

Validacija metoda za određivanje teških metala (Pb, Cd, Sn) u proizvodima od voća atomskom apsorpcijskom spektrometrijom

Kučević, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:991682>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

Hana Kučević

VALIDACIJA METODA ZA
ODREĐIVANJE TEŠKIH
METALA (Pb, Cd, Sn) U
PROIZVODIMA OD VOĆA
ATOMSKOM APSORPCIJSKOM
SPEKTROMETRIJOM

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u službenom kemijskom i mikrobiološkom laboratoriju E.C. Inspekt d.o.o. te uz pomoć Valentine Ščitnik, mag. ing. agr.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

VALIDACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE TEŠKIH METALA (Pb, Cd, Sn) U
PROIZVODIMA OD VOĆA ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROMETRIJOM

Hana Kučević, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0119027960

Sažetak: Validacija metode je postupak kojim se, na temelju rezultata ispitivanja ključnih parametara validacije, utvrđuje služi li metoda svrsi. Cilj ovog rada bio je utvrditi je li ispitivana metoda primjenjiva za određivanje koncentracije olova, kadmija i kositra u proizvodima od voća. Konkretno, ispitivani parametri su linearnost, preciznost u uvjetima ponovljivosti i intermedijarne preciznosti, točnost preko iskorištenja, granica kvantifikacije i granica detekcije. Svi parametri zadovoljavaju postavljeni kriterij osim granice detekcije (GD) za određivanje koncentracije kositra. GD za kositar, nalazi se izvan postavljenog kriterija ali to ne predstavlja problem u validaciji ove metode jer, prema zahtjevima vodiča AOAC, GD nije ključan parametar validacije. Rezultati ispitivanja u ovom radu dokazuju da ova metoda služi svrsi, odnosno da je primjenjiva za određivanje koncentracije olova, kadmija i kositra te da bi kod određivanja kositra u obzir trebalo uzeti da se vrijednosti ispod 1,25 mg/L ne mogu detektirati.

Ključne riječi: *Teški metali, validacija, AAS, voće*

Rad sadrži: 47 stranica, 5 slika, 17 tablica, 28 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Valentina Ščitnik, mag. ing. agr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjenski član)

Datum obrane: 2. lipnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology
Graduate university study programme: Food Safety Management

VALIDATION OF THE METHODS FOR DETERMINATION OF HEAVY METALS (Pb, Cd, Sn)
IN FRUIT PRODUCTS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Hana Kučević, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0119027960

Abstract: Validation is a procedure that, based on the test results of the key validation parameters, determines whether the method serves its purpose. The aim of this study was to establish if the tested method is applicable for determining the concentration of lead, cadmium and tin in fruit products. The validation parameters tested in this paper are linearity, precision under the conditions of repeatability and intermediate precision, accuracy as bias, limit of quantification and limit of detection. All parameters meet the criteria except the limit of detection (LOD) for determining the concentration of tin. The LOD of tin is beyond the required criterion, but this does not pose a problem in the validation of this method because, according to the requirements of the AOAC guide, the LOD is not the key validation parameter. The results in this paper prove that this method serves its purpose and is applicable for determining the concentration of lead, cadmium and tin, but when determining the concentration of tin, it should be considered that values below 1.25 mg/L cannot be detected.

Keywords: *heavy metals, validation, AAS, fruits*

Thesis contains: 47 pages, 5 figures, 17 tables, 28 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Marina, Krpan, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Valentina, Ščitnik, MSc in Agroecology

Reviewers:

1. Ksenija, Marković PhD, Full professor (president)
2. Marina, Krpan, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ivona, Elez Garofulić, PhD, Associate professor (member)
4. Ines, Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: June 2nd, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TEŠKI METALI.....	2
2.2. VOĆE I POVRĆE	3
2.3. TOKSIČNI EFEKTI NA LJUDSKI ORGANIZAM	4
2.4. VALIDACIJA I VALIDACIJSKI PARAMETRI.....	5
2.4.1. Linearnost	7
2.4.2. Preciznost.....	7
2.4.3. Točnost.....	8
2.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije	9
2.5. ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA I NJEZINE PREDNOSTI	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. PARAMETRI INSTRUMENTA.....	11
3.1.1. Atomski apsorpcijski spektrometar (AAS).....	11
3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR.....	11
3.2.1. Olovo i kadmij (grafitna tehnika)	11
3.2.2. Kositar (plamena tehnika).....	12
3.3. POSTUPAK	15
3.3.1. Priprema uzoraka za određivanje olova i kadmija.....	15
3.3.2. Priprema radne otopine, otopine za ispiranje, kalibracijske otopine i standardnih otopina olova i kadmija	15
3.3.3. Mjerenje na AAS-u, grafitnom tehnikom	18
3.3.4. Olovo, Pb	18
3.3.5. Kadmij, Cd.....	20

3.3.6.	Priprema uzoraka za određivanje kositra.....	21
3.3.7.	Priprema radne i standardne otopine za određivanje kositra	21
3.3.8.	Mjerenje na AAS-u, plamenom tehnikom.....	22
3.3.9.	Kositar, Sn	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1.	OLOVO.....	25
4.2.	KADMIJ	31
4.3.	KOSITAR	36
5.	ZAKLJUČCI	43
6.	LITERATURA	44

1. UVOD

Od davnina je poznato da je konzumacija voća i povrća nužna u održavanju homeostaze organizma. Sukladno tome, Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje minimalni dnevni unos od 400 g voća i povrća. Također, prema istraživanju američke udruge za srce „Circulation“, dvije porcije voća i tri porcije povrća na dan, smanjuje rizik od jednog od vodećih uzročnika smrti, karcinoma.

U ubrzanom, industrijskom svijetu, okruženi smo različitim zagađivačima. Ljudski utjecaj, u smislu neadekvatnog zbrinjavanja otpada, industrija, rudarstvo i pesticidi najčešći su uzročnici kontaminacije okoliša. Posljedica zagađenih poljoprivrednih površina jesu kontaminirani plodovi voća i povrća. Pored toga, u nedostatku vremena kojeg oduzima moderni način života, primorani smo posezati za bržim rješenjima proizvodnje i pakiranja hrane, pri čemu procesi proizvodnje i ambalažni materijali mogu imati utjecaj na zdravstvenu ispravnost te hrane.

Obzirom da su prehrabene navike ljudi za unosom voća i povrća u organizam svakodnevnne, uredbom EZ 1881/2006, definirane su najveće dopuštene količine (NDK) kontaminanata u voću i povrću. NDK vrijednosti su procijenjene vrijednosti kontaminanata koje sadrži određena hrana, za koje se može očekivati da konzumacija takve hrane neće imati štetan učinak na zdravlje čovjeka, te da je stoga, rizik zanemariv. Kako bi se utvrdilo je li hrana kontaminirana, odnosno prelaze li kontaminanti zakonom definiranu NDK vrijednost, potrebno je najprije uvesti i validirati odgovarajuću laboratorijsku metodu.

Cilj ovog rada bio je validirati laboratorijske metode za određivanje olova, kadmija i kositra u proizvodima od voća. Mjerenje koncentracija spomenutih metala provedeno je na atomskom apsorpcijskom spektrometru (AAS), grafitnom i plamenom tehnikom. Ključni parametri validacije su linearnost, preciznost određena na razini ponovljivosti i intermedijarne preciznosti, točnost određena preko iskorištenja, granica kvantifikacije te granica detekcije. Validacija je provedena prema smjernicama vodiča AOAC (Association of Analytical Communities), uz preporuke i uputstva prilagođena spektrometrijskim metodama na AAS-u Hrvatskog mjeriteljskog društva (HMD, 2022).

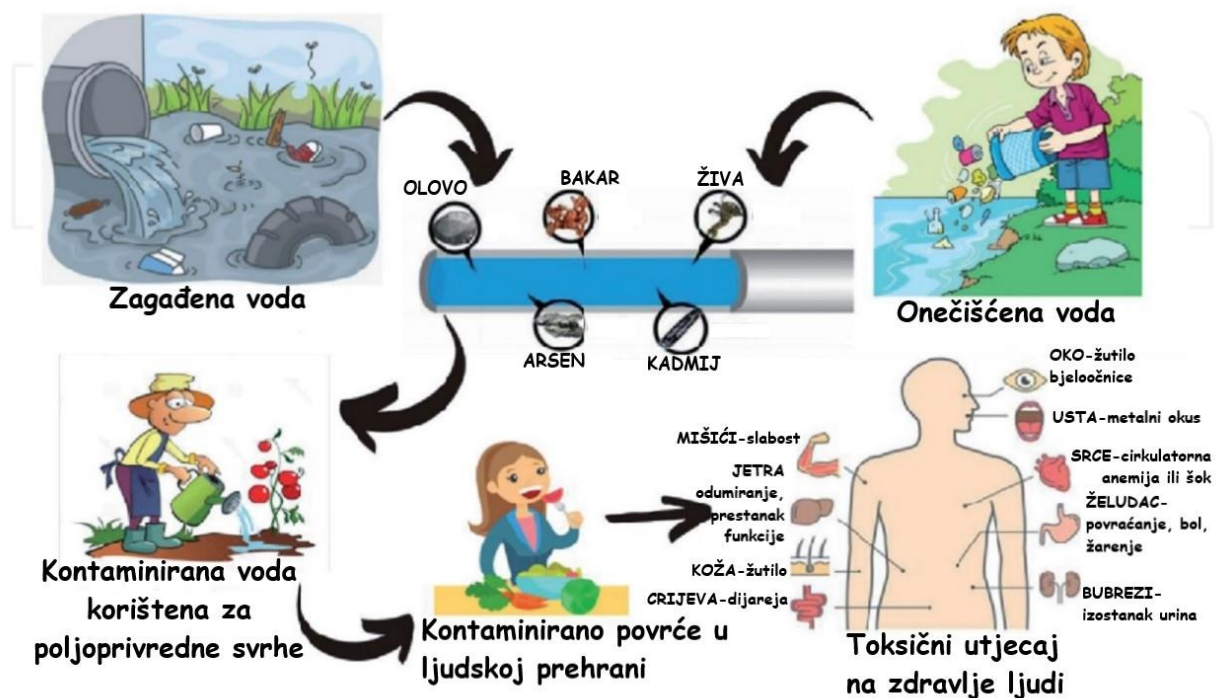
2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEŠKI METALI

Teški metali su kemijski elementi metalne prirode s relativno većom gustoćom. Ukoliko se u organizam ili općenito ekološki sustav unose iznad određene najveće dopuštene koncentracije postaju zdravstvena opasnost po ljude i životinje, te opasan uzrok zagađenja čitavog ekosustava. Osim što su toksični za ljudski organizam, budući da uzorkuju brojne zdravstvene poremećaje čovjeka, kao i poremećaje u razvoju ploda, glavna opasnost kontaminacije teškim metalima je biomagnifikacija - dugotrajni porast koncentracije teških metala duž hranidbenog lanca uslijed konstantnog bioakumuliranja (Manwani i sur., 2022).

Teški metali kao što su olovo i kadmij u prirodu dospijevaju putem vode, tla i zraka, sve do čovjeka. Onečišćene vode kojom se navodnjavaju poljoprivredne površine sadrže teške metale koji se posljedično akumuliraju u voću i povrću namijenjenom za ljudsku prehranu (Pipoyan i sur., 2023; Puntarić i sur., 2013). Osim toga, izvor kontaminacije teškim metalima jesu i otpadne vode koje se ispuštaju u okoliš, industrijska goriva, mineralna gnojiva, prekomjerna uporaba pesticida i dr. (Stančić i sur., 2016). Rusin i sur. (2021) navode da izvor kontaminacije također mogu biti tehnološki procesi prerade namirnica za konzumaciju (metalni nož, dio pogona i sl.) ili pak ambalažni materijali kao što konzerve. Takav slučaj kontaminacije češći je kod otpuštanja kositra iz ambalaže u hranu, posebice ukoliko je namirnica kisela (Rusin i sur., 2021).

Najčešće kositrom kontaminirano voće i povrće je ono pakirano u metalnim limenkama, tzv. konzervama (Pasias i sur., 2012). Konzerve su limenke od bijelog lima presvučene slojem kositrenih spojeva koji sprječava interakciju organskih kiselina iz hrane i metalne legure. Takva je ambalaža česta budući da osigurava hermetičnost, čvrstoću, lako se pakira i transportira, nije lomljiva, te dobro podnosi pasterizaciju, a time osigurava dulji rok trajnosti pakiranog proizvoda. Međutim, najveći nedostatak ovakve ambalaže je korozija, koja se najčešće pojavljuje na mjestu vara, brtve ili mehaničkog oštećenja, uslijed koje dolazi do migracije kositra u hranu. Osim toga, može doći do ljuštenja dodatno nanesenog laka tj. sloja, zbog loše adhezivnosti ili posljedica „stresa“ kojem je limenka izložena (Vujković i sur., 2007).



Slika 1. Ciklični prikaz kontaminacije povrća teškim metalima i njihov toksični utjecaj na ljude (prema Manwani i sur., 2022)

2.2.VOĆE I POVRĆE

Voće i povrće važne su namirnice u svakodnevnom životu ljudi jer sadrže hranjive tvari nužne za uravnoteženu prehranu, zdravlje i vitalnost čovjeka. Prema WHO/FAO (*engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*), dnevni unos voća i povrća trebao bi biti 400 g, tj. pet puta po 80 g/dan. Brojne studije ukazuju na važnost voća i povrća u svakodnevnoj prehrani. Svjež, suho ili toplinski obrađeno, ipak sadrži vrijedne tvari poput vlakana, vitamina, minerala, polifenola i dr. koje imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja. Novija istraživanja podupiru trend konzumacije hrane u što izvornijem, cjelovitom i minimalno obrađenom obliku. Razlog minimalne obrade je očuvanje vrijednih nutrijenata, čija bi se koncentracija narušila toplinskom ili nekom drugom tehnološkom obradom. Osim vitamina i minerala iz voća, često zanemarena vlakna također su vrijedne tvari. Vlakna daju osjećaj sitosti kroz duže vrijeme, stoga se povezuju s pozitivnim učinkom kod prevencije pretilosti, te pozitivno utječu na gastrointestinalni sustav zbog čega ih nazivaju "čistačima crijeva" (Slavin i Loyd, 2012).

Minimalna obrada s druge strane, ostavlja veću vjerojatnost zaostataka raznih kontaminanata u svježem voću i povrću. Puntarić i sur. (2013) radili su istraživanje o stupnju kontaminacije i izloženosti stanovnika Zagreba kontaminaciji lisnatog povrća, tla i zraka teškim metalima (Pb, Cd, As i Hg) nakon nesreće u spalionici otpada "Puto", 2002. godine. Nesreća je uzrokovana nepropisno uskladištenom otpadu pripremljenom za spaljivanje, što je rezultiralo požarom i u konačnici ekološkim problemom. Također, kao razlog istraživanja navode i tijekom godina, kontinuirani porast metala i metaloida u tlu i zraku. Rezultati istraživanja pokazali su da kontaminacija teškim metalima uvelike ovisi o blizini i intenzitetu prometnica, te da je najveća koncentracija olova u povrću nađena u južnom i jugozapadnom dijelu grada, zbog prometa, ali i prevladavajućih vjetrova. Lisnato se povrće, zbog većeg stupnja transpiracije i translokacije, koristi kao bioindikator taloženja teških metala poput olova, kadmija, željeza, arsena i cinka. Navode da se špinat, zelena salata i endvija uspješno koriste za kontrolu i praćenje bioakumulacije teških metala uzrokovanih ponajviše oborinama u industrijskim i stambenim područjima (Puntarić i sur., 2013).

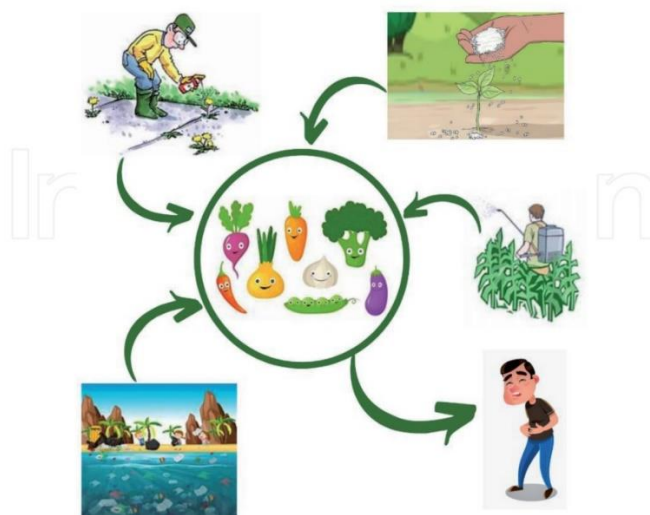
Olovo, kadmij i kositar teški su metali koji se u organizam čovjeka mogu unijeti konzumacijom kontaminiranog voća i povrća (Stančić i sur., 2016; Pasić i sur., 2012). Kadmij se najčešće u biljku apsorbira putem korijena odnosno kontaminirane zemlje, a olovo preko onečišćenog zraka (Manwani i sur., 2022), dok kositar u organizam najčešće dopijeva uslijed otpuštanja iz ambalaže u hranu ili pak korištenja aditiva E 512 (SnCl_2), koji se dodaje u malim količinama kao antioksidans (Pasić i sur., 2012). Iz tog je razloga nužno provoditi kontrole kontaminanata u hrani. Najveće dopuštene količine teških metala u voću i povrću, te proizvodima od voća i povrća regulirane su Uredbom EZ 1831/2003 i razlikuju se ovisno o vrsti voća ili povrća. Konkretno, NDK za olovo kreće se u rasponu od 0,05-0,80 mg/kg, za kadmij 0,02-0,20 mg/kg, te za kositar 100-200 mg/kg (Uredba, 2006).

2.3. TOKSIČNI EFEKTI NA LJUDSKI ORGANIZAM

U tijelu čovjeka, teški se metali nakon apsorpcije, krvlju prenose do ciljanih tkiva, uzrokujući pritom brojne kronične bolesti. Ovisno o razini toksičnosti i vremenu izlaganja, posljedično povećavaju kancerogeni efekt. Posebno osjetljivi organi na toksičnost kadmija su bubrezi i jetra, ali i testisi, pluća i kosti, budući da kadmij ometa metabolizam esencijalnih mineralnih tvari kao što su Ca, Mg, Zn, Cu i Fe. Olovo negativno utječe na živčani sustav.

Neurotoksičnost olova povezuje se s neurodegenerativnim bolestima, problemima s koncentracijom, sniženjem IQ, hiperaktivnošću kod djece i dr. (Rusin, 2021). Kositar uzrokuje iritaciju želuca i druge gastrointestinalne smetnje (dijareja, povraćanje, abdominalna bol), te povećava rizik od razvoja gastritisa (Pasias i sur., 2012; Martin i sur., 1994).

Teški metali uglavnom imaju sličan mehanizam djelovanja. Nakon konzumacije kontaminiranog voća ili povrća, teški metali dospijevaju u kiselu sredinu želuca. U takvoj se sredini oksidiraju i postaju reaktivni. Drugim riječima, stvaraju se slobodni radikali koji lako stupaju u reakciju s biološkim molekulama kao što su proteini, pri čemu stvaraju enzim-supstrat komplekse. U enzim-supstrat kompleksu, na mjesto odgovarajućeg supstrata, vezuje se teški metal, što posljedično dovodi do inhibicije enzima koji u konačnici gubi funkciju. Umjesto odgovarajućeg produkta enzim-supstrat kompleksa, u tkivo se ugrađuje teški metal. Rezultat ovakve ugradnje jesu razna oštećenja, abnormalnosti i disfunkcije organa (Manwani i sur., 2022).



Slika 2 Različiti načini kontaminacije povrća (prema Manwani i sur., 2022)

2.4.VALIDACIJA I VALIDACIJSKI PARAMETRI

Validacija je postupak dokazivanja ili potvrđivanja izvedbenih parametara metode. Ona obuhvaća niz mjerenja različitih parametara, kojima su postavljeni kriteriji prihvatljivosti. Validirati metodu znači da rezultati ispitivanja parametara validacije zadovoljavaju postavljene kriterije, čime se u konačnici dokazuje da je metoda prikladna za određeno analitičko ispitivanje (AOAC, 2019).

Različite metode zahtijevaju različit pristup validaciji, stoga se isti parametri i kriteriji prihvatljivosti tih parametara, ne mogu uvijek primijeniti na sve metode. Neke zahtijevaju više, a neke manje parametara koje je potrebno ispitati. Također, u ovisnosti o osjetljivosti metode, različiti su kriteriji prihvatljivosti (Pravilnik, 2005). Mnoštvo je priručnika i smjernica za provedbu validacije izdanih od različitih međunarodnih organizacija kao što su AOAC (*engl. Association of Analytical Communities*), Eurachem Guide, ICH (*engl. International Conference on the Harmonization*), IUPAC (*engl. International Union of Pure and Applied Chemistry*) i dr. koje diktiraju definicije pojmova i validacijskih parametara, izvođenje validacije i uvjete prihvatljivosti te plan i dokumentaciju validacije. Prilikom validiranja metode, preporuka je držati se jednog vodiča, koji je najprikladniji za našu metodu (Grgić, 2019). Osim toga, validaciju metode treba provesti u skladu s dobrom laboratorijskom i analitičkom praksom (DLP i DAP), te ISO normom HRN ISO 17025:2017 (AOAC, 2019; Eurachem Guide, 2014; ICH, 2005).

Hrvatska akreditacijska agencija (HAA) je nekomercionalna nacionalna ustanova koja dodjeljuje dokaz o osposobljenosti za obavljanje određenih djelatnosti. Njezina je uloga osigurati povjerenje u rad institucija, te kvalitetu proizvoda i usluga na domaćem kao i na međunarodnom tržištu budući da tijela akreditirana od strane HAA imaju mogućnost ravnopravnog konkuriranja na europskom tržištu roba i usluga. Akreditaciju provodi ocjeniteljska skupina koja ocjenjuje sukladnost prema zahtjevima nacionalnih, europskih i međunarodnih normi. Ukoliko je podnositelj zahtjeva za akreditaciju sukladan zahtjevima norme, te je zadovoljio sve uvjete za obavljanje poslova za to područje akreditacije, dodjeljuje mu se potvrda o akreditaciji, certifikat kojim se dokazuje da je tijelo akreditirano za opisano područje akreditacije. Akreditacijska komisija provjerava i utvrđuje sukladnost rada prema zahtjevima norme svakih godinu dana (HAA, 2018).

Svaki akreditirani laboratorij mora najprije validirati metodu koju planira primjenjivati za ispitivanje. Prema tome, validacija je također uvjet za akreditiranje laboratorija prema zahtjevima Norme 17025, dokumentu koji omogućuje službenim laboratorijima dokazati da rade prema zahtjevima struke i da su njihovi rezultati pouzdani i validni (HAA, 2018; ISO 17025, 2017).

2.4.1. Linearnost

Linearnost i linearno područje metode je parametar koji se određuje pomoću kalibracijskog pravca ukoliko metoda pokazuje linearnu ovisnost (Eurachem Guide, 2014). U tom slučaju, potrebno je konstruirati kalibracijski pravac čija jednadžba predstavlja ovisnost koncentracije analita (x-os) o odzivu instrumenta (y-os). U linearnom području određene analitičke metode koje se izvodi iz studije linearnosti, izmjereni rezultati izravno su proporcionalni koncentraciji analita (ICH, 2005).

2.4.2. Preciznost

Preciznost je mjera bliskosti izmjerenih rezultata, tj. bliskost slaganja između neovisnih rezultata izmjerenih pod određenim uvjetima (AOAC 2019; Eurachem Guide, 2014). Također se opisuje kao rasipanje rezultata, mjera nepreciznosti, koja se izražava numerički tj. relativnom standardnom devijacijom, ukoliko se radi o kvantitativnim metodama (ICH, 2005). Kod kvalitativnih metoda, preciznost se ne može izraziti numerički (standardnom devijacijom), već se ona izražava kao lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati (Eurachem Guide, 2014). Niža relativna standardna devijacija (RSD) označava veću preciznost. U ovisnosti o različitim uvjetima mjerenja, upravo razlikujemo preciznost određenu pod uvjetima ponovljivosti, međupreciznosti i reproducibilnosti (AOAC, 2019).

2.4.2.1 Ponovljivost

Mjera razlikovanja rezultata dobivenih izvođenjem jedne, iste metode, od strane jednog, istog analitičara, koristeći istu opremu, kroz kraći vremenski period. Za preciznost određenu u uvjetima ponovljivosti, obično se očekuje najmanje razlikovanje u rezultatima, odnosno najveća preciznost - niži RSD (Eurachem Guide, 2014).

2.4.2.2 Reproducibilnost (Obnovljivost)

Mjera razlikovanja rezultata dobivenih u uvjetima izvođenja analitičke metode između različitih laboratorija i različitih analitičara, koji koriste različitu opremu (AOAC, 2019). Za preciznost određenu pod uvjetima reproducibilnosti, očekuje se najveće razlikovanje u rezultatima, odnosno viši RSD (Eurachem Guide, 2014). Sudjelovanje u „Ispitivanju sposobnosti“ (engl. *Proficiency testing, PT*), osim točnosti, može pružiti uvjerljive podatke o

preciznosti određenoj pod uvjetima reproducibilnosti, budući da postoji mogućnost usporedbe s drugim laboratorijima učesnicima.

2.4.2.3 Međupreciznost

U nekim se literaturama može naći pod imenom intermedijarna preciznost. Međupreciznost je preciznost određena između uvjeta ponovljivosti i reproducibilnosti kao dva različita ekstrema. To su uvjeti u kojima različiti analitičari u istom laboratoriju, izvode istu metodu, kroz duži vremenski period, pri čemu mogu koristiti različite kemikalije, dijelove instrumenta i sl. Ideja je da uvjeti budu varijabilniji od uvjeta ponovljivosti, koje svakako prije mjerenja treba definirati, kako bi se moglo procijeniti koliko različiti uvjeti utječu na preciznost (Eurachem Guide, 2014).

2.4.3. Točnost

Parametar točnosti opisuje bliskost između srednje vrijednosti beskonačnih rezultata mjerenja i referentne vrijednosti (često nazvana „točna vrijednost“). Međutim, budući da se točnost mora odrediti na određenom broju rezultata mjerenja, te da taj broj ne može biti beskonačan, teorijski se točnost ne može mjeriti. Stoga se u svrhu određivanja točnosti određuje tzv. *bias*, praktična procjena točnosti (istinitosti), koja omogućava da se točnost odredi brojčano (Eurachem Guide, 2014).

Bias je kvantitativna mjera koja uspoređuje očekivanu vrijednost rezultata ispitivanja s referentnom vrijednošću (AOAC, 2019). U ovisnosti o dostupnosti certificiranog referentnog materijala (CRM – materijal koji sadrži točno poznate koncentracije tvari), vrsti analita, tj. prirodi matriksa, opsegu metode, trendu dobivenih rezultata i dr., postoje različiti pristupi računanja ovog parametra. Razlikujemo apsolutno odstupanje (engl. *absolute bias*) kao razliku referentne i srednje vrijednosti mjerenja, relativno odstupanje (engl. *relative bias*) izraženo u postotcima, kao omjer spomenute razlike i referentne vrijednosti, iskorištenje metode (engl. *relative recovery*) izraženo u postotcima kao omjer srednje vrijednosti rezultata mjerenja i referentne vrijednosti, te iskorištenje obogaćenog uzorka (engl. *relative spike recovery*). Određivanje točnosti preko odstupanja ili iskorištenja, može se iskoristiti i za korekciju konačnih rezultata (Eurachem Guide, 2014).

2.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije

Granicom kvantifikacije (engl. *LOQ* – limit of quantification) smatra se najniža koncentracija ili masa analita u matriksu, koja se može kvantificirati s određenom razinom pouzdanosti (AOAC, 2019). Granica detekcije određuje se na temelju istih uzoraka i rezultata mjerenja kao i za granicu kvantifikacije. Ona (engl. *LOD* – limit of detection) pak predstavlja najnižu koncentraciju ili masu analita u matriksu koja može biti detektirana s određenom razinom pouzdanosti. Važno je odabrati prikladne uzorke - uzorci slijepe probe ili uzorci cijepljeni analitom očekivane vrijednosti LOD ili niže. Osim toga, bitno je provesti dovoljan broj ponavljanja kako bi se dobila pouzdana procjena. U atomskoj spektrometriji kao i spektrofotometriji, za određivanje LOQ i LOD, najčešće se koriste uzorci slijepe probe, iz razloga što se dobiva mjerljivi signal slijepe probe (Eurachem Guide, 2014). Granice detekcije i kvantifikacije mogu se odrediti vizualno, metodom *signal-to-noise*, te na temelju standardne devijacije rezultata ponavljanja i regresijskog pravca. Vizualna metoda uključuje vizualnu procjenu najnižeg signala uzorka s poznatom koncentracijom, koji se bez sumnje može prepoznati. *Signal-to-noise* metoda koristi se kod analitičkih postupaka s baznom linijom, a temelji se na omjeru signala uzorka poznate koncentracije i signala slijepe probe (šum). Takva metoda određivanja zahtjeva da omjer signala i šuma za granicu kvantifikacije bude 10:1, a za granicu detekcije 3:1, kako bi rezultati imali potrebnu razinu pouzdanosti (ICH, 2005). LOD i LOQ se u konačnici, mogu odrediti uvrštavanjem u formule:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{SD}{a} \quad [1]$$

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \frac{SD}{a} \quad [2]$$

pri čemu je *SD* standardna devijacija rezultata ponavljanja najčešće uzoraka slijepe probe, a *a* nagib regresijskog pravca.

2.5.ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA I NJEZINE PREDNOSTI

Atomska apsorpcijska spektrometrija je tehnika za kvantitativno određivanje nekog elementa na temelju apsorbiranog UV ili VIS zračenja. Atomi (u atomskoj pari) koji apsorbiraju zračenje određene valne duljine, prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje. Svaki element apsorбира zračenje određenih valnih duljina, dajući pritom prepoznatljivi spektar tog elementa.

Analiza započinje usisavanjem malog volumena tekućeg uzorka u atomizator, gdje se prevodi u atomsku paru slobodnih atoma. Ovisno o tehnici, atomizatorom se može smatrati plamen (plamena tehnika) ili grafitna kiveta (grafitna tehnika) Šuplja katodna lampa emitira svjetlost direktno kroz atomizator, pri čemu nastali slobodni atomi u atomskoj pari, apsorbiraju svjetlost određene valne duljine. Detektor registrira razliku poznate i detektirane valne duljine, pri čemu se određuje apsorbanacija. Pomoću kalibracijske krivulje i apsorbanacije, konačno se određuje nepoznata koncentracija elementa u uzorku. Najčešće je ta ovisnost proporcionalna, odnosno povećanjem apsorbanacije, raste i koncentracija ciljanog elementa u uzorku.

Neke od prednosti ove instrumentalne metode su:

- Jednostavno rukovanje instrumentom
- Mogućnost brzog i izravnog dobivanja rezultata (kratko trajanje analize)
- Nije potrebna velika količina uzorka
- Mogućnost da se iz jedne otopine odredi koncentracija većeg broja elemenata
- Izrazito selektivna budući da se koristi šuplja katodna lampa karakteristična za svaki element
- Dovoljno osjetljiva za određivanje elemenata u tragovima

Nedostatkom ove instrumentalne metode može se smatrati nemogućnost kvantifikacije više elemenata odjednom. Naime, u pojedinom trenutku moguće je provoditi samo individualnu analizu pojedinog elementa, odnosno moguće je kvantificirati samo onaj element čije zračenje odašilje katodna lampa. Također, vrlo koncentrirane uzorke potrebno je razrijediti u skladu s granicama linearnog područja (Garcia i Baez, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Postupak validacije metode proveden je prema smjernicama AOAC (2019), uz preporuke i uputstva prilagođena spektrometrijskim metodama na AAS-u Hrvatskog mjeriteljskog društva (HMD, 2022).

3.1.PARAMETRI INSTRUMENTA

3.1.1. Atomski apsorpcijski spektrometar (AAS)

Validacija metode za određivanje olova i kadmija provodi se na atomskom apsorpcijskom spektrometru Varian AAS AA 240 uz pripadajući autosampler PSD 120, grafitnom tehnikom. Grafitna tehnika zahtjeva plin argon, čiji tlak u boci valja biti od 2,5 do maksimalno 3,5 bar kako bi protok argona bio zadovoljavajući (0,3 L/min). Korištena je višeelementna šuplja katodna lampa struje 5 mA. Kadmij je određivan na valnoj duljini od 228,8 nm, a olovo na 283,3 nm. (Varian, 2004)

Kositar se određuje plamenom tehnikom na istom apsorpcijskom spektrometru. Za razliku od grafitne, plamena tehnika zahtjeva plamenik, atomizator, te mješavinu plinova acetilena i sintetskog zraka. Kod određivanja kositra, poželjno je da tlak acetilena bude 3,5-3,7 bar, kako bi protok bio 5,0 mL/min. Korištena je jednoelementna, šuplja katodna lampa, struje 7 mA. Valna duljina pri kojoj je kositar određivan iznosi 286,3 nm (Varian, 2004).

3.2.KEMIKALIJE I PRIBOR

3.2.1. Olovo i kadmij (grafitna tehnika)

Pribor i oprema:

- Kvarcni lončići
- Plastične laboratorijske žličice
- Satna stakalca
- Staklene čaše od 100 mL
- Stakleni lijevci
- Falkon kivete od 50 mL sa čepovima

- Filter-papir
- Odmjerne tikvice od 10 mL, 100 mL, 500 mL i 1000 mL
- Mikropipete Eppendorf s nastavcima (10-100 μ L, 100-1000 μ L I 1-10 mL)
- Atomski apsorpcijski spektrometar, AA 240, Varian
- Samouzorkivač, Autosampler PSD 120, Varian
- Višeelementna šuplja katodna lampa, AA Multielement Ag/Cd/Pb/Zn, Agilent
- Električni blender, 5KSBC1BO, KitchenAid

Kemikalije:

- Nitratna kiselina, 65 %, T.T.T.
- Klorovodična kiselina, 37 %, T.T.T.
- Demineralizirana voda, Merck
- Fosfat-modifier, Merck
- Magnezij-modifier, Merck
- Plin argon iz boce, tip 4.8, Messer
- STOCK standard za Pb, Merck
- STOCK standard za Cd, Merck
- Pire od grejpa, Grapefruit Puree TM 07429, FAPAS
- Pire od grejpa, Grapefruit Puree CRM TYG094RM, FAPAS

3.2.2. Kositar (plamena tehnika)

Pribor i oprema:

- Plastične kivete za mokru digestiju
- Plastične laboratorijske žličice
- Staklene čaše od 100 mL
- Stakleni lijevci
- Falkon kivete od 50 mL sa čepovima
- Filter-papir
- Odmjerne tikvice od 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- termometar

- Mikropipete Eppendorf s nastavcima (1-10 mL)
- Jednoelementna šuplja katodna lampa, AA Single element Sn, Agilent
- Električni blender, 5KSBC1BO, KitchenAid

Kemikalije:

- Nitratna kiselina, 65 %, T.T.T.
- Klorovodična kiselina, 37 %, T.T.T.
- Demineralizirana voda, Merck
- STOCK standard za Sn, Merck
- Plin acetilen iz boce, tip 2.6, Messer
- Pire od grejpa, Grapefruit puree TM 07429, FAPAS
- Pire od grejpa, Grapefruit puree CRM TYG094RM, FAPAS

Tablica 1. Tablični prikaz korištenih kemikalija, uz pripadajući kemijski i komercijalni naziv, čistoću i proizvođača

KEMIJSKI SPOJ	KEMIJSKI NAZIV	KOMERCIJALNI NAZIV	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
HNO ₃ (aq)	Nitratna kiselina	Nitratna kiselina, 14,4 M	65 %	T.T.T.
HCl (aq)	Klorovodična kiselina	Klorovodična kiselina, 12 M	37 %	T.T.T.
Pb(NO ₃) u HNO ₃ 0,5 mol/L	Otopina olovnog nitrata u 0,5 M nitratnoj kiselini	Stock standard za Pb	High purity	Merck
Cd(NO ₃) u HNO ₃ 0,5 mol/L	Otopina kadmijevog nitrata u 0,5 M nitratnoj kiselini	Stock standard za Cd	High purity	Merck
SnCl ₄ u HCl 2 mol/L	Otopina kostitrova(IV) klorida u 2 M klorovodičnoj kiselini	Stock standard za Sn	High purity	Merck
H ₂ O (l)	Demineralizirana voda	DEMI voda	Stupanj čistoće 2 (< 1 μS/cm)	Merck
NH ₄ H ₂ PO ₄ u H ₂ O	Amonijev dihidrogenfosfat	Fosfat-matrixmodifier za grafitnu tehniku, MM-P-40 phosphate	100 %	Merck
Mg(NO ₃) ₂ u H ₂ O	Magnezijev nitrat	Magnezijev-matrixmodifier za grafitnu tehniku, MM-MG-10 magnesium nitrate	99,99 %	Merck
Ar (g)	Plin argon	Boca plina argona, 50 L, tip 4,8	99,99 %	Messer
C ₂ H ₂ (g)	Plin acetilen	Boca plina acetilena, 50 L, tip 2,6	99,60 %	Messer

3.3.POSTUPAK

3.3.1. Priprema uzoraka za određivanje olova i kadmija

Nakon upisa i dodjeljivanja analitičkog broja i oznake, uzorak se prema potrebi homogenizira. Zatim se u prethodno oprane, dekontaminirane i osušene kvarcne lončiče odvaži oko 1 g uzorka i stavi u peć za suho spaljivanje ($450\text{ }^{\circ}\text{C} / 7\text{ h}$). Spaljivanje traje 7 sati, a po potrebi se uzorak vraća na dopaljivanje ($200\text{ }^{\circ}\text{C} - 450\text{ }^{\circ}\text{C} / 1\text{-}2\text{ h}$), ovisno o tome je li se uzorak preveo u bijelo-sivi prah. Slijedi preddigestija u digestoru: U pepeo u kvarcnom lončiću, pipetom se ulije 5 mL HCl (6 mol/L) (pipetom se po stijenkama kvarcnog lončića pokupi eventualno zaostali pepeo) i stavi na uparavanje (vodena kupelj, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) dok ne ispari (otprilike 2 - 2,5 h). Nakon toga, potrebno je pripremiti 20 mL HNO₃ (0,1 mol/L), pri čemu će se 10 mL koristiti za digestiju koja traje 2 h, a ostalih 10 mL za filtraciju. Digestija započinje tako da se u upareni pepeo ulije 10 mL 0,1 M HNO₃ i poklopi satnim stakalcem. Nakon 2h digestije, otopina uzorka se filtrira preko filter papira u plastične *Falkon* kivete. Prema potrebi, otopina uzorka nadopuni se 0,1 M HNO₃ do konačnog volumena od 20 mL. Ukoliko uzorci ne idu odmah na mjerenje na AAS-u, kivete je potrebno spremite u hladnjak. Slijepa proba priprema se na identičan način kao uzorak, prolazi jednak tretman, uz izostanak uzorka (ISO 14082, 2005).

3.3.2. Priprema radne otopine, otopine za ispiranje, kalibracijske otopine i standardnih otopina olova i kadmija

U ovoj metodi, razlikuje se radna otopina HNO₃ (0,1 M HNO₃) i otopina za ispiranje (0,07 M HNO₃). Radna otopina HNO₃ koristi se u pripremi standardnih otopina olova i kadmija te kao otopina pod nazivom „CALZERO“, prilikom mjerenja na aparatu. CALZERO otopina služi kako bi se instrument kalibrirao u nuli, tj. kako bi postavio baznu liniju. U idealnom slučaju, otopina slijepe probe i CALZERO trebale bi se poklapati (ISO 14082, 2012). Međutim, u praksi se gotovo uvijek pojavljuje određeni pik slijepe probe, što sugerira da je koncentracija otopine slijepe probe uvijek nešto viša od otopine CALZERO, koja u tom slučaju predstavlja „nulu“ od koje počinje mjerenje. Otopina za ispiranje, 0,07 M HNO₃ koristi se za ispiranje sustava grafitne tehnike na AAS-u tijekom analize (ISO 13804, 2013).

PRIPREMA RADNE OTOPINE I OTOPINE ZA ISPIRANJE:

65 % HNO₃

ρ (HNO₃) = 1,39 kg/L

Mr (HNO₃) = 63,01 g/mol

$$n(65\% \text{ HNO}_3) = \frac{0,65 \cdot 1390 \text{ g}}{63,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 14,4 \text{ mol} \quad [3]$$

$$V(\text{HNO}_3)_{0,1\text{M}} = \frac{0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0,5 \text{ L}}{14,4 \text{ mol}} = 3,5 \text{ mL} \quad \text{RADNA OTOPINA} \quad [4]$$

$$V(\text{HNO}_3)_{0,07\text{M}} = \frac{0,07 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 1 \text{ L}}{14,4 \text{ mol}} = 5 \text{ mL} \quad \text{OTOPINA ZA ISPIRANJE} \quad [5]$$

0,1 M HNO₃ i 0,07 M HNO₃ pripremaju se iz 65 % koncentrirane nitratne kiseline. Za pripremu 0,1 M HNO₃, potrebno je u tikvicu od 500 mL otpipetirati 3,5 mL 65 % HNO₃ i nadopuniti do oznake demineraliziranom vodom. Pritom treba poštovati pravilo o razrjeđivanju koncentriranih kiselina, pa je potrebno tikvicu od 500 mL najprije napuniti polovicom volumena demineralizirane vode, zatim dodati kiselinu i nadopuniti do oznake. 0,07 M HNO₃ priprema se u tikvici od 1000 mL, tako da se otpipetira 5 mL 65 % HNO₃ i nadopuni do oznake demineraliziranom vodom (ISO 14082, 2005).

PRIPREMA KALIBRACIJSKIH I STANDARDNIH OTOPINA OLOVA I KADMIJA:

c (STOCK, Pb) = 1000 ppm

c (STOCK, Cd) = 1000 ppm

Međustandard za kalibracijsku otopinu:

$$V(\text{Pb, MSTD kalib.}) = \frac{5 \text{ ppm} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L} \quad [6]$$

$$V(\text{Cd, MSTD kalib.}) = \frac{0,7 \text{ ppm} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} = 0,07 \text{ mL} = 70 \mu\text{L} \quad [7]$$

Međustandard za standardnu otopinu:

$$V (\text{Pb, MSTD}) = \frac{3 \text{ ppm} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} = 0,3 \text{ mL} = 300 \text{ }\mu\text{L} \quad [8]$$

$$V (\text{Cd, MSTD}) = \frac{0,1 \text{ ppm} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} = 0,01 \text{ mL} = 10 \text{ }\mu\text{L} \quad [9]$$

Kalibracijska otopina:

$$V (\text{Pb, RSTD kalib.}) = \frac{0,05 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}}{5 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ mL} = 100 \text{ }\mu\text{L} \quad [10]$$

$$V (\text{Cd, RSTD kalib.}) = \frac{0,007 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}}{0,7 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ mL} = 100 \text{ }\mu\text{L} \quad [11]$$

Standardna otopina:

$$V (\text{Pb, RSTD}) = \frac{0,03 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}}{3 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ mL} = 100 \text{ }\mu\text{L} \quad [12]$$

$$V (\text{Cd, RSTD}) = \frac{0,001 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}}{0,1 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ mL} = 100 \text{ }\mu\text{L} \quad [13]$$

Za pripremu kalibracijske (RSTD kalib.) i standardne otopine (RSTD), najprije je potrebno pripremiti međustandardnu otopinu. Međustandard se priprema iz temeljne (STOCK) otopine, čije su koncentracije za olovo i kadmij 1000 mg/L. Bitno je razlikovati međustandard za kalibracijsku otopinu (MSTD kalib.) i međustandard za standardnu otopinu (MSTD). Međustandardna kalibracijska otopina (MSTD kalib.) je, kao i standardna (MSTD), otopina od 100 mL koja sadrži različite koncentracije olova i kadmija. Budući da MSTD kalib. sadrži 5 mg/L olova i 0,7 mg/L kadmija, iz STOCK otopine olova, potrebno je otpipetirati 500 μL , a iz STOCK otopine kadmija 70 μL u istu tikvicu od 100 mL i nadopuniti radnom otopinom (0,1 M HNO_3) do oznake. MSTD otopina se priprema na sličan način, pri čemu u tikvicu od 100 mL, iz STOCK otopine olova treba otpipetirati 300 μL , iz STOCK otopine kadmija 10 μL , te nadopuniti radnom otopinom do oznake. Nakon što se pripreme međustandardne otopine, one su stabilne kroz 6 mjeseci. Kalibracijska i standardna otopina pripremaju se u posebnim tikvicama

od 10 mL, prije svake analize. Konačno, kalibracijska se otopina priprema na način da se iz MSTD kalib. otpipetira 100 μ L, kao i standardna otopina, koja se priprema tako da se iz MSTD otpipetira također 100 μ L (ISO 14082, 2005).

3.3.3. Mjerenje na AAS-u, grafitnom tehnikom

Prije početka mjerenja, potrebno je namjestiti nastavak za grafitnu tehniku koji uključuje grafitnu kivetu i karusel. U programu se potom kreira „batch“- serija rasporeda i broja mjerenja uzoraka. Nakon toga, potrebno je upaliti katodnu lampu koja se grije kroz 20 minuta. Tijekom tih 20 minuta slijedi niz radnji prije samog mjerenja: priprema kalibracijske otopine, otopine standarda, ulijevanje modifera, uzoraka i otopine „calzero“. Zatim slijedi optimizacija lampe i grafitne kivete, tako da se dobije maksimalni signal lampe (eksperimentalno oko 0,960). Nakon optimizacije lampe, na aparat je potrebno priključiti autosampler s karuselom, te namjestiti protok argona „kap po kap“ i iglu koja ubada u grafitnu kivetu. Također, u odgovarajuće čašice u utorima na autosampleru, ulije se kalibracijska otopina, otopina „CALZERO“, te odgovarajući modifieri. Modifieri su otopine koje smanjuju interferencije, na način da sprječavaju stvaranje određenih spojeva uslijed kojih bi aparat pokazivao pogrešnu apsorbanciju. Nakon što se sve provjeri, spali se grafitna kiveta u svrhu čišćenja (pritiskom na *Tube clean*), te započinje analiza označavanjem startne pozicije i pritiskom na *START* (Varian, 2004).

3.3.4. Olovo, Pb

3.3.4.1. Ispitivanje linearnosti

Prema uputama Hrvatskog mjeriteljskog društva (HMD), poželjno je da najviša dozvoljena koncentracija (NDK) bude na sredini linearnog područja, pri čemu je potrebno najmanje 5 koncentracija podijeliti u relativno jednakim razmacima duž čitavog linearnog područja (HMD, 2022). Svaka se koncentracija tri puta mjeri, te se određuje njezina srednja vrijednost kao konačni rezultat zadane koncentracije (AOAC, 2019). U ovom je radu linearno područje konstruirano iz 9 različitih koncentracija (1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb, 20 ppb, 25 ppb, 30 ppb, 40 ppb, 50 ppb) kojima su mjerene apsorbancije. Koncentracije su pripremane razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena međustandarda MSTD kalib. u tikvice od 10 mL, kao što je prikazano u tablici ispod.

Tablica 2. Priprema koncentracija za određivanje linearnog područja Pb

Koncentracija Pb / [µg/L]	Volumen pipetiran iz međustandarda / [µL]
1	2
5	10
10	20
15	30
20	40
25	50
30	60
40	80
50	100

3.3.4.2. Ispitivanje ponovljivosti i međupreciznosti

Parametri ponovljivost i međupreciznost određeni su mjerenjem uzoraka pirea od grejpa, TM 07429. Ponovljivost je određena na istom uzorku kroz 10 ponavljanja, od strane jedne analitičarke. Međupreciznost, koja se u nekim literaturama još naziva i intermedijarna preciznost određena je tako da su dvije analitičarke pripremile isti uzorak 10 puta. Međupreciznost je, dakle, određena kroz ukupno 20 mjerenja, a ponovljivost kroz 10 mjerenja istog uzorka.

3.3.4.3. Ispitivanje točnosti

Točnost je određena preko iskorištenja, mjerenjem uzoraka pirea od grejpa, CRM TYG094RM. Dobiveni se rezultati uspoređuju sa stvarnom koncentracijom CRM TYG094RM (172 µg/kg), te se na temelju iskorištenja zaključuje o prihvatljivosti ovog parametra. Iskorištenje se računa prema formuli:

$$T = \frac{I}{C} \cdot 100\% \quad [14]$$

gdje je I izmjerena koncentracija, a C ciljna (stvarna koncentracija, 172 µg/kg).

3.3.4.4. Ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije

LOQ (engl. *limit of quantification*) ili granica kvantifikacije (GK), određena je prema HMD-ovim uputama, tako da iznosi 30 % od NDK (HMD, 2022). Granica kvantifikacije određena je kroz 10 mjerenja „spike“ uzoraka (engl. *spike*, obogaćeni uzorci) obogaćenih koncentracijom olova od 1 µg/L. Uzorci su pripremljeni na način da se u tikvice od 10 mL otpipetira 2 µL međustandarda MSTD kalib. čija koncentracija olova iznosi 5 ppm. Nakon što je izmjerena apsorbancija 10 obogaćenih uzoraka, granica kvantifikacije i granica detekcije su izračunate prema formulama [1] i [2] gdje je SD standardna devijacija 10 mjerenja, a *a* nagib koji se očita iz kalibracijskog pravca.

3.3.5. Kadmij, Cd

3.3.5.1. Ispitivanje linearnosti

Poštujući ranije navedena pravila, kao kod olova, na isti je način određen raspon linearnog područja. Linearno područje za kadmij konstruirano je kroz 7 koncentracija: 0,050 ppb; 0,250 ppb; 0,500 ppb; 1 ppb; 2,5 ppb; 5 ppb i 7 ppb. Koncentracije su pripremane razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena međustandarda MSTD u tikvice od 10 mL, kao što je prikazano u tablici ispod.

Tablica 3. Priprema koncentracija za određivanje linearnog područja Cd

Koncentracija Cd / [µg/L]	Volumen pipetiran iz međustandarda / [µL]
0,050	5
0,250	25
0,500	50
1	100
2,5	250
5	500
7	700

3.3.5.2. Ispitivanje ponovljivosti i međupreciznosti

Budući da se radi o istoj metodi, kao i tehnici (grafitnoj) određivanja koncentracije metala, odvaga, priprema i analiza uzoraka za ispitivanje ponovljivosti, međupreciznosti i točnosti kadmija, identična je kao kod određivanja olova. Ispitivanje je provedeno na istim uzorcima, ali na različitoj valnoj duljini (za olovo 283,3 nm, za kadmij 228,8 nm).

3.3.5.3. Ispitivanje točnosti

Točnost se također određuje preko iskorištenja, usporedbom dobivenih rezultata i stvarne koncentracije. Stvarna koncentracija kadmija u uzorku (CRM TYG094RM) iznosila je 104 µg/kg.

3.3.5.4. Ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije

Granica kvantifikacije određena je kroz 10 mjerenja obogaćenih uzoraka čija koncentracija iznosi 0,050 µg/L. Uzorci su pripremljeni na način da je u tikvice od 25 mL otpipetirano 12,5 µL međustandarda MSTD čija koncentracija kadmija iznosi 100 ppb. Nakon 10 mjerenja, granica kvantifikacije i detekcije računaju se prema formulama [1] i [2], kao i kod olova.

3.3.6. Priprema uzoraka za određivanje kositra

Uzorak se po potrebi homogenizira u električnom blenderu ili tarioniku (ISO 13804, 2013). U prethodno opranu i dekontaminiranu kivetu za mokru digestiju, odvagane se oko 5 g uzorka i ulije 10 mL 6 M HCl. Na prethodno termostatiranoj vodenoj kupelji (80 °C ± 3 °C), kivete se inkubiraju kroz sat vremena uz povremeno miješanje i provjeravanje održavane temperature. Nakon 1h, slijedi filtracija preko filter papira, u plastične *Falkon* kivete. *Falkon* kivete se nadopune do konačnog volumena od 50 mL. Preporučljivo je mjerenje obaviti unutar 5-6 sati, no ukoliko nije moguće, uzorke je potrebno konzervirati s par kapi koncentrirane HCl (12 mol/L) i spremiti u hladnjak (ISO 17240, 2008).

3.3.7. Priprema radne i standardne otopine za određivanje kositra

Radna otopina za plamenu tehniku je 0,1 M HCl, a priprema se iz 37 % koncentrirane klorovodične kiseline, tako da se 8,33 mL koncentrirane klorovodične kiseline otpipetira u

tikvicu od 1000 mL i nadopuni do oznake demineraliziranom vodom. Bitno je napomenuti da se tikvicu od 1000 mL najprije dopuni barem polovicom volumena demineralizirane vode, poštujući pravilo o razrjeđivanju koncentriranih kiselina (KuV). Standardna otopina za određivanje kositra priprema se iz temeljne (STOCK) otopine kositra, na način da se u 100 mL, STOCK otopina razrijedi 10 puta, odnosno 10 mL STOCK otopine otpipetira se u tikvicu od 100 mL i nadopuni 0,1 M HCl do oznake. Kalibracijska otopina pripravlja se na jednak način kao standarda i sadrži 100 mg/L kositra, pri čemu uređaj sam razrjeđuje na potrebne koncentracije (15, 25 i 50 mg/L) radnom otopinom (0,1 M HCl).

PRIPREMA RADNE OTOPINE I STANDARDNE OTOPINE:

37 % HCl

ρ (HCl) = 1,19 kg/L

Mr (HCl) = 36,5 g/mol

$$n(37\% \text{ HCl}) = \frac{0,37 \cdot 1190 \text{ g}}{36,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 12,06 \text{ mol} \quad [15]$$

$$V(\text{HCl})_{0,1\text{M}} = \frac{0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 1 \text{ L}}{12 \text{ mol}} = 8,33 \text{ mL} \quad \text{RADNA OTOPINA} \quad [16]$$

$$V(\text{Sn, RSTD}) = \frac{100 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \frac{\text{mol}}{\text{L}}} = 10 \text{ mL} \quad \text{STANDARDNA OTOPINA} \quad [17]$$

3.3.8. Mjerenje na AAS-u, plamenom tehnikom

Za plamenu tehniku na AAS-u, potrebno je namjestiti atomizator i plamenik. Zatim se u tablicu sa serijom rasporeda i broja uzoraka (engl. *batch*) upišu uzorci s dodijeljenim analitičkim brojem i oznakom. Katodnu lampu za kositar potrebno je grijati 20-30 min. Nakon toga, slijedi namještanje plamenika i lampe u optimalan položaj kako bi se dobio maksimalni signal. Budući da plamenik zahtjeva mješavinu acetilena i zraka, nužno je oprezno otvoriti ventil za protok acetilena i upaliti kompresor za zrak. Protok acetilena namjesti se na 3,5 L/min i uključi ventilacija. Analiza započinje označavanjem startne pozicije, te pritiskom na *START* (Varian, 2004).

3.3.9. Kositar, Sn

3.3.9.1. Ispitivanje linearnosti

Područje linearnosti određeno je kroz 8 koncentracijskih točaka; 1 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm i 150 ppm. Koncentracije su pripremane na način da se u tikvice od 100 mL, otpipetira odgovarajući volumen STOCK otopine kositra čija koncentracija iznosi 1000 ppm. Priprema otopina kalibracijskih standarda prikazana je u tablici ispod.

Tablica 4. Priprema koncentracija za određivanje linearnog područja Sn

Koncentracija Sn / [mg/L]	Volumen otpipetiran iz STOCK otopine / [mL]
1	0,1
10	1
25	2,5
50	5
75	7,5
100	10
125	12,5
150	15

3.3.9.2. Ispitivanje ponovljivosti, međupreciznosti i točnosti

Ponovljivost metode za određivanje kositra ispitana je na 10 uzoraka pirea od grejpa, TM 07429. Uzorci su odvagani, pripremljeni i razoreni prema metodi za određivanje kositra ISO HRN 17240:2008. Međupreciznost je ispitana na ukupno 20 uzoraka pirea od grejpa, TM 07429, koji su pripremljeni od strane dvije različite analitičarke (svaka 10).

3.3.9.3. Ispitivanje točnosti

Točnost metode ispitana je kroz 20 uzoraka pirea od grejpa, CRM TYG094RM. Točnost je ispitana preko iskorištenja, mjerenjem 20 uzoraka i uspoređivanjem sa stvarnom vrijednošću

CRM (102 mg/kg), prema formuli [14].

3.3.9.4. Ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije

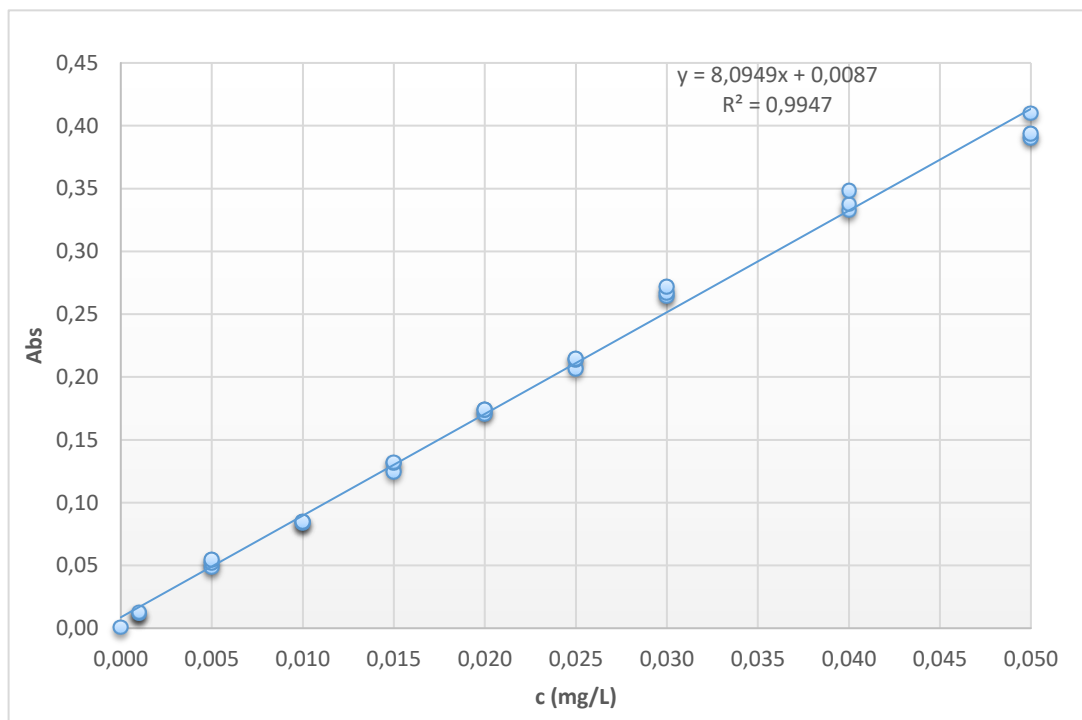
Granica kvantifikacije određena je kroz 10 mjerenja obogaćenih uzoraka čija koncentracija iznosi 1 mg/L. Uzorci su pripremljeni na način da je u tikvice od 25 mL otpipetirano 25 μ L STOCK otopine kositra čija koncentracija iznosi 1000 ppm. Nakon 10 mjerenja, granica kvantifikacije i detekcije računaju se prema formulama [1] i [2].

4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu validacije metoda za određivanje olova, kadmija i kositra u proizvodima od voća, uzeti su uzorci pirea od grejpa certificiranog referentnog materijala i referentnog materijala za PT (engl. *Proficiency testing, PT*), akreditirane kuće za usluge ispitivanja sposobnosti, FAPAS. Uzorci su pripremljeni prema normiranoj ISO i prilagođenoj, laboratorijskoj *in-house* metodi, te su podvrgnuti mjerenju različitih metala (Pb, Cd i Sn) atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Ostali uzorci, obogaćeni su odgovarajućim koncentracijama metala. Na temelju rezultata mjerenja, koji su prikazani grafički ili tablično, određeni su sljedeći parametri validacije: Linearnost, preciznost (ponovljivost i međupreciznost), točnost (tzv. *bias* odnosno iskorištenje), granica detekcije LOD i granica kvantifikacije LOQ.

4.1. OLOVO

- LINEARNOST



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji olova

Kalibracijski pravac konstruira se tako da se na x-osi nanose odabrane koncentracije, a na y-osi izmjerene apsorbancije. Iz takve ovisnosti može se očitati nagib pravca a , koji će biti potreban podatak kod ispitivanja granice kvantifikacije LOQ i granice detekcije LOD. Kriterij

prihvatljivosti za linearnost je $R^2 \geq 0,995$ (AOAC, 2019). R^2 je izražen iz grafičke ovisnosti koncentracije olova o apsorbanciji. Prema tome, može se zaključiti da je metoda linearna u području koncentracija od 1 $\mu\text{g/L}$ do 50 $\mu\text{g/L}$.

- PONOVLJIVOST, MEĐUPRECIZNOST, TOČNOST

Tablica 5. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za Pb

BROJ UZORKA	c(Pb)/[$\mu\text{g/L}$]	γ (Pb)/[$\mu\text{g/kg}$]
1	5,93	110,68
2	6,29	117,11
3	6,06	112,32
4	5,51	102,13
5	6,48	119,52
6	6,75	125,18
7	5,61	107,14
8	6,28	119,55
9	6,35	120,85
10	6,58	124,36
srednja vrijednost, \bar{X}	=	115,88
standardna devijacija, SD	=	7,19
relativna standardna devijacija, RSD (%)	=	6,20

Kriterij prihvatljivosti za ponovljivost metode određivanja olova, obzirom na udio analita u uzorku je $RSD \leq 11 \%$ (AOAC, 2019). Ponovljivost i međupreciznost važni su parametri, budući da je kroz njih definirana preciznost metode. Iz Tablice 5 vidljivo je da RSD ponovljivosti iznosi 6,20 %, tj. da zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD \leq 11 \%$), stoga se

može zaključiti da je metoda precizna. Tan i sur. (2018) u svojoj su validaciji metode za određivanje teških metala naveli vrijednosti RSD od 4,56 % do 5,34 % za ponovljivost određivanja olova.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za Pb

	BROJ UZORKA	c(Pb)/[μg/L]	γ(Pb)/[μg/kg]
1	1	6,16	124,03
	2	5,36	105,06
	3	5,15	112,62
	4	5,66	121,39
	5	5,38	119,03
	6	5,59	122,67
	7	5,67	131,13
	8	5,45	124,52
	9	5,83	134,63
	10	6,34	139,86
2	1	5,93	110,68
	2	6,29	117,11
	3	6,06	112,32
	4	5,51	102,13
	5	6,48	119,52
	6	6,75	125,18
	7	5,61	107,14
	8	6,28	119,55
	9	6,35	120,85
	10	6,58	124,36
	relativna standardna devijacija, RSD (%)	=	7,79

Kriterij prihvatljivosti za međupreciznost, obzirom na udio analita u uzorku je $RSD \leq 16$ % (AOAC, 2019). Metoda je precizna budući da u ovom radu RSD za međupreciznost iznosi 7,79 %. Tan i sur. (2018) u salaku (*engl. Snake fruit*) su određivali teške metale u svrhu validacije slične metode. U njihovom radu, RSD za međupreciznost određivanja olova iznosi 5,77 %. Razlog veće preciznosti njihove metode vjerojatno je ICP-AES (*engl. Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*), instrument na kojem se vrši određivanje olova, a koji je precizniji od atomskog apsorpcijskog spektrometra.

Tablica 7. Rezultati ispitivanja točnosti za Pb

BROJ UZORKA	c(Pb)/[$\mu\text{g/L}$]	γ (Pb)/[$\mu\text{g/kg}$]	CRM/[$\mu\text{g/kg}$]	iskorištenje/[%]
1	8,00	166,00	172	96,51
2	8,03	172,57	172	100,33
3	8,02	180,97	172	105,21
4	8,35	186,26	172	108,29
5	8,44	176,60	172	102,68
6	8,65	188,86	172	109,80
7	8,95	185,84	172	108,04
8	8,49	178,04	172	103,51
9	9,19	207,50	172	120,64
10	9,09	203,27	172	118,18
11	8,74	189,43	172	110,13
12	8,8	178,77	172	103,94
13	8,68	181,84	172	105,72
14	8,84	179,88	172	104,58
15	9,09	186,84	172	108,63
16	9,1	200,41	172	116,52
17	9,05	191,33	172	111,24
18	9,05	191,51	172	111,34
19	8,42	173,85	172	101,08
20	8,45	183,32	172	106,58
srednja vrijednost, \bar{X}				107,65
relativna standardna devijacija, RSD (%)				5,61

Točnost metode određena je kroz iskorištenje, kao omjer izmjerene i stvarne koncentracije. Prema AOAC (2019), metoda je točna ukoliko je srednja vrijednost iskorištenja unutar intervala [80 - 110] %. Iz tablice rezultata ispitivanja točnosti za Pb, može se zaključiti da je metoda točna (107,65 %). Tan i sur. (2018) u svojem radu, za iskorištenje navode vrijednosti od 99,43 % do 100,71 %.

- GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE

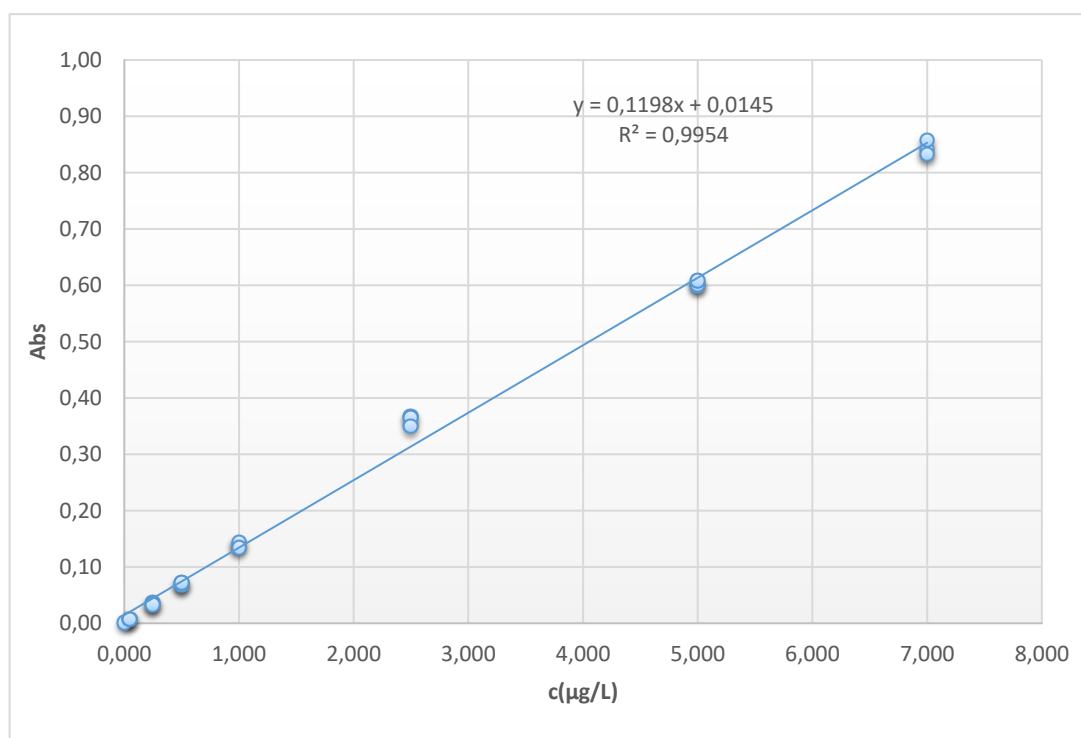
Tablica 8. Rezultati određivanja granice kvantifikacije i detekcije za Pb

OLOVO, Pb	BROJ MJERENJA	APSORBANCIJA
	1	0,0069
	2	0,0076
	3	0,0083
	4	0,0062
	5	0,0065
	6	0,0081
	7	0,0061
	8	0,0067
	9	0,0081
	10	0,0061
	srednja vrijednost, \bar{x}	0,0071
	standardna devijacija, SD	0,0008
	relativna standardna devijacija, RSD (%)	11,6722
nagib pravca, a	8,0949	

Granice detekcije, $LOD = 0,34 \mu\text{g/L}$ smatra se zadovoljavajućom budući da se nalazi ispod donje vrijednosti linearnog područja olova ($1\text{-}50 \mu\text{g/L}$). Iz formule [2], određeno je da najniža koncentracija koju je moguće ovom metodom kvantificirati iznosi $LOQ = 1,03 \mu\text{g/L}$. Rusin i sur. (2021) u istraživanju u kojem su mjerili koncentraciju olova i kadmija u voću i povrću, grafitnom tehnikom na AAS-u, za granicu detekcije (LOD) naveli su $1,7 \mu\text{g/L}$, a za granicu kvatifikacije (LOQ) $3,5 \mu\text{g/L}$.

4.2. KADMIJ

- LINEARNOST



Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji kadmija

Nakon što se konstruira kalibracijski pravac koji prikazuje ovisnost koncentracija [$\mu\text{g/L}$] o izmjerenim apsorbancijama Abs , iz njega je potrebno očitati nagib pravca a , te R^2 koji mora biti veći od 0,995 kako bi linearnost bila zadovoljavajuća. Iz grafa je vidljivo da je metoda linearna u području koncentracija od $0,05 \mu\text{g/L}$ do $7 \mu\text{g/L}$.

- PONOVLJIVOST, MEĐUPRECIZNOST, TOČNOST

Tablica 9. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za Cd

BROJ UZORKA	c(Cd)/[μg/L]	γ(Cd)/[μg/kg]
1	3,521	73,93
2	3,684	76,62
3	3,627	75,43
4	3,535	74,41
5	3,619	74,31
6	3,672	75,48
7	3,346	72,41
8	3,522	74,91
9	3,567	75,76
10	3,403	71,49
srednja vrijednost, \bar{X}	=	74,47
standardna devijacija, SD	=	1,48
relativna standardna devijacija, RSD (%)	=	1,99

Prihvatljivi RSD za ponovljivost metode određivanja kadmija mora biti manji od 15 % (AOAC, 2019). U odnosu na Tan i sur. (2018) koji za ponovljivost kadmija navode RSD u intervalu [2,84 – 3,10] %, može se zaključiti da je metoda za određivanje kadmija, opisana u ovom radu, preciznija (RSD = 1,99 %). Međutim, preciznost ove metode svakako valja potvrditi još parametrom međupreciznosti.

Tablica 10. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za Cd

	BROJ UZORKA	c(Cd)/[μg/L]	γ(Cd)/[μg/kg]
1	1	3,611	68,18
	2	3,670	66,85
	3	3,790	76,81
	4	3,653	73,08
	5	3,537	72,73
	6	3,786	77,43
	7	3,400	73,34
	8	3,576	76,01
	9	3,359	72,48
	10	3,758	77,88
2	1	3,521	73,93
	2	3,684	76,62
	3	3,627	75,43
	4	3,535	74,41
	5	3,619	74,31
	6	3,672	75,48
	7	3,346	72,41
	8	3,522	74,91
	9	3,567	75,76
	10	3,403	71,49
	relativna standardna devijacija, RSD (%)	=	3,74

RSD međupreciznosti ove metode iznosi 3,74 %. Tan i sur. (2018) naveli su sličan rezultat u svome radu, RSD = 3,92 %. Prihvatljivi kriterij, prema AOAC (2019) je $RSD \leq 22\%$. Obzirom na zadovoljavanje kriterija ponovljivosti i međupreciznosti, može se zaključiti da je opisana metoda za određivanje kadmija, precizna.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja točnosti za Cd

BROJ UZORKA	c(Cd)/[μg/L]	γ(Cd)/[μg/kg]	CRM/[μg/kg]	iskorištenje/[%]
1	5,452	109,16	104	104,96
2	5,275	109,41	104	105,20
3	4,888	106,45	104	102,35
4	4,874	105,08	104	101,04
5	5,394	109,11	104	104,92
6	4,635	97,93	104	94,17
7	5,139	103,37	104	99,39
8	5,359	108,67	104	104,49
9	4,724	103,42	104	99,44
10	4,802	103,95	104	99,95
11	4,612	98,74	104	94,94
12	5,004	100,42	104	96,56
13	4,637	95,95	104	92,26
14	5,412	108,79	104	104,61
15	5,136	104,33	104	100,31
16	4,167	90,70	104	87,21
17	4,802	100,32	104	96,47
18	4,874	101,92	104	98,00
19	5,362	109,30	104	105,10
20	4,886	104,66	104	100,63
srednja vrijednost, \bar{X}				99,60
relativna standardna devijacija, RSD (%)				4,94

Iz tablice 11, vidljivo je da je srednja vrijednost iskorištenja 99,60 %, što je unutar prihvatljivog intervala [80 - 110] %. Tan i sur. (2018) naveli su nešto niže rezultate iskorištenja; 94,08 %, 96,08 % i 97, 30 %. Zadovoljavanje kriterija i sličnost rezultata u usporedbi s drugim radom, upućuje na zaključak da je metoda točna.

- GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE

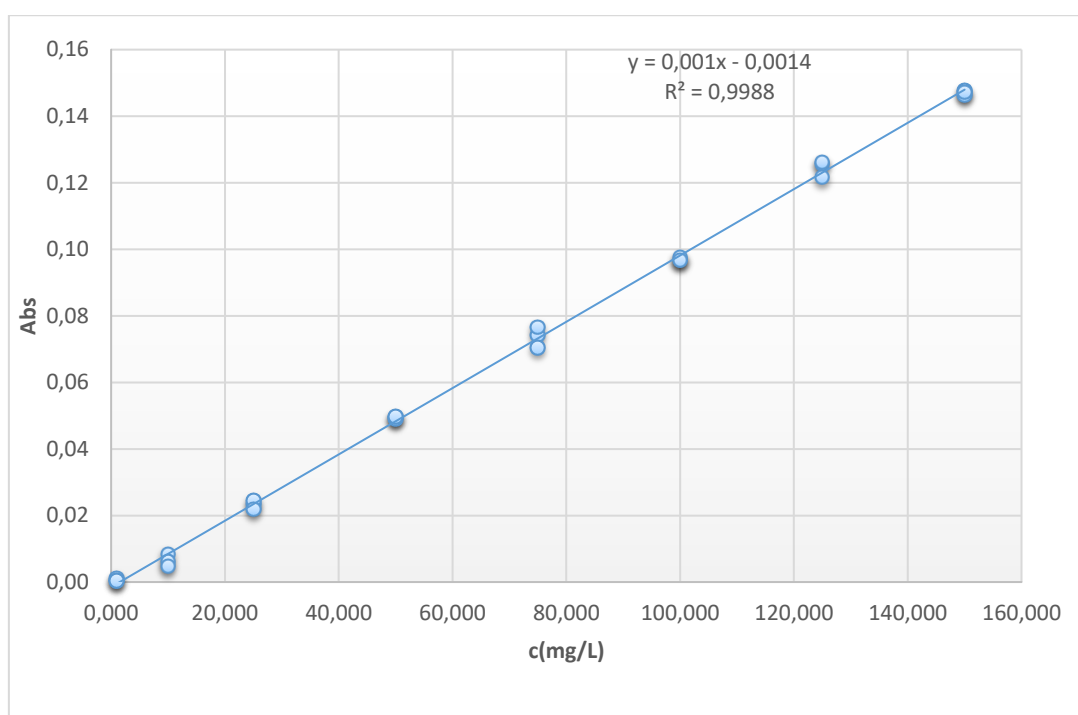
Tablica 12. Rezultati određivanja granice kvantifikacije i detekcije za Cd

KADMIJ, Cd	BROJ MJERENJA	APSORBANCIJA
	1	0,0073
	2	0,0071
	3	0,0073
	4	0,0065
	5	0,0055
	6	0,0054
	7	0,0055
	8	0,0068
	9	0,0072
	10	0,0068
	srednja vrijednost, \bar{x}	0,00654
	standardna devijacija, SD	0,00078202
	relativna standardna devijacija, RSD (%)	11,95749504
nagib pravca, a	0,1197	

Granica detekcije, $LOD = 0,02 \mu\text{g/L}$ smatra se zadovoljavajućom budući da se nalazi ispod donje vrijednosti linearnog područja olova ($0,05 - 7 \mu\text{g/L}$). Iz formule [1], određeno je da najniža koncentracija koju je moguće ovom metodom kvantificirati iznosi $LOQ = 0,07 \mu\text{g/L}$. Yaman i Dilgin (2002), u svojem su radu određivali koncentraciju kadmija u voću, grafitnom tehnikom na AAS-u, te su naveli granicu detekcije $LOD = 0,03 \mu\text{g/L}$, a granicu kvantifikacije $LOQ = 0,05 \mu\text{g/L}$, dok su Rusin i sur. (2021) naveli $0,2 \mu\text{g/L}$ za granicu detekciju i $0,35 \mu\text{g/L}$ za granicu kvantifikacije.

4.3.KOSITAR

- LINEARNOST



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji kositra

Apsorbancije prikazanih točaka mjere se u triplikatu, te se određuje srednja vrijednost svake. Nakon toga, izradi se kalibracijski pravac koji prikazuje ovisnost apsorbancije o pripadajućoj koncentraciji [mg/L]. Iz pravca se očita nagib a , te R^2 , na temelju kojeg se odlučuje o prihvatljivosti ovog parametra. R^2 mora biti veći od 0,995 da bi linearnost bila zadovoljavajuća (AOAC, 2019).

Iz grafičnog prikaza ovisnosti koncentracije kositra o apsorbanciji, može se zaključiti da je metoda linearna u rasponu koncentracija od 1 mg/L do 150 mg/L . Linearno područje obuhvaća

širok raspon koncentracija, daleko veći od NDK (prema Uredbi 1881/2006, NDK= 20 mg/kg). Razlog tome je što u praksi, na analizu većinom dolaze uzorci s visokim koncentracijama kositra, pa je praktičnije proširiti linearno područje nego razrjeđivati uzorak, kako bi dobiveni rezultat bio validan. Naknadnim razrjeđivanjem uzorka, povećava se vjerojatnost unošenja pogreške, ali i kontaminacije uzorka.

- PONOVLJIVOST, MEĐUPRECIZNOST, TOČNOST

Tablica 13. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za Sn

BROJ UZORKA	c (Sn) / [mg/L]	γ (Sn) / [mg/kg]
1	54,67	564,05
2	56,88	534,02
3	56,58	536,87
4	55,27	534,56
5	56,82	585,01
6	56,17	563,37
7	55,91	562,34
8	56,21	587,42
9	55,05	558,37
10	56,87	613,95
srednja vrijednost, \bar{X}	=	564,00
standardna devijacija, SD	=	24,54
relativna standardna devijacija, RSD (%)	=	4,35

Kriterij za ponovljivost metode određivanja kositra je $RSD \leq 5,3 \%$ (AOAC, 2019). U odnosu na kadmij i olovo, kriterij je znatno strožiji. Razlog tome je veća koncentracija analita (kositra), čije koncentracije dosežu red veličine mg/L, u odnosu na olovo i kadmij, čije su

koncentracije reda veličine $\mu\text{g/L}$. Ponovljivost ove metode je zadovoljavajuća ($\text{RSD} = 4,35 \%$).

Tablica 14. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za Sn

	BROJ UZORKA	c (Sn) / [$\mu\text{g/L}$]	γ (Sn) / [$\mu\text{g/kg}$]
1	1	54,730	564,67
	2	56,170	527,36
	3	55,170	523,49
	4	56,350	545,00
	5	57,570	592,74
	6	54,740	549,03
	7	57,540	578,73
	8	54,740	572,06
	9	56,110	569,12
	10	55,790	602,29
2	1	54,670	573,88
	2	56,880	574,28
	3	56,580	604,91
	4	55,270	568,35
	5	56,820	597,50
	6	56,170	565,75
	7	55,910	579,37
	8	56,210	588,35
	9	55,050	562,06
	10	56,870	589,19
		relativna standardna devijacija, RSD (%)	=

Iz tablice 14 je vidljivo da je $\text{RSD} = 3,83 \%$ što je unutar kriterija prihvatljivosti za međupreciznost metode, $\text{RSD} \leq 8 \%$ (AOAC, 2019). Obzirom da su kriterij za ponovljivost i kriterij za međupreciznost zadovoljavajući, može se zaključiti da je preciznost metode za

određivanje kositra zadovoljavajuća.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja točnosti za Sn

BROJ UZORKA	c (Sn) / [mg/L]	γ (Sn) / [mg/kg]	CRM / [mg/kg]	iskorištenje / [%]
1	9,5	97,83	102,00	95,91
2	10,21	100,09	102,00	98,13
3	9,41	99,24	102,00	97,29
4	10,78	103,06	102,00	101,04
5	10,23	98,09	102,00	96,17
6	9,61	96,90	102,00	95,00
7	10,15	100,85	102,00	98,87
8	10,23	100,01	102,00	98,04
9	10,6	101,42	102,00	99,43
10	9,82	98,40	102,00	96,47
11	11,04	92,49	102,00	90,68
12	10,52	96,45	102,00	94,56
13	10,89	98,07	102,00	96,14
14	9,95	99,68	102,00	97,72
15	9,48	100,18	102,00	98,22
16	9,57	100,17	102,00	98,21
17	10,17	106,08	102,00	104,00
18	10,46	108,88	102,00	106,74
19	10,48	107,71	102,00	105,59
20	10,71	107,86	102,00	105,74
srednja vrijednost, \bar{X}				98,70
relativna standardna devijacija, RSD (%)				4,06

Točnost metode određena je kroz iskorištenje, koje prema AOAC (2019) mora biti unutar intervala [90-107] %, da bi se metoda smatrala točnom. Srednja vrijednost iskorištenja iznosi 98,70 %, stoga se može zaključiti da je metoda za određivanje kositra točna.

- GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE

Tablica 16. Rezultati određivanja granice kvantifikacije i detekcije za Sn

KOSITAR, Sn	BROJ MJERENJA	APSORBANCIA
	1	0,0025
	2	0,0021
	3	0,0031
	4	0,0032
	5	0,0024
	6	0,0022
	7	0,0022
	8	0,0026
	9	0,0029
	10	0,0027
	srednja vrijednost, \bar{x}	0,0026
	standardna devijacija, SD	0,0004
	relativna standardna devijacija, RSD (%)	14,84
nagib pravca, a	0,001	

Granica detekcije, LOD, iznosi 1,25 mg/L. Budući da se ne nalazi ispod donje vrijednosti linearnog područja (1-150 mg/L), granica detekcije ove metode je upitna. Takav rezultat ipak ne

predstavlja problem u validaciji ove metode jer prema zahtjevima vodiča AOAC, granica detekcije nije ključan parametar koji metoda mora zadovoljavati, da bi se validirala. Martin i sur. (1994), u svojem radu opisuju određivanje koncentracije kositra u pasiranoj rajčici atomskom apsorpcijskom spektrometrijom, te su naveli $LOD = 0,20 \text{ mg/L}$. Obzirom na dobiveni rezultat u ovom radu, može se zaključiti da je ova metoda primjenjiva za određivanje koncentracije kositra, ali da se vrijednosti ispod $1,25 \text{ mg/L}$ ne mogu detektirati. Granica kvantifikacije (LOQ) iznosi $3,84 \text{ mg/L}$ i nalazi se unutar linearnog područja, stoga se može uzeti u obzir i smatrati zadovoljavajućom.

Dakle, dobiveni su rezultati u većoj ili manjoj mjeri u skladu s drugim radovima. Do veće nepreciznosti može doći uslijed dugotrajne pripreme uzoraka. Posebno su važni koraci spaljivanja i preddigestije, pri čemu treba voditi računa o boji pepela i temperaturi spaljivanja, tvrde Szkoda i Zmudzki (2005). Također, razlike u rezultatima mogu biti prisutne uslijed manjih mogućnosti instrumenta, odnosno osjetljivosti u područjima ppm (engl. *parts per million*) i ppb (engl. *parts per billion*). ICP instrument (engl. *inductively coupled plasma*) je instrument koji je puno osjetljiviji i precizniji u odnosu na AAS (atomski apsorpcijski spektrometar). Svakako bi u budućnosti trebalo nastojati ispitivanja provoditi na suvremenijim uređajima. Tan i sur. (2018) metodu u svom radu smatraju validiranom budući da je, prema prikazanim rezultatima, dovoljno točna i precizna, odnosno s prihvatljivim vrijednostima iskorištenja i niskim RSD vrijednostima, te da se može koristiti za uspješno određivanje Cd, Cr, Cu, Ni i Pb. Obzirom na sličnost matriksa i pripadnosti istoj skupini namirnica, opisana bi se metoda mogla primjeniti i u svrhu određivanja teških metala u povrću, proizvodima od povrća kao i u voću. Rezultati ispitivanja ukazuju da bi se opisane metode u ovom radu mogle koristiti u analitičkom laboratoriju u svrhu određivanja koncentracija olova, kadmija i kositra u proizvodima od voća. Dodatna potvrda ovoj tezi je uspješno sudjelovanje u „Ispitivanju sposobnosti“ (PT), s konkretnim rezultatima z-scora za Pb 0,2; Cd -0,3 i Sn 0,4.

Tablica 17. Zaključak validacije

<i>PARAMETAR</i>	<i>KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI (AOAC, 2019)</i>	<i>DOBIVENI REZULTAT</i>	<i>DA/NE</i>
<i>Linearnost</i>	$R^2 \geq 0,995$	R^2 (Pb) = 0,9947	DA
		R^2 (Cd) = 0,9954	DA
		R^2 (Sn) = 0,9988	DA
<i>Ponovljivost</i>	RSD (Pb) \leq 15 %	RSD (Pb) = 6,20 %	DA
	RSD (Cd) \leq 15 %	RSD (Cd) = 1,99 %	DA
	RSD (Sn) \leq 5,3 %	RSD (Sn) = 4,35 %	DA
<i>Međupreciznost</i>	RSD (Pb) \leq 16 %	RSD (Pb) = 7,79 %	DA
	RSD (Cd) \leq 22 %	RSD (Cd) = 3,74 %	DA
	RSD (Sn) \leq 8 %	RSD (Sn) = 3,83 %	DA
<i>Točnost</i>	Iskorištenje [80-110] %	Iskorištenje (Pb) = 107,65 %	DA
	Iskorištenje [80-110] %	Iskorištenje (Cd) = 99,60 %	DA
	Iskorištenje [90-107] %	Iskorištenje (Sn) = 98,70 %	DA
<i>LOD</i>	Vrijednost LOD ispod donje granice linearnog područja	LOD (Pb) = 0,34 $\mu\text{g/L}$	DA
		LOD (Cd) = 0,02 $\mu\text{g/L}$	DA
		LOD (Sn) = 1,25 mg/L	NE
<i>LOQ</i>	Vrijednost LOQ unutar linearnog područja	LOQ (Pb) = 1,02 $\mu\text{g/L}$	DA
		LOQ (Cd) = 0,07 $\mu\text{g/L}$	DA
		LOQ (Sn) = 3,84 mg/L	DA

5. ZAKLJUČCI

1. Metoda za određivanje olova, kadmija i kositra u proizvodima od voća zadovoljava postavljeni kriterij za linearnost ($R^2 \geq 0,995$), stoga se može zaključiti da je u ispitivanom području (za Pb [1-50] $\mu\text{g/L}$, za Cd [0,050-7] $\mu\text{g/L}$, za Sn [1-150] mg/L) istraživana metoda linearna.
2. Preciznost je određena na temelju rezultata ponovljivosti i međupreciznosti. Ispitivana je metoda precizna, budući da su postavljeni kriteriji za ponovljivost i međupreciznost zadovoljeni za sva tri ispitivana metala.
3. Točnost je određena na temelju srednje vrijednosti iskorištenja. Ispitivana je metoda točna, budući da su postavljeni kriteriji za srednju vrijednost iskorištenja zadovoljeni za sva tri metala.
4. Granica detekcije za olovo iznosi 0,34 $\mu\text{g/L}$ i za kadmij 0,02 $\mu\text{g/L}$, te one zadovoljavaju postavljeni kriterij. Granica detekcije za kositar iznosi 1,25 mg/L i ne zadovoljava postavljeni kriterij, budući da se nalazi unutar postavljenog linearnog područja [1-150] mg/L . Obzirom da se radi o kvantitativnoj metodi analize kontaminanata, granica detekcije izvan postavljenog kriterija ne predstavlja problem u validaciji te metode (AOAC, 2019). To također znači da se ovom metodom koncentracije kositra niže od 1,25 mg/L ne mogu detektirati.
5. Granica kvantifikacije za olovo iznosi 1,02 $\mu\text{g/L}$, za kadmij 0,07 $\mu\text{g/L}$ i za kositar 3,84 mg/L te zadovoljavaju postavljeni kriterij odnosno nalaze se unutar linearnog područja i smatraju se prihvatljivima.
6. Na temelju rezultata ispitivanja navedenih parametara validacije, može se zaključiti da je ispitivana spektrometrijska metoda primjenjiva za određivanje teških metala (olova, kadmija i kositra) u proizvodima od voća.

6. LITERATURA

AOAC (2019) Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis, str. 1-18.

Eurachem Guide (2014) The Fitness for Purpose of Analytical Methods. U: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Magnusson B., i Örnemark U. (ured.), 2. izdanje, ISBN 978-91-87461-59-0.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1995) Fruit and vegetable processing. Rome, Italy.

GARCÍA R, BÁEZ AP (2012) Atomic absorption spectrometry (AAS). *Atomic absorption spectroscopy*, 1-13.

Grgić Z (2019) Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda - Svijet kvalitete. [Svijet kvalitete. Svijet kvalitete - Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda \(svijet-kvalitete.com\)](https://svijet-kvalitete.com). Pristupljeno: 27. siječna 2023.

HAA (2018) Znete li što je akreditacija? – HAA. [Znete li što je akreditacija 2018 FIN.PDF \(szp.hr\)](#). Pristupljeno: 03. veljače, 2023.

HMD – Hrvatsko mjeriteljsko društvo (2022) Validacija i verifikacija analitičkih metoda. U: Seminar Hrvatskog mjeriteljskog društva, Gašljević V (ured.), Zagreb, Hrvatska.

HRN EN ISO/IEC 17025, Opći zahtjeva za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija, šesto izdanje, prosinac 2017.

ICH (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1).

ISO/IEC 13804:2013, Hrana – Određivanje elemenata i njihovih kemijskih vrsta – Opća razmatranja i posebni uvjeti (EN 13804:2013).

ISO/IEC 14082:2005, Namirnice - Određivanje elemenata u tragovima – Određivanje olova, kadmija, cinka, bakra, željeza i kroma atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (AAS) nakon suhog spaljivanja (EN 14082:2003).

ISO/IEC 17025:2017, Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija.

ISO/IEC 17240:2008, Proizvodi od voća i povrća – Određivanje količine kositra – Metoda plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (ISO 17024:2004).

Manwani S, Vanisree CR., Jiman V, Awasthi KK, Yadav CS, Sankhla MS i sur. (2022) Heavy Metal Contamination in Vegetables and Their Toxic Effects on Human Health. *Sustainable Crop Production-Recent Advances*, IntechOpen, str. 1-17. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102651>

Martin AM, Sanchez M, Espinosa P, Bagur G (1994) Determination of Tin in Canned Fruits and Vegetables by Atomic Absorption Spectrometry and Liquid-Liquid Extraction. *Journal of AOAC International* **77** (6), 1627-1630.

Pasias NI, Papageorgiou V, Thomaidis NS, Proestos C (2012) Development and Validation of an ETAAS Method for the Determination of Tin in Canned Tomato Paste Samples. *Food Anal Method* **5**, 835–840. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9320-3>

Pipoyan D , Stepanyan S, Beglaryan M , Stepanyan S , Mendelsohn R ., Deziel NC (2023) Health risks of heavy metals in food and their economic burden in Armenia. *Environ Int* **172**, 107794. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107794>

Pravilnik (2005) Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Narodne novine 2, Zagreb. [Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata \(nn.hr\)](#)
Pristupljeno: 16.ožujak 2023.

Puntarić D, Domagoj Vidosavljević D, Gvozdić V, Puntarić E, Puntarić I, Mayer D i sur. (2013) Heavy Metals and Metalloid Content in Vegetables and Soil Collected from the Gardens of Zagreb, Croatia. *Coll Antropol* **37** (3), 957–964.

Rusin M, Domagalska J, Rogala D, Razzaghi M, Szymala I (2021) Concentration of cadmium and lead in vegetables and fruits. *Nature* **11**, 11913. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91554-z>

Stančić Z , Vujević D , Gomaz A , Bogdan S, Vincek D (2016) Detection of heavy metals in common vegetables at Varaždin City Market, Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol* **67**, 340-350. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2823>

Szkoda J, Zmudzki J (2005) Determination of lead and cadmium in biological material by graphite furnace atomic absorption spectrometry method. *Bull Vet Inst Pulawy* **49**, 89-90.

Tan M, Sudjadi, Astuti A, Rohman A (2018) Validation and quantitative analysis of cadmium, chromium, copper, nickel and lead in snake fruit by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy. *J Appl Pharm Sci* **8** (2), 44-48. <https://doi.org/10.7342/JAPS.2018.8206>

Uredba EZ 1881 (2006) Uredba o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Službeni list Europske unije. [EUR-Lex - 32006R1881 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](https://eur-lex.europa.eu/eur-lex.do?uri=CELEX:32006R1881:EN:EUR-Lex) Pristupljeno: 17. studeni 2022.

Varian AA 140/240/280 series (2004) Operational Manual, 5.izd., Middelburg, Nizozemska.

Vujković I, Galić K, Vereš M (2007) Ambalaža za pakiranje namirnica. Tectus. Zagreb, Hrvatska.

WHO (2021) Nutrition – Data and statistics. WHO - World Health Organisation, [Nutrition – Data and statistics \(who.int\)](https://www.who.int/nutrition) Pristupljeno: 27. siječnja 2023.

Yaman M, Dilgin Y (2002) AAS Determination of Cadmium in Fruits and Soils. *Atomic Spec* **23** (2), 59-64.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja HANA KUČEVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis