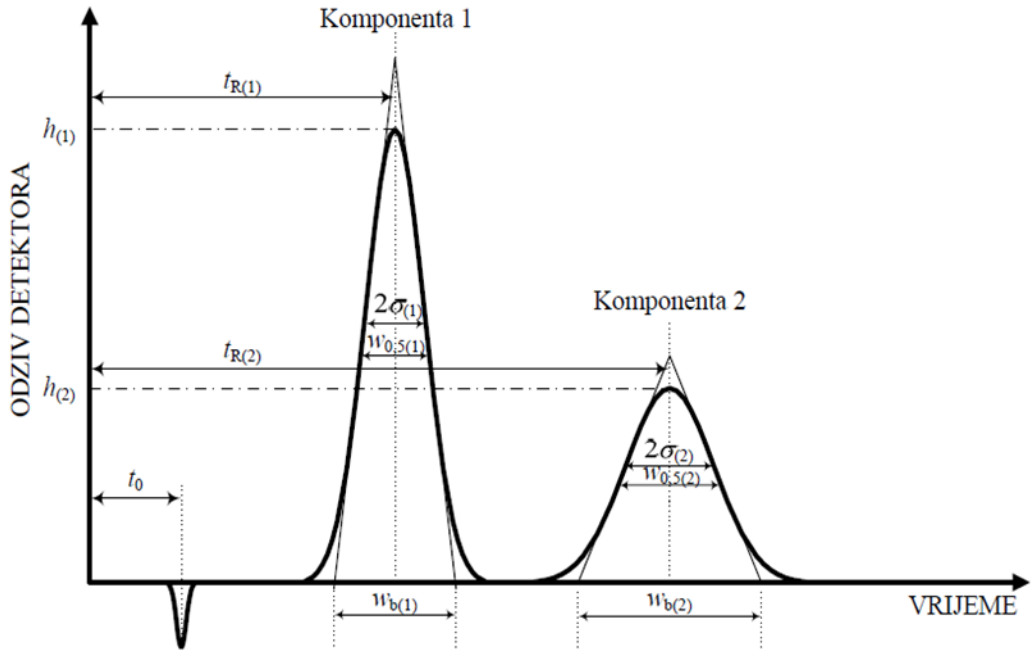
$$N_{ef} = N \left(\frac{k}{1+k} \right)^2 \tag{22}$$

Razlučivanje je pak jednako omjeru udaljenosti vremena zadržavanja dviju susjednih komponenti i dvostruke vrijednosti sume standardnih devijacija krivulja odziva:

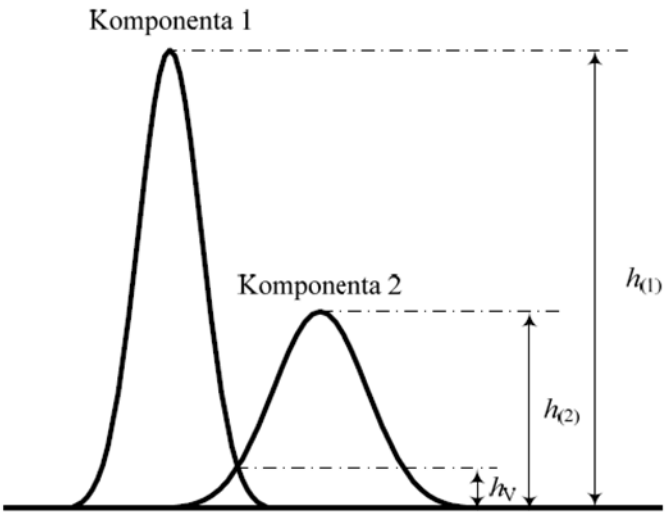
$$R_{\text{s}} = \frac{t_{\text{R},2} - t_{\text{R},2}}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \tag{23}$$

Slično kao i kod izračuna broja teorijskih odsječaka, uvažavajući odnose (14), (15) i (16), razlučivanje se može računati preko širina krivulja odziva:

$$R_{\text{s}} = \frac{t_{\text{R}(2)} - t_{\text{R}(1)}}{w_{ti(1)} + w_{ti(2)}} = 1{,}18 \frac{t_{\text{R}(2)} - t_{\text{R}(1)}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} = \frac{t_{\text{R}(2)} - t_{\text{R}(1)}}{w_{b(1)} + w_{b(2)}} \tag{24}$$



Slika 1. Shema odziva kromatografske analize s naznačenim karakterističnim veličinama



Slika 2. Procjena razlučivanja na temelju visina susjednih krivulja i njihove preklopljenosti

Ponekad, razlučivanje se može procijeniti koristeći vrijednosti visina kromatografskih krivulja, *h*, i visine njihovog eventualnog preklopa[6] (Slika 2):

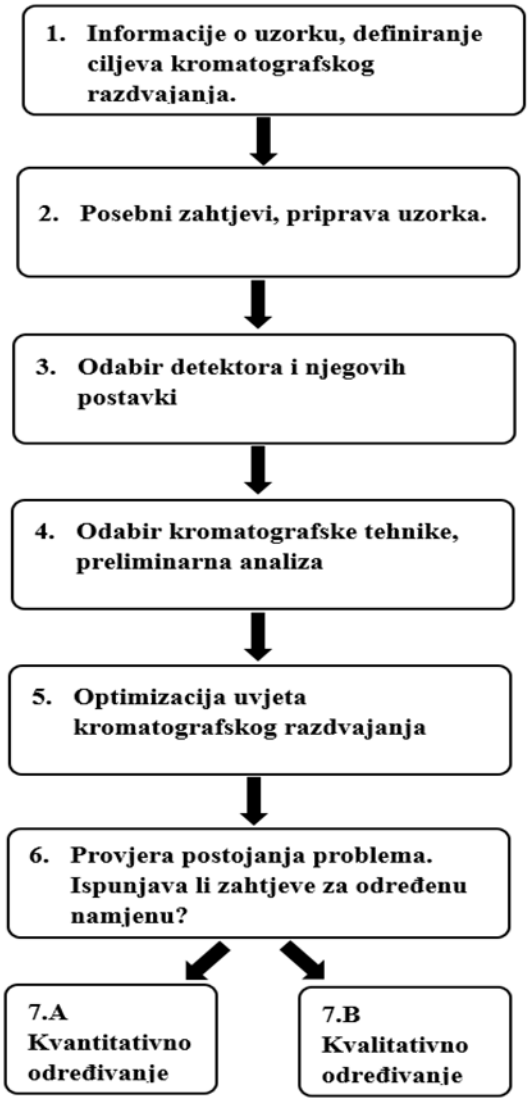
$$R_S \approx 0{,}1\left(\frac{\bar{h}}{h_v}\right); \qquad \bar{h} = \frac{h_1 + h_2}{2} \tag{25}$$

Većina kromatografičara smatra da je za kvalitativnu analizu uzoraka potrebno postići vrijednosti razlučivanja veće od 1,5[11-15], dok neki za krivulje koje znatnije odstupaju od Gaussove funkcije razdiobe predlažu da minimalna potrebna vrijednost razlučivanja bude 2.[1]

2.4 Razvoj kromatografskih metoda

Kako bi se utvrdio kemijski sastav uzorka, potrebno je imati metodu za njegovo određivanje. Sastojci uzorka se često mogu odrediti s nekoliko različitih metoda. Izbor metode ovisi o nizu čimbenika kao što su kemijska svojstva analita, njegova koncentracija, matrica uzorka, cijena i brzina analize, zahtjevi mjerenja (kvalitativna ili kvantitativna analiza) i broj uzoraka.

Razvoj kromatografskih metoda obično se provodi prema shemi na slici 3. Vidljivo je da se razvoj kromatografskih metoda može podijeliti u 6 koraka.



Slika 3. Shematski prikaz razvoja kromatografskih metoda.

Korak 1

Prije razvoja metode potrebno je prikupiti informacije o uzorku poput broja sastojaka koje je potrebno odrediti u uzorku i njihove kemijske strukture, UV spektra, koncentracijskog područja sastojaka u uzorcima od interesa i sl. Potrebno je definirati ciljeve analize, poput: definirati da li će se provoditi kvalitativna analiza ili kvantitativna, da li je potrebno postići razdvajanje svih sastojaka uzorka ili samo nekih, definirati zahtjeve za točnošću, preciznošću, osjetljivošću i sl., definirati matrice za koje metoda mora biti prikladna te postaviti zahtjeve za vremenskim trajanjem analize. Jedan od najčešćih ciljeva u

kromatografiji je postizanje potpunog razdvajanja analita od onih sastojaka koji bi smetali daljnjoj analizi. Pri definiranju ciljeva kromatografskog razdvajanja uzima se u obzir očekivani broj uzoraka, dostupnost kromatografske opreme (detektori, kolone, mogućnost gradijentnog eluiranja i sl.) te vještine analitičara.[8]

Ciljevi se mogu ostvariti pravilnim odabirom parametara kao što su: vrsta nepokretne faze, sastav pokretne faze, temperatura tijekom kromatografskog razdvajanja, dimenzije kolone, protok pokretne faze, količina analita koja se unosi u kromatografski sustav, način i postavke detekcije, priprema uzorka i sl.

Korak 2

Neki uzorci mogu se direktno unijeti u kromatografski sustav, što je vrlo praktično i osigurava veću preciznost rezultata. Ipak, većina uzoraka zahtjeva pripravu, kao što je razrjeđivanje, podešavanje pH-vrijednosti, dodavanje unutarnjeg standarda, a ukoliko je uzorak krutina potrebno ga je otopiti ili ekstrahirati analit. Kod nekih uzoraka potrebno je uzorak koncentrirati, ukloniti interferencije ili tvari iz uzorka koje bi mogle uzrokovati oštećenje kromatografske kolone. Stoga je vrlo važno poznavati prirodu matrice i vjerojatne koncentracije analita.

Korak 3

Odabir detektora i njegovih postavki. Tijekom razvoja metode, prije prvog unošenja uzorka, potrebno je izabrati detektor. Detektor se bira ovisno o sastojcima koji će se određivati i njihovim kemijskim svojstvima. Kod ionske kromatografije na izboru su konduktometrijski detektor, UV/VIS detektori, elektrokemijski detektori (mogućnost direktne kulometrije, amperometrijske detekcije i pulsne amperometrijske detekcije), a u novije vrijeme i spektrometar masa.

Korak 4

Na temelju informacija o uzorku i ciljeva kromatografskog razdvajanja, odabire se kromatografska tehnika. Kreće se s preliminarnom analizom, koja se obično provodi kod uobičajenih početnih uvjeta. Odabire se kolona (dimenzije, veličina čestica, nepokretna faza), pokretna faza, protok pokretne faze, temperatura, volumen injektiranja.

Korak 5

Nakon preliminarne analize, slijedi optimizacija uvjeta kromatografskog razdvajanja, odnosno uvjeti se sistematično mijenjaju kako bi se postiglo što bolje razdvajanje sastojaka. U većini slučajeva uvjeti se optimiraju metodom pokušaja i pogreške. Kod ionske kromatografije najčešće se optimira sastav pokretne faze. Sastav pokretne faze utječe na razlučivanje, vrijeme trajanja analize, asimetriju kromatografskih krivulja itd. Ispituju se izokratični i gradijentni uvjeti eluiranja kako bi se ispunili postavljeni ciljevi iz točke 1. Prilikom optimizacije uvjeta, osim razlučivanja (R_S > 1,5) koje je primarni zahtjev te trajanja analize, metoda mora zadovoljiti i ostale izvedbene karakteristike, kao što su asimetrija pika, prikladan tlak u sustavu, a poželjno je i da utrošak otapala bude što manji.

Ukoliko se radi sa zahtjevnijim uzorcima ili ukoliko su postavljeni strogi ciljevi kromatografskog razdvajanja, potreban je velik broj eksperimenata kako bi se postiglo zadovoljavajuće razdvajanje. U nekim slučajevima striktno eksperimentalni pristup razvoju metode nije izvediv zbog velikog utroška vremena i financijskih troškova. Stoga su se krajem 1980-ih počele razvijati računalne simulacije kao pomoć u razvoju metoda. Računalne simulacije zahtijevaju manji broj eksperimentalnih analiza, a omogućuju predviđanje kromatografskog razdvajanja za veliki skup različitih profila eluiranja. Na taj način najdugotrajniji dio razvoja metode znatno se skraćuje.

Korak 6

U zadnjem dijelu razvoja metode, potrebno je provjeriti ponovljivost kromatograma, tj. razdvajanja. Također, provjerava se da li metoda zadovoljava postavljene zahtjeve. Utvrđuje se da li je metoda robusna te postoje li problemi koji bi mogli smetati prilikom rutinskog rada. Ukoliko se radi o kvantitativnoj metodi određivanja, izrađuje se kalibracijski dijagram te se metoda validira.[16]

2.5 Ionska kromatografija

Ionska kromatografija (eng. *ion chromatography*, IC) je separacijska tehnika u kojoj se odjeljivanje uglavnom temelji na razlici u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni na nepokretnoj fazi. Primjenjuje se za analizu anorganskih aniona i kationa, a razvojem novih detektora upotreba se proširila na analizu organskih kiselina, ugljikohidrata, aminokiselina i proteina.[1]

Tijekom razvoja ili unapređivanja IC metoda potrebno je pronaći optimalne radne uvjete koji će zadovoljiti postavljene kvalitativne i kvantitativne zahtjeve. Zahtjevi koje IC metoda mora zadovoljiti obično se odnose na kvalitetu razdvajanja i vrijeme trajanja analize. Kvaliteta razdvajanja i vrijeme trajanja analize pak ovise o uvjetima u sustavu, prvenstveno o vrsti nepokretne faze, sastavu eluensa, protoku i temperaturi.[16]

2.5.1 Povijesni razvoj ionske kromatografije

Ionsku su kromatografiju kao novu analitičku metodu prvi put predstavili Small, Stevens i Bauman.[18] Za vrlo kratko vrijeme ionska se kromatografija razvila od postupka za određivanje nekoliko kationa i aniona u modernu tehniku za određivanje niza ionskih vrsta. Godine 1979. Fritz[19] je opisao tehniku za određivanje anorganskih aniona u kojoj je kolonu za odjeljivanje izravno vezao s konduktometrijskom ćelijom. U tom su ionskom kromatografskom sustavu nepokretnu fazu činili ionski izmjenjivači niskog kapaciteta izmjene, tako da se mogao upotrijebiti eluens niske ionske jakosti. Molarna je provodnost određivanih iona također bila niska, te samim time nije bila moguća osjetljivija detekcija analita. Koncem 1970-ih ionska je kromatografija prvi put upotrijebljena za analizu organskih iona. Zahtjevi za kromatografskom tehnikom koja bi omogućila odjeljivanje i analizu organskih kiselina doveli su do razvoja metode temeljene na mehanizmu ionskog isključivanja koju su prvi opisali Wheaton i Bauman.[20] Širina primjene ionske kromatografije uvelike se povećala uvođenjem elektrokemijskih i spektrometrijskih detektora. Pulsna ampermetrijska detekcija olakšala je analizu ugljikohidrata.[21] Primjena poslijekolonske obrade uzorka u kombinaciji s fotometrijskim detektorom omogućila je određivanje teških i prijelaznih metala. Osobitu je popularnost ionska kromatografija stekla uvođenjem segmenata za prigušivanje pozadinskog šuma, tzv. supresora: 1970-ih diskontinuirani kemijski, 1980-ih kontinuirani kemijski te 1990-ih samoregenerirajući elektrokemijski supresori.

Ovakav je razvoj ionskoj kromatografiji omogućio da se uvrsti u moderne analitičke tehnike, te da postane sastavni dio moderne anorganske i organske analize.[4]

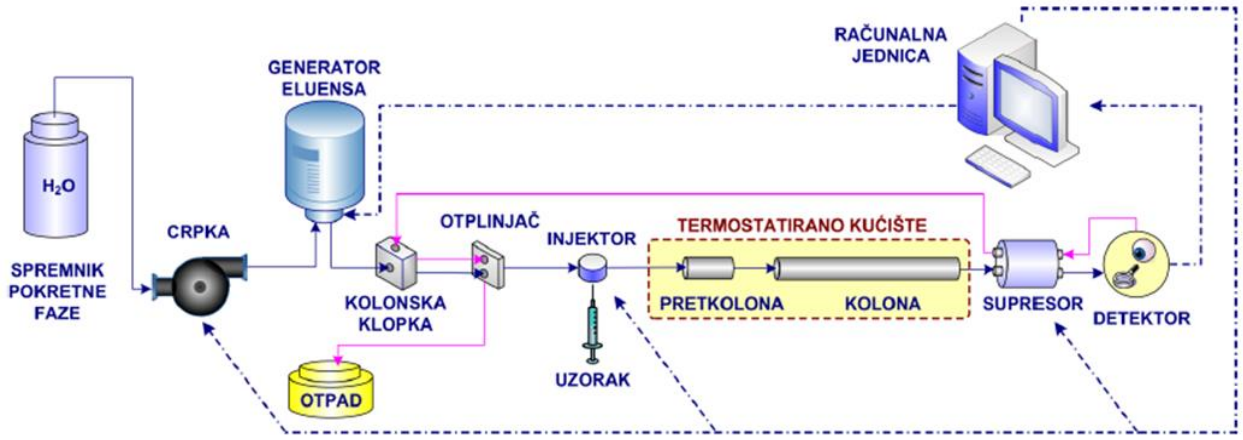
2.5.2 Princip ionskog kromatografskog razdvajanja

Pokretna faza je kapljevina, a nepokretna faza ionski izmjenjivač smješten u koloni. Ionski izmjenjivač može biti u krutom ili gel obliku, a sastoji se od nosača, funkcionalne skupine i protuiona.

Kada je ionski izmjenjivač u kontaktu s otopinom, protuioni izmjenjivača izmjenjuju mjesta s ionima iz otopine koji imaju naboj istog predznaka (kompeticijski ioni). Nakon što ion iz otopine zamijeni na aktivnom mjestu postojeći protuion, zadržava se na izmjenjivaču uslijed elektrostatskih sila. Ukoliko uzorak sadrži više sastojaka koji imaju različit afinitet prema izmjeni na nepokretnoj fazi, svaki od tih sastojaka bit će na nepokretnoj fazi zadržan različit vremenski period. Na taj način dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka na ionskom izmjenjivaču.[16,17]

2.5.3 Ionski kromatografski sustav

Na slici 4 prikazan je blokovski dijagram osnovnih sastavnica modernog ionskog kromatografa s konduktometrijskom detekcijom.



Slika 4. Shema modernog IC sustava s konduktometrijskom detekcijom.[4]

Voda se kao pokretna faza iz spremnika crpi visokotlačnom crpkom s prigušivačem pulsova i potiskuje dalje kroz sustav. Eluens željene koncentracije nastaje elektrolitičkim putem u računalno kontroliranoj jedinici otkuda nastavlja dalje kroz sustav. Ako sustav sadrži jedinicu

za generiranje eluensa, u pravilu se odmah iza nje mora nalaziti tzv. kolonska klopka, koja uklanja pojedine smetajuće ionske vrste te reducira trend povećanja pozadinskog šuma s porastom koncentracijskog gradijenta eluensa. Nakon kolonske klopke iz eluensa se uklanjaju potencijalno prisutni plinovi. U injektorskoj jedinici dolazi do uvođenja uzorka u tok pokretne faze kojim dalje biva nošen kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu, a unutar kojih dolazi do odjeljivanja sastojaka uzorka. Pretkolona i kolona najčešće se nalaze u termostatiranom kućištu. Na izlasku iz kolone nalazi se elektrokemijski supresor koji omogućava smanjenje pozadinskog šuma i pojačanje signala analita te detektor za mjerenje signala. Signal detektora sakuplja se i obrađuje u računalnoj jedinici. Iako ionski kromatograf ne koristi izrazito visoke tlakove, poput primjerice tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), izvedbeni materijali moraju biti dovoljno čvrsti. Stoga su dijelovi koji dolaze u dodir s pokretnom fazom obično izrađeni od polietereterketona i drugih polimera te materijala poput safira, rubina ili čak keramike, a koji se koriste u glavama crpki, sigurnosnim ventilima i injektoru.[4]

2.5.4 Prednosti IC-a nad ostalim metodama detekcije/kvantifikacije iona

U analitičkoj se kemiji određivanje ionskih vrsta smatra tipičnim problemom koji ima nekoliko različitih rješenja. I dok u području analize kationa već dugo imamo brze i osjetljive analitičke metode poput atomske apsorpcijske spektroskopije (eng. *atomic absorption spectroscopy*, AAS) i induktivno spregnute plazme (eng. *induced coupled plasma*, ICP), u području analize aniona imamo nedostatak odgovarajućih metoda visoke osjetljivosti. Uobičajene kemijske metode poput titracije, gravimetrije, turbidimetrije i kolorimetrije zahtijevaju dosta rada i vremena, a ponekad mogu biti i problematične. Za razliku od njih, ionska kromatografija nudi brzo, selektivno i simultano određivanje većeg broja analita uz zavidnu osjetljivost.[1]

2.5.4.1 Brzina

Vrijeme potrebno za izvođenje analize postaje sve važniji faktor jer su povećani troškovi proizvodnje zbog visoke kvalitete proizvoda i dodatni napori za zaštitu okoliša doveli do značajnog porasta broja uzoraka za analizu. Uvođenjem kolone s visokom učinkovitosti separacije prosječno vrijeme analize se može skratiti na otprilike 10 minuta. Dakle, kvantitatvni

rezultati se dobiju praktički u djeliću vremena potrebnog za analizu klasičnim kemijskim metodama.[1]

2.5.4.2 Osjetljivost

Uvođenje mikroprocesorske tehnologije u kombinaciji s modernom visokoefektivnom stacionarnom fazom rezultiralo je detektiranjem iona u srednjim i nižim koncentracijskim područjima bez pretkoncentracije. Granica detekcije za jednostavne anorganske anione i katione iznosi oko 10 μg/L uz injekcijski volumen od 50 μL. Čak se i anionski i kationski sastav ultračiste vode može analizirati uz prethodnu pretkoncentraciju upotrebom određenih kolona. Korištenjem pretkoncentracijskih tehnika granica detekcije se može smanjiti na koncentracijska područja u iznosu ng/L. Instrumenti za mjerenje tako niskih koncentracija su vrlo sofisticirani. Visoka osjetljivost u pmol koncentracijskom području postignuta je u analizi ugljikohidrata i aminokiselina korištenjem integrirane pulsne amperometrijske detekcije.[1]

2.5.4.3 Selektivnost

Selektivnost ionske kromatografije osigurana je odabirom prikladnog separacijskog i detekcijskog sustava. Visok stupanj selektivnosti postignut je korištenjem specifičnih detektora poput UV/Vis detektora kod analizu nitrita u prisutnosti visoke koncentracije klorida. Nova dostignuća na području poslijekolonske derivatizacije pokazuju da određene klase spojeva poput prijelaznih metala, zemnoalkalijskih metala, polivalentnih aniona, silikata, itd., mogu biti detektirani s visokom selektivnošću. Takvi primjeri objašnjavaju zašto priprema uzoraka za ionsku kromatografiju obično uključuje samo jednostavno razrjeđenje i filtraciju uzorka. Visok stupanj selektivnosti olakšava identifikaciju nepoznatih sastojaka uzorka.[1]

2.5.4.4 Simultana detekcija više analita

Glavna prednost ionske kromatografije, osobito u usporedbi s drugim instrumentalnim metodama, poput fotometrije ili AAS, je sposobnost da simultano detektira višekomponentni uzorak. Informacije o anionima i kationima u uzorku se dobivaju u kratkom vremenu te se na taj način izbjegavaju dugotrajni testovi. Međutim, sposobnost ionske kromatografije za simultanu kvantifikaciju je ograničena jako velikim razlikama u koncentracijama između različitih komponenti uzorka. Na primjer, glavni i minorni sastojak u matrici otpadne vode može biti

simultano detektiran ako im je omjer koncentracija manji od 1000:1. U suprotnom, uzorak mora biti razrijeđen i analiziran u zasebnoj kromatografskoj analizi.[1]

2.5.4.5 Stabilnost kolone

Iako stabilnost kolone nema veze s prednostima nad ostalim analitičkim tehnikama, ona je značajna karakteristika svake kromatografske metode. Stabilnost kolone značajno ovisi o tipu materijala koji je korišten za kolonu. Za razliku od kolona na bazi silicijeva dioksida koje se obično koriste za HPLC, materijali poput polistiren/divinilbenzen kopolimera prevladavaju kao nosivi materijal u ionskoj kromatografiji. Njihova visoka pH stabilnost omogućava korištenje jakih kiselina i baza kao eluensa, što je preduvjet za široku upotrebu ove metode. S druge strane, jake kiseline i baze mogu služiti prilikom procesa ispiranja. Međutim, većina organskih polimera je kompatibilno s organskim otapalima, poput metanola i acetonitrila, što se može koristiti za uklanjanje organskih zagađenja. Nepokretne faze na bazi polimera imaju nisku osjetljivost za kompleksne matrice poput otpadne vode, hrane ili tjelesnih tekućina tako da je jednostavno razrjeđenje uzorka deioniziranom vodom prije filtracije najčešće jedini postupak priprave.[1]

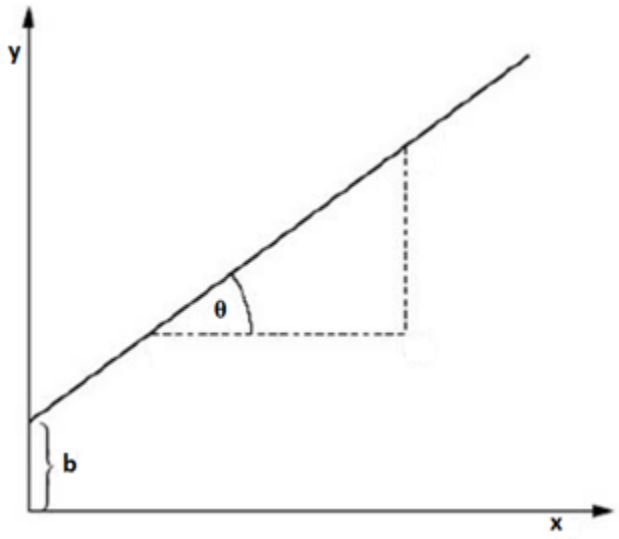
3 KALIBRACIJA

Kalibracija je temelj svakog mjerenja i to ju čini jednom od najvažnijih koraka kemijske analize. Kako se istražuju i razvijaju sve kompleksniji kemijski sustavi, tako i kalibracija postaje predmet sve većih istraživanja i razmatranja. Svrha kalibracije je uklanjanje ili minimiziranje pogreške mjernog sustava, a kao rezultat kalibracijskog postupka dobiva se kalibracijska krivulja ili pravac za jednokomponentne sustave te kalibracijska površina za višekomponentne sustave. Idealan slučaj je kad se dobije linearna ovisnost odziva instrumenta o koncentraciji. Kalibracijom se mjere signali što ih daju standardni uzorci poznate koncentracije te se prikazuje matematički ili grafički kako bi se iz toga mogla izračunati nepoznata koncentracija analita. Očekuje se da ulazni podaci budu oslobođeni pogreške ili da ta pogreška bude zanemariva u usporedbi s pogreškama vrijednosti izlaznih podataka jer o tome ovisi točnost konačnog rezultata. U ovom poglavlju ćemo se usmjeriti na tri kalibracijske metode.[22]

3.1 Metoda vanjskog standarda

Metoda vanjskog standarda je jedna od najčešće korištenih metoda kalibracije. Koristi se kada je utjecaj matice na određivanje analita zanemariv i ne ovisi o koncentraciji analita. Pod utjecajem matice misli se na promjene signala zbog sastojka uzorka koji nije analit. Prvi korak u metodi vanjskog standarda je pripravljanje niza standardnih otopina koje sadrže poznatu koncentraciju analita te se u idućem koraku očitava odziv instrumenta u ovisnosti o koncentraciji analita u otopinama. Standardne otopine bi trebale pokrivati koncentracijsko područje u kojem je očekivana koncentracija analita iz uzorka. Kalibracijski dijagrami nisu uvijek linearni nego su često kod visokih ili niskih koncentracija krivulje, a linearni dio je negdje u sredini takvog dijagrama te ga nazivamo dinamičkim područjem. Kalibracijski dijagram se dobiva grafičkim prikazom ovisnosti dobivenih rezultata, odnosno signala instrumenta, u odnosu na različite koncentracije analita u standardnim otopinama. Koncentracija analita u nepoznatom uzorku se određuje iz kalibracijskog dijagrama ili se izračunava iz poznate jednadžbe kalibracijskog dijagrama na temelju dobivenog signala instrumenta za nepoznati uzorak.[2,23,24]

Princip na kojem se temelji metoda vanjskog standarda i parametre koje sadrži mogu se vidjeti na slici 4 koja prikazuje linearnu ovisnost analita i odziva instrumenta.



Slika 4. Kalibracijski pravac koji ne prolazi kroz ishodište.

Signal dobiven na instrumentu označen je s *y*, *x* je koncentracija analita, *b* je signal slijepe probe (tj. odsječak na ordinati) dok je *a* nagib pravca:

$$a = \mathrm{tg}\theta \tag{26}$$

za ispitivani sustav koji odgovara osjetljivosti postupka. Odziv slijepe probe definiran je kao odziv instrumenta kada nije prisutan analit u uzorku. Slijepa proba služi za korekciju izmjerene vrijednosti koncentracije analita u nepoznatom uzorku te se na taj način uklanja pogreška nastala utjecajem instrumenta ili nečistoćom reagensa, opreme ili laboratorijskog posuđa.

Metoda vanjskog standarda omogućava analizu niza uzoraka na temelju samo jedne kalibracijske krivulje. Ovo je važna prednost u laboratorijima gdje treba analizirati puno uzoraka. Unatoč tom svojstvu, postoji ozbiljno ograničenje korištenja metode vanjskog standarda. Ako postoji utjecaj matice standarda i matice uzorka na vrijednost nagiba pravca (*a*), tada ova metoda nije povoljna, a to možemo vidjeti i na slici 5.[2,25,26]



Slika 5. Prikaz utjecaja matice uzorka i matice standarda na nagib pravca.

3.2 Metoda standardnog dodatka

Ako je utjecaj matice na određivanje analita znatan, koristi se metoda standardnog dodatka. Kalibracija i mjerenje se provode unutar iste matice te se na taj način smanjuje pogreška nastala poradi prisutnih interferencija.

Metoda standardnog dodatka se sastoji od najmanje tri koraka. Prvi je mjerenje signala analita iz uzorka, drugi dodavanje poznate koncentracije analita, a treći ponovno mjerenje signala analita. Sa samo jednim dodatkom poznate koncentracije analita nužna je pretpostavka da smo u linearnom dijelu odnosa signala i koncentracije analita. Slijedeći dodaci standardne otopine analita omogućuju veću preciznost i dokazuju ili opovrgavaju našu pretpostavku o linearnosti odziva prema koncentraciji. Najprecizniji rezultati se dobiju ako je koncentracija prvog dodatka jednaka najmanje dvostrukoj koncentraciji analita u uzorku.[2,25,26]

3.3 Metoda unutarnjeg standarda

Ova metoda se koristi kada je osjetljivost instrumentalne metode promjenjiva s vremenom, kada je moguć gubitak uzorka za vrijeme određivanja te kod nestabilnog rada instrumenta, odnosno kada se količina uzorka i signal instrumenta mijenjaju od mjerenja do

mjerenja iz nekog razloga koji je teško ili nemoguće kontrolirati. Često se upotrebljava u kromatografskim određivanjima, emisijskim spektrometrijama i rendgenskoj difrakciji.[25]

Za razliku od metode unutarnjeg standarda, uspješna primjena metode vanjskog standarda i metode standardnog dodatka uvelike ovisi o sposobnosti analitičkog kemičara da osigura dovoljnu ponovljivost za uzorke i standarde. Ukoliko svi uzorci i standardi ne mogu biti jednako tretirani, tada se to odražava na točnost i preciznost. Najbolje se to može shvatiti na slijedeći način. Ako je analit prisutan u hlapljivom otapalu, njegova koncentracija će se povećavati kako otapalo isparava. Međutim, ako imamo uzorak i standard s istom koncentracijom analita i identičnim signalom, ako oboje iskuse isparavanje jednake količine otapala, i dalje će imati jednake koncentracije analita i identične signale. Ali ako identični standard i uzorak izgube različitu količinu otapala, njihove koncentracije i signali više neće biti isti. U tom će slučaju metoda vanjskog standarda kao i metoda standardnog dodatka rezultirati pogreškom pa je prikladno koristiti metodu unutarnjeg standarda.

Unutarnji standard je tvar dodana uzorku, slijepoj probi i svim standardnim otopinama te je njegova koncentracija poznata i konstantna. Važno je napomenuti da je unutarnji standard tvar potpuno različita od analita te se njegov signal mjeri istovremeno sa signalom analita tako da se pripremi poznata smjesa unutarnjeg standarda i analita za mjerenje relativnog signala detektora. S obzirom da su analit i unutarnji standard jednako tretirani, na njihov omjer signala neće utjecati smanjena razina ponovljivosti. S istim unutarnjim standardom moguće je u jednom kromatografskom određivanju odrediti koncentraciju svih separiranih komponenti uz prethodno određivanje omjera odziva za svaku komponentu smjese.

4 VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira da je određena analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Postupak za razvijanje i usvajanje nove metode ili već postojeće prerađene metode zahtijeva dovoljan broj podataka kojima se dokumentira da je metoda valjana, a procjenjuje kvaliteta, pouzdanost i konzistentnost analitičkih rezultata. Osim metode, validirati se mogu i podatci te uzorak i uzorkovanje.

Validaciju treba provoditi pri uvođenju nove metode, prilikom prenamjene ili modifikacije postojeće metode, nakon svake promjene ili većeg servisa instrumenta, za utvrđivanje standardnog radnog postupka, za nenormirane metode ili kada se normirana metoda želi upotrijebiti izvan normiranog područja, ako podatci kontrole kvalitete pokazuju da se rezultati dobiveni normiranom metodom mijenjaju s vremenom, itd.

Provedba validacije dijeli se u tri odvojena, ali međusobno povezana koraka. U prvom koraku se vrši karakterizacija ispitnog postupka gdje se moraju definirati i opisati koji se specifični zahtjevi postavljaju pri konkretnom određivanju izabranom metodom i potrebno je karakterizirati metodu ispitivanjem njezinih glavnih izvedbenih značajki. U drugom koraku se vrši usporedba sa zahtjevima korisnika, a u zadnjem koraku slijedi izjava o udovoljavanju zahtjevima.

Validacijom se određuju izvedbene značajke metode uzevši u obzir sve vanjske i unutarnje čimbenike koji na njih utječu te se nastoji smanjiti njihov utjecaj. Ti čimbenici mogu biti:

- tehnički (povezani s izvedbenim i radnim značajkama ispitivanja i mjerne opreme te s postupcima koji prethode ispitivanju, kao što je postizanje homogenosti uzorka tijekom uzorkovanja i priprave uzorka za analizu),
- ljudski (odnose se na osposobljenost osoblja),
- iz okoline (odnose se na atmosferske prilike poput temperature, tlaka i vlage, te onečišćenja ili zagađenja iz okoliša).

Analitički parametri koji se određuju u postupku validacije su točnost, preciznost, linearnost, selektivnost/specifičnost, granica detekcije i granica kvantifikacije, osjetljivost i stabilnost.[27]

4.1 Regresijska analiza

Regresijska analiza se bavi opisivanjem ovisnosti jedne varijable o jednoj ili više drugih varijabli. Varijabla od primarnog interesa, čije se varijacije objašnjavaju pomoću varijacija drugih varijabli naziva se zavisnom varijablom, a varijable kojima se objašnjavaju varijacije zavisne varijable nazivaju se nezavisnim varijablama. Model kojim se izražava povezanost između zavisne varijable i odabranog skupa nezavisnih varijabli je regresijski model.

Osnovna težnja u regresijskoj analizi je razvoj prikladnog matematičkog modela za deskriptivne i prediktivne svrhe. Model se može koristiti kako bi se potvrdila teorija o odnosu između varijabli ili se može koristiti za predviđanje općenitih, kontinuiranih funkcija odziva na temelju ograničenog broja mjerenja.[28]

Nedvojbeno je da se u analitičkim laboratorijima kao regresijska analiza najčešće koristi konstruiranje kalibracijskih linija prema podacima dobivenim mjerenjem instrumentalnim metodama analize (npr. grafovi kod kojih su apsorbancija ili emisija u funkcionalnoj ovisnosti o koncentraciji). Idealan slučaj je kad se dobije linearna ovisnost odziva instrumenta o koncentraciji, međutim, nerijetko u praksi nailazimo na kompleksne sustave za koje je moguće primijeniti jedino nelinearne modele.

4.2 Intervali pouzdanosti

Interval pouzdanosti za bilo koju statističku mjeru predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s izvjesnom vjerojatnosti nalazi ta statistička mjera populacije te je omeđen granicama. Ovisno o razini pouzdanosti mijenja se i raspon, tj. granice intervala. Najčešće korišteni intervali pouzdanosti su 95 i 99 %-tni interval pouzdanosti. Što su granice intervala uže, preciznost procjene je veća. Tradicionalno se u literaturi najčešće koristi 95 %-tni interval pouzdanosti, koji je u svezi s opće prihvaćenom razinom statističke značajnosti $P < 0,05$. Što je manja razina pouzdanosti veća je preciznost procjene. Istraživanja provedena na velikom uzorku će dati vrlo uski interval pouzdanosti koji ukazuje na veliku preciznost procjene, s visokom razinom pouzdanosti. Interval pouzdanosti moguće je pridružiti gotovo svakom statističkom pokazatelju.[29]

4.3 Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost je brojčani iskaz kvalitete mjernog rezultata koji ukazuje na raspon vrijednosti unutar kojeg se s određenom vjerojatnošću, tj. uz određenu razinu povjerenja, nalazi prava vrijednost rezultata. Laboratorij mora imati i primjenjivati postupke za procjenu mjerne nesigurnosti za sva umjeravanja i sva kvantitativna mjerenja.

Uzroci mjerne nesigurnosti mogu biti uzorkovanje, uvjeti čuvanja uzorka, utjecaj matice i interferencija, uvjeti mjerenja, čistoća standarda, slučajne varijacije, itd.

Mjerna nesigurnost je raspon unutar kojega očekujemo pravu vrijednost, a iskazuje se standardnim odstupanjem. Prema metodi procjenjivanja, komponentne nesigurnosti se mogu razvrstati u dvije grupe:

- komponente koje se određuju statističkim metodama na temelju eksperimentom dobivene razdiobe učestalosti opetovanim mjerenjima dobivenih mjernih rezultata
- komponentne koje se procjenjuju na temelju specifikacija mjerne opreme, podacima o umjeravanju mjerila, podacima o ranije provedenim sličnim mjerenjima, mjernim podacima drugih laboratorija, podacima o nesigurnosti upotrijebljenih konstanti, te tehničkim podacima proizvođača

4.4 Statistički važni testovi u analitičkoj kemiji

4.4.1 *F*-test

F-testom se ispituje da li je razlika između varijanci dva skupa podataka značajna, a iskazuje se omjerom varijanci, odnosno, kvadrata standardnih devijacija, kao što je prikazano jednadžbom:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \tag{27}$$

gdje je s_1^2 varijanca prvog skupa podataka, a s_2^2 varijanca drugog skupa podataka. Važno je napomenuti da je $s_1 > s_2$ te da se treba paziti na stupnjeve slobode prilikom očitavanja kritične *F*-vrijednosti iz statističke tablice. Ukoliko je dobivena *F*-vrijednost manja od kritične

F-vrijednosti, nema značajne razlike između varijanci dva skupa podataka te se razlika koja se javlja između standardnih devijacija može objasniti kao posljedica slučajnih pogrešaka. U suprotnom slučaju, ako je dobivena *F*-vrijednost veća od kritične *F*-vrijednosti, postoji značajna razlika između varijanci dva skupa podataka.[30,31]

4.4.2 *t*-test

t-test je statistički postupak koji se koristi za određivanje značajnosti razlike između dva uzorka, tj. između dvije aritmetičke sredine. Kada dobijemo aritmetičku sredinu uzorka to je samo procjena aritmetičke sredine populacije (ili prave aritmetičke sredine). Što je uzorak veći i što je pojava koju mjerimo manje varijabilna, to će naša aritmetička sredina uzorka biti bliža pravoj aritmetičkoj sredini. Prema tome, pogreška koja se veže uz svaku aritmetičku sredinu uzorka bit će veća što je pojava koju mjerimo više varijabilna i što je uzorak manji. Kako na varijabilnost neke pojave ne možemo djelovati, a na broj mjerenja možemo, jasno je da možemo povećanjem broja mjerenja smanjivati pogrešku koja se povezuje uz naše mjerenje.
Parametar *t* se računa prema slijedećoj jednadžbi:

$$t = \frac{(\overline{x} - \mu) \cdot \sqrt{N}}{s} \tag{28}$$

Dobivena t-vrijednost se uspoređuje s kritičnom t-vrijednosti koja se za dani stupanj slobode i nivo pouzdanosti očitava u statističkim tablicama. Ako je dobivena t-vrijednost manja od kritične, razlika između dva uzorka nije statistički značajna.[32]

4.4.3 Analiza varijance

Analizu varijance, kao praktičnu tehniku za istraživanje nekih bioloških fenomena, prvi je razvio poznati engleski statističar R.A. Fischer. Danas je analiza varijance vrlo važna i često primjenjivana metoda za istraživanje različitih slučajnih pojava u mnogim znanstvenim područjima.

Analiza varijance se najčešće upotrebljava kada želimo testirati postojanje razlike između aritmetičkih sredina triju ili više uzoraka. Ideja analize varijance sastoji se u razdvajanju varijabilnosti na dva dijela:

- varijabilnost među podacima koji pripadaju različitim grupama, odnosno uzorcima,
- varijabilnost među podacima unutar svake pojedine grupe, odnosno uzorka.

Na početku se postavlja tzv. nulta hipoteza, H_0, koja je pretpostavka o izostanku efekta, tj. da ne postoji razlika među uzorcima u populaciji od interesa (nema razlike u aritmetičkim sredinama). Nulta hipoteza se testira, ali prije njenog testiranja se postavlja alternativna hipoteza, H_1, koja vrijedi ako nulta hipoteza nije istinita.

U postupku primjene analize varijance prvo treba izračunati aritmetičke sredine za svaki uzorak, zatim varijabilnost među ispitanicima između grupa (uzoraka) i varijabilnost među podacima unutar grupa (uzoraka). Potom se *F*-testom ispituje odnos varijabilnosti između grupa i varijabilnosti unutar grupa. Ako je dobivena *F* vrijednost manja od granične, koju možemo pronaći definiranu u brojnim statističkim priručnicima, prihvaća se nulta hipoteza. U suprotnom slučaju se prihvaća alternativna hipoteza.[22]

4.4.4 Testovi za *outliere*

Vrijednosti varijabli koje u velikoj mjeri odstupaju od ostalih nazivamo *outlierima*. Uključivanje *outliera* u statističke izračune dovodi do netočnih i nepreciznih rezultata. Oni su posljedica netočnog mjerenja ili se radi o krivo unesenom podatku. Također, može se raditi i o podatku koji dolazi iz druge populacije. Podatci za kalibraciju moraju biti oslobođeni *outliera* te postoji nekoliko testova za njihovo otkrivanje.[30]

4.4.4.1 Dixonov test (*Q*-test)

Dixonov test se primjenjuje za mali broj parametara, do dvadeset. Ovim testom se uspoređuje sumnjiva vrijednost s vrijednosti koja je najbliža sumnjivoj u odnosu na cijeli raspon vrijednosti, što je prikazano formulama:

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \tag{29}$$

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \tag{30}$$

gdje je *n* broj parametara uzorka, x_n najveća vrijednost, x_1 najmanja vrijednost, a *R* raspon koji se dobije oduzimanjem najmanje vrijednosti od najveće vrijednosti. Dobivena vrijednost *Q* se uspoređuje s kritičnom *Q* vrijednošću koja se nalazi u statističkim tablicama. Ukoliko je dobivena vrijednost *Q* veća od kritične, sumnjiva vrijednost je *outlier* te se odbacuje i možemo smatrati da je posljedica grube pogreške. U suprotnom, sumnjiva vrijednost nije *outlier* te se ne odbacuje.

Dixonov test nije primjenjiv za skupove podataka poredanih po rastućoj vrijednosti od kojih prva dva ili zadnja dva podatka imaju jednaku vrijednost, a smatraju se sumnjivim rezultatima, jer tada u brojniku kod izračuna Dixonove pogreške slijedi da je razlika sumnjive vrijednosti i najbliže vrijednosti jednaka nuli, pa je analogno $Q = 0$.[26,33,34]

4.4.4.2 Grubbsov test

Grubbsov test se, kao i Dixonov, koristi za skup podataka koji se ponaša po normalnoj razdiobi, a formule su slijedeće:

$$G_n = \frac{x_n - \overline{x}}{s} \tag{31}$$

$$G_1 = \frac{\overline{x} - x_1}{s} \tag{32}$$

$\overline{x}$ predstavlja srednju vrijednost uzorka, x_n je najveća, a x_1 najmanja vrijednost uzorka, dok *s* predstavlja standardnu devijaciju uzorka. Ukoliko je dobivena *G*-vrijednost veća od kritične *G*-vrijednosti koja se nalazi u statističkim tablicama, sumnjiva vrijednost je *outlier* te se odbacuje. U suprotnom se sumnjiva vrijednost ne odbacuje jer nije *outlier*.[30,31,33]

4.5 Izvedbene značajke

Izvedbene značajke su kvantitativne veličine koje naznačuju doseg kvalitete kemijskog mjernog procesa i pomažu pri izboru optimalne metode. Služe pri odlučivanju primjenjivosti metode pri specifičnim mjerenjima te se mogu odnositi na metodu i analit.

4.5.1 Preciznost

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istoga homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Iskazuje se kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje ili varijanca. Preciznost je karakterizirana ponovljivošću, međupreciznošću i obnovljivošću.

Ponovljivost se iskazuje rasipanjem rezultata kao kratkoročno standardno odstupanje koje nam govori koliko ponovljenih mjerenja možemo učiniti u nekom vremenu kako bismo postigli željenu razinu preciznosti. Metoda je ponovljiva ako osigurava bliskost rezultata ponovljenih uzastopnih mjerenja istog analita obavljenih u istim mjernim uvjetima (isti mjerni postupak, isti analitičar, instrument, mjesto i vrlo kratko vremensko razdoblje).

Međupreciznost se iskazuje rasipanjem rezultata kao dugoročno standardno odstupanje pri čemu se mogu mijenjati analitičar, oprema, reagensi, itd.

Obnovljivost je bliskost rezultata ponovljenih mjerenja istog analita pri promijenjenim mjernim okolnostima. Pri tome se mijenjaju mjerno načelo, metoda, analitičar, instrument, referentni uzorak, mjesto i vrijeme određivanja. Obnovljivost služi za međulaboratorijske usporedbe, tj. uspoređuje se preciznost između više laboratorija.[27]

4.5.2 Točnost

Mjerenje je točno ako se ne razlikuje od prave vrijednosti, a smatramo ga pogrešnim kada postoji signifikantno odstupanje graničnog prosjeka od prave vrijednosti, što je uzrokovano sustavnom pogreškom.

