

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KEMIJSKE POTROŠNJE KISIKA U OTPADNIM VODAMA

Dreta, Eleonora

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Polytechnic in
Pozega / Veleučilište u Požegi**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:112:203253>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



VELEUČILIŠTE U POŽEGI
STUDIA SUPERIORA POSEGANA

Repository / Repozitorij:

[Repository of Polytechnic in Pozega - Polytechnic in
Pozega Graduate Thesis Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U POŽEGI



Eleonora Dreta, 1522/16

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KEMIJSKE POTROŠNJE KISIKA U OTPADNIM VODAMA

ZAVRŠNI RAD

Požega, 2019. godine

VELEUČILIŠTE U POŽEGI
POLJOPRIVREDNI ODJEL
PREDDIPLOMSKI STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

**VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE
KEMIJSKE POTROŠNJE KISIKA U OTPADNIM
VODAMA**

ZAVRŠNI RAD

IZ KOLEGIJA TEHNOLOGIJA VODE I OBRADA OTPADNIH VODA

MENTOR: Ana Mrgan, dipl.ing

STUDENT: Eleonora Dreta

Matični broj studenta: 1522/16

Požega, 2019. Godine

Sažetak:

Validacija je postupak kojim se prikupljaju objektivni dokazi kako bi se dokazalo da određena metoda služi svrsi kojoj je namijenjena. Procjenom metoda dobivamo objektivne dokaze o tome kako se ponaša određena metoda u svim realnim radnim uvjetima i koje su joj slabe točke, kakva je usklađenost osoblja i dr. Validirane metode osiguravaju veću pouzdanost u radu te lakše otkrivanje grešaka u radu i veće povjerenje u točnost rezultata. Otpadne vode su sve vode koje su nakon uporabe promijenile svoj sastav i kao takve, ukoliko se ispuštaju u prirodne sustave moraju proći tehnološke procese obrade kako se ne bi narušila ekološka svojstva nekog vodenog sustava. Ispitivanje otpadne vode na parametar kemijske potrošnje kisika zakonski je reguliran budući da je on direktni pokazatelj stupnja zagađenosti vode. U radu je validirana UV spektrofotometrijska metoda kemijske potrošnje kisika, koja se koristi u ZZJZ Požeško-slavonske županije. Određivane su slijedeće radne značajke: linearnost, preciznost, istinitost i robusnost.

Ključne riječi: validacija, kemijska potrošnja kisika, otpadna voda, radne značajke

Summary:

Validation is a procedure normally carried out in order to get objective evidence of the usefulness of certain method. By evaluating the method we can obtain objective evidence of how a specific method behaves in real working conditions, which are its weak points and level of agreement among the workers. Validated methods ensure higher reliability of the work, easier detection of errors during the work, and higher confidence in the results accuracy. Wastewaters are all waters that have changed their composition, and as such they must go through water treatment before being released in the environment so that ecological balance of water system wouldn't be disturbed. Wastewater testing on chemical oxygen demand is regulated by legislative as it is a direct indicator of the water contamination degree. UV spectrophotometric method for chemical oxygen demand determination which is used in laboratory of Croatian Institute of Public Health Požega-Slavonia county, was validated. Following method performance characteristics were determined: linearity, precision, veracity and robustness.

Key words: validation, chemical oxygen demand, waste water, performance characteristics

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Validacija i izvedbene značajke metoda	2
2.1.1. Specifičnost/selektivnost metode	3
2.1.2. Linearnost.....	4
2.1.3. Preciznost	5
2.1.4. Istinitost.....	6
2.1.5. Robusnost.....	7
2.2. Otpadne vode.....	7
2.3. Kemijska potrošnja kisika	9
2.4. Metode određivanja kemijske potrošnje kisika.....	10
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	12
3.1. Zadatak.....	12
3.2. Materijali i metoda	12
3.2.1. Materijali	12
3.2.2. Metoda.....	12
3.3. Parametri validacije.....	14
4. REZULTATI	16
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK	21
7. LITERATURA	22
POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA	25
IZJAVA O AUTORSTVU RADA	27

1. UVOD

Validacija je svjetski prepoznata kao važan dio u procjeni osiguranja kvalitete u analitičkim laboratorijima. Osiguranje kvalitete glavni je temelj za dobivanje pouzdanih, vjerodostojnih i reproducibilnih rezultata. Osiguranje kvalitete provodi se u svim radnjama laboratorija, od uzorkovanja do konačnog izvještaja. Kod svake radnje u laboratoriju treba biti uspostavljena sljedivost, što znači da se svakom postupku, podatku i rezultatu mora moći ući u trag (Knežević, 2007: 1, URL). Validirati metodu znači istražiti i procijeniti dali je postignuta svrha te metode uz sakupljanje objektivnih dokaza sa prihvatljivom razinom nesigurnosti (Taverniers, De Loose& Van Bockstaele, 2004: 535,URL). Dokaze o svrhovitosti procjenjujemo na temelju eksperimenata, odnosno radnih ili izvedbenih značajki metode (Lazarić, 2012: 62, URL).

Prema Zakonu o vodama otpadne vode su sve potencijalno onečišćene industrijske, sanitarne, oborinske i druge vode (Zakon o vodama, NN 153/09, 63/11, 130/11, 56/13, 14/14, 46/18).

Razvojem industrije i poljoprivrede raste i količina otpadnih voda. Iako je svijest o problemu otpadnih voda sve veća, još uvijek se oko 80% od ukupne količine otpadne vode diljem svijeta, nepročišćene ispušta u prirodu. Najveći polutanti u otpadnim vodama su organske tvari, a njihov utjecaj pratimo analizirajući kemijsku potrošnju kisika (KPK) i biološku potrošnju kisika (BPK). KPK je superiornija u odnosu na BPK, jer BPK zahtjeva duže vrijeme potrebno za analizu i teško ju je standardizirati. Kemijska potrošnja kisika predstavlja važan parametar te je strogo kontroliran od strane agencija za zaštitu okoliša (Li et al., 2017: 1, URL).

Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za analizu kemijske potrošnje kisika kako bi se procijenila njezina prikladnost za uporabu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Validacija i izvedbene značajke metoda

U svakom analitičkom laboratoriju provode se kemijske analize koje za cilj imaju dobivanje kvalitativnih i/ili kvantitativnih rezultata sa prihvatljivom razinom nesigurnosti. Kako bismo osigurali točnost i pouzdanost dobivenih analitičkih rezultata provodi se validacija metoda (Taverniers, De Loose&Van Bockstaele, 2004: 535, URL; Lazarić, 2012: 61, URL). Validirati metodu znači dokazati da metoda služi svrsi koja joj je namijenjena, a provodi se kako bi se na temelju dobivenih vjerodostojnih mjerenih rezultata mogle donijeti ispravne odluke (Lazarić, 2012: 61, URL; Gašljević, 2009: 57, URL).

Validaciju je potrebno provesti kod uvođenja nove nepoznate metode, za nestandardne metode, za metode razvijene u laboratoriju, standardne metode koje se žele primijeniti izvan normiranog područja te kod modificiranih metoda. Standardizirane metode nije potrebno validirati budući da su one validirane prilikom uspostavljanja metode (Gašljević, 2009: 57; Eurecham guide, 2014: 11, URL). Također, metodu je potrebno revalidirati ako je metoda promijenjena te ako novi parametar izlazi iz radnog raspona, zatim ako je opseg metode povećan ili promijenjen, te ako se planira koristiti instrument čija svojstva nisu bila obuhvaćena inicijalnom validacijom (Garcia Lopez et al., 2011: 9, URL).

Kako bismo utvrdili da je metoda prikladna za upotrebu određujemo parametre validacije koji se odnose na tu metodu i analit. Osnovne radne značajke koje se provode su selektivnost/specifičnost, istinitost, preciznost, linearnost, radno područje, granica detekcije i granica kvantifikacije i robusnost (Gašljević, 2009: 58, URL; Araujo, 2009: 2225, URL). Za svaku metodu ispituju se samo parametri koji su bitni za tu metodu budući da validacijski eksperimenti zahtijevaju vrijeme i novac, pa tako razlikujemo potpunu i djelomičnu validaciju. Kod potpune validacije određujemo sve parametre validacije. Prije početka validacije sastavlja se plan validacije na osnovu tih parametara (Gašljević, 2009: 58-59, URL; Lazarić, 2012: 61, URL). Validacija se može provoditi na razini samo jednog laboratorija ili ukoliko se radi o razvoju neke nove metode između više laboratorija. Validacija na razini više laboratorija često je nepraktična jer zahtjeva posjedovanje instrumenta za provođenje validacije, educiranost osoblja, a česti faktor je i cijena (Eurecham guide, 2014: 13, URL).

Validacija bi trebala dati odgovore na to dali je metoda točna i precizna, nadalje, o odnosima uzorka i odaziva metode, o mogućim interferencijama iz matrice uzorka, o najmanjim

koncentracijama koje će se moći utvrditi ili kvantificirati tom metodom i doznat će se njezine najslabije, ali i najjače strane. Validacija je dužnost i moralna obveza svakog analitičara, a vrijeme i novac uloženi u validaciju isplatiti će se u vidu točnih i vjerodostojnih rezultata (Lazarić, 2012: 64, URL).

Tablica 1. Validacijski parametri potrebni za validaciju analitičkih metoda različitih namjena (ICH, 2005: 3, URL)

	Identifikacijski testovi	Analiza tragova		Sadržaj
		Kvantitativna	Limit test	
Istinitost	Ne	Da	Ne	Da
Ponovljivost	Ne	Da	Ne	Da
Međupreciznost	Da	Da	Ne	Da
Selektivnost	Ne	Da	Da	Da
GD	Ne	Ne	Da	Ne
GK	Ne	Da	Ne	Ne
Linearnost	Ne	Da	Ne	Da
Područje rada	Ne	Da	Ne	Da

2.1.1. Specifičnost/selektivnost metode

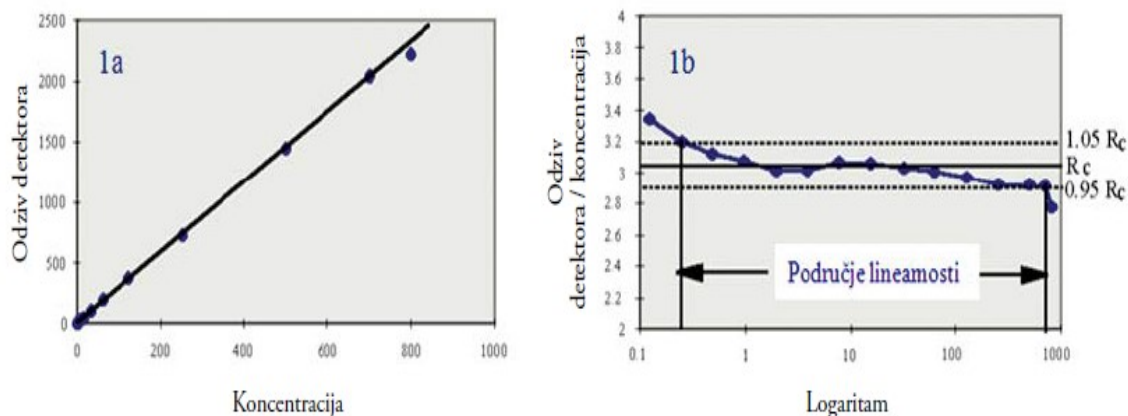
Specifičnost ili selektivnost metode je njezina sposobnost da točno i specifično odredi željeni analit pri prisustvu ostalih komponenata u matrici uzorka. Iako se često spominju zajedno, specifičnost i selektivnost imaju različito značenje i primjenu, i ne bi se smjele poistovjećivati. Po definiciji selektivna metoda je ona metoda kojom je moguće odrediti više komponenti istodobno, pod uvjetom da te komponente prilikom određivanja ne smetaju jedna drugoj. Specifična metoda je metoda kojom određujemo jedan specifični analit u uzorku (Lazarić, 2012: 61, URL). Nije uvijek moguće dokazati da je analitička metoda specifična za neki analit te se u tom slučaju provodi više analitičkih postupaka kako bi se postigao nužan nivo razlikovanja (ICH, 2005: 6, URL).

2.1.2. Linearnost

Linearnost metode je njena sposobnost da unutar danog raspona daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (ICH, 2005: 5, URL). Linearni odnos procjenjuje se preko područja rada analitičke metode. Područje rada se definira kao raspon između donje i gornje koncentracijske granice u uzorku, koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Za određivanje točnosti zaključci se izvode iz parametara linearnosti (Lazarić, 2012: 62, URL). Za određivanje linearnosti potrebno je analizirati kalibracijske standarde od najmanje 5 uzoraka, te bi oni trebali biti jednako raspoređeni iznad raspona interesa. Raspon koncentracija trebao bi obuhvatiti od 0 – 150% očekivane koncentracije analita. Kalibracijski standardi trebali bi se ponoviti tri puta nasumičnim odabirom (Thompson, Ellison & Wood, 2002: 846, URL). Linearnost se izražava matematički i grafički. Matematički dio izražava se preko linearne regresije i jednadžbe pravca ($y = ax + b$), te se izračuna koeficijent korelacije (k). Kao dokaz linearnosti navodi se jednadžba regresijskog pravca, koeficijent korelacije i grafički prikaz. Koeficijent korelacije mora biti veći ili jednak 0,999 kako bi kriterij prihvatljivosti bio zadovoljen. Nagib pravca ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca može ukazivati na sustavnu pogrešku (Lazarić, 2012: 62, URL; Araujo, 2017: 2229, URL; ICH, 2005: 8, URL).

Na Slici 1 su grafički prikaz 1a i grafički prikaz 1b, dva najčešća načina uporabe grafova koji nam služe za praćenje vizualnog nadzora:

- Grafički prikaz 1a, prikazuje grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije – za linearna područja odstupanja su jednoliko raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti
- Grafički prikaz 1b, prikazuje grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale. Dobivena linija treba biti vodoravna u cijelome linearnom području, a područje linearnosti prestaje pri koncentracijama gdje linija relativnog odaziva siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 postotnoj ili 105 postotnoj koncentraciji (Lazarić, 2012: 62, URL).



Slika 1. Dva načina grafičkog prikaza linearnosti (Lazarić, 2012: 62, URL).

2.1.3. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka označava bliskost slaganja između niza mjerenja dobivenih analizom više homogenih uzoraka pri definiranim uvjetima. Obično se izražava kroz odstupanje, standardnu devijaciju ili koeficijent varijabilnosti niza mjerenja. Relativna standardna devijacija (% RSD) koristi se za procjenu kada želimo vidjeti dali je postignuta potrebna preciznost (ICH, 2005: 4, URL; Garcia Lopez et al.,2011: 16, URL).

Razlikujemo tri vrste preciznosti, ovisno o kojim uvjetima određivanja je riječ:

- Ponovljivost – kada su uključeni jedan laboratorij, isti analitičar, ista aparatura i kratko razdoblje od mjerenja do mjerenja
- Međupreciznost – ostvaruje se unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promijene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, kemikalije iz različitih boca i različitih dobavljača).
- Obnovljivost – uključuje različite laboratorije i koristi se u svrhu normiranja metode, te rijetko u svrhu validacije koju provodi sam laboratorij (Lazarić, 2012: 62, URL).

Kod analize metode obično se rade tri ponavljanja na nekoliko koncentracijskih razina koja se poklapaju s područjem linearnosti. Kriterij prihvatljivosti ovisiti će o vrsti analize, matrici uzorka i koncentraciji uzorka koji se određuje (Lazarić, 2012: 62, URL). Određivanje preciznosti jedan je od osnovnih koraka kako bi se postigla ponovljivost i reproducibilnost prilikom validacije metode (Araujo, 2009: 2228, URL).

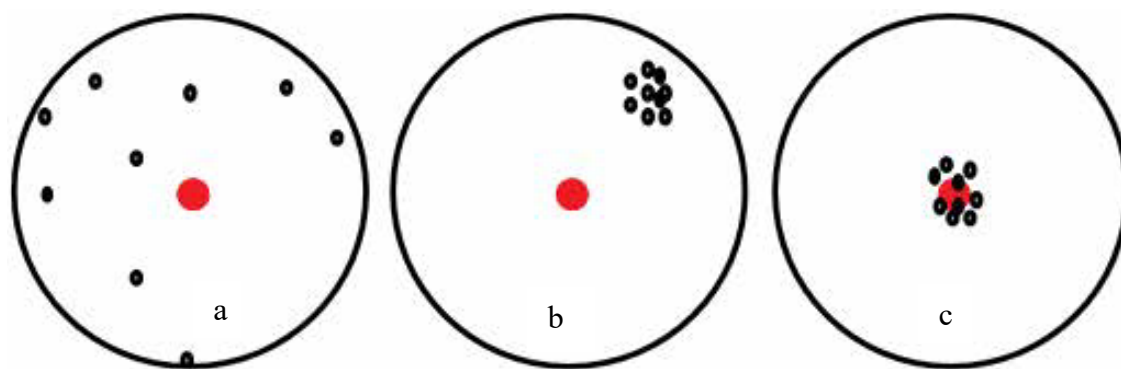
Tablica 2. Granice prihvatljivosti relativnog standardnog odstupanja (RSD) za preciznost metode ovisno o koncentraciji analita prema procjeni AOAC (Taverniers, De Loose & Van Bockstaele, 2004: 542, URL)

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

2.1.4. Istinitost

Istinitost se definira kao bliskost slaganja između rezultata dobivenih testiranjem uzorka i prihvaćene referentne vrijednosti (Thompson, Ellison & Wood, 2002: 847, URL). Istinitost se obično izražava kroz odstupanje (*eng. bias*), a ono ukazuje na sustavnu pogrešku (Taverniers, De Loose & Van Bockstaele, 2004: 539, URL), a dobiven je kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti (Lazarić, 2012: 62, URL). Eksperiment se provodi najmanje tri puta za najmanje tri koncentracije razine raspoređene unutar radnog područja metode. Rezultati se mogu prikazati grafički, kao odnos teorijske (očekivane) vrijednosti prema izmjerenoj koncentraciji, ali obavezno kao srednje iskorištenje (Lazarić, 2012: 62, URL). Kako bi se izbjegle greške preporuča se upotreba odgovarajućih certificiranih materijala ili primjena standardnih analitičkih metoda (Van Zoon et al., 1998: 359, URL).

