

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

VALIDACIJA CIANIDOV V BISTRIH VODAH

Mentor: prof. dr. Milenko Roš

Somentorica: Ksenija Bošnjak, univ. dipl. ing. kem. inž.

MONIKA ARČAN
Varstvo okolja in ekotehnologije

VELENJE, 2017



Številka: 726-40/2015-2
Datum: 12. 11. 2015

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Visoke šole za varstvo okolja **Monika Arčan** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

Validacija cianidov v bistrih vodah.

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

Validation of cyanides in clear waters.

Mentor: **prof. dr. Milenko Roš.**

Somentorica: **Ksenija Bošnjak, univ. dipl. inž. kem. teh.**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom VŠVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat VŠVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Izr. prof. dr. Boštjan Pokorny
dekan

Visoka šola za varstvo okolja

Trg mladosti 7 | 3320 Velenje

t: 03 898 64 10 | f: 03 89864 13 | e: info@vsvo.si

www.vsvo.si





IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana Monika Arčan, vpisna številka 34080002, študentka visokošolskega strokovnega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtorica diplomskega dela z naslovom Validacija cianidov v bistrich vodah, ki sem ga izdelala pod:

- mentorstvom prof. dr. Milenka Roša,
- somentorstvom Ksenije Bošnjak univ. dipl. inž. kem. teh..

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Andreja Tkalec;
- dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

Datum: 07.02.2017

Podpis avtorice:

ZAHVALA

Izjemno velika zahvala gre mojemu mentorju, prof. dr. Milenku Rošu, in somentorici Kseniji Bošnjak, univ. dipl. ing. kem. inž., za vsa prizadevanja, pomoč in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se jima tudi za ves trud in čas, ki sta mi ga posvetila, da je moja naloga končana.

Posebna zahvala gre moji mami in botri, ki sta me ves čas podpirali, mi stali ob strani in me spodbujali pri samem šolanju ter pisanju diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in prostor, Oddelku za kemijske analize Celje, ki mi je omogočil izvajanje diplomske naloge.

IZVLEČEK

Cianidi so zelo toksične spojine, zato spadajo med zelo nevarne kemijske spojine. V naravi nastaja cianid kot stranski produkt metabolizma številnih bakterij, gliv in alg. V diplomskem delu sem z metodo validacije določali cianide v bistrih vodah. Določali smo naslednje parametre: delovno in linearno območje, mejo zaznavnosti, mejo kvantifikacije, natančnost, točnost ter merilno negotovost. Metoda s predpripravljenim reagentom LCK 315 je primerna za določanje cianida v bistrih vodah.

Ključne besede: analiza cianida, validacija, cianidi, bistre vode.

ABSTRACT

Cyanids are known as very toxic substances, so they are a part of very toxic chemical compounds. In the nature cyanide is produced as a byproduct of the metabolism of number of bacteria, fungi and algae. In the thesis we determine cyanide by the method of validation in the crystalline waters. We determined the following parameters: the working range, linear range, limit of detection, limit of quantiation, precision, accuracy and measurement uncertainty. The method of cyanide in the clear waters of preprepared reagent LCK 315 is suitable for the determination of cyanide in the crystalline waters.

Keywords: cyanide analysis, validation, cyanides, clear water.

KAZALO

1 UVOD	8
1.1 Opredelitev problema	8
1.2 Namen in cilj diplomskega dela ter hipoteze	9
1.3 Metode dela	9
2 VODE V SLOVENIJI	10
2.1 Kakovost površinskih voda	10
3 CIANIDI	13
3.1 Lastnosti cianidov	14
3.2 Nastanek cianidov	15
3.3 Določanje in delitev cianidov	16
4.3 Mejne vrednosti	18
4 VALIDACIJA	19
4.1 Delovno območje	20
4.2 Linearnost	20
4.3 Meja zaznavnosti – LOD	21
4.4 Meja določanja – LOQ	21
4.6 Pravilnost	23
4.7 Robustnost	24
4.8 Stabilnost	24
5 EKSPERIMENTALNI DEL	25
5.1 Princip metode	25
5.2 Opozorila in varnostni ukrepi	25
5.3 Reagenti in materiali	25
5.4 Aparature in oprema	26
5.5 Vzorčenje in vzorci	27
5.6 Kalibracija	28
5.7 Interference	28
5.8 Izvedba postopka	29
6 REZULTATI IN DISKUSIJA	31
6.1 Točnost	31
6.2 Meja zaznavnosti – LOD (Limit of detection)	36
6.3 Meja določljivosti – LOQ (limit of quantification)	37
6.4 Linearnost in delovno območje	38
6.5 Vpliv matriksa	41
6.6 Robustnost metode	43
7 SPREMLJANJE KAKOVOSTI S KONTROLNO KARTO	45
7.1 Opis kontrolne karte	46
7.2 Izdelava kontrolne karte	46
8 ZAKLJUČEK	49
9 VIRI IN LITERATURA	51

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Linearnost	39
Graf 2: Vpliv matriksa - pitna voda	41
Graf 3: Vpliv matriksa - podzemna voda	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Elektronska pipeta (Foto: M.Arčan, 2015).	27
Slika 2: Navodilo za izvedbo analiznega postopka (Vir: Medmrežje 1, 2015)	29
Slika 3: Merjenje vzorcev (Foto: M.Arčan, 2015).....	30
Slika 4: Kontrolna karta.	48

KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava koncentracij validirane in preskusne metode.....	32
Tabela 2: Tabela t vrednosti	33
Tabela 3: Ponovljivost standardne raztopine, obogatene destilirane vode in obogatenih vzorcev podtalnih in pitnih vod.....	34
Tabela 4: Obnovljivost za cianid v koncentracijskem območju 0,05 mg/l ter izračun za povprečno vrednost in relativni standardni odklon.....	34
Tabela 5: Medlaboratorijska obnovljivost rezultatov meritev referenčnega materiala na različnih koncentracijskih nivojih.....	35
Tabela 6: Določanje meje zaznavnosti.....	36
Tabela 7: Izračun meje določljivosti.....	37
Tabela 8: Preglednica povprečnih vrednosti za linearnost cianida.....	38
Tabela 9: Preglednica meritev za homosedastičnost cianida.....	40
Tabela 10: Rezultati F-testa za preverjanje homosedastičnosti.	40
Tabela 11: Tabela F vrednosti.....	40
Tabela 12: Podatki za preverjanje vpliva matriksa – pitna voda (2496 - PV).....	41
Tabela 13: Podatki za preverjanje vpliva matriksa - podzemna voda (49 - PDV).	42
Tabela 14: Rezultati robustnosti.	43
Tabela 15: Določevanje opozorilnih in kontrolnih meja.	47

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Čista voda je bistvenega pomena za preživetje človeštva. Človek pa, s svojimi dejavnostmi, različno onesnaži vodo okrog sebe. Z leti se je povečevalo število prebivalstva na Zemlji, posledično so se povečevale dejavnosti, sorazmerno s tem pa se je onesnažila tudi voda. K temu so pripomogle predvsem gospodinjske odpadne vode, industrijski odpadki, pa tudi odtekanje pesticidov s kmetijskih zemljišč v reke, jezera in oceane.

Z namenom trajnostne rabe, preprečitve slabšanja, varovanja in izboljšanja obstoječega stanja voda, zmanjšanja onesnaževanja z nevarnimi snovmi ter zagotavljanja zadostnih zalog kakovostne površinske in podzemne vode je Evropska skupnost leta 2000 sprejela Okvirno vodno direktivo (v nadaljevanju: Vodna direktiva), ki daje državam članicam pravna in strokovna izhodišča za celovit pristop za zaščito in upravljanje z vodami. Glavni cilj Vodne direktive je doseganje dobrega kemijskega in ekološkega stanja voda do leta 2015. Vodna direktiva ne določa mejnih vrednosti za posamezne parametre v vodi, pač pa podaja nov pristop k celostnemu vrednotenju tako kemijskega kot tudi ekološkega stanja voda. Nov pristop temelji na razmerah vodnega okolja, kjer ni vpliva človeka oziroma je njegov vpliv zanemarljiv. To pomeni, da se v skladu z zahtevami Vodne direktive kakovost vode ocenjuje celovito in je naravno stanje definirano kot stanje brez nevarnih snovi ali drugih večjih obremenitev, ki omogočajo življenje vsem organizmom v vodi, kot bi v tem vodnem okolju živeli ob zanemarljivem vplivu človeka. Hkrati zagotavlja primerljivost metodologij oziroma standardov in s tem prvič tudi primerljivost ocen stanja kakovosti voda med posameznimi državami članicami (Ambrožič in ostali, 2008).

Cianidi so izredno toksični in spadajo med zelo nevarne kemijske spojine. Izpostavljenost manjšim koncentracijam cianida otežuje dihanje, slabša sluh in vid, povzroča glavobole in moti delovanje ščitnice. Izpostavljenost visokim koncentracijam cianida lahko privede do poškodb možganov in srca, lahko pa povzroči celo komo ali smrt.

V diplomskem delu želimo opraviti validacijo cianidov v bistrih vodah.

1.2 Namen in cilj diplomskega dela ter hipoteze

V diplomskem delu smo ugotavljali, ali je metoda s predpripravljenimi reagenti primerna za vzorce pitnih in podtalnih vod. Želeli smo ugotoviti, kakšna konzervacija vzorcev je najbolj primerna. Novo metodo konzervacije vzorcev smo primerjali s staro metodo, saj smo pri stari metodi vzorce konzervirali drugače. Ugotavljali smo tudi vpliv matriksa na vzorec. Želeli smo tudi ugotoviti, kakšne so lahko motnje pri analizi: ali so samo tiste, ki jih je proizvajalec napovedal, ali se pojavijo še kakšne druge motnje, ki lahko pripeljejo do napačnega rezultata (interference). Zanimalo nas je tudi, kako dolgo lahko vzorci po konzervaciji stojijo, preden se analizirajo.

V skladu s cilji naloge lahko predpostavimo naslednje hipoteze:

1. Konzervacija vzorca po stari metodi se ne obnese.
2. Vpliv matriksa na vzorec je ničen.

1.3 Metode dela

Diplomsko delo je razdeljeno na dva dela, prvi je teoretični, drugi pa praktični. V prvem delu smo v okviru deskriptivnega pristopa uporabili metodo komplikacije, saj smo povzeli opazovanja, spoznanja drugih avtorjev. Ta del obsega predvsem preučitev obstoječe literature s področja voda, preučili smo področje cianidov, pregledali mejne vrednosti cianida v pitnih in podzemnih vodah, predstavili metodo validacije, predstavili različne načine zagotavljanja kvalitete.

Praktični del naloge je eksperimentalni. V tem delu smo predstavili reagente in materiale, ki smo jih uporabili v poskusih. Predstavili smo tudi materiale in opremo, pripravo vzorcev, kontrolne vzorce in izvedbo samega postopka. V zadnjem delu so skupaj z diskusijo, predstavljeni dobljeni rezultati.

2 VODE V SLOVENIJI

Slovenija je ena najmanjših držav v Evropi, a je glede vodnih virov med najbogatejšimi evropskimi državami. Povprečna letna količina padavin, ki napajajo površinske in podzemne vode, znaša približno 1500 mm. Letno največ padavin prejme zahodni gorati svet, najmanj pa vzhodni del Slovenije. Tekoče vode v Sloveniji oblikujejo gosto rečno mrežo. Zaradi močne razgibanosti terena in kamninske sestave so vodotoki večinoma kratki, saj je le okoli 22 % vodotokov daljših od 25 km. Tudi v geoloških plasteh, ki prevajajo in akumulirajo podzemno vodo, je velika količina dinamičnih zalog, ki so v Sloveniji glavni vir pitne vode (Kakovost voda, 2008).

2.1 Kakovost površinskih voda

Monitoring kakovosti površinskih vodotokov se izvaja na osnovi zakonskih in podzakonskih podlag ob upoštevanju zahtev Vodne direktive ter drugih smernic in strokovnih navodil za vzpostavitev in izvajanje monitoringa. Program monitoringa opredeljuje pogostost vzorčenja, metodologijo vzorčenja, fizikalno–kemijska in mikrobiološka preskušanja. Glede na določbe Pravilnika o pitni vodi določamo naslednje parametre: mikrobiološke, kemijske in indikatorske parametre. Preskušanje vzorca vode na posamezne kemijske parametre pokaže obseg in stopnjo onesnaženosti vode s kemičnimi snovmi, ki lahko predstavljajo tveganje za zdravje ljudi. Kljub velikemu številu kemikalij v okolju so v normative vključene le nekatere, s katerimi si pomagamo pri oceni. Na površinskih vodotokih je bilo v letu 2005 določenih skupno 135 vodnih teles, od tega 110 na vodnem območju Donave in 25 na vodnem območju Jadran. Na nekaterih od teh vodnih teles je monitoring potekal že v preteklosti, na ostalih pa sta bila za potrebe prvega načrta upravljanja voda po vodnih območjih monitoring in ocena stanja prvič izvedena v obdobju 2007-2009. V Sloveniji se od leta 2002 ocenjuje kemijsko stanje površinskih vodotokov v skladu z Uredbo o kemijskem stanju površinskih voda. Uredba določa mejne vrednosti parametrov in merila za ugotavljanje kemijskega stanja (Ambrožič in ostali, 2008).

Kemijsko stanje je treba ugotavljati:

- za vsako reko ali njen del na mestu, kjer prispevna površina dosega 2500 km²,
- za vsako vodno telo, ki je znatno onesnaženo z enim ali več parametri iz prednostnega ali indikativnega seznama parametrov,
- za vsako vodno telo, v katerega se odvajajo odpadne vode s prednostnimi snovmi,
- za vodna telesa, ki jih prečka državna meja.

V skladu z Uredbo o kemijskem stanju površinskih voda je na vseh merilnih mestih treba meriti fizikalno-kemijske parametre. Na vseh osnovnih merilnih mestih se poleg tega redno merijo prednostne snovi, na osnovnih in dodatnih merilnih mestih pa tudi tisti parametri, za katere je na podlagi meritev monitoringa kakovosti površinskih vodotokov ali podatkov letnih poročil emisijskega monitoringa virov onesnaževanja ugotovljeno povečano obremenjevanje. Kemijsko stanje vodnega telesa površinske vode se določa na podlagi izračuna povprečne letne vrednosti parametrov, za katere so v že omenjeni uredbi določene mejne vrednosti (Ambrožič in ostali, 2008).

V primerjavi z razvitimi državami je kakovost voda v Sloveniji v samem evropskem vrhu. Eden od razlogov je brez dvoma ta, da večina rek izvira na ozemlju Slovenije. Vendar to nikakor ne pomeni, da v Sloveniji ni težav tako s kakovostjo površinskih kot tudi podzemnih voda. Posamezne odseke rek še vedno obremenjujejo prevelike količine industrijskih in komunalnih odpadkov in so zato znatno ali celo prekomerno onesnaženi. Problemi so tudi v podzemnih vodah, ki so v Sloveniji glavni vir pitne vode. Podzemne vode so obremenjene z nitrati in pesticidi, lokalno pa tudi s kloriranimi organskimi topili. Onesnaženje je najbolj izrazito v severovzhodnem delu Slovenije in v okolici Celja. Z namenom učinkovitega upravljanja voda je Evropska skupnost v letu 2000 sprejela Vodno direktivo, ki jo je Slovenija že v celoti prenesla v svoj pravni red. V letu 2003 sta bili za potrebe Vodne direktive in upravljanja povodij določeni osnovni administrativni enoti, vodno območje Donave in vodno območje Jadrana. Ozemlje Slovenije je bilo glede na ekološke značilnosti razvrščeno v štiri hidroekoregije, čemur je sledila natančnejša členitev na bioregije in tipe. Izvajanje Vodne direktive se je nadaljevalo z analiziranjem podatkov o naravnih značilnostih voda in vplivih človekove dejavnosti. Ti podatki so bili tudi osnova za določitev vodnih teles površinskih in podzemnih voda, ki so bila določena v letu 2005 (Ambrožič in ostali, 2008).

Vodna telesa so osnovne enote za ugotavljanje stanja voda glede na okoljske cilje. V primeru površinskih vodotokov je, na primer, vodno telo neprekinjeni odsek vodotoka v dolžini od nekaj do več deset kilometrov, s podobnimi naravnimi značilnostmi kot tudi s podobnimi vplivi človekove dejavnosti (kmetijstvo, industrija, urbanizacija). Vodno telo podzemne vode pa je razločna prostornina podzemne vode v enem ali več vodonosnikih. Na površinskih vodah je bilo v Sloveniji določenih 155, na podzemnih pa 21 vodnih teles. V letu 2007 je bil na vseh omenjenih vodnih telesih vzpostavljen monitoring, kot ga zahteva Vodna direktiva. Pri tem gre morda poudariti predvsem nov pristop monitoringa, ki ga uvaja Vodna direktiva. Programi so osnovani na analizah pritiskov. To so podatki o emisijah snovi v vodah iz točkovnih virov, podatki o rabi zemlje, presežkih dušika, rabi fitofarmaceutskih sredstev itd.

Glede na analizo teh podatkov je program monitoringa problemsko orientiran in vključuje predvsem vodna telesa, ki so problematična. Ostala vodna telesa so v program vključena redkeje. Bistvena novost monitoringa je ocena ekološkega stanja. Ekološko stanje se ocenjuje na podlagi bioloških elementov kakovosti (fitoplanktona, fitobentosa in makrofitov, rib in bentoških nevretenčarjev) ter podpornih fizikalno-kemijskih in hidromorfoloških elementov s petimi kakovostnimi razredi. Izhodišče vrednotenja ekološkega stanja je merjenje spremenjenosti strukture in funkcije ekosistema od naravnega stanja, to je stanja, kjer ni opaziti vpliva človeka oziroma je njegov vpliv zelo majhen (Ambrožič in ostali, 2008).

3 CIANIDI

Cianovodikova kislina (tudi vodikov cianid) je spojina z molekulsko formulo HCN, ki nastane, ko plinasti vodikov cianid raztopimo v vodi. Ima vonj po grenkih mandeljnih. Do odkritja živčnih bojnih strupov je HCN veljala za najbolj strupeno sintetično spojino. Njene soli se imenujejo cianidi in tvorijo negativni ion CN^- . Pripravijo jo lahko z učinkovanjem kislin na cianide (KCN, NaCN), pri čemer se sprošča plinasti HCN (Lazarini in Brenčič, 2014).

Pod imenom cianidi razumemo veliko različnih spojin, ki vsebujejo CN skupino. Viri cianidov v okolju so naravni ali umetni, osnovni vzrok strupenosti pa je cianidni anion. Veliko se uporabljajo v kemični in kovinski industriji, npr. pri galvanizaciji ali za fumigacijo. V virih pitne vode najdemo cianide običajno v nizkih koncentracijah, obstaja pa možnost akutnega onesnaženja (transport, uporaba, odplake), ko se lahko pojavijo v visokih koncentracijah, zlasti če je vir pitne vode površinska voda. Zaradi sočasnega izhlapevanja in kemijske ter bakterijske razgradnje manjša onesnaženja običajno le stežka dosežejo toksično raven. Ker je cianid v zemljini mobilni, lahko dospe tudi v podzemno vodo. Sicer je v okolju relativno stabilen, razpolovni čas v vodi naj bi bil nekaj tednov. Skupina CN reagira z velikim številom reaktantov in tvori širok spekter produktov, kot so amidi, amini, karboksilne kisline, aldehidi, ketoni estri, tioamidi itd. Nižji alifatski nitrili so gorljivi. Cianidi so kot cianogeni glikozidi prisotni tudi v številnih rastlinah. Pri kloriranju vode se lahko ob prisotnosti organskih prekurzorjev, ali pa pri tvorbi kloraminov za dezinfekcijo vode tvori cianogen klorid, ki razpade in pri tem sprosti cianid (Lazarini in Brenčič, 2014).

V običajnih razmerah je glavni vir vnosa cianidov v človeški organizem cigaretni dim. Izpostava preko vode z vnosom preko dihal ali kože naj ne bi bila pomembna. Glavna in učinkovita sprotna presnova poteka v jetrih do tiocianata, izločanje pa v obliki tiocianata preko urina. Učinkovanje ni kumulativno. Cianid je v visokih koncentracijah akutno toksičen zaradi prekinitve oksidativne presnove. Simptomi so zato posledica pomanjkanja kisika v tkivih, predvsem v možganih. O rakotvornem delovanju ni podatkov, testi mutagenosti so bili v glavnem negativni. Tiocianati bi lahko ob kroničnem vnosu delovali toksično na ščitnico (Lazarini in Brenčič, 2014).

3.1 Lastnosti cianidov

V naravi nastaja cianid kot stranski produkt v metabolizmu številnih bakterij, gliv in alg. Do sprostitve cianida prihaja tudi pri hidrolizi cianogenih glikozidov, kot je amigdalín, ki ga najdemo v mandljih in koščičastem sadju, in linamarin, ki ga najdemo v gomoljih tropske rastline tapioka (kasava). Cianovodikova kislina (tudi vodikov cianid) je spojina z molekulsko formulo HCN, ki nastane, ko plinasti cianovodik raztopimo v vodi. Ima vonj po grenkih mandeljnih. Do odkritja živčnih bojnih strupov je HCN veljala za najbolj strupeno sintetično spojino. Nizke koncentracije HCN najdemo v vlažnem zraku kot produkte nepopolnega sežiga spojin, ki vsebujejo dušik, kot je na primer cigaretni dim. HCN nastaja tudi med požari, kjer dušik vsebujoči polimeri pirolizirajo ali zgorijo. Nedavne raziskave kažejo, da pri žrtvah požarov vsebuje kri znatne koncentracije cianida, kar dokazuje, da je cianid v požaru lahko smrtonosen (Lazarini in Brenčič, 2014).

Izpostavljenost visokim koncentracijam cianida (MDK: 5 mg/m³ oz. 1 mg/kg telesne teže) poškoduje možgane in srce ter lahko povzroči komo ali celo smrt. V organizmu prihaja preko pljuč, prebavnega trakta in kože, če je zajeta večja površina. Deluje zelo hitro, človek najprej izgubi zavest, nastopijo kronično-tonični krči ter končna paraliza dihalnega centra. Pri vnosu smrtne koncentracije nastopi smrt v prvih treh minutah. Srednja smrtna koncentracija LC50 znaša od 2000 do 5000 mg•min/m³. Manjše koncentracije otežujejo dihanje, slabšajo sluh in vid, povzročajo glavobol in motijo delovanje ščitnice (Lazarini in Brenčič, 2014).

S cianidi se lahko zastrupimo na več načinov. Najbolj nevarna sta vdihovanje HCN hlapov in uživanje cianidnih soli, ki se z lahkoto absorbirajo iz gastrointestinalnega trakta. Nižji kot je pH v želodcu, več plinastega HCN se sprostí iz soli. HCN je namreč bolj hidrofoben in prepusten za membranske nosilce kot CND. Pri zastrupitvi z uživanjem cianidnih soli pride do visokih koncentracij cianida v jetrih. Pri obeh načinih zasledimo visoke koncentracije cianida v plazmi in eritrocitih ter v srcu, pljučih in možganih. Cianidi se lahko absorbirajo tudi skozi kožo, vendar je v tem primeru nevarnost zastrupitve manjša (Lazarini in Brenčič, 2014).

Naravna pot odstranjevanja cianida iz organizma poteka z njegovo pretvorbo v neškodljivi tiocianat (SCN⁻) ob pomoči encima rodenaze, ki zahteva žveplove spojine, iz katerih odtrga za pretvorbo potreben žveplov atom. Raziskave v predelih Afrike, kjer se prebivalstvo prehranjuje pretežno s tapioko, ki vsebuje precej HCN, so odkrile, da so ljudje, katerih prehrana ni vsebovala z žveplom bogatih hranil, dosti prej razvili simptome kronične

zastrupitve s cianidom, saj se organizem zaradi pomanjkanja žveplo-donorskih spojin ni mogel sam očistiti (Glavaš, 2004).

Toksičnost cianidov je odvisna predvsem od oblike, v kateri se nahajajo. Najbolj strupeni so alkalijski oziroma zemljoalkalijski cianidi in cianovodikova kislina (HCN), ki jih prištevamo med proste cianide. Soli alkalijskih cianidov so v vodi že v šibko alkalnem okolju ($\text{pH} < 11$) zelo dobro topne, v nevtralnem ali kislem mediju pa že prehajajo v lahko hlapni HCN, ki je strupen brezbarvni plin s šibkim vonjem po mandljih. Zaradi nizke temperature vrelišča je izhlapevanje HCN pri sobni temperaturi zelo močno. Da preprečimo izhlapevanje, morajo biti raztopine močno alkalne ($\text{pH} > 12$) ali pa jih moramo hladiti ($T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). V vodnem okolju se cianidi nahajajo v obliki kompleksnih spojin s težkimi kovinami, ki so glede na vrsto kovine in obstojnost kompleksa bistveno manj toksični od prostih cianidov (Glavaš, 2004).

Kljub svoji toksičnosti imajo cianidi širok spekter uporabe. HCN se uporablja pri deratizaciji. Široka razširjenost uporabe cianidov v industriji (metalurška, plastična, fotografska, rudarska ...), dobra topnost v vodi in hlapnost HCN predstavljajo stalno potencialno nevarnost za neposredno okolico, predvsem pa za vodne ekosisteme. Mehanizem toksičnosti temelji na zaviranju celičnega dihanja. Cianidni ion se veže na Fe^{3+} v citokromu močneje kot kisik in s tem prekine transport elektronov v notranjo membrano mitohondrija. Za razliko od mehanizma toksičnosti ogljikovega monoksida se cianidni ion ne veže na Fe^{2+} v hemoglobinu (Glavaš, 2004).

3.2 Nastanek cianidov

Metabolični nastanek cianida temelji na razgradnji nekaterih spojin v našem prebavnem traktu, kar lahko povzroči simptome, značilne za zastrupitev s cianidom. Primeri takih spojin so nitroprusid (razgradi se v NO in cianid), hipotiocianat (antibakterijsko sredstvo), alifatski nitrili, organotiocianati in cianoamid. Shranjevanje vzorcev za analizo vsebnosti cianida je lahko zelo problematično. Med shranjevanjem se lahko zgodi, da cianid nastane v reakciji med nitrili in organskimi spojinami, ki so pogosto prisotne v vzorcu (hemoglobin, serum ali hem). To velja tudi za alkil nitrite. V enem od primerov zastrupitve s cianidom je nekdo skušal zastrupiti sodelavce s kavo, v katero je dodal izobutil nitrit (IBN). Ta je v kavi razpadel v izobutil alkohol in nitrit, kar je povzročilo znižanje pH. V kislem okolju pa je nitrit postal zelo reaktiven. Del se ga je z zračnim kisikom pretvorilo v nitrat, del pa je reagiral z organskimi spojinami v kavi in tako je nastal cianid. Poleg nitrilov in nitritov cianid tvorijo tudi mikroorganizmi pri gnitju in v procesih cianogeneze. Spontanemu nastanku cianida se lahko izognemo s shranjevanju vzorcev v hladilniku. Med analiznim postopkom lahko cianid

nastaja pri oksidaciji tiocianata. Pri ugotavljanju vsebnosti cianida v krvi je treba najprej nakisati vzorec, da cianidi preidejo v plinasti HCN. Pri tem je neizogibno, da pride do reakcij razgradnje organskih spojin ali nastanka oksidantov. Slednji so predvsem posledica denaturacije hemoglobina, kjer nastane superoksidni anion, iz katerega lahko nastane H_2O_2 . Tiocianat tako lahko oksidira O_2^- , HOO^- in H_2O_2 . Nastanku cianida iz tiocianata se lahko izognemo z dodatkom askorbinske kisline, ki blokira kisik vsebujoče oksidante. Drugi primeri nastajanja cianida med analizo vključujejo nitrile, iz katerih se med destilacijo lahko odceplja cianid, nitrite, ki ravno tako lahko oksidirajo tiocianat, in ferocianide, iz katerih nastaja cianid v kislih pogojih. Cianid pa lahko nastane tudi med segrevanjem vzorca (Glavaš, 2004).

3.3 Določanje in delitev cianidov

Laboratorijska analiza cianidov poteka v dveh korakih. Najprej cianide ekstrahiramo iz danega vzorca in nato kvantitativno določimo HCN. Pri ekstrakciji uporabljamo različne tehnike, kot so prezračevanje, destilacija in mikrodifuzija. Vsebnost HCN najpogosteje določimo spektrofotometrično, spektrofluorometrično ali z uporabo HPLC. Primerna in občutljiva tehnika, ki združuje ekstrakcijo in kvantifikacijo, je tudi HS-GC (headspace gas chromatography), kjer cianid pretvorimo v cianogen halid (CNX, X = halogen), tega pa določimo s pomočjo dušik-fosforjevega detektorja ali detektorja na zajetje elektronov. Na Japonskem kot standardno metodo v forenzični toksikologiji in kontroli odpadnih voda uporabljajo mikrodifuzijo v kombinaciji s König-spektrofotometrično metodo. Pri slednji cianid najprej oksidirajo v cianogeni halid, ki dá v reakciji s piridinom obarvan produkt (Glavaš, 2004).

Mednarodni ISO standard 6703/2 opredeli naslednje delitve cianidov:

- določanje celotnega cianida,
- določanje lahko sprostljivega cianida,
- določanje cianoklorida (CICN),
- določanje cianidov z difuzijo pri pH = 6,0 (International Standard, 2012).

3.3.1 Določanje celotnega cianida

Ko določamo celotni cianid, ga katalitično razklopimo v močno kisli sredici. Sproščeni HCN absorbiramo v alkalnem mediju. Pri tem se vežejo enostavni in kompleksni cianidi oz. organske spojine, ki imajo CN skupino, pri tej metodi pa tvorijo vodikov cianid. CN skupine teh spojin lahko tvorijo cianidne ione ali vodikov cianid delno ali popolnoma, cianohidrine pa

določamo le delno. Vzorec moramo segreti s solno kislino, pri čemer potrebujemo tudi bakrove ione. Pri tem se v zrak sprošča vodikov cianid, ki ga s tokom zraka preženemo v absorpcijsko kolono, ta pa vsebuje raztopino natrijevega hidroksida (International Standard, 2012).

3.3.2 Določanje lahko sprostljivega cianida

Lahko sprostljivi cianidi so tisti, ki pri sobni temperaturi in pri $\text{pH} = 4,0$ sproščajo hlapni HCN. Metoda določanja lahko sprostljivega cianida vključuje določanje prostih radikalov HCN, predvsem alkalijske in zemljoalkalijske komplekse cianida, komplekse s cinkom, srebrom, bakrom, kadmijem in nikljem. S to metodo ne določamo kompleksov kobalta, nitrilov, železa, cianatov, tiocianatov in cianogenkloridov. Lahko sprostljivi cianid določimo tako, da vzorcu dodamo pufer s $\text{pH} = 4,0$, kovinski cink, raztopino kadmijevega in cinkovega sulfata in EDTA. Hlapni cianid s tokom zraka preženemo v absorpcijsko posodo, ta pa vsebuje raztopino natrijevega hidroksida. Cianidni ioni reagirajo s kloraminom-T v cianoklorid CNCl , ta pa s piridin barbiturno kislino tvori rdeče vijolično obarvan kompleks (International Standard, 2012).

Večjo občutljivost dosežemo z merjenjem intenzitete obarvanja, ki jo povzroča rdeči intermediat. Sistem iz separacijskega modula na osnovi plinske difuzije v kombinaciji z zaustavljenim akceptorskim tokom je omogočil enostavno izolacijo vzorca, predkoncentracijo ter strategijo vzorčevanja - podobno kot pri sulfidu. Totalni anorganski cianid (tako prost kot kompleksiran) lahko določamo tako, da vzorec najprej obsevamo z UV svetlobo, nato pa ga podvržemo kolorimetrični ali amperometrični analizi. Nekateri cianide se dá določati tudi prek nastanka fluorescentnega izoindola. Detekcija cianida je lahko osnovana tudi na ojačitvi fluorescence Cu-kalcein kompleksa ali pa na kemiluminescenčni reakciji med $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{2-}$ (ki ima visok oksidacijski potencial) in luminolom. Poznana je tudi senzitivirana kemiluminescenca, ki temelji na ojačitvi emisije svetlobe, povzročene s strani vzbujenih molekul kisika. Tudi tu so vključeni Cu(II)-CN^- ioni. Cianide lahko določamo tudi potenciometrično, in sicer preko Ag elektrode (Avtomatizirana analiza, 2006).

3.3.3 Določanje cianoklorida

Pri določanju cianoklorida gre za kvantitativno določitev cianidnih ionov, ki poteka spektrofotometrično. Območje uporabe je pod $0,005 \text{ mg/L}$. Cianoklorid je plin, ki je le delno topen v vodi, je pa zelo strupen tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Cianoklorid določimo tako, da dodamo raztopino kositrovega klorida v vzorec. Določanje cianoklorida poteka pri sobni

temperaturi in pH = 5,4 ter s stalnim preprihovanjem z zrakom s piridin barbiturno kislino napolnjene absorpcijske posode. (International Standard, 2012).

3.3.4 Določanje cianidov z difuzijo pri pH = 6,0

Če imamo majhne količine cianida, uporabimo metodo določanja cianidov z difuzijo pri pH = 6,0. Mednarodni standard predstavlja osnutek postopka, ki do zdaj še ni bil sprejet. Laboratorijsko določanje cianidov z difuzijo pri pH = 6,0 poteka v dve stopnjah. Najprej je treba cianide ekstrahirati iz vzorca in nato kvantitativno določiti HCN. Pri ekstrakciji uporabljamo različne tehnike: destilacijo, mikrodifuzijo, preprihovanje ... Vsebnost HCN določimo spektrofotometrično, spektrofluorometrično ali z uporabo HPCL (International Standard, 2012).

4.3 Mejne vrednosti

V Pravilniku o pitni vodi je cianid uvrščen v Prilogo I, del B, kjer je določena njegova mejna vrednost v pitni vodi, in sicer 50 µg/l. SZO je za kratkotrajno in varno izpostavo (incident) za 5 dni izračunala za cianid vrednost 0,6 mg/l v pitni vodi, sicer pa 0,07 mg/l. EPA ima določeno mejo 0,2 mg/l, pri kateri naj ne bi bilo zdravstvenih težav in je hkrati tehnično dosegljiv nivo. Prag vonjanja (vonj po grenkih mandeljnih) za cianide v vodi je pri 0,17 mg/l (Pravilnik, 2004).

Ob preseženih vrednostih cianidov v pitni vodi je potrebno takojšnje ugotavljanje vzrokov in njihova odprava. Ker je cianid v nizkih koncentracijah iz pitne vode preprosto odstraniti s pripravo, npr. klorovimi preparati, ozonom, adsorpcijo itd., so bolj važne incidentne situacije, ko pride do onesnaženja vodnih virov, predvsem površinskih. V takem primeru gre za prehodni pojav, za katerega je po mnenju SZO možno za 5 dni dopustiti za cianid vrednost 0,6 mg/l v pitni vodi. V tem času mora biti onesnaženje odpravljeno (Pravilnik, 2004).

4 VALIDACIJA

Validacija analizne metode je postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analizne metode in potrdimo, ali je metoda primerna za določeno analitsko uporabo ali ne. Validacija analitskih postopkov dokazuje primernosti za določen namen in predstavlja pomemben del pri vpeljavi uporabe postopka nove analitske metode (Statistične metode, 1998).

Mednarodna konferenca (ICH) je zahteve uredila v dve smernici. Prva smernica povzema in definira validacijske značilnosti, ki so potrebne za različne vrste testnih postopkov, druga pa prvo razširja, tako da vključuje zahtevane eksperimentalne podatke in statistične interpretacije. Osnova visoko kvalitetnih podatkov so zanesljive analitske metode. Nove analitske metode zahtevajo previdno razvijanje metode, čemur sledi temeljita validacija končne metode. Pomembno je poudariti, da je kvaliteta analizne metode odvisna predvsem od razvoja metode in ne toliko od uspešnosti njene validacije. Nujno je torej, da metoda ustreza namenu. Temeljni cilj validacije analizne metode je razviti objektivne dokaze, da bo določena metoda pokazala sprejemljivo točnost in natančnost, tako da bo laboratorijsko uporabna. Rezultat validacije kot metode je potrditev s pomočjo preverjanja in pripravo objektivnih dokazov, da so izpolnjene posamezne zahteve za specifične namene uporabe. Validacija metode vključuje preskušanje analizne metode glede na parametre, ki so v nadaljevanju natančneje pojasnjeni: delovno območje, linearnost, meja zaznavnosti, meja določljivosti, natančnost, točnost in merilna negotovost (Statistične metode, 1998).

Pri validaciji metode običajno vrednotimo naslednje parametre:

- delovno območje,
- linearnost,
- meja zaznave – LOD (Limit of detection),
- meja določanja- LOQ (Limit of quantification),
- natančnost,
- pravilnost,
- selektivnost,
- robustnost,
- sterilnost (Žorž, 1991).

4.1 Delovno območje

Delovno območje metode je interval, v katerem predpisana metoda daje rezultate, ki imajo ustrezno tako ponovljivost kot točnost. Določimo ga z merjenjem vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije merjene spojine. Delovno območje se lahko ujema z linearnim območjem, vendar je to bolj izjema kot pravilo. Delovno območje je lahko širše od linearnega, če je določitev v tem območju kvantitativna ter doseže točnost in natančnost meritev (Statistične metode, 1998).

4.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da daje zanesljive signale za izračun po definiranih odnosih. Dokaz linearnosti odziva je pomemben formalni dokaz pravilnosti izračunov. Območje linearnosti izberemo tako, da izmerimo standardne raztopine različnih koncentracij po celotnem delovnem območju in izračunamo regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov. Pomembni parametri so naklon, odsek na ordinati in korelacijski koeficient, ki mora biti nad 0,99. V primeru, če ugotovimo slabšo linearnost, je treba narediti večje število meritev in ponovno določiti korelacijski koeficient. Priporočljivo je, da je metoda linearna po celotnem koncentracijskem območju. Če ni, lahko območje razdelimo na več manjših in znotraj njih testiramo linearnost. Linearnost modela lahko ugotovimo tudi z računanjem koeficienta kakovosti Q_c . Če vrednost izračunanega Q_c ne presega 3 %, je linearnost modela dobra. Vrednosti od 3 do 5 % so še dopustne, če presegajo 5 %, pa moramo ukrepati. Vrednosti določimo tako, da izmerimo standarde raztopine analita različnih koncentracij po celotnem delovnem območju in izračunamo regresijsko premico z metodo najmanjših kvadratov. Linearnost lahko preverimo z risanjem umeritvene krivulje, ki podaja linearno odvisnost koncentracije od merjene količine (Statistične metode, 1998).

Za vrednotenje linearnosti umeritvene krivulje uporabljamo metodo najmanjših kvadratov, ki nam dá enačbo regresijske premice. Kot dodaten parameter, ki vrednoti linearnost umeritvene krivulje, uporabljamo tudi korelacijski koeficient, ki je tem bližje vrednosti ena, čim bolj je krivulja linearna. Pri odvisnostih, ki niso linearne, uporabimo polinomno regresijo višjih stopenj. Oblika krivulje ni toliko pomembna, če jo le dovolj natančno določimo (Brodnjak Vončina, 2006).

Pogosta je tudi situacija, kjer je grafični prikaz približno linearen ali linearen pri nizkih koncentracijah, pri višjih koncentracijah pa opazimo odklik od linearnosti. Ko se odločamo,

ali je najboljša krivulja polinom druge ali tretje stopnje za prilagajanje kalibracijskih podatkov, uporabimo kriterij najmanjših kvadratov, da se odločimo za kvaliteto prilagoditve (Brodnjak Vončina, 2006).

Linearnost opredeljuje spodobnost metode, da je v določenem območju signal linearno odvisen od koncentracije analita (Horjak, 2012).

4.3 Meja zaznavnosti – LOD

Meja zaznavnosti (Limit of detection) je najnižja koncentracija analizirane komponente, ki lahko določimo v danem vzorcu, pomembno pa je, da je ne ovrednotimo kvantitativno. Mejo zaznavnosti določimo tako, da izmerimo vsaj šest paralelnih vzorcev, ki ga preiskujemo, s standardnim dodatkom, nato pa izračunamo standardni odmik, ali pa jo izračunamo statistično. Meja zaznavnosti preiskovalne komponente v vzorcu je najnižja koncentracija analita, ki ga zaznamo, ni pa nujno, da ga kvantitativno določimo. Gre za koncentracijo, katere signal je enak povprečnemu signalu slepega vzorca, ki mu prištejemo šest standardnih odklonov vzorca. Izračunano mejo zaznavnosti moramo vedno potrditi z meritvijo realnega vzorca. Praviloma se meja zaznavnosti spremeni, če se spremeni matrica vzorca (Statistične metode, 1998).

Mejo zaznavnosti izračunamo po naslednji enačbi:

$$\text{LOD} = \text{povprečna vrednost slepega vzorca} + (6 \times \text{standardni odklon}).$$

4.4 Meja določanja – LOQ

Meja določanja (Limit of quantification) je najnižja koncentracija merjenega elementa, ki jo še lahko določimo z zadovoljivo točnostjo in natančnostjo. Po navadi je meja določanja najnižja točka umeritvene krivulje oziroma najnižja koncentracija standardne raztopine, ki smo jo merili. Mejo določanja lahko določimo iz desetkratnega standardnega odklona preiskovanega vzorca s standardnim dodatkom občutljivosti metode. Mejo zaznavnosti in mejo določanja lahko ovrednotimo z osnovnimi statističnimi pojmi, kot so lahko povprečje, standardni odmik in relativni standardni odmik (Statistične metode, 1998).

Mejo določanja izračunamo po naslednji enačbi:

$$\text{LOQ} = \text{povprečna vrednost slepega vzorca} + (10 \times \text{standardni odklon}).$$

4.5 Natančnost

Natančnost je stopnja skladanja med posameznimi rezultati, če je analiza opravljena na več paralelkah istega homogenega vzorca. Običajno se izraža s standardnim odmikom, lahko pa tudi z relativnim odmikom (Žorž, 1991).

Natančnost poda variabilnost rezultatov, ki jih lahko pričakujemo pri izvajanju metode v različnih pogojih v istem laboratoriju. Je vmesna stopnja pri preverjanju obnovljivosti, ki je natančnost, dobljena pri najbolj različnih možnih pogojih (ista metoda, različni analitiki, različni dnevi analize, različni laboratoriji, različne kemikalije, druga oprema, različna temperatura in vlažnost). Uporabimo jo takrat, ko v laboratoriju ne moremo izpolniti vseh pogojev obnovljivosti (Planinšek, 2012).

Natančnost metode podajamo na dva načina, odvisno od tega, pod katerimi pogoji smo jo določili:

- Ponovljivost je sposobnost dajati medsebojno nepomembno različne rezultate v seriji analiz homogenega vzorca. To je natančnost, dobljena iz rezultatov, ki so izmerjeni pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti reagenti, isti analitik, isti laboratorij in ista oprema, pomemben pa je tudi kratek čas med meritvami);
- Obnovljivost je natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih (ista metoda, isti vzorec, drug analitik, različen laboratorij, različna oprema in daljši čas med meritvami) (Statistične metode, 1998).

Mejo ponovljivosti in mejo medlaboratorijske obnovljivosti izračunamo z naslednjo enačbo:

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_r$$

r = meja ponovljivosti ali meja imedlaboratorijske obnovljivosti

$t = 1,96$

σ_r = standardni odmik pri ponovljivih pogojih

T vrednost izračunamo z naslednjimi enačbami:

$$t_{\text{izrač.}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$
$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$
$$PS = n_1 + n_2 - 2$$

$t_{\text{izrač.}}$ = izračunana t vrednost

$t_{\text{tab.}}$ = tabelarična t vrednost

S_1 = standardni odmik prve skupine meritev

S_2 = standardni odmik druge skupine meritev

n_1 = število meritev v prvi skupini

n_2 = število meritev v drugi skupini

\bar{x}_1 = povprečna koncentracija prve skupine meritev

\bar{x}_2 = povprečna koncentracija druge skupine meritev

PS = število prostorskih stopenj

4.6 Pravilnost

Točnost analize je njena sposobnost, da je rezultat kar najbližji pravi vrednosti oziroma da je od nje statistično nepomembno različen. Pove nam, koliko rezultat, dobljen z analizo metodo, odstopa od prave vrednosti. Točnost metode določimo z merjenjem ustreznega referenčnega standarda in rezultat meritve primerjamo s certificirano vrednostjo. Pomembno je, da vzorec izpostavimo popolnoma enakim pogojem, kakor jim bodo izpostavljeni vzorci v rednem ali rutinskem delu. Analize torej izvajamo tako, kot bi analizirali običajen vzorec. Tudi rezultate računamo po enakem protokolu kot za redno analizo. Pravilnost je razlika med povprečjem enega vzorca in njegovo pravo vrednostjo; če meritev ne bi imela sistematske napake (odstopanje - bias je 0), bi bila točnost enaka pravilnosti (Statistične metode, 1998).

Pravilnost je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo pravilne oz. točne rezultate. Izrazimo jo kot % izkoristka med znano dodano količino snovi, ki jo analiziramo, in količino, ki jo izračunamo iz rezultatov analize (Žorž, 1991).

Izkoristek izračunamo po naslednji enačbi:

$$\text{Izkoristek (\%)} = \text{dobljeno/dodano} \times 100 \%$$

4.7 Robustnost

Z robustnostjo identificiramo spremenljivke, ki bi lahko imele znaten vpliv na zmogljivost metode (set eksperimentov z referenčnimi materiali, vzorci z znano sestavo) za ugotavljanje učinkov na točnost in natančnost metode s sistematičnimi spremembami spremenljivk. Ugotavljamo odpornost metode na zunanje vplive. Testiramo jo tako, da v meritve namenoma dodajamo majhne spremembe in ugotavljamo, kako vplivajo na rezultate analize. Vpliv faktorjev je lahko zelo velik, zato je v metodi potrebno definirati izbrane pogoje dela tako, da izničijo vpliv faktorjev (Planinšek, 2012).

4.8 Stabilnost

Stabilnost podaja velikost odstopanj v analiznih rezultatih, narejenih v različnih časovnih intervalih. Mnoge snovi lahko razpadejo že med pripravo vzorca ali med analizo, zato je treba določati stabilnost. Sistem stabilnosti je sprejemljiv, če relativni standardni odmik v časovnih intervalih ne prekorači več kot 20 % celotne natančnosti. Če je vrednost večja, moramo izračunati časovno uporabnost vzorčne raztopine. Časovni vpliv zmrzovanja in odtajevanja preverjamo z dodajanjem merjene komponente takoj ob shranjevanju in po nekaj dnevih ter z merjenjem odgovarjajočih koncentracij (Brodnjak Vončina, 2007).

5 EKSPERIMENTALNI DEL

5.1 Princip metode

Pri preskusni metodi za določanje cianida v bistrih vodah s predpripravljenim reagentom LKC 315, cianid reagira s klorom, pri tem nastane cianoklorid, ki v prisotnosti z barbiturno kislino reagira s piridinom. Pri tem prihaja do kondenzacije, kjer se tvori vijolično barvilo.

5.2 Opozorila in varnostni ukrepi

5.2.1 Priprava reagentov in standardnih raztopin

Vsi reagenti morajo biti znane analitične čistosti, voda mora biti destilirana ali deionizirana. Pri delu je obvezna zaščitna oprema, ki je sestavljena iz zaščitne obleke, očal in rokavic.

5.2.2 Uporaba specialnega zaščitnega okolja – brezprašna komora (digestorij)

Pri pripravi raztopine 5 M natrijevega hidroksida prihaja do močne termične reakcije in do izhajanja strupenih plinov, zato je uporaba protiprašne komore obvezna.

5.3 Reagenti in materiali

- Natrijev hidroksid

CAS št.: 1310-73-2, proizvajalec: Sigma Aldrich.

- Natrijev hidroksid 5 M

V 1000 ml čašo smo zatehtali 100 g natrijevega hidroksida in čašo postavili v banjico z ledom v digestoriju. Nato smo dodali 300 ml deionizirane vode in takoj pričeli mešati raztopino. Ko se je natrijev hidroksid raztopil, smo raztopino prelili v 500 ml merilno bučko in do oznake dopolnili z deionizirano vodo.

- Vsebina vial LKC 315 (Cyanide Sample cuvette)

ES - št.	CAS - št.	Sestavina	Delež
231-448-7	7558-79-4	dinatrijev hidrogenfosfat	> 50 %
231-913-4	7778-77-0	kalijev dihidrogenfosfat	30 %
204-847-9	127-52-6	kloramin B	< 20 %

- Sestava snovi v modrem zamašku (LKC 315 Cyanid DosiCapZip)

ES - št.	CAS - št.	Sestavina	Delež
212-211-7	769-42-6	1,3 dimetilbarbiturna kislina	> 20 %

- Raztopina A (LKC 315 Cyanid LKC 315 A)

ES - št.	CAS - št.	Sestavina:	Delež
231-791-2	7732-18-5	voda	> 95 %
203-809-9	110-86-1	piridin	< 2 %
231-595-7		klorovodikova kislina %	< 1 %

(Medmrežje 2, 2015)

- Standardna raztopina za cianide

$K_2[Zn(CN)_4]$ in H_2O , koncentracije 1000 mg/l. Proizvajalec: Merck.

- Standardna raztopina za cianide I, konc. 5 mg/l

Standardno raztopino smo pripravili tako, da smo v 100 ml merilno bučko odpipetirali 1 ml standardne raztopine za cianide.

- Standardna raztopina za cianide II, konc. 0,05 mg/l

Standardno raztopino smo pripravili tako, da smo v 50 ml merilno bučko odpipetirali 0,5 ml vmesne standardne raztopine za cianide.

- Deionizirana voda

Deionizirana voda nastaja s čiščenjem destilirane vode z Milli-Q sistemom za čiščenje vode (Millipore Corporative, Bedford, MA, ZDA).

5.4 Aparature in oprema

- spektrofotometer HACH LANGE DR 3900

Meritve smo izvajali na spektrofotometru HACH LANGE DR 3900. Izbrani spektrofotometer mora biti primeren za merjenje absorbance v vidnem območju spektra. Najobčutljivejša valovna dolžina je okoli 880 nm, toda če se pojavijo izgube, lahko absorbanco merimo pri valovni dolžini 700 nm (Planinšek, 2012).

- elektronska pipeta RAININ 0,1 ml – 1 ml, 0,2 ml – 2 ml



Slika 1: Elektronska pipeta (Foto: M.Arčan, 2015).

- analitska tehtnica Mettler

Analitska tehtnica, ki je sposobna tehtati na 0,0001 g natančno. Tehtnica mora biti kalibrirana (Planinšek, 2012).

- stresalnik Heidolph PROMAX 2020.
- merilna bučka 50 ml ($\pm 0,10$ ml), 100 ml ($\pm 0,100$), 500 ml ($\pm 0,250$) in 1000 ml ($\pm 0,6100$).
- lijak – steklen.

5.5 Vzorčenje in vzorci

5.5.1 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev

Za vzorčenje smo uporabili 50 ml posodice iz polietilena.

5.5.2 Priprava vzorca

Takoj po prihodu pitne ali podtalne vode v laboratorij smo smo dodali v 50 ml posodico do 1 ml 5M NaOH, saj mora biti pH vzorca od 7 do 8. Vzorce je treba analizirati v čim krajšem času. Če zaradi časovne stiske tega ne moremo narediti, lahko vzorce hranimo pred analizo v hladilniku pri temperaturi od 0 do 4 °C največ 1 teden.

5.5.3 Kontrolni vzorci

Za kontrolo kvalitete smo uporabili laboratorijski standard s koncentracijo 0,05 mg/l in slepi vzorec.

Za laboratorijski standard smo izbrali obogateno deionizirano vodo s standardnim dodatkom s koncentracijo 0,05 mg/l. Pripravili smo ga po postopku standardne raztopine za cianide II in ga obravnavala na enak način kot realne vzorce.

Za slepi vzorec smo uporabili deionizirano vodo. Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo v vialo namesto vzorca odpipetirali 1 ml deionizirane vode in jo obravnavali na enak način kot realne vzorce.

5.6 Kalibracija

Pri metodi za določanje cianida v bistrih vodah s predpripravljenim reagentom LKC 315 kalibracija ni potrebna, saj ima spektrofotometer HACH LANGE 3900 kalibracijsko krivuljo že vgrajeno.

5.7 Interference

Motnje povzročajo nastajanje formaldehida, sulfita in drugih spojin, ki vplivajo na nastajanje klora.

Nastajanje formaldehida in sulfita povzročata prenizko koncentracijo cianida. Tiocianat reagira kot cianid s klorom, pri tem nastane cianogen klorid in je zato vključen pri rezultatu.

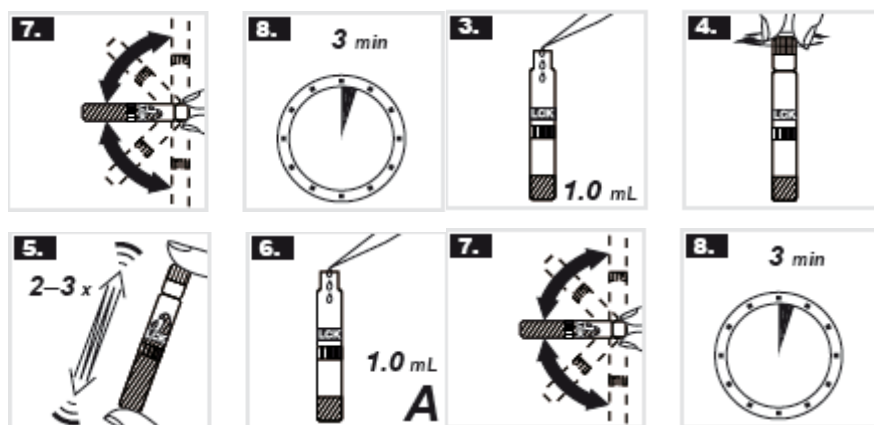
Interference, ki se lahko pojavijo v vzorcih bistrih vod, kjer se določa celotni cianid, so previsok pH, motnost vzorca in nepravilno rokovanje z zamaškom DosiCapZip vial med samim postopkom.

Motnjam previsokega pH se izognemo tako, da ga pred začetkom analize preverimo in opravimo njegovo korekcijo, če je potrebna. Če je vzorec moten, ga prej prefiltriramo skozi 0,45 filter.

Zelo pomembno je, da med postopkom analize zamašek DosiCapZip zelo hitro privijemo na vialo in da ga pravilno obrnemo.

5.8 Izvedba postopka

Vzorci smo najprej pustili na temperaturi od 15 do 20 °C. Medtem smo pripravili laboratorijski standard za cianide s koncentracijo 0,05 mg/l. Iz vialo predpripravljenega reagenta LCK 315 smo najprej pazljivo odstranili folijo zamaška DosiCapZip in ga odvili. Pod folijo je bela kemikalija, ki se uporablja pri nadaljnji izvedbi analiznega postopka. Nato smo z elektronsko pipeto v vialo dodali 1 ml vzorca. Pri procesu dodajanja vzorca je potrebno paziti, da je vrh nastavka pipete nenehno pod gladino vzorca. Vialo smo zelo hitro zaprli z zamaškom DosiCapZip, in sicer tako, da je bela kemikalija, ki je bila na začetku na zgornji strani zamaška, podaj na njegovi spodnji strani. Vialo smo nato dobro pretresla. Ponovno smo odvila zamašek in s pipeto dodali 1 ml raztopine A predpripravljenega reagenta LCK 315. Ponovno smo vialo zaprli z zamaškom DosiCapZip in jo nekajkrat pretresli. Ob prisotnosti cianida se je vzorec obarval vijolično. Vzorec smo nato 3 minute stresali na stresalniku. Medtem smo vklopili spektrofotometer. Po stresanju smo vialo obrisali z mehko krpo in jo postavili na predvideno mesto v spektrofotometru ter odčitali rezultat. Spektrofotometer s pomočjo črtna kode, ki je na viali, sam prepozna metodo za izvedbo meritve, zato ni treba predhodno spreminjati metode in lahko takoj odčitaš rezultat. Enako smo naredili še s slepim vzorcem in kontrolnim vzorcem, ki smo jima dodali znano količino standardne raztopine za cianide II s koncentracijo 0,05 mg/l.



Slika 2: Navodilo za izvedbo analiznega postopka (Vir: Medmrežje 1, 2015)



Slika 3: Merjenje vzorcev (Foto: M.Arčan, 2015).

5.8.1 Kontrola zagotavljanja kvalitete

Kontrola zagotavljanja kvalitete merjenja cianidov v bistrih vodah je sestavljena iz kontrole procesa, ki jo izvaja analitik med izvajanjem preskusa (Horjak, 2012)

Za kontrolo uporabimo standard koncentracije 0,05 mg/l in slepi vzorec. Postopek kontrolnih vzorcev je enak kot pri ostalih vzorcih, le da namesto vzorca analiziramo kontrolno raztopino. Pri slepem vzorcu namesto 1ml vzorca vzamemo 1 ml deionizirane vode.

S tem smo preverili čistost reagentov, steklovine in delovne opreme. Na koncu analize vpišemo rezultate kontrolnih vzorcev v kontrolno karto.

6 REZULTATI IN DISKUSIJA

Praktično delo smo usmerili v validacijo preskusne metode za določanje celotnega cianida v bistrih vodah. Preskusno metodo smo vpeljali po standardu SIST EN ISO 6703/1-1984.

6.1 Točnost

Točnost je merilo za to, kako blizu so izmerjeni rezultati pravi (sprejeti) vrednosti. Z validacijskimi metodami ugotavljamo odstopanja, ki so posledica sistematičnih napak.

Točnost zato proučujemo z dveh vidikov:

- Pravilnost metode je merilo, koliko povprečna vrednost seta meritev odstopa od prave vrednosti. Izraža se, kot odstopanje od prave vrednosti.
- Natančnost nam običajno pove, kako rezultati meritev nihajo znotraj skupine meritev. Podajamo jo na dva načina, in sicer kot ponovljivost in obnovljivost. Izražamo jo s standardnim odklonom (Horjak, 2012).

Preskusna metoda za določanje celotnega cianida v bistrih vodah ne vsebuje sistematičnih napak, kar je razvidno iz dobljenih rezultatov pravilnosti in natančnosti.

6.1.1 Pravilnost

Pravilnost preizkusne metode smo preverili z drugo standardno metodo. Uporabili sem že dobljene rezultate, ki smo jih pridobili po metodi SIST EN ISO 6703/1-1984 (E): Water quality – Determination of cyanide – Part 1: Determination of total cyanide. Primerjali smo rezultate povprečnih vrednosti koncentracij preskusne metode z rezultati, ki smo jih pridobili s standardno metodo na istem vzorcu. Za ta način določanja pravilnosti smo se odločili, ker ni na razpolago ustreznega referenčnega standarda in z metodo nismo sodelovali pri medlaboratorijskem preskušanju.

Uporabili smo dobljene koncentracije standardnih vzorcev s koncentracijo 0,05 mg/l že validirane metode in koncentracije standardnih vzorcev s koncentracijo 0,05 mg/l preskusne metode. S pomočjo programa Excel smo izračunali povprečne vrednosti koncentracij in standardno deviacijo za obe skupini meritev ter jih primerjali med seboj s t testom. Če velja, da je $t_{\text{izrač.}} > t_{\text{tabel.}}(0,05; PS)$, se povprečji obeh skupin razlikujeta, drugače pa ne.

Izračunano t vrednost smo dobili po naslednjih enačbah:

$$t_{\text{izrač.}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$PS = n_1 + n_2 - 2$$

$t_{\text{izrač.}}$ = izračunana t vrednost

$t_{\text{tab.}}$ = tabelarična t vrednost

S_1 = standardni odmik prve skupine meritev

S_2 = standardni odmik druge skupine meritev

n_1 = število meritev v prvi skupini

n_2 = število meritev v drugi skupini

\bar{x}_1 = povprečna koncentracija prve skupine meritev

\bar{x}_2 = povprečna koncentracija druge skupine meritev

PS = število prostorskih stopenj

Tabela 1: Primerjava koncentracij validirane in preskusne metode.

Metoda	Preskusna metoda 0,05 mg/l CN ⁻	Validirana metoda 0,05 mg/l CN ⁻
	0,052	0,05
	0,052	0,05
	0,054	0,04
	0,052	0,05
	0,051	0,05
	0,051	0,05
Povprečje	0,052	0,048
Stadardni odmik	0,001	0,004

Tabela 2: Tabela t vrednosti

t vrednost za interval zaupanja	90 %	95 %	99 %
Nivo signifikantnosti	0,10	0,05	0,01
Število prostorskih stopenj			
1	6,31	12,71	63,66
2	2,92	4,31	9,92
3	2,35	3,18	5,84
4	2,13	2,78	4,60
5	2,02	2,57	4,03
6	1,94	2,45	3,71
7	1,89	2,36	3,50
8	1,86	2,31	3,36
9	1,83	2,26	3,25
10	1,81	2,23	3,17

Iz tabele 2 je razvidno, da t izračunan znaša 2,13, t tabeliran pa 2,23. Ker je t izračunan manjši kot t tabeliran, se povprečje obeh skupin meritev ne razlikuje.

6.1.2 Ponovljivost

Za preverjanje ponovljivosti smo si pripravili standardno raztopino cianida na znanem koncentracijskem nivoju delovnega območja koncentracije 0,05 mg/l, obogateno deionizirano vodo s koncentracijo 0,05 mg/l CN⁻, obogaten vzorec podtalne vode (77-PDV) s koncentracijo 0,05 mg/l CN⁻ in obogaten vzorec pitne vode (124-PV) s koncentracijo 0,1 mg/l CN⁻. Izmerili smo koncentracije raztopin in izračunali povprečno koncentracijo ter relativni standardni odklon. Šlo je za istega analitika, isti instrument in laboratorij ter kratko časovno obdobje (Horjak, 2012).

Tabela 3: Ponovljivost standardne raztopine, obogatene destilirane vode in obogatenih vzorcev podtalnih in pitnih vod.

Vzorec(mg/l CN ⁻) Št. paralelk	Standardna raztopina 0,05	Spike deionizirana voda 0,05	Spike 77- PDV 0,05	Spike 124-PV 0,1
1	0,049	0,051	0,052	0,112
2	0,05	0,051	0,052	0,110
3	0,048	0,051	0,054	0,110
4	0,053	0,051	0,052	0,111
5	0,055	0,051	0,051	0,110
6	0,056	0,053	0,051	0,109
Povprečna koncentracija	0,052	0,051	0,052	0,110
Standardni odmik	0,003	0,0008	0,001	0,001
Relativni standardni odmik (%)	6,39	1,59	2,11	0,94
Meja obnovljivosti	0,009	0,002	0,003	0,003

Glede na to, da so relativni standardni odmiki pri standardni raztopini, obogateni deionizirani vodi, obogatenih vzorcih pozemnih in pitnih vod manjši od 10 %, lahko trdimo, da je ponovljivost metode dobra.

6.1.3 Obnovljivost

Pri obnovljivosti je bil postopek popolnoma enak, le da ga je opravljal drug analitik, uporabljal le isti instrument v istem laboratoriju, vendar v daljšem časovnem obdobju. Pri obnovljivosti smo preverjali standardno raztopino cianida na znanem koncentracijskem nivoju delovnega območja koncentracije 0,05 mg/l.

Tabela 4: Obnovljivost za cianid v koncentracijskem območju 0,05 mg/l ter izračun za povprečno vrednost in relativni standardni odklon.

Število paralelk	Koncentracija v mg/l CN ⁻	Datum meritve
1	0,053	3. 2. 2015
2	0,055	12. 2. 2015
3	0,057	12. 3. 2015
4	0,05	30. 3. 2015
5	0,049	28. 5. 2015
6	0,051	1. 6. 2015
Povprečna koncentracija	0,053	
Standardni odmik	0,003	
Relativni standardni odmik (%)	5,87	

Glede na to, da so relativni standardni odmiki pri standardni raztopini manjši od 10 %, lahko trdimo, da je obnovljivost metode dobra.

6.1.4 Medlaboratorijska obnovljivost

Medlaboratorijsk obnovljivost nam poda variabilnost rezultatov, ki jih lahko pričakujemo pri izvajanju metode v različnih pogojih v istem laboratoriju. Je vmesna stopnja pri preverjanju obnovljivosti, ki je natančnost, dobljena pri najbolj različnih možnih pogojih (ista metoda, različni analitiki, različni dnevi analize, različni laboratoriji, različne kemikalije, druga oprema, različna temperatura in vlažnost). Uporabimo jo takrat, ko v laboratoriju ne moremo izpolniti vseh pogojev obnovljivosti (Planinšek, 2012).

Na petih koncentracijskih nivojih smo izvedli analize preskusne metode referenčnega materiala medlaboratorijske obnovljivosti. Celoten postopek bo ponovil eden ali več analitikov v drugačnem terminu. Iz meritev bomo izračunali mejo ponovljivosti in mejo intralaboratorijske obnovljivosti z naslednjo enačbo:

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_r$$

r = meja ponovljivosti ali meja melaboratorijske obnovljivosti

t = 1,96

σ_r = standardni odmik pri ponovljivih pogojih

Tabela 5: Medlaboratorijska obnovljivost rezultatov meritev referenčnega materiala na različnih koncentracijskih nivojih

Koncentracija	0,01 mg/l CN ⁻ 7.1.2015	0,02 mg/l CN ⁻ 7.1.2015	0,05 mg/l CN ⁻ 7.1.2015	0,1 mg/l CN ⁻ 12.1.205
	konc.	konc.	konc.	konc.
	0,008	0,017	0,052	0,112
	0,008	0,018	0,052	0,110
	0,007	0,017	0,054	0,110
	0,006	0,02	0,052	0,111
	0,006	0,017	0,051	0,110
	0,007	0,018	0,051	0,109
Povprečje	0,007	0,018	0,052	0,11
Stadardni odmik	0,009	0,001	0,001	0,001
Relativni standardni odmik	12,78 %	6,56 %	2,11 %	0,94 %
Meja medlaboratorijske obnovljivosti	0,025	0,003	0,003	0,003

Sprejemljiv standardni odmik je med 10 % in 15 %. Iz zgornje tabele je razvidno, da spremembe pogojev, ki se normalno pojavljajo v laboratoriju, ne vplivajo na natančnost meritve, saj so vsi standardni odmiki pod 10 %.

6.2 Meja zaznavnosti – LOD (Limit of detection)

Meja zaznavnosti se izračuna iz eksperimentalnih dobljenih meritev slepega vzorca vrednosti obogatene na najnižjem koncentracijskem območju, na katerem sem še lahko zazna. Izračuna se po naslednji formuli:

$$\text{LOD} = \text{povprečna vrednost slepega vzorca} + (6 \times \text{standardni odklon}).$$

V dosedanjem izvajanju metode so bile vrednosti slepe večinoma negativne, zato nismo mogli uporabiti zgornje formule.

Pri negativnih rezultatih slepih vzorcev mejo zaznavnosti izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{LOD} = 0 + (3 \times \text{standardni odklon}).$$

Tabela 6: Določanje meje zaznavnosti

Število paralelk	Koncentracija v mg/l CN ⁻
1	-0,004
2	-0,005
3	-0,006
4	0,003
5	-0,005
6	-0,004
Povprečna koncentracija	-0,0035
Standardni odmik	0,003271
Meja zaznavnosti (LOD)	0,009813

Glede na dobljeni rezultat smo za mejo zaznavnosti določili 0,01 mg/l CN⁻.

6.3 Meja določljivosti – LOQ (limit of quantification)

Meja določljivosti je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko določimo z dano metodo z zadovoljivim nivojem ponovljivosti in pravilnosti. Analiziramo 6 neodvisnih slepih vzorcev, če je njihov rezultat pozitiven, uporabimo naslednjo formulo:

$$\text{LOQ} = \text{povprečna vrednost slepega vzorca} + (10 \times \text{standardni odklon}).$$

Ker imamo negativne rezultate slepih vzorcev, smo za določanje meje določljivosti vzeli po 6 slepih vzorcev, obogatenih na koncentracijskem nivoju, ki so blizu meje zaznavnosti. Pripravili smo 6 obogatenih slepih vzorcev s koncentracijo 0,01 mg/l in 6 obogatenih slepih vzorcev s koncentracijo 0,02 mg/l.

Izračunali sem standardni odmik obogatenih slepih vzorcev in narisali krivuljo odvisnost od koncentracije ter določili vrednost meje določljivosti. Mejo določljivosti izrazimo kot najnižjo koncentracijo analita, ki jo lahko določimo s sprejemljivim nivojem negotovosti (Planinšek, 2012).

Tabela 7: Izračun meje določljivosti.

Koncentracija	0,01 mg/l CN⁻	0,02 mg/l CN⁻
	konc.	konc.
	0,008	0,017
	0,008	0,018
	0,007	0,017
	0,006	0,02
	0,006	0,017
	0,007	0,018
Povprečje	0,007	0,018
Stadardni odmik	0,009	0,001

Ker se vrednosti rezultatov na spodnji meji koncentracijskega območja preveč sipajo, smo za mejo določljivosti določili 0,02 mg/l.

6.4 Linearnost in delovno območje

6.4.1 Linearnost

Linearnost opredeljuje spodobnost metode, da je v določenem območju signal linearno odvisen od koncentracije analita. Območje linearnosti za cianid smo preverili za območje od 0,01 mg/l do 0,5 mg/l (Horjak, 2012).

Pripravili smo slepi vzorec in 6 neodvisnih slepih vzorcev, obogatenih na koncentracijskih nivojih znotraj linearnega območja ter jih izmerili.

Rezultatom koncentracij standardnih raztopin smo izračunali povprečne vrednosti, iz katerih smo v programu Excel naredili enačbo kalibracijske premice in korelacijski faktor.

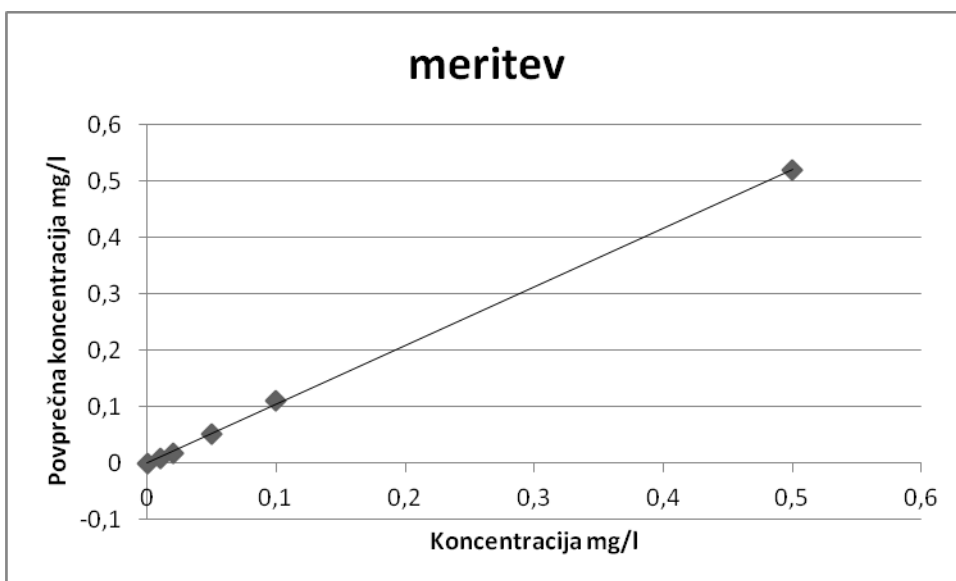
Tabela 8: Preglednica povprečnih vrednosti za linearnost cianida.

Koncentracija mg/l	Povprečna koncentracija mg/l
0	-0,001
0,01	0,007
0,02	0,018
0,05	0,052
0,1	0,11
0,5	0,52

Enačba kalibracijske premice: $y = 1,043x - 0,000$

Korelacijski faktor: 0,999

Graf 1: Linearnost.



Po obdelavi navedenih rezultatov, smo dobili podatke, ki potrjujejo, da je metoda linearna, kar je razvidno iz zgornjega grafa. Korelacijski faktor je 0,999, kar potrjuje linearnost metode.

6.4.2 Delovno območje

Delovno območje metode smo preverjali s testom homosedastičnosti in obogatenim realnim vzorcem.

Homosedastičnost metode smo določili tako, da smo pripravili 6 obogatenih vzorcev na spodnji meji koncentracijskega območja (0,01 mg/l) in 6 obogatenih vzorcev na zgornji meji koncentracijskega območja (0,5 mg/l).

Analizne preizkuse za določanje homosedastičnosti umeritvene krivulje za izračun koncentracij celotnega cianida v bistrih vodah smo izvedli po standardnem postopku za določanje ponovljivosti.

Dobljene podatke o koncentracijah smo nato obdelali s pomočjo programa Excel. Vzorcem smo izračunali variance na najvišjem in najnižjem koncentracijskem nivoju in jih nato primerjali z F-testom. Gre za primerjavo slučajne napake 2 skupin meritev.

Tabela 9: Preglednica meritev za homosedastičnost cianida.

Koncentracija (mg/l)	1	2	3	4	5	6	Povprečje	Standardni odkmik
0,01	0,008	0,006	0,008	0,009	0,009	0,008	0,008	0,001
0,5	0,501	0,501	0,501	0,504	0,499	0,496	0,501	0,004

Tabela 10: Rezultati F-testa za preverjanje homosedastičnosti.

	0,5 mg/l	0,01 mg/l
Mean	0,500333	0,008
Variance	7,07E-06	1,2E-06
Observations	6	6
df	5	5
F	5,888889	
P(F < = f) one-tail	0,037026	
F Critical one-tail	5,050329	

Tabela 11: Tabela F vrednosti.

n ₁ n ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	647,8	799,5	964,2	899,6	921,8	937,1	948,2	956,7	963,3	968,6
2	38,51	39,00	39,17	39,25	39,30	39,33	39,36	39,37	39,39	39,40
3	17,44	16,04	15,44	15,10	14,88	14,73	14,62	14,54	14,47	14,42
4	12,22	10,65	9,979	9,605	9,364	9,197	9,074	8,980	8,905	8,844
5	10,01	8,434	7,764	7,388	7,146	6,978	6,853	6,757	6,681	6,619
6	8,813	7,260	6,599	6,227	5,988	5,820	5,695	5,600	5,523	5,461
7	8,073	6,542	5,890	5,523	5,285	5,119	4,995	4,899	4,823	4,761
8	7,571	6,059	5,416	5,053	4,817	4,652	4,529	4,433	4,357	4,295
9	7,209	5,715	5,078	4,718	4,484	4,320	4,197	4,102	4,026	3,964
10	6,937	5,456	4,826	4,468	4,236	4,072	3,950	3,855	3,779	3,717

Iz tabele 12 je razvidno, da f izračunan znaša 5,050, F tabeliran pa 5,820. Variance na spodnjem in zgornjem koncentracijskem nivoju se na izbranem nivoju zaupanja ne razlikujejo pomembno, zato meritve zadostujejo pogoju homosedastičnosti. Saj je $F_{\text{izračunani}} > F_{\text{tabelarični}}$.

6.5 Vpliv matriksa

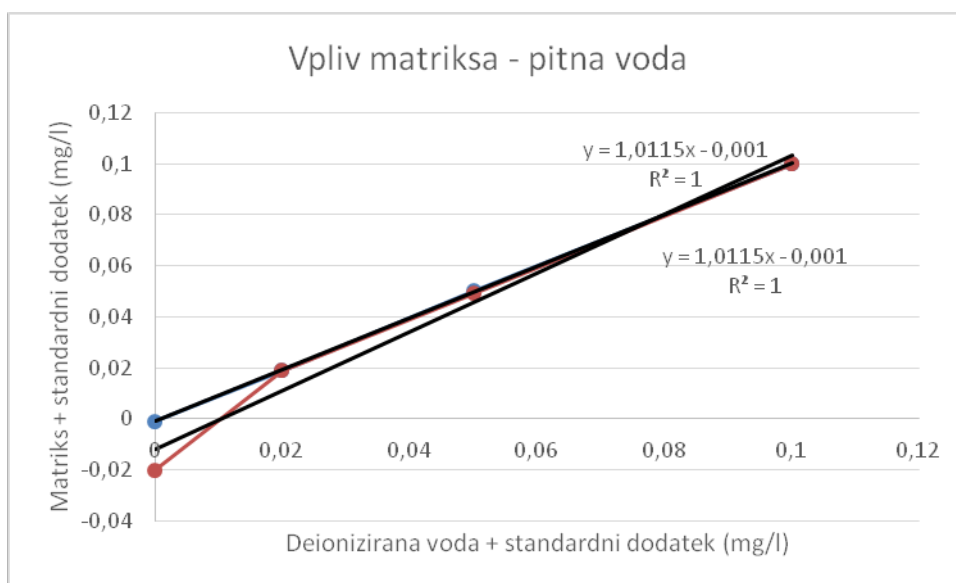
Matriks je neidentificiran del vzorca, ki lahko v danih pogojih privede do lažno previsokih ali prenizkih rezultatov (Planinšek, 2012).

Za vpliv matriksa smo uporabili metodologijo standardnega dodatka v pitno, podzemno in deionizirano vodo. To pomeni, da smo naredili serijo meritev, narisali krivulje, izračunali povprečne vrednosti koncentracij in korelacijske faktorje ter jih primerjali med sabo. Če statistično med nakloni ni razlik, matriks nima vpliva na relativno sistematsko napako.

Tabela 12: Podatki za preverjanje vpliva matriksa – pitna voda (2496 - PV).

Koncentracijski nivo (mg/l)	Povprečna koncentracija (mg/l)	
	Deionizirana voda + standardni dodatek	Pitna voda + standardni dodatek
0	-0,001	-0,02
0,02	0,019	0,019
0,05	0,05	0,049
0,1	0,1	0,1

Graf 2: Vpliv matriksa - pitna voda.

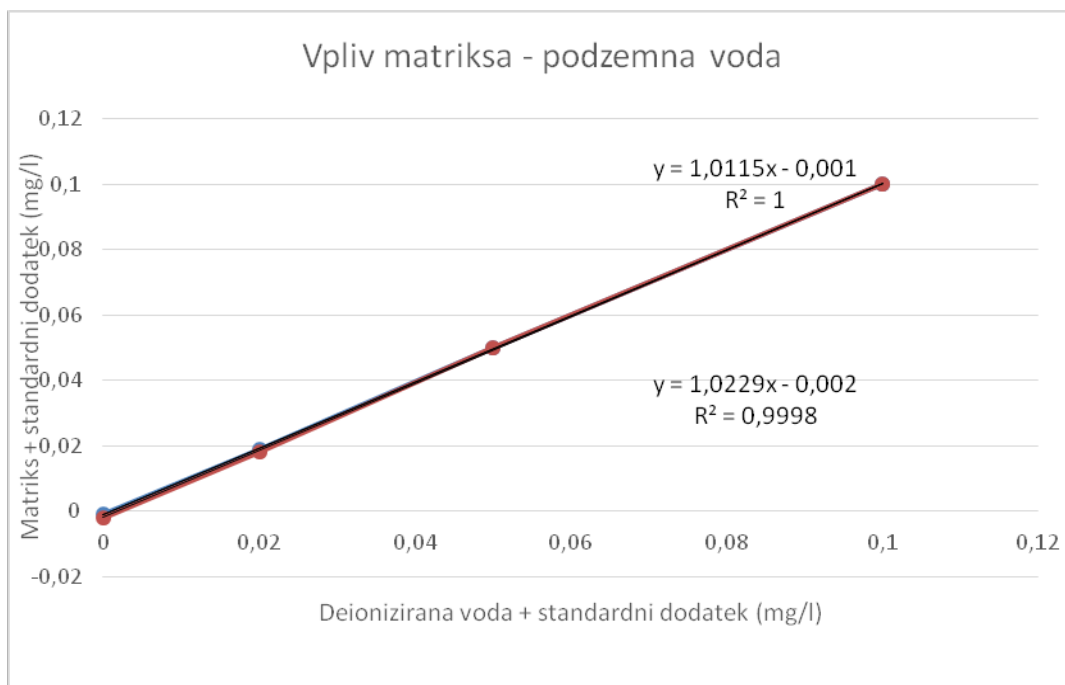


Matriks nima vpliva, saj se korelacijski faktor deionizirane vode s standardnim dodatkom in korelacijski faktor matriksa s standardnim dodatkom ne razlikujeta.

Tabela 13: Podatki za preverjanje vpliva matriksa - podzemna voda (49 - PDV).

Koncentracijski nivo (mg/l)	Povprečna koncentracija (mg/l)	
	Deionizirana voda + standardni dodatek	Podzemna voda + standardni dodatek
0	-0,001	-0,02
0,02	0,019	0,018
0,05	0,05	0,05
0,1	0,1	0,1

Graf 3: Vpliv matriksa - podzemna voda.



Matriks nima vpliva, saj se korelacijski faktor deionizirane vode s standardnim dodatkom in korelacijski faktor matriksa s standardnim dodatkom ne razlikujeta.

6.6 Robustnost metode

Z robustnostjo identificiramo spremenljivke, ki bi lahko imele znaten vpliv na zmogljivost metode (set eksperimentov z referenčnimi materiali, vzorci z znano sestavo) za ugotavljanje učinkov na točnost in natančnost metode s sistematičnimi spremembami spremenljivk. Ugotavljamo odpornost metode na zunanje vplive. Testiramo jo tako, da v meritve namenoma vnašamo drobne spremembe in ugotavljamo, kako vplivajo na rezultate analize. Vpliv faktorjev je lahko zelo velik, zato je v metodi potrebno definirati izbrane pogoje dela tako, da izničijo vpliv faktorjev (Akreditirane metode, 2012).

V okviru robustnosti metode smo preverjali stabilnost barve. Preverjali smo, ali je barva stabilna en dan.

Stabilnost barve smo določevali na vzorcih destilirane vode, obogatenih s standardno raztopino na treh koncentracijskih nivojih. Primerjali smo povprečno koncentracijo, standardni odmik in relativni standardni odmik za vzorce, ki so bili izmerjeni takoj po razvoju barve, in ponovili meritve istih vzorcev pod istimi pogoji čez 3 ure ter 1 dan.

Tabela 14: Rezultati robustnosti.

Koncentracijski nivo	0,02 mg/l CN ⁻	0,02 mg/l CN ⁻	0,05 mg/l CN ⁻	0,05 mg/l CN ⁻	0,1 mg/l CN ⁻	0,1 mg/l CN
	takoj	čez 3 h	takoj	čez 3 h	takoj	čez 3 h
	0,018	0,011	0,1	0,052	0,1	0,1
	0,018	0,027	0,1	0,047	0,1	0,1
	0,02	0,017	0,1	0,046	0,1	0,101
	0,017	0,015	0,101	0,046	0,101	0,1
	0,019	0,015	0,101	0,048	0,101	0,095
	0,019	0,011	0,1	0,048	0,1	0,095
Povprečje	0,019	0,016	0,100	0,048	0,100	0,0985
Standardni odmik	0,001	0,009	0,0005	0,002	0,0005	0,0027
Relativni standardni odmik (%)	5,67	36,87	0,52	4,66	0,52	2,78

Vzorci je treba izmeriti takoj, saj barva ni obstojna. Iz zgornje tabele je razvidno, da se koncentracija vzorcev, ki je bila merjena takoj po razvoju barve, in koncentracija, ki je bila izmerjena čez 3 ure, zelo razlikuje. Pri ponovni meritvi čez 3 ure se zmanjšata koncentracija in povprečna koncentracija, povečata pa se standardni in relativni standardni odmik. Zaradi

tega meritev čez en dan ni bilo smiselno ponavljati, saj je že pri osnovni statistični obdelavi podatkov mogoče opaziti dovolj veliko razlikovanje med rezultati, zato primerjavo skupin meritev ni bilo potrebno dokazovati s t testom.

7 SPREMLJANJE KAKOVOSTI S KONTROLNO KARTO

Najpogostejša oblika kontrolnih kart je Shewhartova kontrolna karta, kjer se rezultat posamezne meritve kontrolnega vzorca vrisuje na karto v odvisnosti od datuma meritve.

Uporabljata se dva tipa kontrolnih kart:

- Kontrolna karta povprečja. Uporablja se skupaj s kontrolnimi vzorci, katerih vrednost nanašamo na kontrolne karte tega tipa. S to vrsto določamo pravilnost rezultatov, ki jih dobimo pri dani metodi. Kontrolni vzorci so lahko slepi vzorec, laboratorijski kontrolni standard, standard za preverjanje kalibracije, obogaten laboratorijski vzorec (določevanec dodamo v deionizirano vodo) ali obogaten laboratorijski matrični vzorec (določevanec dodamo v matriks).
- Kontrolna karta območja. Uporablja se za kontrolo ponovljivosti dane metode. Nanjo nanašamo rezultate ponavljanih analiz oziroma analiz določenih vzorcev, ki se analizirajo dvakrat ali večkrat.

Analiza kontrolnih kart je zelo pomemben faktor pri celotnem procesu, saj nam omogoči, da se zaznajo morebitna odstopanja od pričakovanih rezultatov analiz. Če je opozorilna meja na 95 % nivoju zaupanja, potem lahko v povprečju 1 od 20 analiz preseže to mejo (oziroma 5 od 100, kar je 95 % verjetnosti). Kontrolno mejo lahko preseže le 1 od 100 analiz.

Če 1 meritev preseže zgornjo ali spodnjo kontrolno mejo, moramo takoj ponoviti analizo kontrolnega vzorca. Če je ponovljena meritev znotraj kontrolnih meja, lahko nadaljujemo analize. Če se kontrolna meja spet prekorači, ustavimo analize, preverimo, kje je problem in ga odpravimo. Dokler problem ni odkrit in odpravljen, analiz ne opravljamo.

Risanje in analizo kontrolnih kart izvaja analitik. Če pride do nesprejemljivih kontrolnih vrednosti, začne sam analitik s splošnimi kontrolnimi ukrepi ali s kontrolnimi ukrepi, ki so predpisani pri dani metodi. Opravljene kontrolne ukrepe analitik zapiše. Če ti ukrepi ne odpravijo nesprejemljivih kontrolnih vrednosti, mora analitik o tem obvestiti skrbnika metode. Če opravljeni kontrolni ukrepi ne zadostijo kriterijem kontrolne karte, skrbnik metode in analitik skupaj preverita kontrolne vrednosti in nepravilna dogajanja pri analitski metodi in ustrezno ukrepata. Skrbnik metode se potem odloči, kako postopati in delovati za zadovoljitev zahtevanih potreb pri izvajanju kontrole kvalitete. Če je napaka hujše narave ali skrivnostnega izvora, analitik in skrbnik metode obvestita predstojnika oddelka o nastalem problemu.

7.1 Opis kontrolne karte

Pomen posameznih pojmov Shewhartove kontrolne karte:

- abscisna os (X os): nanjo nanašamo datume analiziranih kontrolnih vzorcev;
- ordinatna os (Y os): nanjo nanašamo koncentracijo v območju, ki jo pričakujemo ob analizah kontrolnega vzorca;
- črta »povprečje« ali »pričakovana koncentracija« kaže koncentracijo, ki je podana (če uporabljamo certificiran referenčni material, je to njegova referenčna vrednost; če uporabljamo laboratorijsko pripravljen kontrolni vzorec, je to koncentracija, ki nam je poznana, saj smo v vzorec dali znano količino določevanca), lahko pa je tudi poprečni izkoristek metode.

Na karti imamo zgornjo in spodnjo opozorilno mejo ter zgornjo in spodnjo kontrolno mejo. Njihova oddaljenost od črte »povprečje« je večkratnik standardnega odmika (s):

- ZOM (zgornja opozorilna meja): oddaljena je + 2 s od črte »povprečje«,
- SOM (spodnja opozorilna meja): oddaljena je - 2 s od črte »povprečje«,
- ZKM (zgornja kontrolna meja): oddaljena je + 3 s od črte »povprečje«,
- SKM (spodnja kontrolna meja): oddaljena je - 3 s od črte »povprečje«.

Točke na karti predstavljajo koncentracije, ki jih dobimo za posamezno meritev ob določenem datumu, ko opravimo analizni preskus.

7.2 Izdelava kontrolne karte

Za metodo določanja cianidov v bistrjih vodah je predvidena kontrolna karta povprečja.

Za laboratorijski standard smo izbrali obogateno deionizirano vodo s standardnim dodatkom s koncentracijo 0,05 mg/l. Referenčni material smo pripravili po postopku standardne raztopine za cianide II in ga obravnavali na enak način kot realne vzorce.

Tabela 15: Določevanje opozorilnih in kontrolnih meja.

Število meritev	Koncentracija slepe (mg/l)	Koncentracija laboratorijskega standarda (mg/l)	Datum meritve
1	-0,004	0,049	7. 1. 2015
2	-0,005	0,05	7. 1. 2015
3	-0,006	0,048	7. 1. 2015
4	0,003	0,041	8. 1. 2015
5	-0,005	0,061	9. 1. 2015
6	-0,004	0,057	9. 1. 2015
7	-0,004	0,055	9. 1. 2015
8	-0,003	0,056	26. 1. 2015
9	0,001	0,057	27. 1. 2015
10	0,003	0,053	30. 1. 2015
11	-0,002	0,055	3. 2. 2015
12	-0,004	0,057	3. 2. 2015
13	-0,002	0,05	12. 2. 2015
14	-0,003	0,049	12. 3. 2015
15	-0,005	0,051	28. 5. 2015
16	-0,005	0,05	28. 5. 2015
17	-0,002	0,062	6. 7. 2015
18	-0,004	0,049	7. 1. 2015
19	-0,005	0,05	7. 1. 2015
Zgornja opozorilna meja (mg/l)		0,0635	
Zgornjakontrolna meja (mg/l)		0,0688	
Spodnja opozorilna meja (mg/l)		0,0425	
Spodnja kontrolna meja (mg/l)		0,0378	

Slika 4: Kontrolna karta.

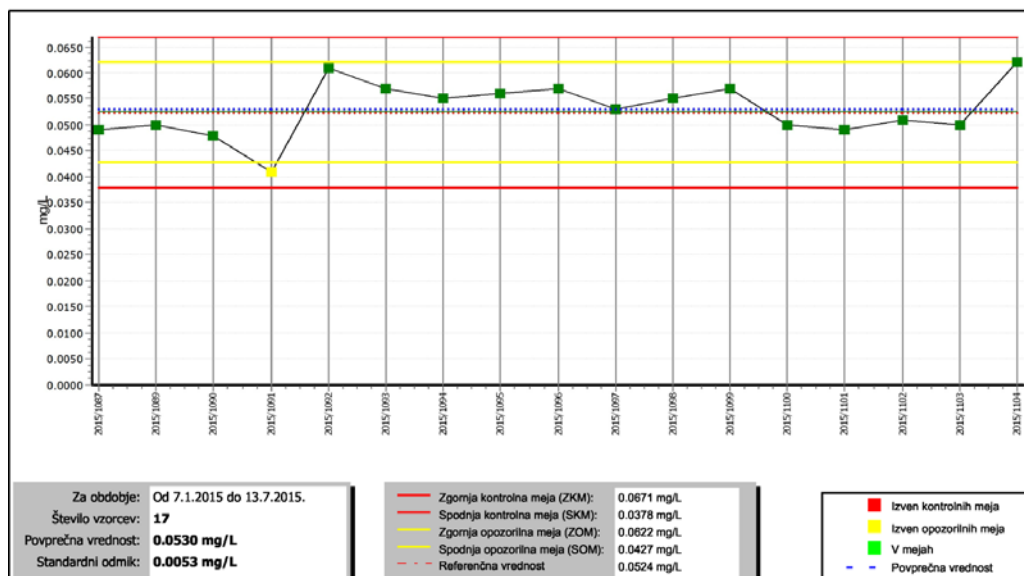


NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO
 Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor
CENTER ZA KEMIJSKE ANALIZE ŽIVIL, VOD IN DRUGIH VZORCEV OKOLJA
 Oddelek za kemijske analize živil, vod in drugih vzorcev okolja Celje
 Ipavčeva 18, 3000 Celje, T: (03) 42 51 200, F: (03) 42 51 172, E: cecka@nizh.si

Celje, 13.7.2015

X-Karta za parameter: **Celotni cianid (pitne vode)**

Cianid v bistrich vodah



Iz zgornje slike je razvidno, da nobena meritev ne presega opozorilne in kontrolne meje.

8 ZAKLJUČEK

Z validacijo smo potrdili, da je metoda za določanje cianida v bistrih vodah s predpripravljenim reagentom LCK 315 primerna.

Natančnost metode smo potrjevali kot ponovljivost in obnovljivost na različnih koncentracijskih nivojih. Potrdili smo, da je natančnost metode dobra, saj je relativni standardni odmik pri standardni raztopini s koncentracijo 0,05 mg/l znašal 6,39 %, pri obogateni deionizirani vodi s koncentracijo 0,05 mg/l je znašal 1,59 %, pri obogateni pitni vodi s koncentracijo 0,1 mg/l je znašal 0,94 %, pri podzemni vodi s koncentracijo 0,05 mg/l pa je znašal 2,11 %. Relativni standardni odmik za obnovljivost pri standardni raztopini s koncentracijo 0,05 mg/l je znašal 5,87 %. Tako pri ponovljivosti kot pri obnovljivosti nobeden ne presega mejne vrednosti 10 %.

Območje linearnosti smo potrdili za koncentracijsko območje od 0,02 mg/l do 0,5 mg/l, saj korelacijski koeficient 0,999 potrjuje linarnost v tem območju.

Mejo zaznavnosti smo potrdili za koncentracijo 0,01 mg/l. Relativni standardni odmik je znašal 0,01 % in ne presega meje 15 %, zato je meja zaznavnosti za koncentracijo 0,01 mg/l poterjena. Mejo določljivosti smo potrdili s koncentracijo 0,02 mg/l, saj je relativni standardni odmik znašal 0,01 % in ne presega mejne vrednosti 10 %.

Pravilnost metode smo potrdili s primerjavo rezultatov že validirane metode SIST EN ISO 6703/1-1984 (E): Water quality – Determination of cyanide – Part 1: Determination of total cyanide in preskusne metode s pred pripravljenimi reagenti pri enaki koncentraciji. Izračunali smo povprečne vrednosti koncentracije obeh skupin meritev in jih primerjali s t testom. Ugotovili smo, da se povprečje obeh skupin meritev ne razlikuje, saj je $t_{\text{izračunan}}$ manjši kot $t_{\text{tabeliran}}$.

Na začetku naloge smo predpostavili hipoteze.

H1: Konzervacija vzorca po stari metodi se ne obnese.

Pri preverjanju robustnosti smo ugotovili, da je vzorce treba izmeriti takoj, kot je določil že proizvajalec. Že pri osnovni statistični obdelavi podatkov smo ugotovili, da sta se po 3 urah zmanjšali koncentracija in povprečna koncentracija, povečala pa sta se standardni in relativni

standardni odmik. Relativni standardni odmik na vseh koncentracijskih nivojih je presegal mejno vrednost 10 %.

Hipotezo 1 (Konzervacija vzorca po stari metodi se ne obnese) smo v celoti potrdili.

Pri ugotavljanju vpliva matriksa smo potrdili, da matriks nima vpliva, saj se ob primerjavi deionizirane vode s standardnim dodatkom in matriksa s standardnim dodatkom na enakih koncentracijskih nivojih se korelacijska faktorja skoraj ne razlikujeta.

Hipotezo 2 (Vpliv matriksa na vzorec je ničen) smo tudi potrdili.

Pravilnost rezultatov je razvidna tudi iz kontrolne karte laboratorijskega kontrolnega standarda, saj nobena meritev ne presega opozorilne in kontrolne meje.

9 VIRI IN LITERATURA

Ambrožič, Š., Dobnikar-Tehovnik, M., Rotar, B. (2008). Kakovost voda v Sloveniji. Ljubljana: Agencija RS za okolje, 72 str.

Brodnjak Vončina, D. (2007). Industrijska analiza. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Zbrano gradivo, Maribor.

Glavaš, N. (2004). Problematika določanja cianidov: Seminarska naloga pri predmetu Avtomatizirana kemija, FKKT.

Horjak, M. (2007). Validacija določanja klortoluona v maloobremenjenih vodah: diplomsko delo. Ljubljana: 36 str.

Hudnik, V. Validacija analiznih metod in merilna negotovost pri kemijskih meritvah. Lastni vir, predavanje Velenje.

International Standard ISO 6703/2 (2012). Water quality – Determination of Cyanide – Part 2: Determination of easily liberatable cyanide, International Organization for Standardization.

Lazarini, F., Brenčič, J. (2014). Splošna in anorganska kemija. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 557 str.

Planinšek, A. (2012). Navodilo – celotni fosfor v vodah, interni dokument NLZOH Celje, 17 str.

Planinšek, A. (2012). Navodilo za obdelovanje akreditiranih metod, interni dokument NLZOH Celje, 44 str.

Planinšek, A. (2013). KK 201 Protokol začetnega ugotavljanja parametrov kk – predpripravljeni reagenti, interni dokument NLZOH Celje, 5 str.

Pravilnik o pitni vodi, Ur. l. RS, št. 19/04, 35/04, 26/06, 92/06, 25/09.

Statistične metode in merilna negotovost: Zbornik predavanj (1998). Ljubljana: Zavod za tehnično izobraževanje, 54 str.

Arčan, M: Validacija cianidov v bistrih vodah, VŠVO Velenje, 2015

Yasuo, S. (2002). False cyanide detection. *Analytical Chemistry*. 74 (5), 134 A–141, medmrežje: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac021967j> (13. 10. 2015).

Zagajšek, A. (2013). Navodilo za spremljanje kakovosti s kontrolnimi kartami, interni dokument NLZOH Celje, 27 str.

Žorž, M. (1991). HPLC. Ljubljana: samozaložba, 154 str.

Medmrežje 1:

http://www.prosessstyring.no/nedlasting/prosman/dr6000/Multi_AD/AD_315_L_Druckf_schwartz (18.11.2015).

Medmrežje 2: <http://laboratory.scichem.com/Downloads/DSWTR270160> (18.11.2015).