Postoji nekoliko načina za procjenu točnosti metode:

- uspoređivanjem rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referentnom metodom,
- analizom uzorka poznate koncentracije, npr. certificiranog referentnog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti,
- cijepljenjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala.

4.5.3 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) je kritična vrijednost ili kritična razina neke kemijske varijable, primjerice signala, koncentracije ili količine koja služi da bi se razlikovao kemijski signal od pozadinskog šuma instrumenta.

Granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ)je najmanja količina analita koja se može dovoljno pouzdano kvantitativno odrediti.

Granica detekcije i granica kvantifikacije mogu biti procijenjene, uz danu razinu točnosti i preciznosti, računanjem iz omjera signala i šuma. Omjer signal/šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljivi su omjeri 3:1 za granicu detekcije i 10:1 za granicu kvantifikacije. Drugi način za određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije je statistički. Statistički se granice detekcije i kvantifikacije mogu odrediti na bazi standardne devijacije signala i nagiba.

Formule za računanje granice detekcije i kvantifikacije na temelju standardne devijacije i nagiba su slijedeće:

$$GD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \tag{33}$$

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \tag{34}$$

4.5.4 Linearnost

Linearnost je svojstvo metode da unutar određenog koncentracijskog područja pokazuje linearnu ovisnost odziva o koncentraciji analita u ispitnom uzorku. Određuje se analizom standardnih otopina različitih koncentracija analita te grafičkim prikazom ovisnosti odziva instrumenta o koncentraciji analita. Preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Linearnost je moguće procijeniti matematički i grafički. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca $y = ax + b$ i izračuna koeficijent korelacije R. Nagib pravca **a** je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca b može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $R \geq 0,99$. Za vrlo niske koncentracije prihvaća se i kriterij $R \geq 0,98$.

Mjera podudarnosti (korelacije), odnosno koeficijent korelacije se računa na slijedeći način:

$$R = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \tag{35}$$

pri čemu je:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n} \tag{36}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_i^n y_i}{n} \tag{37}$$

Vrijednosti koeficijenta korelacije nalaze se unutar intervala [-1, 1], a njihov predznak ukazuje na smjer korelacije: pozitivna korelacija označava da s porastom vrijednosti jedne varijable raste i vrijednost druge varijable, dok negativna korelacija ima suprotni značaj; s porastom vrijednosti jedne varijable smanjuje se vrijednost druge.

U slučaju kada ne postoji linearna ovisnost dviju promatranih komponenti ili pak postoji mogućnost da u promatranom skupu podataka postoje vrijednosti koje su posljedica pogreške mjerenja (*outlier*), neispravno je koristiti koeficijent korelacije (35). Tada se rabi koeficijent determinacije, R^2, jednak kvadratu koeficijenta korelacije:

$$R^2 = \frac{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\right]^2}{\sum_i \left(x_i - \bar{x}\right)^2 \left(y_i - \bar{y}\right)^2} \tag{38}$$

4.5.5 Selektivnost

Selektivnost je svojstvo metode da identificira ili kvantificira željeni analit, ali se pri tome, za razliku od specifičnih reakcija, moraju ukloniti smetnje koje mogu utjecati na rezultat analize.

Iako se vrlo često specifičnost poistovjećuje sa selektivnošću, to su dva različita svojstva metode. Specifičnost je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih

sastojaka uzorka (nečistoće, sastojci matice, razgradni produkti i sl.), koji primjenom specifičnih metoda određivanja ne smetaju.

4.5.6 Robusnost

Robusnost je mjera otpornosti metode na male promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje robusnosti provodi se kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize. Važan su dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode te upućuju na to što treba nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata. Na primjer, kod tekućinske kromatografije ispituju se utjecaji sastava i pH mobilne faze, temperature, protoka te različite šarže ili dobavljači kolona. Stabilnost otopine također je tipičan parametar ispitivanja robusnosti metode. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Uvjete za koje je utvrđeno da utječu na rezultat treba držati pod nadzorom i to jasno naznačiti u opisu metode.

5 EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu analiziran je kvalitativno i kvantitativno anionski sastav realnih uzoraka vode ionskom kromatografijom. Dio analiza je napravljen za vrijeme moje studentske razmjene Fakultetu za kemiju i kemijsku tehnologiju Sveučilišta u Ljubljani, a dio na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

U analizama provedenim u Ljubljani određivana je koncentracija aniona Cl^-, NO_3^- i SO_4^{2-} u uzorcima četiriju komercijalno dostupnih voda: Zala, Dana, Oda i Jana.

U Zagrebu su u uzorcima vode, osim već navedenih Cl^-, NO_3^- i SO_4^{2-}, određivani i F^-, NO_2^-, Br^- i PO_4^{3-}. Od uzoraka analizirana je komercijalno dostupna voda Jana, vodovodna voda grada Zagreba, voda rijeke Orljave (uzorkovano u Pleternici) te sintetski uzorak nepoznata sastava.

Što se tiče priprave uzoraka voda za analizu, uzorci vodovodne vode i komercijalno dostupnih voda nisu zahtijevali prethodnu obradu, sintetski uzorak je razrijeđen 10 puta, a uzorak rijeke Orljave prije analize filtriran. Uzorak Orljave filtriran je preko poliesterskog filtra za vodene uzorke FilterBio PES Syringe Filter (Labex Ltd.), veličine pora 0,22 μm.

Tijekom rada u Ljubljani korištene su već validirane metode, dok je za određivanje sastava voda u Zagrebu razvijena i u potpunosti validirana nova ionska kromatografska metoda.

Pripravljanjem standardnih otopina aniona različitih koncentracijskih razina i mjerenjem odziva instrumenta u ovisnosti o koncentraciji dobiveni su kalibracijski dijagrami. Za pripravu kalibracijskih dijagrama, na temelju kojih je dobivena koncentracija aniona u realnim uzorcima vode, korištena je metoda vanjskog standarda.

5.1 Reagensi i otopine

Da bi se pripravile standardne otopine aniona, u sušioniku na 105 °C sušene su u trajanju od 1 sata sljedeće soli:

- NaF (Kemika, 99 %),
- $NaNO_3$ (Kemika, 99 %),
- KNO_2 (Kemika, 97 %, p.a.),
- KBr (Kemika, 99,5 %),
- Na_2SO_4 (Zorka Šabac, 99,0 %),
- Na_3PO_4 (Kemika, 99 %).

Potom su vagane točne mase soli potrebne za dobivanje temeljne standardne otopine pojedinih aniona, koncentracije 1000 ppm. Iz temeljne standardne otopine od 1000 ppm su razrjeđivanjem ultračistom vodom dobivene radne standardne otopine različitih koncentracija. Ultračista voda, čija je vodljivost 18 Ω, dobivena je Mili-Q uređajem (Milipore, SAD) vidljivim na slici 6.



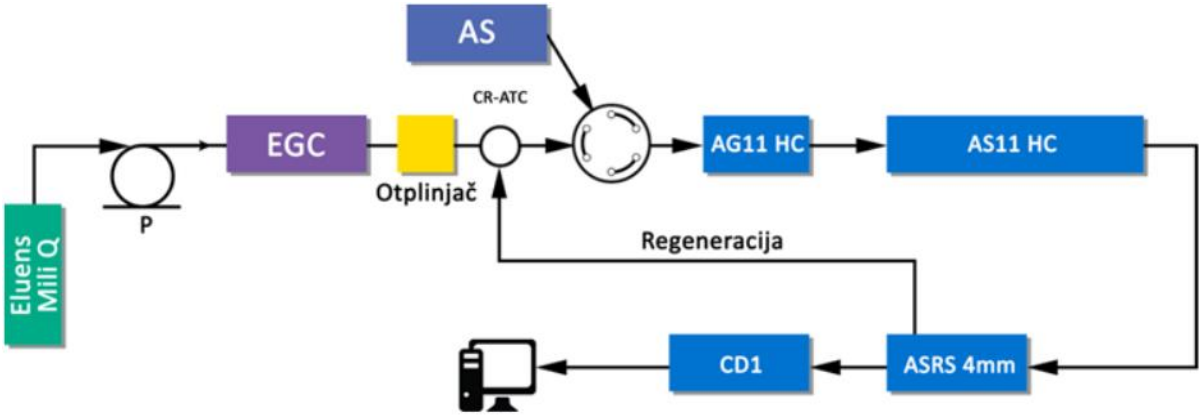
Slika 6. Mili-Q uređaj za dobivanje ultračiste vode

Za pripravu kalibracijskog dijagrama korištene su pripremljene standardne radne otopine koncentracija 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 ppm. Svaka otopina pripravljana je tri puta te su sve pripravljene otopine mjerene tri puta. To znači da imamo po devet mjerenja svake koncentracijske razine. Što se tiče pripreme standardnih radnih otopina koje sam pripremala u Ljubljani, postupak je isti, ali su pripremljene koncentracijske razine za kloride i sulfate 1,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ppm, dok su za nitrate pripremljene standardne radne otopine od 1,0, 3,0, 5,0, 7,0 i 9,0 ppm.

Standardne radne otopine su pripremane u koncentracijskom rasponu u kojem se očekivala koncentracija analita.

5.2 Ionski kromatografski sustav

U Zagrebu je Ionska kromatografska analiza izvedena na jednodimenzionalnom analitičkom IC sustavu Dionex ICS-5000, shematski prikazanom na slici 7. Cijeli sustav računalno je upravljan programskim paketom Chromeleon 7.1.



Slika 7. Shematski prikaz korištenog IC sustava

Kao pokretna faza korištena je otopina hidroksidnih iona (KOH), a elucija je provedena izokratično pri 30 mM KOH. Protok od 1 mL/min, radna temperatura kolone od 30 °C i temperatura detektora od 35 °C održavani su konstantnim. Volumen injekcijske petlje iznosio je 25 μL. Kao nepokretna faza korištena je kolona visokog kapaciteta izmjene AS11 HC s pretkolonom AG11 HC. Detekcija analita provodila se konduktometrijskim detektorom. Kao inertni plin za sprječavanje stvaranja podtlaka u spremnicima pokretne faze korišten je dušik čistoće 5,0. Za prigušenje signala mobilne faze korišten je elektrokemijski supresor ASRS 4mm s postavljenom jakošću struje od 75 mA. Svi spomenuti segmenti jednodimenzionalnog IC sustava su marke Thermo Fisher Scientific (SAD).

Vrijeme trajanja analize pojedinog uzorka iznosilo je 10 minuta.

U Ljubljani je IC analiza provođena na ionskom kromatografu Dionex DX-500. Kao pokretna faza korištena je otopina Na_2CO_3 i $NaHCO_3$ u omjeru 8:1. Protok od 1mL/min i radna temperatura kolone od 30 °C održavani su konstantnim. Kao nepokretna faza korištena je kolona AS14A, a detekcija analita se provodila konduktometrijskim detektorom. Za prigušenje signala

mobilne faze je korišten elektrokemijski supresor ASRS 4mm s postavljenom jakošću struje od 50 mA.

S obzirom da su korišteni različiti programski paketi za upravljanje analizom, različit je i prikaz kromatograma. U Ljubljani je korišten programski paket PeakNet, a kromatogrami prikazani na slikama 8-11 konstruirani su u MS Excel-u. U Zagrebu je korišten programski paket Chromeleon i kromatogrami prikazani na slikama 12-15 dobiveni su u tom programskom paketu.

6 REZULTATI I RASPRAVA

S obzirom da sam u Ljubljani koristila već postojeću metodu za određivanje aniona, nije bilo potrebno provoditi njenu validaciju. Validacija je provedena za metodu koju sam koristila u Zagrebu s obzirom da sam razvijala novu metodu, a od izvedbenih značajki sam odredila granice detekcije i kvantifikacije, linearnost, točnost i preciznost.