Na Slici 2. prikazan je primjer preciznosti i točnosti te njihov međusobni odnos.



a) Neprecizno i netočno b) precizno, ali netočno c) točno i precizno

Slika 2. Prikaz preciznosti i istinitosti (Lazarić, 2012: 63, URL)

2.1.5. Robusnost

Robusnost analitičkog postupka je sposobnost metode da prilikom malih, namjernih promjena parametara ne dolazi do značajnih promjena rezultata analita, tj. da su devijacije rezultata analize unutar dozvoljenih kriterija prihvatljivosti metode (ICH, 2005: 5, URL). Faktori koje možemo mijenjati tijekom ispitivanja robusnosti jesu promjene na instrumentu, analitičar, reagens drugog proizvođača, koncentracija reagensa, pH, temperatura reakcije, vrijeme provedbe postupka, itd. (Thompson, Ellison & Wood, 2002: 851, URL). Kažemo da je rezultat u području robusnosti ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat (Lazarić, 2012: 63, URL).

2.2. Otpadne vode

Voda je opće dobro čiju bi vrijednost svi trebali cijeniti. Sve veći problem u svijetu stvaraju otpadne vode. Prema Zakonu o vodama otpadne vode su sve potencijalno onečišćene oborinske, industrijske, sanitarne i druge vode (Zakon o vodama, NN 153/09, 63/11, 130/11, 56/13, 14/14, 46/18). Otpadne vode, kao i pitke vode sastavni su dio hidrološkog ciklusa pa prema tome gospodarenje otpadnim vodama treba obavljati sukladno pozitivnim zakonskim propisima Republike Hrvatske, što znači da u prirodu trebaju biti ispuštene na propisnoj razini kakvoće. Sve vode koje su nastale kao otpadni produkt industrije, kućanstva i oborina sakupljaju se u kanalizacijski sustav, a prije ispuštanja u prirodu trebaju biti pročišćene na

uređaju za pročišćavanje, i tek tada mogu biti ispuštene u vodotoke, ili iznimno na tlo (Tušar, 2009: 319).

Koji postupak obrade otpadne vode će biti primijenjen ovisi o njihovom stupnju zagađenosti. Tako razlikujemo tri vrste obrade otpadnih voda: fizikalne, kemijske i biokemijske procese.

Fizikalni postupci su taloženje, rešetanje, usitnjavanje, flotacija, koagulacija i filtracija. Kemijski procesi uključuju uklanjanje željeza i mangana, kloriranje, i aeraciju. Biološko pročišćavanje odvija se uz pomoć mikroorganizama. Koristi se aktivni mulj, biološki film, lagune i stabilizacijske bare. Posebna pažnja usmjerena je analiziranju i praćenju sastava otpadnih voda. Otpadne vode iz kućanstava vrlo su raznolika sastava i sadrže velik udio organskoga (razgradljivog) onečišćenja, za razgradnju kojega je potrebna velika količina kisika. Industrijske otpadne vode, često sadrže kemikalije otrovne za bakterije, što onemogućuje biološku razgradnju. Otpadne vode s poljoprivrednih površina nastaju ispiranjem tla oborinama, a sadrže znatnije količine neutrošenih fosfornih i dušičnih gnojiva, te nerazgrađenih herbicida i pesticida čije je uklanjanje iz vode zahtjevan postupak. Prodiranjem nepročišćenih otpadnih voda u podzemlje, onečišćuju se podzemne vode, koje su osnovna zaliha pitke vode naselja i gradova (Enciklopedija, n. d., URL).

Upravo nam sastav otpadne vode govori koji ćemo tehnološki postupak obrade koristiti. Najvažniji dio je uzorkovanje, odnosno uzimanje reprezentativnog uzorka na temelju kojeg dobivamo pravu sliku o stupnju kakvoće neke otpadne vode. Kemijske analize koje se provode kod praćenja kakvoće otpadnih voda su: pH, kemijska potrošnja kisika (KPK), biološka potrošnja kisika (BPK), dušikovi spojevi (amonijak, nitrati, ukupni dušik), ukupni fosfor, utrošak KMnO_4 , mineralna ulja i masti (Tušar, 2009: 321; Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16).

Ispuštanje otpadnih voda uređeno je nizom sanitarnih i sigurnosnih propisa i zakonskih normi, i podložno stalnom nadzoru ovlaštenih državnih tijela. Zakonska regulativa u Republici Hrvatskoj vezana uz otpadne vode regulirana je Zakonom o vodama (NN 153/09, 63/11, 130/11, 56/13, 14/14, 46/18) te Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16).



Slika 3. Mogući izvori onečišćenja vode (Štrkalj, 2014, URL)

2.3. Kemijska potrošnja kisika

Kemijska potrošnja kisika jedan je od najvažnijih parametara za procjenu kvalitete vode (Li et al., 2017: 1, URL), a definira se kao količina kisika koja je potrebna da se razgradi organska ili neorganska tvar u otopini uzorka (Alam, 2015: 12, URL).

Uz kemijsku potrošnju kisika indikator za onečišćenje vode mogu biti i biološka potrošnja kisika (BPK), i ukupni organski ugljik (TOC, *eng. total organic carbon*). BPK je pokazatelj potrošnje kisika potrebne za biološku oksidaciju tvari u otpadnim vodama, a najširu primjenu ima u mjerenju opterećenja uređaja za pročišćavanje otpadnih voda te procjeni uklanjanja tvari koje za svoju razgradnju u sustavu pročišćavanja koriste kisik. Kemijskom potrošnjom kisika ne određujemo količinu neke specifične tvari već mjerimo utjecaj različitih tvari na vodeni svijet, a ta količina može predstavljati indirektnu prijetnju živim organizmima ako količina kisika nije dovoljna za razgradnju neorganskih i organskih onečišćenja (Tušar, 2009: 338; Boyles, 1997: 3, URL).

Vrijednosti za kemijsku potrošnju kisika propisane su Pravilnikom o граниčnim vrijednostima emisija otpadnih voda, a za otpadne vode u trenutku ispuštanja u površinske vode iznosi 125 mgO₂/L (Pravilnik o граниčnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16).

Za provođenje testova pri određivanju KPK, koriste se snažni kemijski reagensi u kiselom okruženju uz zagrijavanje do razgradnje organskog ugljika na CO₂ i H₂O. Najčešće metode određivanja su titrimetrijske i fotometrijske, kod kojih su rezultati dostupni za jedan do tri sata (Boyles, 1997: 3, URL).

2.4. Metode određivanja kemijske potrošnje kisika

Standardne metode određivanja KPK su refluksna razgradnja uz titraciju sa K₂Cr₂O₇ (HRN ISO 6060:1989, 2003) i zatvorena razgradnja sa spektrofotometrijom (HRN EN ISO 15705:2003, 2003). Razvijene su i nove metode određivanja, ali je potrebno još istraživanja za njihovu širu primjenu (Li et al., 2017:15, URL). Ukoliko se za provođenje reakcije kao reagens koristi kalijev dikromat u indeksu će stajati KPK_{Cr}, a ukoliko se koristi kalijev permanganat u indeksu će stajati KPK_{Mn}. KPK_{Cr} obično se koristi za procjenu kvalitete u umjereno i teško zagađenim vodenim sustavima, dok se KPK_{Mn} koristi za procjenu kvalitete u relativno čistim vodenim sustavima gdje je kemijska potrošnja kisika relativno niska (Li et al., 2017: 1, URL).

Princip određivanja kemijske potrošnje kisika titracijskim metodama je takav da se dodaje poznata količina oksidansa (kalijev dikromat, kalijev permanganat) u uzorak, kako bi došlo do oksidacije organskih tvari uz djelovanje visoke temperature u zatvorenim kivetama. Ova metoda ima nedostatak u tome što zahtjeva uporabu skupih i toksičnih kemikalija (Ag₂SO₄, HgSO₄), dosta vremena i puno preciznog ručnog rada. U novije vrijeme sve češće se koristi Mg₂SO₄ zbog svoje netoksičnosti. Ce(SO₄)₂, K₂S₂O₈, KIO₃ se također mogu koristiti kao oksidansi (Alam, 2015: 14, URL).

Kolorimetrijske metode brže su, točnije i jednostavnije za izvođenje od titracijskih. Na spektrofotometru je potrebno napraviti standardnu kalibracijsku krivulju mjerenjem koncentracije dikromata i njegove apsorbancije, a uzorak se mjeri u ampulama. Komercijalno su dostupne bočice za mjerenje kemijske potrošnje kisika sa KHP – kalijev hidrogenftalat (*eng. potassium hydrogenphthalate*) kao referentnim standardom (Alam, 2015: 15, URL).

Dikromat se koristi kao sredstvo za oksidaciju preko 70 godina zbog svoje izrazite oksidativnosti i jednostavnosti za uporabu. Srebro se dodaje kao katalizator za ubrzavanje oksidacije, dok se živa dodaje kako bi se smanjio utjecaj klora. HACH-ov dikromatski KPK reagens sadrži dovoljno sulfata za uklanjanje smetnje 2000 mg/L klora. Ultra visoki rang pokrit će do 20,000 mg/L klora. Ako uzorci ne sadrže značajne količine klora, reagens ne treba sadržavati živu (Boyles, 1997: 10, URL).

Prednosti standardnih metoda su visoka točnost, dobra preciznost i reproducibilnost te niska granica detekcije. Nedostatci su vrijeme trajanja reakcije, toksičnost i cijena reagenasa, a također zahtijevaju određene vještine i preciznost tijekom rada. Zbog tih nedostataka razvile su se nove metode određivanja kemijske potrošnje kisika kao što su CL metode, FIA tehnike, O₃ oksidacijske metode, metode detekcije putem elektrokatalizatora, PcCOD i PeCOD. Njihova prednost je široka granica detekcije, kratko vrijeme detekcije i nisu štetne za okoliš. Njihova uporaba ovisi o daljnjim istraživanjima i teorijama (Li et al., 2017: 15-16, URL).

Kemijska potrošnja kisika standardno se određuje prema ISO normi 6060:1989 prema slijedećem načelu: uzorak se zagrijava u prisutnosti živina (II) sulfata određeno vrijeme s poznatom količinom kalijeva dikromata i srebra kao katalizatora u sumpornoj kiselini, tijekom kojeg prisutna oksidirajuća tvar reducira dio dikromata. Preostali dikromat se titrira amonijevimželjezovim (II) sulfatom. KPK vrijednost se zatim izračuna iz količine reduciranog dikromata, pri čemu je 1 mol dikromata (Cr₂O₇²⁻) ekvivalentan 1,5 mola kisika (HRN EN ISO 6060:1989, 2003).

U tablici 3. prikazana je teorijska potrošnja kisika u različitim tvarima koje se mogu naći u komunalnim i industrijskim otpadnim vodama (npr. teoretska kemijska potrošnja kisika u 1 g oksalne kiseline iznosi 0,18 mg/L, dok je za 1 g metana kemijska potrošnja kisika 4,00 mg/L).

Tablica 3. Teoretske vrijednosti kemijske potrošnje kisika u jednom gramu različitih organskih tvari (Alam, 2015: 13, URL)

SASTOJAK	FORMULA	KPK (mgO ₂ /L)
Oksalna kiselina	C ₂ H ₂ O ₄	0,18
Formalna kiselina	CH ₂ O ₂	0,35
Limunska kiselina	C ₆ H ₄ O ₂	0,75
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	1,22
Etanol	C ₂ H ₆ O	2,09
Etanol	C ₂ H ₅	3,73
Metan	CH ₄	4,00

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Zadatak

Zadatak rada je bio odrediti parametre prilikom provođenja validacije za metodu određivanja kemijske potrošnje kisika, te na osnovu dobivenih rezultata procijeniti njezinu prikladnost za uporabu.

3.2. Materijali i metoda

3.2.1. Materijali

Za rad su korišteni termoreaktor (Hach Lange), kivete, pipetor s mogućnošću doziranja, spektrofotometar (Hach Lange) koji ima mogućnost očitavanja crtičnog koda, stalak za odlaganje kiveta nakon zagrijavanja u termoreaktoru, Erlenmeyerove tikvice od 50 do 250 mL, standardni certificirani standard kalijev hidrogenftalat, LCK 314 testovi za niži rang (15 – 150 mgO₂/L).

3.2.2. Metoda

Korištena je metoda sa malim zatvorenim epruvetama prema normi ISO 15705:2003 za određivanje kemijske potrošnje kisika u vodi.

Prvo se izračuna potreban volumen standarda koji se dodaje u svaku Erlenmeyerovu tikvicu, na način da se pomnoži željenu koncentraciju standarda sa volumenom tikvice i podijeli sa stvarnom koncentracijom standarda, te zatim dobiveni rezultat pomnoži sa 1000. Nakon što se izračuna sve volumene za područje od 15 do 150 mg/L slijedi priprema uzorka. U 15 Erlenmeyerovih tikvica odpipetira se pripadajući volumen standarda, i nadopuni sa destiliranom vodom do oznake. Nakon toga uzimaju se gotovi LCK 314 testovi koji u sebi već sadrže potrebne reagense. Na čep svake kivete napiše se pripadajući broj kako bi se nakon termostatiranja znalo koje su pripadajuće koncentracije. Protrese se kivetu nekoliko puta da se talog homogenizira i zatim pažljivo doda 2,0 mL uzorka. Kiveta se začepi, obriše staničevinom i okrene. Zatim se stavi u termoreaktor na standardni program HT 15 minuta. Nakon što se

poklopac termoreaktora otvori, kivetu se pažljivo okrene dva puta i ostavimo da se ohladi na sobnoj temperaturi i formita talog, a potom se očita rezultat na spektrofotometru.

Princip mjerenja je sljedeći: uzorci su oksidirani djelovanjem otopina H_2SO_4 i $K_2Cr_2O_7$ u prisutnosti srebrnog sulfata ($AgSO_4$) i živina (II) sulfata (Hg_2SO_4). Srebro služi kao katalizator oksidacije organske tvari dok živa smanjuje interferencije kloridnih iona. Količina dikromata koja je korištena za oksidaciju u uzorku utvrđuje se mjerenjem apsorbancije nastalog Cr^{3+} iona na valnoj dužini 605 ± 20 nm (to je mjerno područje za niži rang). Apsorbanciju mjerimo u zatvorenim kivetama prema uputi proizvođača.



Slika 4. LCK testovi korišteni za određivanje KPK (HACH, URL)



Slika 5. Termoreaktor sa kivetama prije zagrijavanja (autor)



Slika 6. HACH-ov DR6000TM UV VIS spektrofotometar korišten za provođenje analiza (HACH, URL)

3.3. Parametri validacije

U svrhu validacije metode, određeni su sljedeći parametri validacije: linearnost, preciznost, istinitost i robusnost metode.

Linearnost metode provjerena je izračunavanjem koeficijenta korelacije (k) na osnovu podataka dobivenih iz kalibracijske krivulje izračunatih matematičkim putem, metodom linearne regresije, u rasponu koncentracije kemijske potrošnje kisika od 15 do 150 mgO₂/L. Svaka koncentracija izmjerena je tri puta.

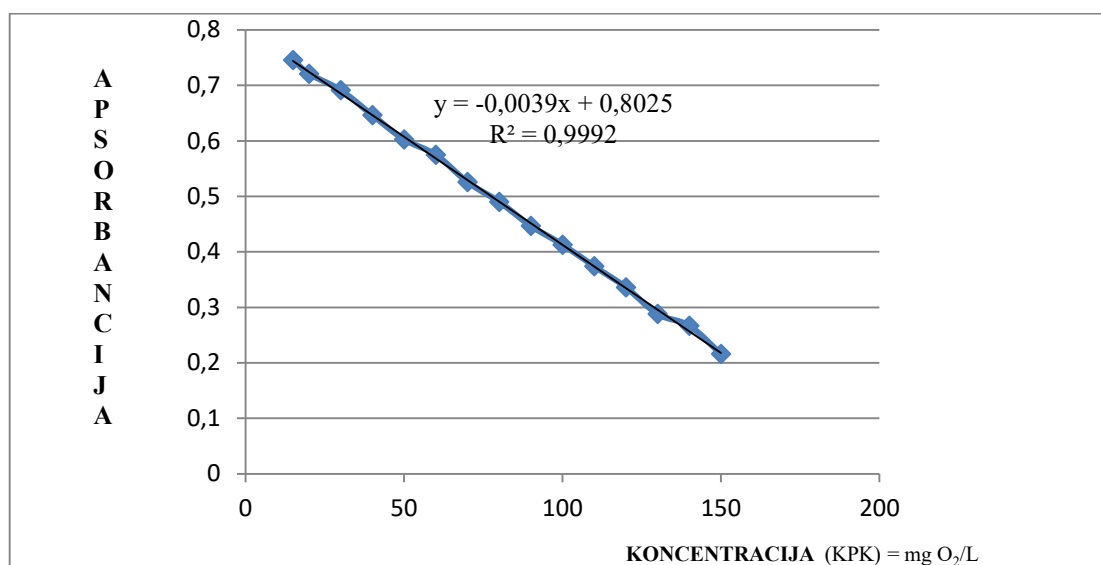
Preciznost metode provjerena je preko ponovljivosti i međupreciznosti. Za ispitivanje ponovljivosti mjerenja ispitan je isti uzorak 10 puta. Za ispitivanje međupreciznosti dva analitičara pripremila su isti uzorak te su izvršena višestruka mjerenja od 10 ponavljanja. Nakon mjerenja izračunata je srednja vrijednost, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD).

Istinitost je ispitana tako što je u uzorak dodana poznata koncentracija standarda. Prvom pripremljenom uzorku očitana je apsorbancija u 4 ponavljanja, te su zatim pripremljene otopine obogaćene uzorkom sa poznatim dodanim koncentracijama standarda. Mjerenja apsorbancije obogaćenih uzoraka također su odrađena u 4 ponavljanja. Izračunate su srednje vrijednosti kemijske potrošnje kisika u uzorku i obogaćenim uzorcima, a istinitost metode izražena je kao iskorištenje (%).

Robusnost metode ispitana je na način da je pripremljeni uzorak analiziran odmah poprimtku, nakon 24 sata i nakon 48 sati. Mjerenja apsorbancije provedena su u 5 ponavljanja,

te su nakon mjerenja izračunate srednja vrijednost, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD).

4. REZULTATI



Slika 7. Rezultati za linearnost metode prikazani preko grafa uz kalibracijsku krivulju($k=0,9992$)

Tablica 4. Rezultati dobiveni za preciznost metode izraženi preko ponovljivosti

Broj mjerenja	Izmjerena apsorbancija	Koncentracija KPK (mgO ₂ /L)
1	0,744	15,7
2	0,744	15,8
3	0,744	15,9
4	0,744	15,9
5	0,743	16,1
6	0,743	16,1
7	0,743	16
8	0,743	16,1
9	0,743	16,1
10	0,742	16,3
Srednja vrijednost,		16
Standardna odstupanje, SD		0,176383
Relativno standardno odstupanje RSD		1,102396

Tablica 5. Rezultati dobiveni za preciznost izraženi preko međupreciznosti

Broj mjerjenja	Izmjerena apsorbancija		Izmjerena koncentracija	
	Analitičar 1	Analitičar 2	Analitičar 1	Analitičar 2
1	0,742	0,742	16,3	16,3
2	0,743	0,743	16,2	16,1
3	0,743	0,742	16,2	16,2
4	0,743	0,742	16,2	16,3
5	0,743	0,742	16,2	16,2
6	0,742	0,742	16,2	16,2
7	0,742	0,743	16,2	16,2
8	0,743	0,742	16,1	16,3
9	0,742	0,742	16,2	16,3
10	0,742	0,742	16,3	16,3
Srednja vrijednost			16,21	16,24
Standardno odstupanje, SD			0,056765	0,069921
Relativno standardno odstupanje, RSD			0,350183	0,430546

Tablica 6. Rezultati dobiveni za istinitost metode

Otopina	Dodano standarda (mg O ₂ /L)	Izmjerena apsorbancija	Izmjerena konc. (mg O ₂ /L)	Srednja dobivena konc. (mg O ₂ /L)	Očekivane vrijednosti (mgO ₂ /L)	Iskorištenje (%)
Uzorak	0	0,359	114	114		
		0,358	114			
		0,358	114			
		0,358	114			
Uzorak + std.1 (1:1)	15,0	0,543	67,2	67,15	64,5	104,1
		0,543	67,2			
		0,543	67,1			
		0,543	67,1			
Uzorak + std. 2 (1:1)	80,0	0,419	98,7	98,75	97	101,8
		0,419	98,7			
		0,419	98,8			
		0,419	98,8			
Uzorak + std. 3 (1:1)	10,0	0,353	116	116	117	91,1
		0,353	116			
		0,353	116			
		0,353	116			

Tablica 7. Rezultati dobiveni za robusnost metode

Broj mjerjenja	Izmjerena apsorbancija			Izmjerena koncentracija		
	Po primitku	Nakon 24h	Nakon 48h	Po primitku	Nakon 24h	Nakon 48h
1	0,744	0,74	0,755	15,7	16,9	18,1
2	0,744	0,738	0,755	15,8	17,3	18,1
3	0,744	0,738	0,755	15,9	17,4	18,2
4	0,744	0,738	0,755	15,9	17,3	18,2
5	0,743	0,738	0,756	16,1	17,3	18,3
Srednja vrijednost				15,88	17,24	18,18
Standardno odstupanje, SD				0,148324	0,174356	0,083666
Relativno standardno odstupanje, RSD				0,93403	9887,818	21729,26

5. RASPRAVA

U radu su ispitivani parametri validacije za određivanje kemijske potrošnje kisika u otpadnim vodama. Validacija je provedena u Zavodu za javno zdravstvo Požeško – slavonske županije na odjelu za ekologiju.

Na Slici 7. prikazana je kalibracijska krivulja dobivena tijekom ispitivanja parametra linearnosti. Na osnovi dobivenih rezultata apsorbancije u ovisnosti o upotrijebljenim koncentracijama izrađena je kalibracijska krivulja iz koje je matematičkim putem metodom linearne regresije dobivena jednadžba pravca te izračunat koeficijent koleracije (k). Iz kalibracijske krivulje vidljivo je da je metoda linearna u ispitivanom području koncentracija, a potvrdu linearnosti dokazuje i koeficijent koleracije koji iznosi 0,9992. Dobiveni koeficijent u skladu je s preporukama za validaciju analitičkih metoda.

U Tablici 4. i 5. prikazani su rezultati dobiveni za ponovljivost i međupreciznost koje smo određivali u sklopu parametra za preciznost. Kod ponovljivosti standardno odstupanje iznosilo je 0,176383 mgO₂/L , dok je relativno standardno odstupanje iznosilo 1,102396%. Međupreciznost je ispitana mjerenjem više uzorka (10) između dva analitičara. Standardno odstupanje iznosilo je 0,056765 mgO₂/L, a relativno standardno odstupanje 0,350183%. Iz navedenih rezultata zaključujemo da je metoda precizna.

U Tablici 6. prikazani su rezultati dobiveni za parametar istinitosti. U homogenom uzorku vode srednja vrijednost KPK iznosila je 114 mgO₂/L, dok je u obogaćenim uzorcima srednja vrijednost KPK iznosila 67,15 mgO₂/L; 98,75 mgO₂/L; 116 mgO₂/L. Iz dobivenih rezultata izračunali smo iskorištenje koje je iznosilo 104,1%; 101,8%; 91,1%. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je metoda istinita.

U Tablici 7. prikazani su rezultati dobiveni za parametar robusnosti. Srednje vrijednosti koncentracija KPK u uzorku iznosile su 15,8 mgO₂/L istog dana, nakon 24 sata 17,24 mgO₂/L, te 18,18 mgO₂/L nakon 48 sati. Iz dobivenih rezultata zaključujemo da uzorak nije stabilan te da metoda nije robusna.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata provedenih u ovom istraživanju, može se zaključiti sljedeće:

- ispitivana spektrofotometrijska metoda linearna je u području ispitivanih koncentracija
- ispitivana metoda pokazala se istinitom i preciznom
- ispitivana metoda nije robusna, na što ukazuju oscilacije u rezultatima mjerenja u različitim vremenskim intervalima
- na temelju rezultata dobivenih iz procjene parametara validacije zaključuje se da je metoda prikladna namjeni.

7. LITERATURA

Knjige:

1. Tušar, B. (2009.) Pročišćavanje otpadnih voda. Kigen, Zagreb, 18, 337-341

Pravni izvori:

1. Narodne novine, (2013, 2014, 2015, 2016) *Pravilnik o graničnim emisijama otpadnih voda*. Zagreb: Narodne novine d.d. NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16.
2. Narodne novine, (2009, 2011, 2013, 2014, 2018) *Zakon o vodama*. Zagreb: Narodne novine d.d. NN 153/09, 63/11, 130/11, 56/13, 14/14, 46/18.

Mrežne stranice:

1. Alam, T. (2015) Estimation of Chemical Oxygen Demand in Waste water using UV-VIS Spectroscopy. Str. 2-48. URL: <http://summit.sfu.ca/item/15487> [pristup: 20.5.2019.]
2. Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877. Str. 2224–2234. URL: http://scholar.google.hr/scholar_url?url=https://www.researchgate.net/profile/Gunawan_Indrayanto/post/How_to_validate_the_linearity_of_calibration_curve/attachment/59d632ae79197b8077990669/AS%253A371407637762048%25401465561889334/download/Araujo_Linearity-sdarticle.pdf&hl=hr&sa=X&scisig=AAGBfm1kDuRL_9B1sOG16aORZ-DxDhZvUQ&nossl=1&oi=scholar [pristup: 20.5.2019.]
3. Boyles, W. (1997) The science of chemical oxygen demand: *Technical information series*, Booklet no.9. Str: 3-20. URL: <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984471> [pristup: 18.5.2019.]
4. Enciklopedija (n. d.) Otpadne vode. URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45899> [pristup: 20.5.2019.]
5. Eurachem Guide. (2014) The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2. izd. Str. 2-12. URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf [pristup: 17.5.2019.]
6. Garcia Lopez, P. et al. (2011) Analytical Method Validation. *Wide spectra of Quality control*. Instituto de Aperfeiçoamento Farmacêutico (IAF), Brasil. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain. Str. 1-10. URL:

https://www.researchgate.net/publication/221913303_Analytical_Method_Validation

[pristup: 20.5.2019.]

7. Gašljević, V. (2010.) Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochemia medica*. Vol. 20, No. 1. Str. 57 – 58. URL:

<https://www.biochemia-medica.com/en/journal/20/1/10.11613/BM.2010.007> [pristup: 18.5.2019.]

8. HACH. URL: <https://uk.hach.com/cod-cuvette-test-15-150-mg-l-o/product?id=26370291408> [pristup: 20.5.2019.]

9. HACH. URL: <https://www.hach.com/dr6000-uv-vis-spectrophotometer-with-rfid-technology/product?id=10239244800> [pristup: 20.5.2019.]

10. ICH. (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline – Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation, Geneva. Str. 5-13 URL: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf [pristup: 20.5.2019.]

11. Knežević, Z. (2007) Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju. *Hrana i zdravlje*. Vol 3, No 10, Str. 1- 5. URL: <https://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/article/download/2086/2060> [pristup: 19.5.2019.]

12. Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* 1, 61-64 URL: <https://www.scribd.com/doc/235266219/Katica-Lazaric-Validacija-analitickih-metoda> [pristup: 17.5.2017.]

13. Li, J. et al. (2017) Analytical Approaches for Determining Chemical Oxygen Demand in Water Bodies: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Vol 48, Str. 1-19. URL: https://www.researchgate.net/publication/319413417_Analytical_Approaches_for_Determining_Chemical_Oxygen_Demand_in_Water_Bodies_A_Review [pristup: 19.5.2019.]

14. Štrkalj, A. (2014.) Onečišćenje i zaštita voda. Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet. Sisak. URL: https://travelsdocbox.com/Eastern_Europe/68366371-Oneciscenje-i-zastita-voda.html [pristup: 25.5.2019.]

15. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, No 8, Str. 535-552 URL: https://www.researchgate.net/publication/228011694_Analytical_Method_Validation_and_Quality_Assurance [pristup: 18.5.2019.]

16. Thompson, M., Ellison, S., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem*. Vol. 74, No.5,

Str. 835-855 URL:

https://www.researchgate.net/publication/244742566_Harmonized_guidelines_for_single-laboratory_validation_of_methods_of_analysis_IUPAC_Technical_Report [pristup: 17.5.2019.]

17. Van Zoon, P et al. (1998) Validation of analytical methods and laboratory procedures for chemical measurements. *Arhhig rada toksikol*,49, str. 355-370. URL: <https://hrcak.srce.hr/file/5503> [pristup: 18.5.2019.]

POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA

Popis slika

Slika 1. Dva načina grafičkog prikaza linearnosti

Slika 2. Prikaz preciznosti i istinitosti

Slika 3. Mogući izvori onečišćenja vode

Slika 4. LCK testovi korišteni za određivanje KPK

Slika 5. Termoreaktor sa kivetama prije zagrijavanja

Slika 6. HACH-ov DR6000TM UV VIS spektrofotometar korišten za provođenje analiza

Slika 7. Rezultati za linearnost metode prikazani preko grafa uz kalibracijsku krivulju ($k=0,9992$)

Popis tablica

Tablica 1. Validacijski parametri potrebni za validaciju analitičkih metoda različitih namjena

Tablica 2. Granice prihvatljivosti relativnog standardnog odstupanja (RSD) za preciznost metode ovisno o koncentraciji analita prema procjeni AOAC

Tablica 3. Teoretske vrijednosti kemijske potrošnje kisika u jednom gramu različitih organskih tvari

Tablica 4. Rezultati dobiveni za preciznost metode izraženi preko ponovljivosti

Tablica 5. Rezultati dobiveni za preciznost izraženi preko međupreciznosti

Tablica 6. Rezultati dobiveni za istinitost metode

Tablica 7. Rezultati dobiveni za robusnost metode

Popis kratica

Eurecham – Europska udruga kemijskih laboratorija

KPK – kemijska potrošnja kisika

BPK – biološka potrošnja kisika

TOC – ukupni ugljik

h – sat

npr. – na primjer

NN – Narodne Novine

RSD – relativna standardna devijacija

SD – standardno odstupanje

konc. – koncentracija

mg – miligrami

mL – mililitri

mg/L – miligrami po litri

mgO₂/L – miligrami kisika po litri

std. – standard

ZZJZ – Zavod za javno zdravstvo

AOAC – Association of Official Analytical Chemists – Udruga službenih analitičkih kemičara

URL – eng. *Uniform Resource Locator* – usklađeni lokator sadržaja

HACH – Housing Authority of the City of Houston

GD – granica detekcije

GK – granica kvantifikacije

CL – eng. *chemiluminescence*

FIA – eng. *Flow injection analysis* – Analiza injektiranjem u protok

PcCOD – eng. *Photocatalytic method for chemical oxygen demand* – Fotokatalitička metoda za određivanje kemijske potrošnje kisika

PeCOD – eng. *Photoelectrocatalytic method for chemical oxygen demand* – Fotoelektrokatalitička metoda za određivanje kemijske potrošnje kisika

KHP – kalijev hidrogenftalat

O₃ - ozon

IZJAVA O AUTORSTVU RADA

Ja, **Eleonora Dreta**, pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autorzavršnog/diplomskog rada podnaslovom **Validacija metode za određivanje kemijske potrošnje kisika u otpadnim vodama** te da u navedenom radu nisu na nedozvoljen način korišteni dijelovi tuđih radova.

U Požegi, _____

Ime i prezime studenta: _____