6.1 Granica detekcije i granica kvantifikacije

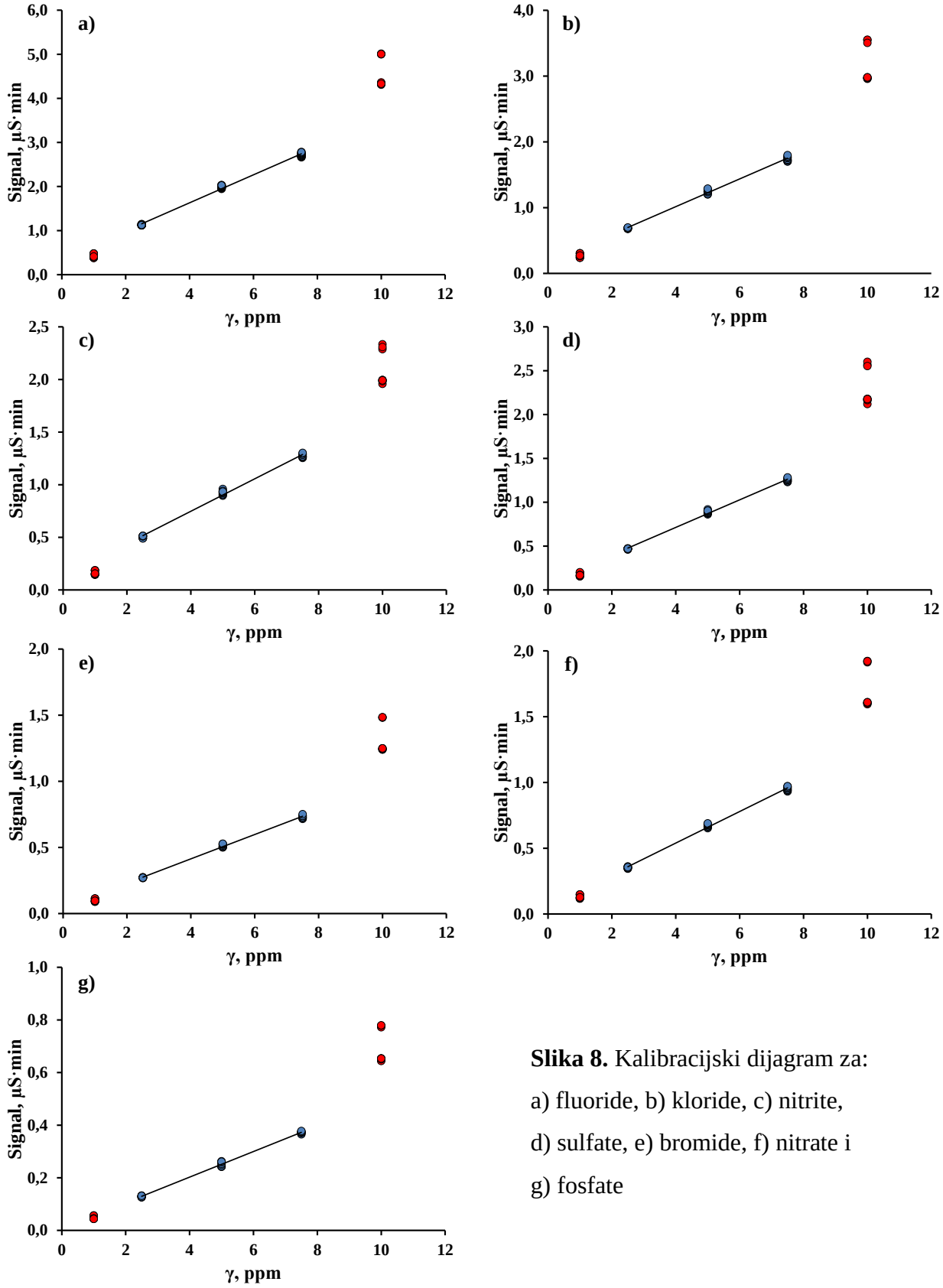
Za određivanje granica detekcije i kvantifikacije korišteni su izrazi (33) i (34), a dobivene vrijednosti prikazane u tablici 1 zajedno s pripadajućim standardnim devijacijama.

Tablica 1. Izračunate granice detekcije i granice kvantifikacije

Anion	σ	GD, ppm	GK, ppm
F^-	0,04	0,41	1,25
Cl^-	0,03	0,42	1,29
NO_2^-	0,02	0,35	1,08
SO_4^{2-}	0,02	0,38	1,16
Br^-	0,01	0,36	1,08
NO_3^-	0,01	0,35	1,06
PO_4^{3-}	0,01	0,37	1,11

6.2 Linearnost

Za svaki anion određeno je područje linearnosti. Na slici 8 prikazane su sve eksperimentalno određene vrijednosti površina u rasponu 1,0-10,0 ppm. Vidljivo je da koncentracija 10 ppm za sve anione izlazi iz linearnog područja. Također, kako je za sve anione određena granica kvantifikacije veća od 1,0 ppm, stanardne otopine aniona koncentracije 1,0 ppm nisu uključene u kalibraciju.



Slika 8. Kalibracijski dijagram za: a) fluoride, b) kloride, c) nitrite, d) sulfate, e) bromide, f) nitrate i g) fosfate

Nakon provedbe regresijske analize nad preostalim eksperimentalnim podacima, dobiveni su kalibracijski pravci čije karakteristike su prikazane u tablici 2. Vidljive su jako visoke vrijednosti koeficijenata determinacije (R^2>0,9951) što ukazuje na dobar odabir kalibracijskog modela, odnosno veliku linearnost odziva instrumenta u području ispitivanih koncentracija.

Tablica 2. Parametri linearnosti za ispitivane anione

	F^-	Cl^-	NO_2^-	SO_4^{2-}	Br^-	NO_3^-	PO_4^{3-}
a	0,317	0,210	0,154	0,157	0,092	0,120	0,048
b	0,358	0,171	0,130	0,084	0,045	0,059	0,008
R^2	0,9959	0,9951	0,9951	0,9965	0,9969	0,9967	0,9970

6.3 Točnost

Analiza točnosti provedena je usporedbom nazivnih, odnosno teoretskih koncentracija pripremljenih otopina s koncentracijama dobivenim uvrštavanjem eksperimentalno dobivenih vrijednosti u jednadžbu kalibracije.

U tablici 3 prikazane su vrijednosti dobivene regresijskom analizom: odsječak i nagib te donja i gornja granica intervala pouzdanosti 95 %. Iz tablice se može vidjeti da za sve ispitane modele 95 %-tni interval pouzdanosti za odsječak uključuje 0, što znači da se sa 95 % sigurnošću može tvrditi da se odsječak ne razlikuje značajno od 0 odnosno da ne postoji apsolutna sustavna pogreška.

Također, za sve ispitane modele 95 %-tni interval pouzdanosti za nagib uključuje vrijednost 1, što znači da sa 95 % sigurnošću možemo tvrditi kako se nagib ne razlikuje značajno od 1 i da ne postoji proporcionalna sustavna pogreška.

Tablica 3. Analiza točnosti metode

Anion	Parametar	Iznos	Donja granica intervala pouzdanosti 95 %	Gornja granica intervala pouzdanosti 95 %
F^-	Odsječak	-0,000	-0,1430	0,1427
	Nagib	1,000	0,9736	1,0265
Cl^-	Odsječak	0,000	-0,1553	0,1557
	Nagib	0,999	0,9710	1,0286
NO_2^-	Odsječak	0,000	-0,1559	0,1562
	Nagib	1,000	0,9712	1,0291
SO_4^{2-}	Odsječak	-0,000	-0,1324	0,1322
	Nagib	0,999	0,9753	1,0243
Br^-	Odsječak	0,000	-0,1230	0,1240
	Nagib	1,000	0,9775	1,0232
NO_3^-	Odsječak	-0,000	-0,1286	0,1285
	Nagib	0,999	0,9758	1,0234
PO_4^{3-}	Odsječak	-0,000	-0,1240	0,1220
	Nagib	1,000	0,9777	1,0232

6.4 Preciznost

Preciznost metode se izražava kao relativna standardna devijacija, *RSD*:

$$RSD = \frac{\sigma}{c} \cdot 100\% \tag{39}$$

pri čemu je σ standardna devijacija, a *c* koncentracija. Standardna devijacija se računa preko formule:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i (c_i - \bar{c})^2}{N-1}} \tag{40}$$

Preciznost je određena na koncentracijskim razinama od 2,5 i 5,0 ppm za sve anione. Također je određena i ukupna preciznost kao srednja vrijednost preciznosti na obje koncentracijske razine.

Tablica 4. Analiza preciznosti na koncentracijskim razinama od 2,5 i 5,0 ppm

Anion	Koncentracija, ppm	σ	RSD, %	RSD_{uk}, %
F^-	2,5	0,018	0,653	0,982
	5,0	0,064	1,310	
Cl^-	2,5	0,025	0,927	1,616
	5,0	0,110	2,305	
NO_2^-	2,5	0,056	2,012	2,077
	5,0	0,107	2,141	
SO_4^{2-}	2,5	0,019	0,691	1,288
	5,0	0,090	1,883	
Br^-	2,5	0,016	0,598	1,301
	5,0	0,096	2,005	
NO_3^-	2,5	0,037	1,374	1,536
	5,0	0,081	1,696	
PO_4^{3-}	2,5	0,036	1,390	2,232
	5,0	0,143	3,073	

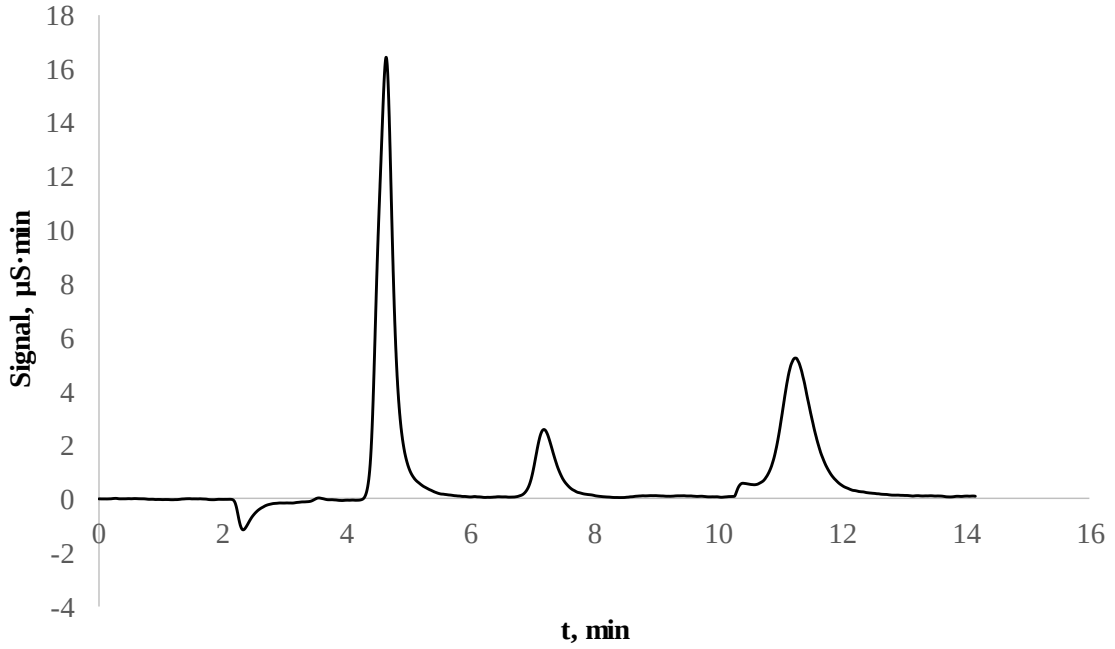
Iz tablice 4 je vidljivo da je relativna standardna devijacija za sve anione na obje ispitane koncentracijske razine oko 2 % dok je jedino za fosfate na koncentracijskoj razini od 5,0 ppm 3,07 %. Male standardne devijacije ukazuju na relativno veliku preciznost metode.

6.5 Analiza realnih uzoraka vode

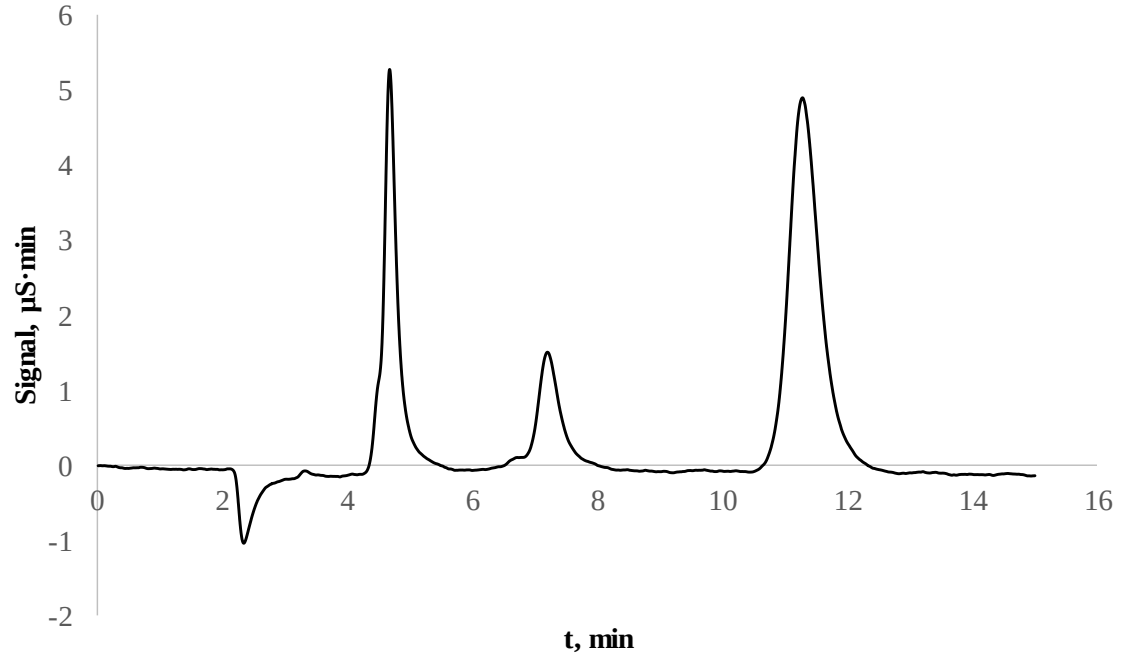
U prvom dijelu ovog poglavlja nalaze se kromatogrami dobiveni analizom uzoraka vode u Ljubljani, dok se u drugom dijelu nalaze kromatogrami dobiveni analizom uzoraka vode u Zagrebu.

Za kloride, nitrate, sulfate i fosfate u uzorcima određivanim na FKIT-u koncentracije nerazrijeđenih uzoraka su bile iznad područja linearnosti te su uzorci razrijeđeni deset puta i ponovno analizirani.

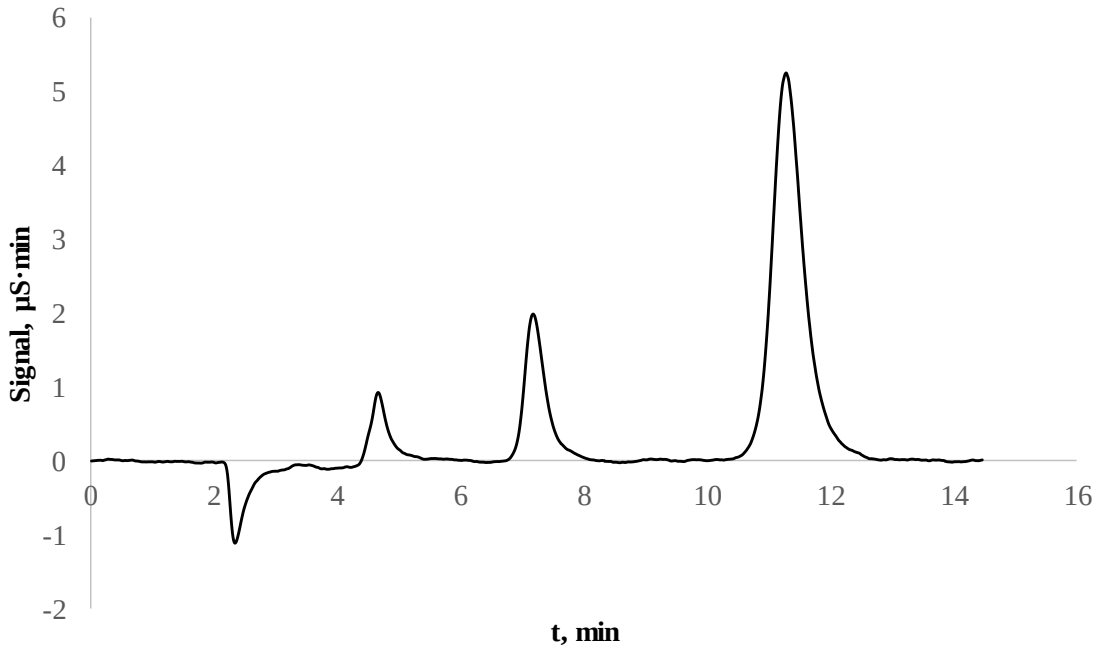
Rezultati IC analiza provedenih u Ljubljani



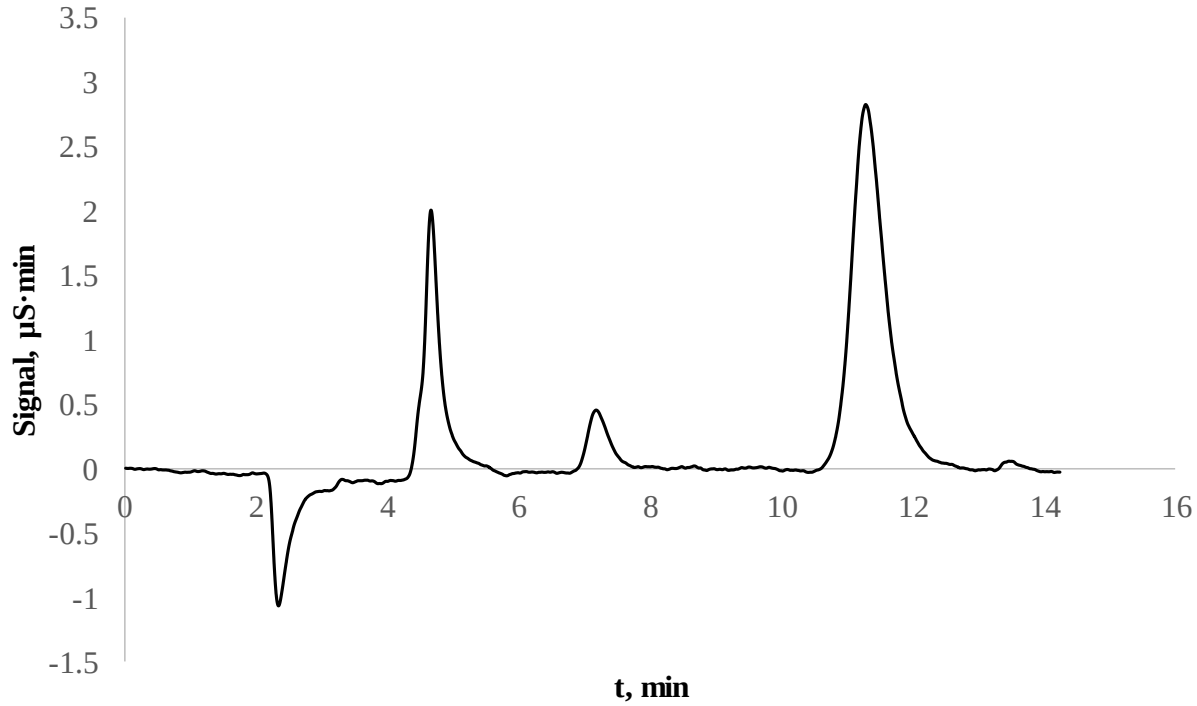
Slika 9. Kromatogram vode Zale dobiven IC analizom



Slika 10. Kromatogram vode Dane dobiven IC analizom



Slika 11. Kromatogram vode Ode dobiven IC analizom



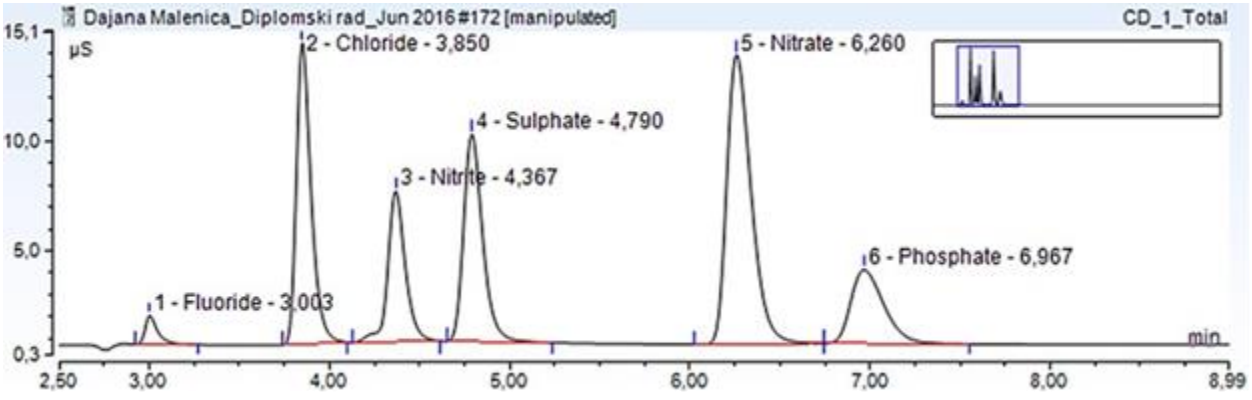
Slika 12. Kromatogram vode Jane dobiven IC analizom

Na slikama 9-12 prikazani su kromatogrami četiriju uzoraka vode analiziranih u laboratoriju u Ljubljani, te na njima označeni pikovi triju detektiranih i kvantificiranih iona: Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, u uzorcima komercijalnih voda. Rezultati analiza prikazani su u tablici. 5

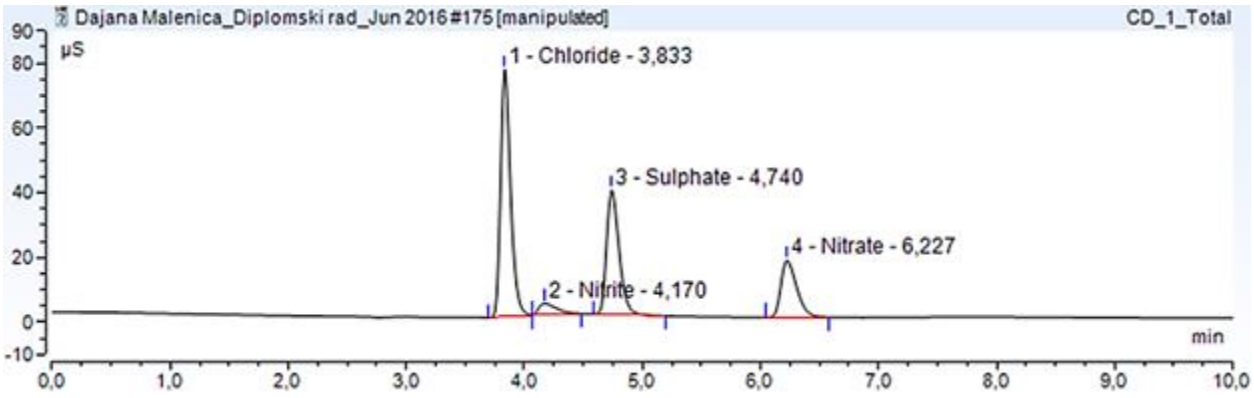
Tablica 5. Vrijednosti koncentracija aniona u komercijalnim vodama dobivene IC analizom

Koncentracija, ppm	**Cl^-**	**NO_3^-**	**SO_4^{2-}**
Zala	13,41	6,32	12,57
Dana	3,74	3,45	12,56
Oda	0,82	4,73	13,11
Jana	1,2	1,45	7,04

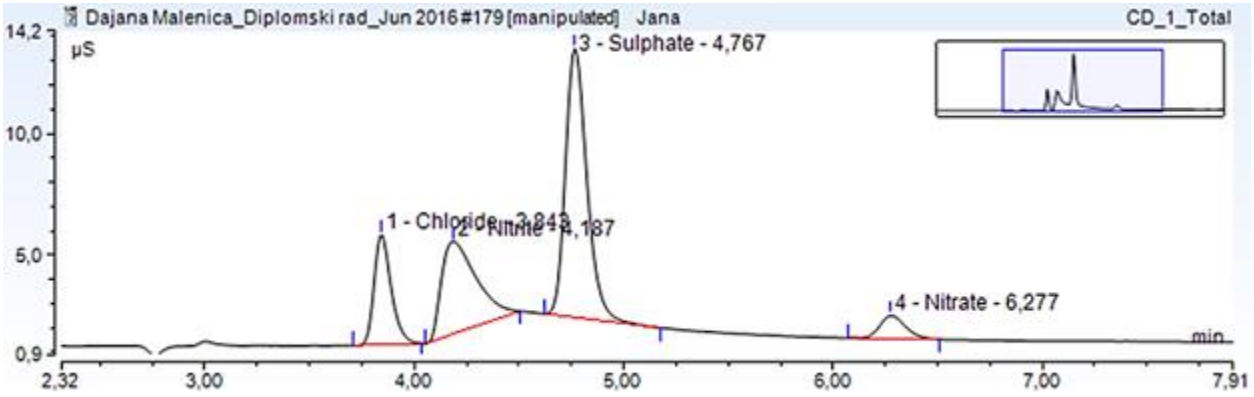
Rezultati IC analiza provedenih u Zagrebu



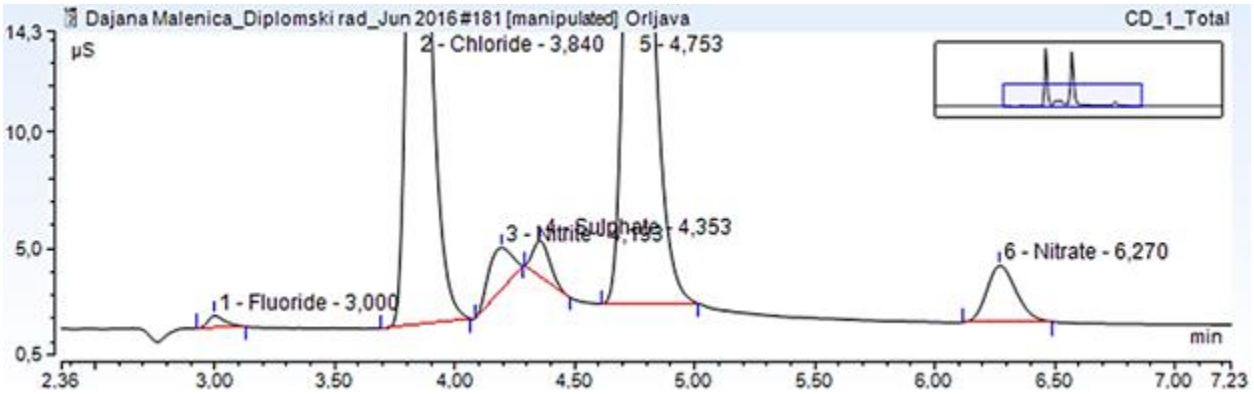
Slika 13. Kromatogram sintetskog uzorka vode dobiven IC analizom



Slika 14. Kromatogram vodovodne vode grada Zagreba dobiven IC analizom



Slika 15. Kromatogram vode Jane dobiven IC analizom



Slika 16. Kromatogram uzorka Orljave dobiven IC analizom

Za razliku od redoslijeda izlaženja aniona na kromatogramima (slika 9-12) dobivenih u Ljubljani, u Zagrebu je korišten drugačiji sustav (druga kromatografska kolona, druga metoda) pa je samim time drugačiji i redoslijed eluiranja analita (slika 13-16; sulfati eluiraju prije nitrata).

Tablica 6. Vrijednosti koncentracija aniona u realnim uzorcima vode dobivene IC analizom

Koncentracija, ppm	**F^-**	**Cl^-**	**NO_2^-**	**SO_4^{2-}**	**Br^-**	**NO_3^-**	**PO_4^{3-}**
Sintetski uzorak	<GK	54,4	43,8	68,3	<GD	162,2	143,8
Vodovod grada Zagreba	<GD	32,81	3,52	28,16	<GD	21,36	<GD
Jana	<GD	1,54	4,12	4,25	<GD	<GK	<GD
Orljava	<GK	14,86	<GK	<GK	<GD	2,63	<GD

Ako usporedimo rezultate analiza uzoraka vode prikazanih u tablici 6 s Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, sve koncentracije (osim sintetskog uzorka) su ispod maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK). Sintetski uzorak, naravno, nije potrebno promatrati u kontekstu ispravnosti vode za piće.

Uzorci bromida u svim otopinama su ispod granice detekcije, slično kao i fluoridi koji su u vodovodnoj vodi i Jani ispod granice detekcije, a u sintetskom uzorku i Orljavi ispod granice kvantifikacije. Također, fosfati su ispod granice detekcije u svim uzorcima osim u sintetskom uzorku, a nitriti i sulfati su ispod granice kvantifikacije u uzorku Orljave.

7 ZAKLJUČAK

Voda je veliko prirodno bogatstvo, a problem nestašice i onečišćenja vode postaje sve veći. Hrvatska se ubraja u skupinu zemalja koje su bogate vodom, a prema UNESCO-vom istraživanju iz 2003., po dostupnosti i bogatstvu vodenih izvora nalazi se na 5. mjestu u Europi. Od velike je važnosti očuvanje tog prirodnog bogatstva s obzirom da o njemu ovise svi živi organizmi i cijeli ekosustav.

U ovom radu određivana je koncentracija 7 aniona: F^-, Cl^-, NO_3^-, NO_2^-, Br^-, SO_4^{2-} i PO_4^{3-}, u različitim uzorcima vode ionskom kromatografijom. U analiziranim realnim uzorcima voda pronađene su relativno niske koncentracije ispitanih iona, pa čak i u uzorku riječne vode koncentracije su niže od onih propisanih Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. Rezultati analiziranog sintetskog uzorka ne mogu se komentirati u kontekstu onečišćenosti, već će oni biti korišteni kao jedan dio poredbenih ispitivanja rada dvaju laboratorija na FKIT-u.

Za potrebe analize proveden je validacija metoda, te je utvrđen izostanak sustavnih pogrešaka za sve izrađene kalibracijske modele. Također, preciznost metoda je bila u prihvatljivim okvirima (do cca 2%).

Ispitivanja su pokazala kako su ove analize provedene na relativno čistim uzorcima, te je za očekivati da bi primjena kompleksnijih matrica uvelike otežala analizu, prvenstveno na području priprave uzorka.

8 LITERATURA

1. J. Weiss: Handbook of Ion Chromatography, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim, 2004
2. D. A. Skoog, S. R. Crouch, F. J. Holler: Principles of instrumental analysis, 6. izd., Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007
3. F. Ziberi, I. Rezić: Kemijska analiza metalnih vlakana na srmi iz Makedonije, TEDI **5** (2015)14 –26.
4. T. Bolanča, Š. Ukić: Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2015
5. Š. Ukić: Matematički model za simuliranje odziva ionske kromatografske analize, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2009
6. A. Braithwaite, F.J. Smith: Chromatographic Methods, V izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999
7. H. Small: Ion Chromatography, Plenum Press, New York, 1989
8. Š. Cerjan-Stefanović: *Kem. Ind.* **41** (1992) 227-231.
9. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch: Practical HPLC Method Development, II izd., Wiley, New York, 1997
10. C.F. Poole: The Essence of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003
11. C.F. Poole, S.K. Poole: Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991
12. I.N. Bronshtein, K.A. Semendyayev, G. Musiol, H. Muehlig: Handbook of Mathematics, V izd., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2007
13. D. Blanco Gomis, N. Sánchez Núñez, E. Andrés García, P. Arias Abrodo, M. Bayod Jasanda, M.D. Gutiérrez Álvarez: *Anal. Chim. Acta* **531**(2005) 105–110.
14. H. Schmidt-Traub: Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Farmaceutical Agents, Wiley-VCH, Weinheim, 2005
15. R. Tijssen: The Mechanisms and Importance of Zone-Spreading, u E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (Ed.): *Handbook of HPLC*, Vol. 78, Marcel Dekker, New York-Basel, 1998

16. M. Novak Stankov: Molekulsko modeliranje i umjetna inteligencija u razvoju ionskih kromatografskih metoda, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015
17. Fritz, J. S.; Gjerde, D. T. *Ion chromatography*; Wiley-VCH: Weinheim, 2000
18. H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman: Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection, *Anal. Chem.* **47** (1975) 1801–1809.
19. D. T. Gjerde, J. S. Fritz, G. Schmuckler: Anion chromatography with low-conductivity eluents, *J. Chromatogr.* **186** (1979) 509–519.
20. R. M. Wheaton, W. C. Bauman: Ion exclusion - A unit operation utilizing ion exchange materials, *Ind. Eng. Chem.* **45** (1953) 228–233.
21. R. D. Rocklin, C. A. Pohl: Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Liq. Chromatogr.* **6** (1983) 1577–1590.
22. D. Malenica: Metode kalibracije u analitičkoj kemiji, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2014
23. http://www.dzm.hr/_download/repository/mjeriteljski_rjecnik.pdf (pristupljeno 28.8.2016.)
24. J. Mišović, T. Ast: Instrumentalne metode hemijske analize, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1989
25. M. Kaštelan-Macan: Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003
26. D. Harvey: Modern Analytical Chemistry, 1. izd., New York, McGraw-Hill, 2000
27. S. Babić: Predavanja iz kolegija Upravljanje kvalitetom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
28. M.J. Adams: Chemometrics in Analytical Spectroscopy, 2. izd., RSC Analytical Spectroscopy Monographs (ur. N.W. Barnett), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005
29. http://www.biochemia-medica.com/content/interval-pouzdanosti (pristupljeno 29.8.2016.)
30. P. Gemperline: Practical guide to chemometrics, 2. izd., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006

31. https://www.chem.bg.ac.rs/~dusankam/ORM_10_11/Termin%205_%206%20Statisti%83ki%20testovi.pdf (pristupljeno 29.8.2016.)
32. https://ldap.zvu.hr/~oliverap/MetodeIstrazivanjaFT/9_T-test.pdf (pristupljeno 29.8.2016.)
33. https://bib.irb.hr/datoteka/764412.Predavanja_TTM.pdf (pristupljeno 30.8.2016.)

ŽIVOTOPIS

Dajana Malenica rođena je 7. svibnja 1991. godine u Požegi. Osnovnu školu fra Kaje Adžića završila je 2006. u Pleternici, a 2010. završava prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Požega. Iste godine upisala je preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija odradila je stručnu praksu u Ekološkom laboratoriju na Zavodu za javno zdravstvo Požeško-slavonske županije.

Zvanje prvostupnice primijenjene kemije stekla je 2014. godine obranom završnog rada „Metode kalibracije u analitičkoj kemiji“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Šime Ukića.

Iste godine upisuje na matičnom fakultetu diplomski studij Primijenjena kemija, modul Specifični materijali i napredne tehnologije.

Tijekom prve godine diplomskog studija volontirala je 6 mjeseci na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu u Laboratoriju za fizikalno-organsku kemiju, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju.