Određivanje kationa u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu sa C4D detektorom

Kraševac, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:139931

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

Marija Kraševac

Određivanje kationa u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu sa C^4D detektorom

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kemiju, Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom doc. dr. sc. Nikole Sakača. Kroz znanstvena istraživanja me vodila dr. sc. Marija Jozanović. Rad je predan stručnom vijeću na ocjenu radi stjecanja diplome magistra edukacije iz područja kemije.

Dio rada predstavljen je na II. međunarodnom i VI. domaćem znanstveno-stručnom skupu „Voda za sve“, pod nazivom „Određivanje kationa u prirodnim vodama mikročip elektroforezom sa C^4D detektorom“, u Osijeku, 18.ožujka 2016. na Poljoprivrednom fakultetu.

Zahvala

Na prvom mjestu željela bih se zahvaliti svome mentoru, doc. dr. sc. Nikoli Sakaču, na ukazanom povjerenju, vodstvu i svim korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada te dr. sc. Mariji Jozanović koja me vodila kroz eksperimentalni dio, pratila svaki moj korak i uvijek imala sve pod kontrolom. Hvala Vam oboma na jednoj jako lijepoj i ugodnoj suradnji, strpljenju i stečenom prijateljstvu.

Također, zahvaljujem se prof. dr. sc. Zdenku Lončariću sa Zavoda za agroekologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku na suradnji i obavljenim ICP-OES mjerenjima.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Odjela za kemiju koji su mi pomogli u stjecanju znanja kemije te svojim radom uvelike utjecali na mene.

Hvala svim kolegama kemičarima što su uljepšali moje studentske dane svojim prijateljstvom, hvala na svakoj pomoći i svim lijepim zajedničkim trenutcima.

Velika hvala i kolegama i profesorima Umjetničke akademije bez čije kolegijalnosti, razumijevanja, strpljenja i prijateljstva ovu misiju paralelnog studiranja ne bih uspješno privela kraju.

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji bez koje sve ovo ne bi bilo moguće: mami što me uvijek iznova dizala, slušala i bila najveći oslonac i savjetnik, tati, sestri i bratu za veliku podršku i svako odricanje za moj boljitak.

I na kraju, hvala svim mojim dragim prijateljima koji su vjerovali u mene, koji su ostavili utisak u mom životu bez obzira jesu li bili prolaznici ili su tu cijelo vrijeme. Hvala na najvećoj podršci u onim trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA *Diplomski rad*
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ODREĐIVANJE KATIONA U PRIRODNIM VODAMA ELEKTROFOREZOM NA MIKROČIPU SA C^{4}D DETEKTOROM

Marija Kraševac

***Rad je izrađen na*:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

SAŽETAK

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) je vrlo učinkovita separacijska tehnika za kvantifikaciju različitih nabijenih specija. Elektroforeza na mikročipu (engl. *Microchip electrophoresis*, MCE) je minijaturizirana verzija CE.

Alkalijske i zemnoalkalijske metale rutinski se prati u različitim uzorcima vode, koji su važni u industriji voda za piće i otpadnih voda industrije.

MCE uređaj sa kapacitivno spregnutim beskontaktnim detektorom vodljivosti (engl. CCCCD, engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection* C^{4}D) uspješno je primijenjen za analizu nekoliko kationa, pojedinačno i u smjesi. Separacija je provedena na borosilikatnom mikročipu, duljine separacijskog kanala 4 mm. Kao pomoćni elektrolit (engl. *background electrolyte*, BGE) korištena je 0,5 M octena kiselina, pH = 2,5. Primijenjeni napon injektiranja iznosio je +0,7 kV, a napon separacije +1,4 kV. Istraživan je utjecaj sljedećih parametara na učinkovitost separacije: vrijeme injektiranja, napon injektiranja, vrijeme i napon separiranja. Ustanovljen je linearni odziv za svaki pojedini ispitivani kation, pojedinačno i u smjesi pomoću linearne regresije. Metoda je primijenjena kod određivanja kationa u vodi iz slavine, flaširanoj vodi i u kišnici.

Metodički dio rada sadrži pripremu za nastavnu jedinicu "Osnovna svojstva tekućina". Nastavni sat je zamišljen kao kombinacija frontalnog i grupnog rada sa pokusima. Grupnim radom nastoji se osamostaliti učenike, a pokusima im se nastoji približiti gradivo te potiče na razmišljanje i donošenje zaključaka.

Diplomski rad obuhvaća: Stranica: 105; Slika: 37 ; Tablica: 17 , Literaturnih navoda: 43
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: kationi, prirodne vode, C^{4}D detektor, elektroforeza na mikročipu, mikrofluidika
Rad prihvaćen: 13.9.2016.
Datum obrane:29.9.2016.
Mentor: doc. dr. sc. Nikola Sakač
Neposredni voditelj: dr. sc. Marija Jozanović
Sastav povjerenstva za obranu: 1. doc. dr. sc. Nikola Sakač

2. prof. dr. sc. Milan Sak-Bosnar

3. prof. dr. sc. Ivan Vicković

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Ul. Cara Hadrijana 8/a, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD *Graduation Thesis*

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

DETERMINATION OF CATIONS IN NATURAL WATERS USING ELECTROPHORESIS ON MICROCHIP WITH C^{4}D DETECTOR

Marija Kraševac

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) is a highly efficient separation technique for quantitation of different charged compounds. Electrophoresis on microchip (MCE) is a miniaturized version of the CE.

Alkali and earthalkali metals were routinely monitored in a variety of aqueous samples important to several industries, such as drinking and waste water industries.

In this investigations a MCE device with capacitively coupled contactless conductivity detection (engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection*, CCCCD, C^{4}D) has been successfully applied for analysis of several cations, individually and in mixture. The separation was carried out on a borosilicate microchip with the separation channel length of 4 mm. Acetic acid solution of the concentration 0.5 M has been used as a background electrolyte (pH = 2.5). The applied injection voltage was +0.7 kV and the separation voltage was +1.4 kV. The influence of the following parameters on the separation ability was investigated: injection time, injection voltage, separation time and separation voltage. The linear response region for each particular cation investigated, both single and in a mixture, has been determined using linear regression. The method was applied to determine cations in tap water, mineral water and rain water.

In the teaching part of the thesis it is proposed a preparation lecture called The basic properties of liquids. Lesson is designed as a combination of frontal lectures and students group work with experiments. Aim of the group work is to achieve the independence of students, and experiments are helpfull for thinking about teaching materials and to make conclusions.

***Thesis includes*:** pages 105; pictures 37; tables 17, references 43
Original in: Croatian
Keywords: cations, natural waters, C^{4}D detector, microchip electrophoresis, microfluidic
Thesis accepted: 13.9.2016.
Thesis defence: 29.9.2016.
Supervisor: assist. prof. Nikola Sakač
Adviser: Marija Jozanović, PhD

Reviewers:
1. Nikola Sakač, Ph. D. Assistant Professor
2. Milan Sak-Bosnar, Ph. D. Full Professor
3. Ivan Vicković, Ph. D. Full Professor

***Thesis deposited in*:** Department of Chemistry library, Ul. Cara Hadrijana 8/a, Osijek, Croatia

Sadržaj:

1. UVOD 8

2. LITERATURNI PREGLED 10

2.1. VODA I SASTAV VODE 11

2.2. METODE ODREĐIVANJA IONA U PRIRODNIM VODAMA 15

2.2.1. Ionska kromatografija 15

2.2.1.1. HPLC 17

2.2.2. Kapilarna elektroforeza 17

2.2.3. Spektroskopija 18

2.2.3.1. UV/VIS spektroskopija 18

2.2.3.2. Atomska apsorpcijska spektroskopija 18

2.3. ELEKTROFOREZA 21

2.3.1. Teorijska načela elektroforeze 22

2.3.2. Vrste elektroforeze 24

2.3.2.1. Zonska elektroforeza 25

2.3.2.2. Elektroforeza pomičnih granica 26

2.3.2.3. Kapilarna elektroforeza 26

2.3.3. Eletroosmotski protok 28

2.3.4. Elektroforeza na mikročipu 30

3. EKSPERIMENTALNI DIO 33

3.1. UREĐAJI I PRIBOR 34

3.1.1. HV Sequencer 35

3.1.2. C^4D detektor 35

3.1.3. Platforma mikročipa 38

3.1.4. Mikročip 38

3.2. OSTALI PRIBOR 41

3.2.1. Analitička vaga 41
3.2.2. Pipete 42
3.2.3. Ultrazvučna kupelj 42
3.2.4. Aparat za ultra čistu vodu 43
3.3. POPIS KORIŠTENIH KEMIKALIJA 44
3.4. PRIPREMA OTOPINA 45
3.4.1. Priprema otopine BGE koncentracije 0,5 M 45
3.4.2. Priprema otopine NaOH koncentracije 0,5 M 45
3.4.3. Priprema otopina LiAc 45
3.4.4. Priprema otopina Na_2SO_4 45
3.4.5. Priprema otopina KNO_3 46
3.4.6. Priprema otopina $MgCl_2$ 46
3.4.7. Priprema otopina $CaCl_2$ 47
3.4.8. Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+ i Na^+ 47
3.4.9. Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+, Na^+ i Mg^{2+} 47
3.4.10. Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+, Na^+ i Ca^{2+} 47
3.5. POSTUPAK MJERENJA 48
4. REZULTATI I RASPRAVA 49
4.1. Elektroforetska mobilnost 50
4.2. Bazna linija 51
4.3. Baždarni pravac za kalij 52
4.4. Baždarni pravac za kalcij 54
4.5. Baždarni pravac za magnezij 56
4.6. Baždarni pravac za natrij 58
4.7. Baždarni pravac za litij 60

4.8. Baždarni pravac za smjesu kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija 64

4.9. Određivanje kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija 68

4.10. Određivanje sadržaja alkalijskih i zemnoalkalijskih metala u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu 71

4.11. Usporedba rezultata određivanja kationa na uređaju za elektroforezu na mikročipu s rezultatima dobivenim ICP-OES metodom 76

5. METODIČKA OBRADA NASTAVNE JEDINICE „OSNOVNA SVOJSTVA TEKUĆINA“ 78

5.1. Priprema za nastavni sat 79

5.2. Struktura nastavnog sata 81

5.3. Plan ploče 84

5.4. Pokusi 85

5.4.1. Pokus 1: Što se događa pri miješanju tekućina različitih gustoća? 85

5.4.2. Pokus 2: Površinska napetost 86

5.5. Radni listić 87

5.5.1. Pokus 1 87

5.5.2. Pokus 2 88

5.6. Pitanja za ponavljanje i domaću zadaću 89

5.7. Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje i domaću zadaću 91

6. ZAKLJUČAK 93

7. LITERATURA 95

8. ŽIVOTOPIS 100

1. Uvod

Elektroforeza je separacijska metoda analitičke kemije koja je korištena za separaciju komponenata smjese. Danas ova metoda obuhvaća vrlo široko područje, a budući da se stalno razvija i unaprijeđuje sve češće se susrećemo s njenim novim tipovima. Zbog svoje jednostavnosti elektroforeza se koristi u analitici u određivanju kationskog i anionskog sastava neke smjese. Elektroforeza također ima i široku primjenu u biokemiji i molekularnoj biologiji u analizi kompleksnih molekula kao što su proteini, nukleinske kiseline, a isto tako i u separaciji jednostavnih molekulskih vrsta (nabijene molekule šećera, aminokiseline, peptidi, nukleotidi, jednostavni ioni). Elektroforeza se stalno razvija te ima za cilj pronalazak metoda čije su karakteristike niska cijena, mala veličina uređaja, kratko vrijeme analize, prenosivost i ekološka prihvatljivost. Tip elektroforeze koji u najvećoj mjeri zadovoljava te uvjete je kapilarna elektroforeza. Budući da se danas u svemu, pa i u kemiji, teži ka pojednostavljenju svake metode i minijaturizaciji uređaja to je potaklo i minijaturizaciju kapilarne elektroforeze te se razvila njena nova podvrsta, tzv. elektroforeza na mikročipu.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost razdvajanja kationa u uzorcima prirodnih voda pomoću elektroforeze na mikročipu sa C^4D detektorom te odrediti koji se kationi nalaze u uzorcima.

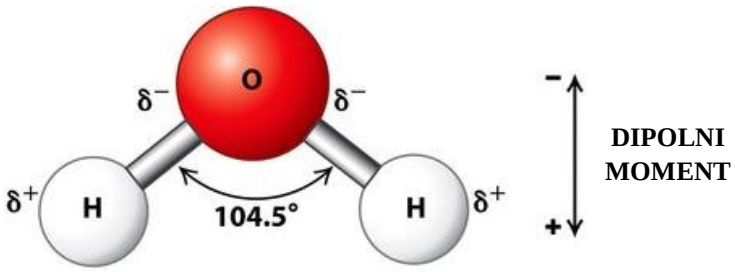
2. Literaturni pregled

2.1. VODA I SASTAV VODE

Voda kao najrasprostranjenija tekućina na Zemlji (70 % ukupne površine Zemlje) je ujedno i najvažnije otapalo. To je otopina u kojoj se nalaze otopljeni plinovi, krute tvari i tekućine. Otopljene tvari u vodi mogu se podijeliti u pet skupina:

1. Otopljeni plinovi (O_2, N_2, CO_2, SO_2, NO, NO_2, H_2, CH_4, H_2S, He, Ar)
2. Otopljeni ioni (kationi, anioni)
3. Otopljene biogene tvari (ulaze u sastav vode zbog metaboličkih aktivnosti organizma; CO_2, H_2O, NH_3, H_2S, NO_3^-)
4. Otopljeni mikroelementi (otopljene krute tvari kojih ima u vrlo malim količinama; otopljeni kationi teških metala)
5. Otopljene organske tvari (potječu od produkata raspada organizama, produkata naftnih i komunalnih onečišćenja)

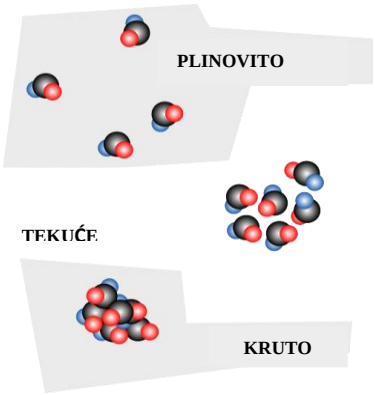
Molekula vode (Slika 1.) se sastoji od dva atoma vodika koji, vezani na atom kisika, zatvaraju kut od 104,45^o te su zajedno s nepodijeljenim elektronskim parovima kisika tetraedarski raspoređeni.



Slika 1. Molekula vode [1].

Molekula se očituje svojom polarnošću, što je posljedica neravnomjerne razdiobe naboja unutar molekule, stoga je pogodno otapalo za polarne tvari. Zbog značajne razlike u elektronegativnosti vodikova i kisikova atoma molekula vode je razmjerno jaki dipol, zbog čega molekule vode i u tekućem i u čvrstom stanju grade nakupine molekula međusobno povezane vodikovim vezama. Tendencija stvaranja vodikovih veza daje vodi jedinstveno

svojstvo koje je u opreci očekivanju da je tvar najgušća u krutom stanju, a u tekućem najrjeđa. Kao krutina led je strukturiran kao kristal, pri čemu kristalnu rešetku drže vodikove veze. Uobičajena forma leda je heksagonalna neplanarna struktura pri čemu se javljaju velike šupljine u kristalnoj mreži koja je opravdanje za smanjenu gustoću vode u krutom stanju. U tekućoj vodi molekule su nestabilne i nasumične, a u ledu one tvore pravilnu tetraedarsku strukturu. Na slici 2. su prikazane molekule vode s vodikovim vezama u 3 različita agregatna stanja.



Slika 2. Molekule vode u tri različita agregatna stanja: plinovito, tekuće i kruto [2].

Voda u sebi, ovisno o svom porijeklu i nalazištu, sadrži otopljene soli u različitim koncentracijama. Ioni čija je prisutnost moguća u vodama su Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, HCO_3^-, NO_3^-, SO_4^{2-} i Cl^-. Elementi koji su mogući u manjim koncentracijama jesu: Fe, Mn, Al, Ni, Zn, Cu i Cr, dok je za otpadne vode karakteristično da sadrže povećanu koncentraciju NH_4^+ iona. Na Zemlji voda čini oceane, rijeke, jezera, oblake i polarne kape. U tablici 1. je navedena njena cjelokupna rasprostranjenost te postotak zastupljenosti u različitim oblicima.

Tablica 1. Ukupna rasprostranjenost vode na Zemlji.

morska voda	**96,652 %**
polarni led i ledenjaci	**1,702 %**
podzemna voda	**1,631 %**
površinska voda (jezera i rijeke)	**0,013 %**
voda u tlu	**0,001 %**
voda u atmosferi	**0,001 %**

U morske vode spadaju vode mora i oceana i njena zastupljenost obuhvaća 97 % sveukupne vode na Zemlji. Ta činjenica nam govori da vode ostalih porijekla, kao i pitke, ima na Zemlji vrlo malo. Zbog prisutnosti Ca i Mg u obliku klorida i sulfata kao i velikih količina ostalih otopljenih soli (više od 35 g/L) ova voda je izrazito tvrda.

Pitka voda je potpuno prozirna, bistra te bez mirisa i boje. Njen karakterističan okus potječe od otopljenog kisika, ugljičnog dioksida i topljivih soli (NaCl, $NaHCO_3$). Ukoliko sadrži kalcijev bikarbonat ($Ca(HCO_3)_2$), kalcijev klorid ($CaCl_2$) i kalcijev sulfat ($CaSO_4$) naziva se tvrdom vodom. Kao vode za piće najčešće se koriste izvorske vode (npr. Jamnica, Jana i dr.) koje se crpi direktno s izvora i samo su pročišćene od eventualnih nečistoća.

Oborinska voda dio je oborina, koje se, ispirući površine, izravno ili neizravno slijevaju u vodne sustave. Voda ovog porijekla sadrži prašinu i nešto otopljenih plinova iz atmosfere i moguće su vrlo male količine otopljenih soli, a zbog sve većeg onečišćenja atmosfere i zemljišta znatno onečišćuje prirodne vode.

Voda u tlu je voda koju sadržava tlo u koje je dospjela procjeđivanjem ili upijanjem. Može biti adehijska, kapilarna ili podzemna voda.

- Adehijska voda, voda gornjeg sloja tla
- Kapilarna voda, voda koja ispunjava najuže pore tla zbog djelovanja površinske napetosti, pojavljuje se zbog povećanja vlažnosti tla
- Podzemna voda, vode u šupljinama tla
- Arteška voda, podzemna voda koja se pod određenim tlakom nalazi u vodopropusnome sloju između vodonepropusnih slojeva

Voda u sebi može imati otopljeni ugljični dioksid te obilje iona (Na^+, Ca^+, K^+, Mg^{2+}, Cl^-, I^-, F^-) otopljenih u koncentraciji većoj od 1 g/L koji su zaslužni za njen specifičan okus i

svojstva.. Takva voda se zove mineralna voda, a nastala je tijekom stotina tisuća godina, prodiranjem oborinske vode u zemlju. Oborinska voda, prolazeći kroz slojeve zemlje, se pročišćavala i obogaćivala mineralima, elementima u tragovima te ugljičnim dioksidom iz dolomita karbonatnog porijekla.

Također, voda se može javiti i kao teška voda. U kemijskom smislu to je deuterijev oksid (D_2O), a u praktičnom smislu je naziv za vodu koja je tehničkim postupkom obogaćena deuterijem, odnosno teškim vodikom.

Na našem planetu osim vode u svim navedenim oblicima, postoji i kao otpadna, koja je produkt ljudskog djelovanja. Sadrži u sebi otopljene i suspendirane otpadne tvari iz domaćinstava, industrije i poljoprivrede. Takva voda je toliko onečišćena da se ne bi smjela ispuštati u vodne tokove bez pročišćavanja jer predstavlja veliku opasnost za održavanje biološke ravnoteže u rijekama, jezerima i morima.

2.2. METODE ODREĐIVANJA IONA U PRIRODNIM VODAMA

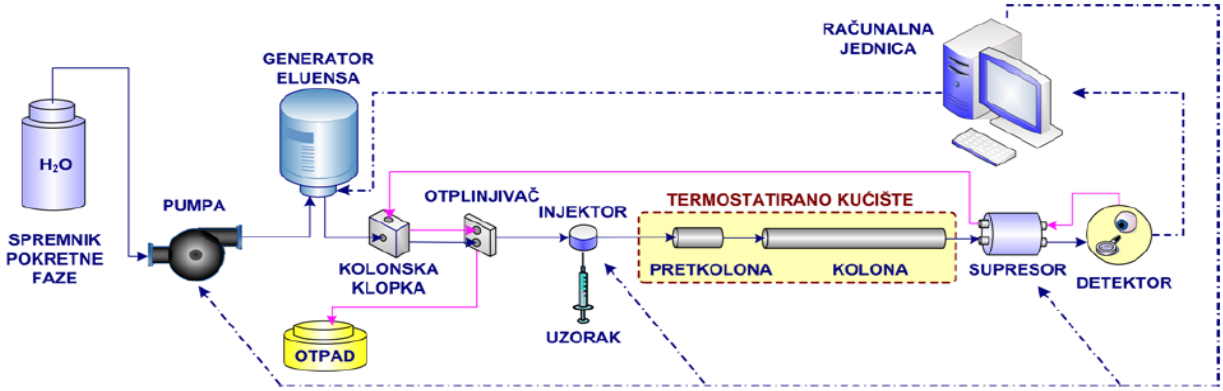
Kako bi se uspješno ispitao sastav vode te utvrdile eventualne nečistoće, metode koje se danas uspješno primjenjuju u određivanju kationskog i anionskog sastava voda jesu:

- Ionska kromatografija
    - HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC)
- Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE)
- Spektroskopija
    - UV/VIS spektrofotometrija (engl. *UltraViolet-VISible*, UV/VIS)
    - Atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. *Atomic absorption spectroscopy*, AAS)
        - Plamena apsorpcijska spektroskopija (engl. *flame atomic absorption spectroscopy*, F-AAS)
        - Induktivno spregnuta plazma spektroskopija (engl. *inductively coupled plasma*, ICP)

2.2.1. Ionska kromatografija

Kromatografska analiza služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama. Za ovu tehniku separacije komponenata karakteristično je postojanje stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Sastojci smjese odjeljuju se ovisno o brzinama kojima ih plinovita ili tekuća mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze [3]. Ionsko izmjenjivačka kromatografija razdvaja sastojke uzorka s obzirom na njihove različite afinitete prema ionskoj izmjeni. Sama tehnika određivanja bazira se na odvajanju sastojaka eluacijom na sintetskim ionskim izmjenjivačima, nakon čega slijedi detekcija ispitivanih iona pogodnim detektorom, najčešće konduktometrom. Kao pokretna faza u ionskoj kromatografiji koristi se voda, koju se crpi iz spremnika s prigušivačem pulseva i potiskuje dalje kroz sustav. Eventualne nečistoće se uklanja u tzv. ionskoj klopci. Uzorak se unosi u tok eluensa koji je nošen strujom pokretne faze kroz kromatografsku pretkolonu i kolonu unutar koje dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka. Pri

eluiranju manji ioni izlaze prije velikih, a monovalentni prije dvovalentnih i trovalentnih iona. Na izlasku iz kolone nalazi se detektor za mjerenje odziva. Donja granica detekcije je <1 ppm, no ona ovisi o eluensu, detektoru, koloni te predtretmanu uzorka. Na slici 3. je prikazana shema ionskog kromatografskog sustava [4].



Slika 3. Moderni ionski kromatografski sustav s detektiranjem vodljivosti [4].

U tablici 2. su navedene koncentracije pojedinih kationa u uzorcima otpadnih voda određene pomoću IC [5].

Tablica 2. Koncentracije kationa u uzorcima otpadnih voda [5].

KATION	KONCENTRACIJA (mg/L)		
	TEXAS	CALIFORNIA	NORTH DAKOTA
Litij	14,00	-	49,00
Natrij	4,30	28,00	92,00
Amonijak	50,00	18,00	3,70
Kalij	65,00	130,00	6,20
Magnezij	24,00	540,00	1,60
Kalcij	500,00	2,20	21,00
Stroncij	3,00	-	530,00

2.2.1.1. HPLC

Pojavom tekućinske kromatografije razvijaju se nove metode koje se primjenjuje u preparativne svrhe. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), je nova tehnologija koja koristi mnogo složenije uređaje od jednostavnih staklenih kolona koji se primjenjuje u klasičnoj tekućinskoj kromatografiji. Time je postignuto kraće vrijeme odjeljivanja, sama tehnika postaje djelotvornija te primjenjivija na puno širi spektar spojeva [3].

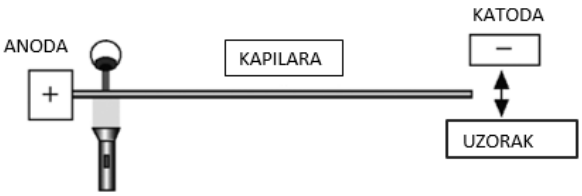
Calisevici i suradnici su primjenom HPLC odredili anione i katione u rumunjskoj pitkoj vodi. Uzeli su 4 uzorka s različitih područja. Vrijednosti dobivenih koncentracija kationa navedene su u tablici 3 [6].

Tablica 3. Koncentracije kationa određene pomoću HPLC [6].

UZORCI	Na^+ (mg/L)	K^+(mg/L)	Mg^{2+}(mg/L)	Ca^{2+}(mg/L)
A	8,494	5,097	4,68	57,038
B	2,025	3,979	10,861	18,514
C	2,505	1,302	7,285	96,060
D	19,233	2,408	12,137	105,098
DOZVOLJENA GRANICA	200	12	50	100

2.2.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je moderna tehnika analitičke separacije, podvrsta elektroforeze, koja služi za odvajanje ionskih specija nekog uzorka prema njihovoj veličini (masi) i naboju. Električki nabijene čestice se gibaju pod utjecajem električnog polja u uskoj kapilari koja je ispunjena elektrolitom. Na slici 4. je prikazana shema kapilarne elektroforeze.



Slika 4. Kapilarna elektroforeza [7].

Ova metoda separacije ima široku primjenu u biotehnologiji za karakterizaciju farmaceutski dobivenih proteina. Uspješno razdvaja aminokiseline, peptide, molekule DNA i razne druge ionske specije.

2.2.3. Spektroskopija

Molekulska spektroskopija ima široku primjenu u identifikaciji brojnih organskih i anorganskih vrsta. Važnu ulogu ima u kvantitativnoj analizi. Postoje mnoge podvrste spektroskopije, no u analizi voda bitno je spomenuti dvije najprimjenjivanije. To su UV/VIS spektroskopija i atomska apsorpcijska spektroskopija.

2.2.3.1. UV/VIS spektroskopija

UV/VIS spektroskopijom se određuje čestice koje daju valne duljine u vidljivom i ultraljubičastom spektru. Primjenjiva je za otkrivanje kromofornih skupina (alkeni, konjugirani alkeni, alkini, karbonili, karboksili, amido-, azo-, nitro-, nitrozo-spojevi, nitrati, aromatski spojevi) budući se kod njih javljaju maksimumi između 200 i 400 nm.

2.2.3.2. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomsku spektroskopiju se primjenjuje za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u uzorku. Ova metoda se koristi u analizi metala i metaloida te spada u najvažnije metode elementarne analizea njena osjetljivost je u ppm području (engl. *parts per milion,* ppm), odnosno dijelova na milijun. Ova metoda ima veliku prednost jer se očituje brzinom, prikladnošću, visokom selektivnošću te prihvatljivom cijenom instrumenta. Temelj ove metode je kvantizirani prijelaz slobodnog atoma u više energijsko stanje. Takav prijelaz induciran je apsorpcijom toplinske energije ili energije zračenja. Obuhvaća tri procesa: atomsku apsorpciju, atomsku emisiju i atomsku fluorescenciju [8]. Prvi korak ove metode je atomizacija, odnosno proces kojim se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomske pare. Taj korak je i najkritičniji jer utječe na osjetljivost, preciznost i točnost mjerenja [3]. U tablici 4. su navedene koncentracije prisutnih iona u uzorcima voda određene pomoću AAS. Uzorci voda uzeti su sa različitih izvora i zdenaca koji pripadaju podzemnim vodama masiva Kalnika [9].

Tablica 4. Koncentracije iona u uzorcima voda [9].

KONCENTRACIJA (mg/L)					
NALAZIŠTE	**Na^+**	**K^+**	**Ca^+**	**Mg^+**	**NH_4^+**
Trstina 09/06	10,6	3,9	122,4	13,2	<0,01
Trstina 04/07	5,3	2,6	75,5	14,3	<0,01
Opušnjak 09/06	9,6	5,1	101,6	16,6	<0,01
Opušnjak 04/07	4,7	2,5	73,7	14,4	<0,01
Podvinje 09/06	12,4	3,5	142	21	<0,01
Podvinje 04/07	6,1	1,9	77,4	14,6	<0,01
Rakovec 09/06	14,5	8,8	136	14,6	0,08
Rakovec 04/07	7	5,8	70,4	14,1	<0,01
Kraljev zdenac 09/06	8,2	0,7	68,4	12,9	<0,01
Kraljev zdenac 04/07	3,3	0,5	66,2	12,6	<0,01
Izvor Vratno	9	1,9	80,8	9,7	<0,01
Mihalj	6,9	1,8	83,2	7,8	<0,01
Potok Kamešnica 09/06	9	1,9	79,2	10,7	<0,01
Nova bušotina	652	24,4	49,3	56	0,19
Apatovac	2002	76,4	57,4	64,8	-

Kod određivanja iona u vodi moguće je koristiti atomsku spektroskopiju temeljenu na plamenoj atomizaciji (F-AAS) i induktivno spregnutu argonsku plazma spektroskopiju (ICP).

- F-AAS

U plamenoj atomizaciji vodenu otopinu uzorka se raspršuje u finu vodenu prašinu te miješa s plinovitim gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen.

- ICP

Masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se induktivno spregnutu plazmu (smjesa kationa i elektrona) koristi kao ionizacijski izvor, a detektira se masenom spektroskopijom. Osnovne vodljive vrste

su ioni argona i elektroni. Izborom odgovarajuće rezolucije za pojedini element postiže se maksimalno razdvajanje izotopa koji želimo mjeriti od mogućih interferencija. Instrument karakterizira visoka osjetljivost, veliki linearni raspon i mogućnost paralelnog određivanja 50 elemenata (multielementarna analiza). Granice mjerljivosti su od 10^{-12} do 10^{-3} g/L.

U tablici 5. su navedene koncentracije pojedinih kationa u uzorcima voda. Uzorci su sakupljeni u ožujku 2016. godine, a navedeni kationi određeni su pomoću ICP-OES uređaja (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES).

Tablica 5. Koncentracije prisutnih kationa u uzorcima voda.

KONCENTRACIJA IONA (mg/L)					
UZORAK	**Ca^+**	**Mg^+**	**K^+**	**Na^+**	**Li^+**
Oborinska voda	11,250	15,716	0,036	0,970	0,01066
Vodovodna voda	9,207	2,436	1,645	6,271	0,01141

2.3. ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je elektrokemijski proces u kojemu otopljena tvar ili čestica efektivnog naboja Q putuje u pomoćnom elektrolitu pod djelovanjem električnog polja prema jednoj od elektroda ovisno o prirodi njenog naboja [10]. Ova metoda separacije također predstavlja i elektroanalitičku metodu kojom se nabijene čestice razdvajaju i identificiraju u otopini pomoćnog elektrolita. Prvi koji je zamijetio takvo gibanje čestica je Ferdinand Frederic Reuss, 1807. godine. On je uočio da čestice gline raspršene u vodi migriraju primjenom električnog polja te došao do zaključka da su ta gibanja prouzrokovana električnim poljem, a određena su nabojem, veličinom (masom) i oblikom molekule. Također određen utjecaj na njihovo gibanje ima i sam medij (fluid) u kojem se gibanje provodi (njegova viskoznost, ionska jakost i temperatura) [11].

Sam pojam „Elektroforeza“ prvi je uveo Michaelis 1909. godine, dok je prvu sofisticiranu aparaturu i prva razdvajanja razvio Arne Tiselius, 1937.g. On je primijenio elektroforezu na proteine te uspješno razdvojio serumske albumine, α, β, i γ globuline. Za svoj rad je dobio Nobelovu nagradu. Prvotno, sam naziv *Elektroforeza* bio je korišten za migraciju električki nabijenih koloidnih čestica, no danas ima puno šire značenje. Nabijene čestice, osim jednostavnih koloida, mogu biti i makromolekulski ioni ili agregati većeg broja čestica [12]. Rezultat elektroforeze je elektroferogram koji je svojstven za svaku elektroforezu. Iz njega se iščitaju sve korisne informacije o separaciji koja se odvijala [13].

Istraživanje ove metode separacije te želja za unaprjeđenjem i pronalaskom što boljeg, isplativijeg i jednostavnijeg načina za njezinu provedbu dovelo je do njenog grananja, rezultat čega je današnja šarolika podjela elektroforetskih metoda, a danas predstavlja jednu od najkorištenijih tehnika analitičke separacije.

2.3.1. Teorijska načela elektroforeze

Pokretljivost nabijenih čestica u otopini BGE (engl. *background electrolyte,* BGE) ovisi o:

- veličini, obliku, koncentraciji, električnom naboju, stupnju hidracije i disocijacije čestice
- viskoznosti, pH, temperaturi i ionskoj jakosti pomoćnog elektrolita
- jakosti električne struje
- vremenu putovanja

Kada se dvije elektrode povežu s izvorom istosmjerne struje nekog napona, između njih se stvara električno polje (E) koje djeluje pogonskom silom (F) na česticu sfernog oblika, koja posjeduje određenu količinu naboja q. Osnovna pogonska sila elektroforeze (F) može se iskazati izrazom:

$$F = Eq$$

Gibanju čestice suprotstavlja se sila trenja (F_t) koja je, prema Stokesovom zakonu za čestice sfernog oblika, proporcionalna koeficijentu viskoznosti pomoćnog elektrolita (η), radijusu čestice (r) i brzini kojom se čestica kreće (v):

$$F_t = 6\,\pi\eta r\,v$$

Izjednače li se ove dvije sile, čestica će se kretati konstantnom brzinom (v):

$$v = \frac{Eq}{6\pi\eta r}$$

Dobiveni izraz potvrđuje prethodno spomenutu tvrdnju o pokretljivosti nabijenih čestica u elektrolitu, odnosno vidi se da je brzina proporcionalna jakosti električnog polja (E) i naboju čestice, a obrnuto proporcionalna radijusu čestice i viskoznosti otopine, iz čega proizlazi da brzinu separacije možemo povećavati povećanjem jakosti električnog polja, odnosno napona među elektrodama [14].

Jakost električnog polja (E) je razlika potencijala između elektroda. Opisana je omjerom napona izvore struje (U) na elektrodama i udaljenosti (d) među elektrodama, tj. duljinom kapilare:

$$E = \frac{U}{d}$$

Elektroforetska mobilnost (engl. *mobility*, pokretljivost), μ, definira se kao udaljenost (d) koju čestica prijeđe u vremenu (t) pod djelovanjem gradijenta napona (E):

$$\mu = \frac{d}{tE} \qquad \text{ili} \qquad \mu = \frac{v}{E}$$

Brzina kojom čestice putuju opisana je sljedećim izrazom, gdje je v brzina putovanja iona.

$$v = \mu E$$

2.3.2. Vrste elektroforeze

Prema tehnici izvođenja te mehanizmu razdvajanja analita elektroforetske tehnike se, u grubo, mogu svrstati u zonalnu i elektroforezu pomičnih granica. U tablici 6. je prikazan pregled svih elektroforetskih metoda.

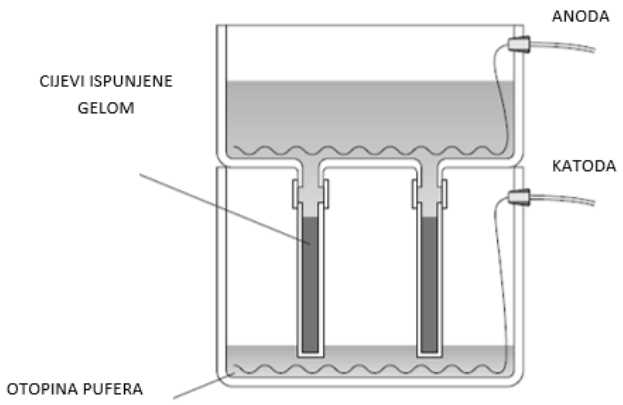
Tablica 6. Podjela elektroforetskih metoda.

ELEKTROFOREZA	
ZONSKA ELEKTROFOREZA	**ELEKTROFOREZA POMIČNIH GRANICA**
Elektroforeza na papiru	**Kapilarna elektroforeza** • Kapilarna zonska elektroforeza (engl. *capillary zonal electrophoresis*, CZE) • Kapilarna gel elektroforeza (engl. *capillary gel electrophoresis*, CGE) • Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic cromatography*, MEKC) • Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. *capillary isoelectric focusing*, CIEF) • Kapilarna izotahoforeza (engl. *capillary isotahophoresis*, CITP) • Kiralna kapilarna elektroforeza (engl. *chiral capillary electrophoresis*, CCE) • Kapilarna elektrokromatografija (engl. *capillary electrocromatography*, CEC) • Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (engl. *microemulsion electrocinetic cromatography*, MEKC)
Elektroforeza na gelu	**Izotahoforeza**
Tankoslojna elektroforeza	**Izoelektrično fokusiranje**
Elektroforeza na acetat-celulozi	**Imunoelektroforeza**

2.3.2.1. Zonska elektroforeza

Zonska elektroforeza je tip elektroforeze kod kojeg nabijene čestice putuju unutar granica čvrstog elektroforetskog nosača, a naziv je dobila po tome što je svaka nabijena čestica nakon odvajanja izolirana u pojedinačnu zonu na elektroforetskom nosaču. Na elektroforetsku pokretljivost čestice i oštrinu odvajanja djeluju različiti činitelji, ovisno o vrsti elektroforetskog nosača, a to su: adsorpcija, nehomogenost i kapacitet elektroforetskog nosača, protok pufera mostićima i elektroendoosmoza. Elektroendoosmoza je pojava koja se javlja tijekom elektroforeze na filtrirnom papiru, acetatnoj celulozi, agaru i običnoj agarozi, a uzrokovana je negativno nabijenim karboksilnim i sulfatnim skupinama papira ili agaroze. Negativno nabijene skupine imaju tendenciju putovanja prema anodi, ali budući da je to onemogućeno jer se nalaze na čvrstom mediju stvara se sila koja se uravnotežuje na način da pozitivno naelektrizirane molekule vode putuju prema katodi.

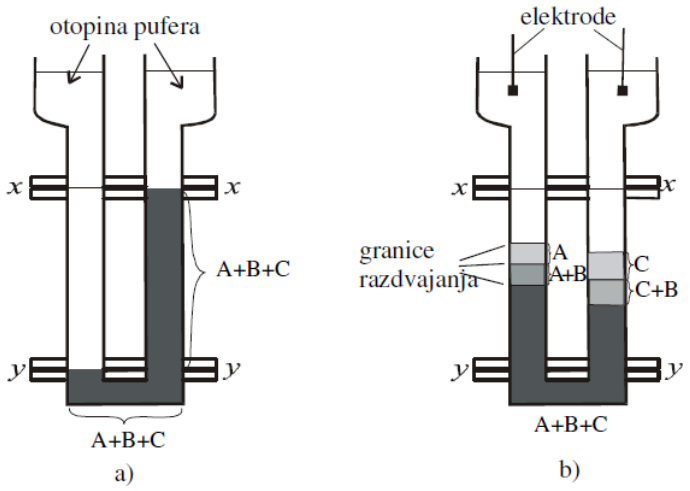
Sam proces odvajanja nabijenih čestica se provodi u elektroforetskoj kadi s dva puferska odjeljka spojena katodom i anodom. Kao nosači se mogu koristiti papir za filtriranje, acetat-celuloza, agar, agaroza, škrob i akrilamid. Nosači aktivno sudjeluju u postupku odvajanja djelujući na pokretljivost nabijenih čestica. Čestice se na nosačima odvajaju prema gustoći naboja i prema veličini. Nosači također sprečavaju prijenos topline i smanjuju difuziju. Svojstvo razlikovanja molekula prema veličini pripisuje se njihovom kapacitetu prosijavanja zbog čega je ovaj učinak dobio naziv "učinak molekularnog prosijavanja" [14]. Kao najbolji čvrsti nosač pokazao se poliakrilamidni gel jer ima najmanje pore te je zbog toga postignuta bolja rezolucija i veća osjetljivost detekcije (Slika 5.). Papir se pokazao manje uspješnim zbog nejednoličnih pora na čijoj površini dolazi do adsorpcije mnogih makromolekula i membrane celuloznog acetata.



Slika 5. Elektroforeza na gelu [15].

2.3.2.2. Elektroforeza pomičnih granica

Kod ovog tipa elektroforeze, razdvajanje se može uočiti praćenjem pomicanja granica stupca pojedinih ionskih specija. Razdvajanje se provodi na način da se uspostavi migracija iona iz otopine analita u drugu otopinu, koja je u izravnom kontaktu s otopinom analita. Putujući različitim brzinama kroz drugu otopinu, ionske vrste iz analita se razdvajaju. Princip ovog tipa elektroforeze je prikazan na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz elektroforeze u slobodnoj otopini: a) ćelija napunjena otopinom pufera i otopinom analita prije elektroforeze, b) ćelija napunjena otopinom pufera i otopinom analita nakon elektroforeze [12].

2.3.2.3. Kapilarna elektroforeza

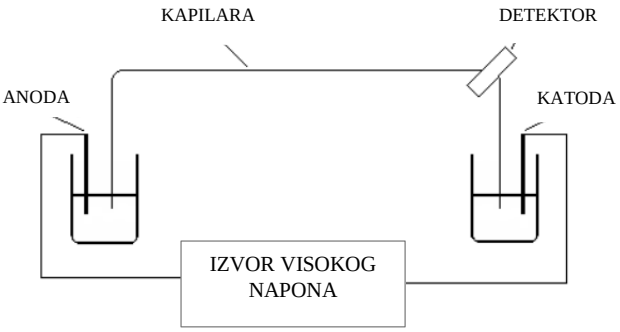
CE (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) je analitička tehnika separacije koja se prvi put javlja 1981.g. Osmislili su je Lukacs i Jorgenson [16] te primijenili kod razdvajanja smjese peptida i proteina. To otkriće imalo je veliku ulogu u proučavanju ljudskog genoma jer je većina sekvence ljudskog genoma određena pomoću CE. Danas se uspješno koristi za separaciju i određivanje različitih molekula, od enantiomera, aminokiselina, peptida i molekula DNA pa sve do jednostavnijih ionskih specija. Ova metoda ima veliku prednost nad ostalim elektroforetskim metodama i općenito nad svim metodama analitičke separacije, zbog izrazite brzine izvođenja te malih količina uzoraka i reagensa što je čini ekološki prihvatljivom i primjenjivom na širok raspon analita [17]. Rocha i suradnici su 2001. godine primijenili zonalnu kapilarnu elektroforezu s bezkontaktnim konduktometrijskim

detektorom (engl. *contactless conductivity detector*, CCD) za razdvajanje iona u oborinskim vodama Sao Paula u Brazilu. Dobivene vrijednosti koncentracija kationa nalaze se u tablici 7. [18].

Tablica 7. Koncentracije kationa određene pomoću kapilarne zonalne elektroforeze (engl. *capillary zone electrophoresis*, CZE) u oborinskoj vodi Sao Paula u Brazilu [18].

KATIONI	KONCENTRACIJA	
	µmol/L	µg/L
NH_4^+	0,58	10
K^+	0,43	17
Ca^{2+}	0,38	15
Na^{2+}	0,41	9,4
Mg^{2+}	1,1	24

Separiranje nabijenih čestica odvija se u pomoćnom elektrolitu (engl. *background electrolyte*, BGE) koji ispunjava staklenu kapilaru. Pomoćni elektrolit sadrži polimere koji povećavaju viskoznost otopine. Također, cijevi mogu biti ispunjene i gelom [12]. Krajevi kapilare, kao i same elektrode, uronjeni su u spremnike u kojima se nalazi BGE. Razina BGE u oba spremnika mora biti jednaka kako ne bi došlo do protoka pufera kroz kapilaru zbog razlike u hidrostatskom tlaku. Potom se mala količina uzorka injektira u kapilaru i to na način da se jedan spremnik zamijeni spremnikom uzorka te se, primjenom vanjskog pritiska ili napona, uzorak injektira u kapilaru. Kada se uzorak nalazi u kapilari primijeni se visoki napon i odvija se separacija. Shema elektroforeze u kapilari prikazana je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz elektroforeze u kapilari [19].

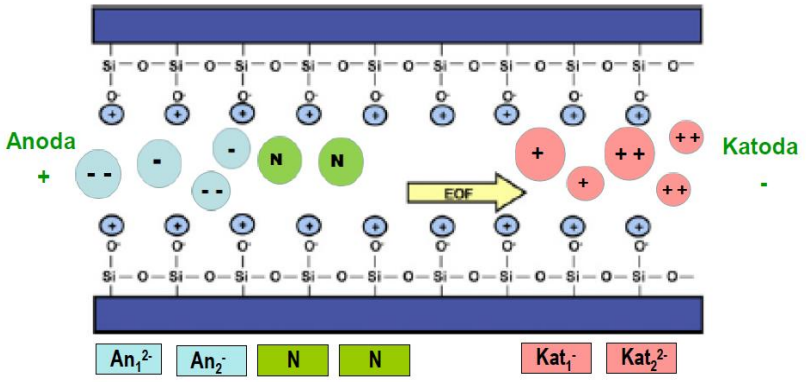
Temeljnu ulogu u učinkovitosti separacije imaju same kapilare, čiji je unutarnji promjer od 10 do 250 μm, duljine 10 do 110 cm, a izrađene su od kvarcnog stakla ili fluoriranih ugljikovodičnih smola. Najjednostavniji oblik kapilarne elektroforeze je kapilarna zonska elektroforeza. U ovom tipu elektroforeze kapilara je ispunjena samo otopinom BGE, a čestice se razdvajaju na temelju omjera naboja i mase. Zbog različite elektroforetske mobilnosti u otopini BGE čestice putuju različitim brzinama i razdvajaju se u odijeljene zone [20].

2.3.3. Elektroosmotski protok

Ključnu ulogu u kapilarnoj elektroforezi ima elektroosmotski protok (engl. *electroosmotic flow*, EOF), odnosno protok BGE u kapilari. On utječe na brzinu migracije električki nabijenih čestica, a javlja se kao posljedica površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Pojava EOF-a i njegovo kretanje u kapilari postižu se ionizacijom silanoilnih skupina ($Si\text{-}O^-$) koje su u sastavu stjenke separacijskog kanala. Silanoilne skupine se, nakon punjenja kapilare otopinom BGE, deprotoniraju te daju negativan naboj, čime privlače na sebe molekule suprotnog naboja. Pri tome dolazi do stvaranja dvostrukog sloja kationa i aniona koji se naziva Debye-ev sloj. Čvrsti dio čine ioni suprotnog naboja, a difuzijski dio čine i kationi i anioni. Potencijal koji se javlja na stjenci kapilare, uzrokovan nastalim dvostrukim slojem, naziva se zeta potencijal, ζ. Primjenom napona na krajevima kapilara, solvatizirani kationi iz difuznog sloja migriraju prema katodi zbog nastale Coulombove sile povlačeći za sobom i okolnu tekućinu (molekule BGE) prema detektoru. Budući da se silanoilne skupine ponašaju kao slabe kiseline, naboj stjenke kapilare i kretanje EOF-a su uvjetovani pH vrijednošću otopine BGE. U neutralnoj sredini i višim

vrijednostima pH, EOF je dovoljno jak da pomiče katione prema katodi. Povećanjem pH, kretanje EOF-a se povećava dosežući svoj maksimum pri pH 8. Smanjenjem pH silanoilne skupine su u potpunosti protonirane te se EOF usporava što ujedno usporava i kretanje iona prema pripadajućoj elektrodi.

S obzirom da na mobilnost iona utječe mobilnost EOF-a, ukupna brzina kretanja iona je suma elektroforetske i ionske mobilnosti. Osim pH pufera, brzina kretanja EOF-a uvjetovana je i drugim parametrima kao što su ionska jakost otopine BGE, temperatura, intenzitet električnog polja i prisutnost aditiva. Zaustavljanje ili promjena smjera EOF-a može se postići privremenim ili trajnim modifikacijama stjenki kapilare. Zahvaljujući EOF-u, moguće je odijeliti i anionske i kationske otopljene tvari, dok neutralne koeluiraju zajedno s EOF-om. Kretanje nabijenih čestica u kapilari pod utjecajem elektroosmotskog protoka prikazano je na slici 8. [21].



Slika 8. Gibanje nabijenih čestica u kapilari mikročipa pod utjecajem EOF-a [21].

Brzina migracije nabijenih molekula određena je brzinom elektroosmotskog toka. Ukupna mobilnost (μ) supstanci u kapilari može se izraziti kao suma elektroforetske (μ_{EOF}) i elektroosmotske mobilnosti (μ_{EOS}). Elektroosmotska mobilnost može se prikazati izrazom:

$$\mu = \frac{\sigma}{\kappa\eta} = \frac{\varepsilon\psi}{\eta}$$

gdje je σ - gustoća naboja na površini kapilare, κ - debljina dvostrukog električnog sloja, η - viskoznost otopina, ε - dielektrična konstanta pufera i Ψ - električni potencijal na površini kapilare.

Brzina kretanja otopine pod utjecajem elektroosmoze na razmaku x od zida kapilare ovisi o elektroosmotskoj mobilnosti i jačini primijenjenog električnog polja (E):

$$v(x) = \mu_{EOF} E$$

te je brzina samog analita određena umnoškom njegove mobilnosti sa EOF-om i jakosti električnog polja, što se vidi iz izraza:

$$v(analita) = (\mu_e \mu_{EOF}) E$$

gdje je v - brzina analita, μ_e - elektroforetska mobilnost analita, μ_{EOF} - elektroosmotski tok te E - jakost električnog polja.

2.3.4. Elektroforeza na mikročipu

Daljnjim unaprjeđivanjem kapilarne elektroforeze došlo je do njene minijaturizacije 90-ih godina 20. stoljeća. Prvotno je primjenjivana za brzu separaciju bioloških molekula kao što su DNK i proteini, a kasnije svoju primjenu pronalazi u određivanju analita širokog spektra [20]. Segato i suradnici su 2005. godine elektroforezom na mikročipu (engl. *microchip electrophoresis*, MCE) odredili ione u uzorcima tla pustinje Atacama (Chile) te uz pomoć C^4D detektora utvrdili o kojim ionima je riječ. Karakteristična vremena migracije i dobivene koncentracije prisutnih iona prikazane su u tablici 9. [22].

Tablica 8. Koncentracije ispitivanih kationa u uzorku tla [22].

KATIONI	t_M (min)	KONCENTRACIJA (µmol/L)
NH_4^+	7,1	7
K^+	8,2	53
Ca^+	8,9	38
Na^+	9,3	57
Mg^{2+}	9,6	45
Li^+	11,0	91

Kationе u uzorku pitke vode, pomoću elektroforeze na mikročipu i konduktometrijskog deetektora odredili su Vrowe i suradnici [23]. Koristili su stakleni mikročip, a pomoćni anionski elektrolit su pripremili sa 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansumpornom kiselinom i cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) u kojem je otopljen Rodamin B. Dobivena vremena migracije su pridružena odgovarajućem kationu, a izračunate vrijednosti njihovih koncentracija prikazane su u tablici 9.

Tablica 9. Kationi određeni elektroforezom na mikorčipu u uzorku pitke vode s odgovarajućim koncentracijama [23].

KATIONI	KONCENTRACIJA (mg/L)	KONCENTRACIJA (mmol/L)
K^+	4,6	0,12
Na^+	25	1,1
Ca^{2+}	48	1,2
Mg^{2+}	5,7	0,23

U elektroforezi na mikročipu kombinirani su elektroforeza i elektroosmotski protok kako bi se postigla separacija željenih specija.

Standardni protokol elektroforeze na mikročipu sastoji se od injektiranja, separacije i detekcije. Elektrokinetičko injektiranje je najčešće korištena metoda injektiranja u elektroforezi na mikročipu budući da ne zahtijeva dodatne mehaničke dijelove. Istosmjerni napon se primjenjuje kod unošenja uzorka u separacijski kanal. Električno polje primijenjeno za injektiranje uzorka je manje jakosti od onog koje je potrebno za separaciju uzorka u separacijskom kanalu te se nakon injektiranja isključuje i primjenjuje se veće električno polje. Dio uzorka koji se nađe u sjecištu kanala pod utjecajem električnog polja odlazi u separacijski kanal gdje započinje separacija. Separirani segmenti zatim putuju do radnih elektroda gdje se detektiraju.

U elektroforetskom procesu ispitivani analit se može detektirati različitim metodama, a detektor se odabire ovisno o tvarima koje se želi kvantitativno odrediti. Ovisno o veličini koju se mjeri, elektrokemijska detekcija se može podijeliti na amperometrijsku, konduktometrijsku, potenciometrijsku i voltametrijsku. U elektroforezi na mikročipu se

najčešće koristi amperometrijske i konduktometrijske detektore. Amperometrijska detekcija temelji se na mjerenju električne struje koja se javlja kao posljedica oksidacije ili redukcije elektrolita na površini radne elektrode do kojih dolazi primjenom napona na elektrolit. Osnova konduktometrijske detekcije je mjerenje vodljivosti otopine elektrolita pri čemu je izmjerena vodljivost proporcionalna koncentraciji otopljene tvari.

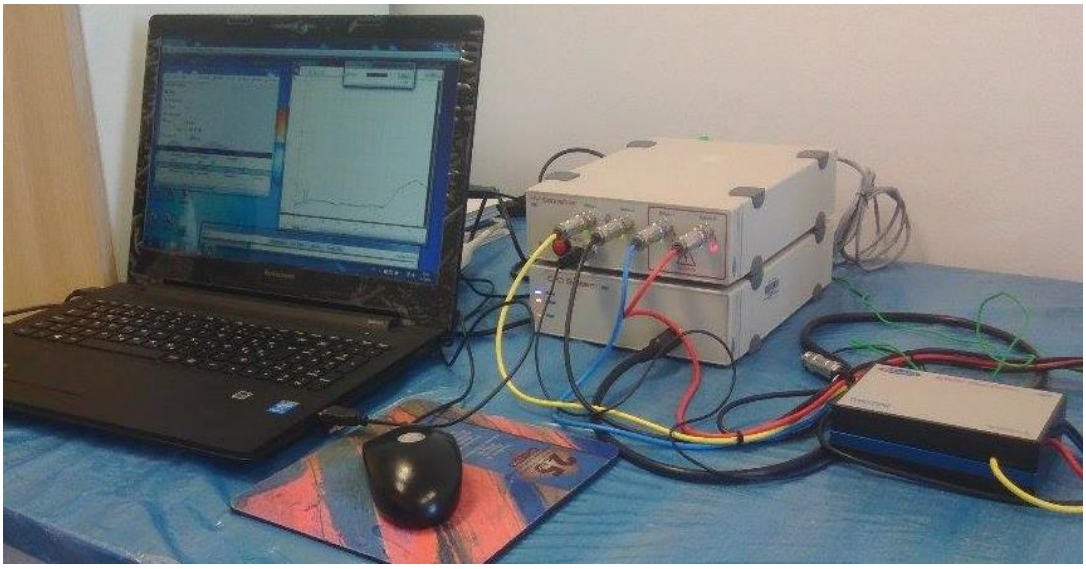
Posljednjih godina sve više se primjenjuje konduktometrijsku detekciju jer nije ograničena samo na detekciju ionskih ili molekulskih vrsta koje se mogu oksidirati i reducirati već se mogu detektirati sve nabijene čestice koje se gibaju u elektroforetskom polju i imaju različitu vodljivost od BGE [24], [25].

3. Eksperimentalni dio

3.1. UREĐAJI I PRIBOR

Instrumenti korišteni za elektroforetska mjerenja obuhvaćaju (Slika 9.):

- HV Sequencer (ER230)
- C^4D detektor (ER225)
- Platformu mikročipa (Micronit ET225)
- Stakleni mikročip (ET145-4)



Slika 9. Instrumenti u elektroforetskim mjerenjima.

3.1.1. HV Sequencer

HV Sequencer (ER230) služi kao izvor visokog napona za elektroforezu na mikročipu (Slika 10.). Ima četiri izlaza (output) na koja su vezani kabeli koji vode do rezervoara na mikročipu pri čemu se konstantno mjeri i prati napon i električna struja kako bi se uklonilo eventualne smetnje uzrokovane mjehurićima ili blokadom kanala. Maksimalan napon koji je primjenjiv na pojedini kanal je 3 kV, dok minimalan iznosi 300V [29].



Slika 10. HV Sequencer (ER230) [31].

3.1.2. C^4D detektor (engl. CCCCD, engl. *Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection*, C^4D), Slika 11.

Konduktometrijski detektori se sastoje od dviju metalnih elektroda kojima se testira vodljivost otopine analita. S obzirom da sve nabijene vrste daju signal, vrlo je važan odabir pomoćnog elektrolita (BGE). Nabijene čestice uzrokuju promjenu ukupne vodljivosti uzorka, što se očituje kao signal, koji se obrađuje u nama čitljiv zapis, elektroferogram. Budući da otopina pufera (BGE) već ima određenu vodljivost, cilj je odabrati BGE što niže vodljivosti kako bi pozadinski šum bio što manji i kako bi se dobila što veća promjena, odnosno signal. Konstantnim praćenjem vodljivosti, signal će prikazati serije pikova, površine i visine razmjerne koncentraciji ispitivanog uzorka (elektroferogram).

Osjetna elektroda mjeri vodljivost otopine sukladno jednadžbi:

$$L = \frac{A}{d}\sum \lambda_i c_{i_i}$$

gdje je:

L = vodljivost,

A = površina elektrode,

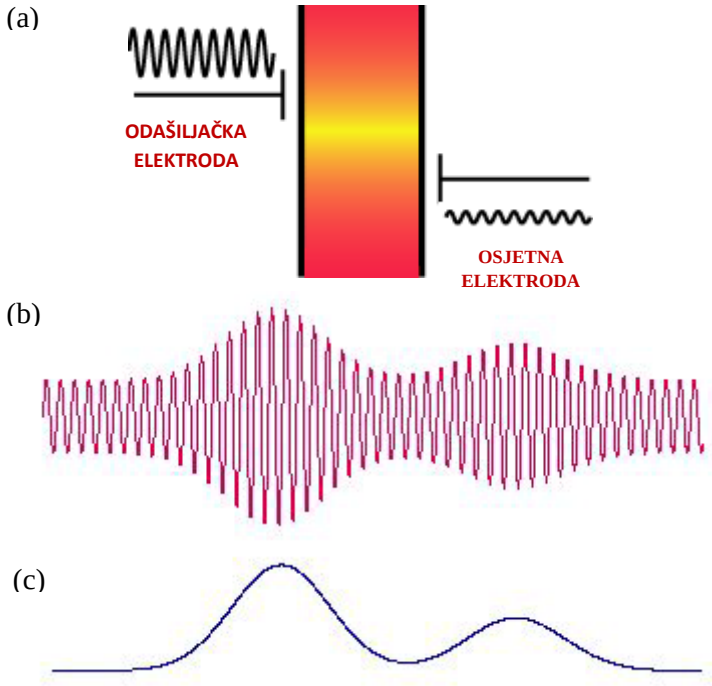
d = relativna udaljenost između elektroda,

c_{i_i} = koncentracija svih spojeva koji prenose naboj,

λ_i = molarna vodljivost svih spojeva koji prenose naboj, ($\lambda = \lambda_+ \lambda_-$).

Iz jednadžbe se može zaključiti da se granica detekcije može mijenjati ukoliko promijenimo površinu elektrode [25].

C^4D je kapacitivno spregnuti beskontaktni konduktometrijski detektor. Princip samog rada prikazan je na slici 11.



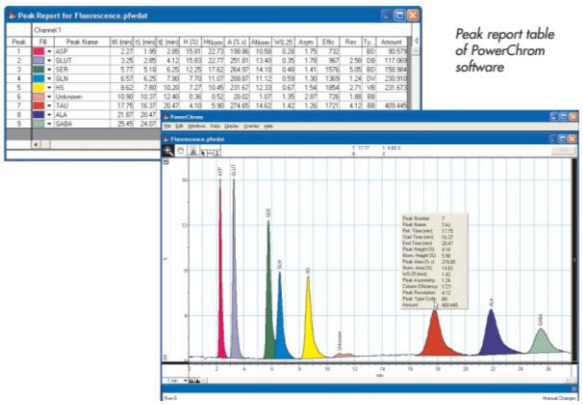
Slika 11. Shematski prikaz C^4D detektora: a) prenošenje signala između odašiljačke i osjetne elektrode, b) dobiveni signal na elektrodi, c) amplituda primljenog signala izmjenične struje nakon pretvaranja u signal istosmjerne struje [27].

Odašiljačka i osjetna elektroda nalaze se pri kraju separacijskog kanala i smještene su izvan mikročipa, odvojene od elektrolita. Detektor primjenjuje visokofrekventnu izmjeničnu struju na odašiljačku elektrodu (engl. *transmitter*). Signal je potom kapacitivno spregnut u elektrolit, a nakon prolaska kapacitivno se spreže u drugu elektrodu, pri čemu se odgovarajući slabi signal izmjenične struje očitava na osjetnoj (engl. *receiver*) elektrodi. Veličina primljenog signala ovisi o električnoj vodljivosti uzorka [28].

ER225 C^4D Data sustav je dizajniran za korištenje zajedno s eDAQ softverskim paketom, što uključuje PowerChrom softver za prikupljanje i analizu podataka (Slike 12. i 13.).



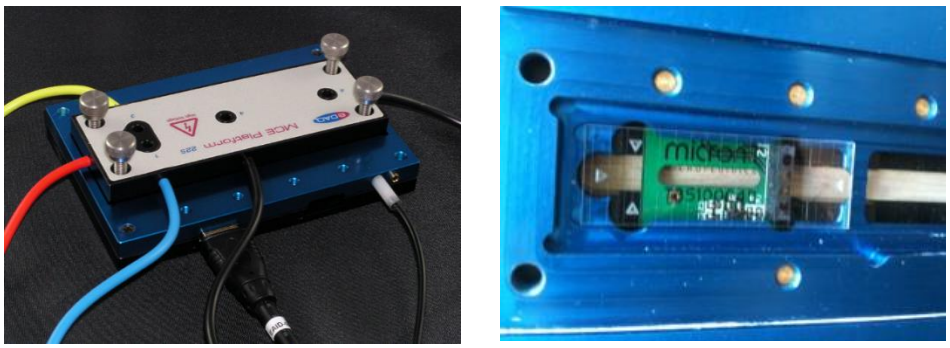
Slika 12. C^4D detekcijski sustav [32].



Slika 13. Primjer prikazivanja podataka obrađenih računalnim programom PowerCrom [31].

3.1.3. Platforma mikročipa (Micronit ET225)

Platforma uređaja dizajnirana je za elektroforezu na mikročipu s kapacitivno spregnutim bezkontaktnim detektorom provodnosti (engl. *microchip electrophoresis with capacitively-coupled contactless conductivity detection, MCE-C^{4}D).* S gornje strane ima četiri otvora kroz koje se ubrizgava pomoćni elektrolit i uzorak u mikročip. Svaki otvor je kabelom povezan na izvor visokog napona (Slika 14.).

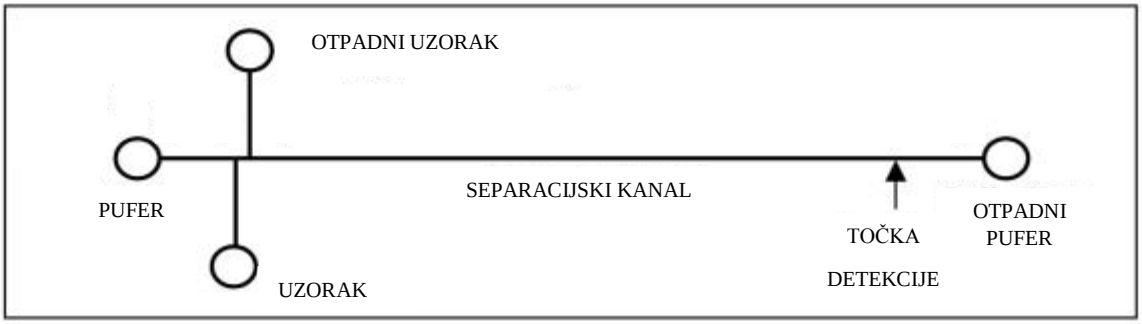


Slika 14. a) Platforma mikročipa, b) Unutrašnjost platforme s mikročipom [33].

Poklopac platforme sadrži visokonaponske elektrode za uvođenje i separaciju uzorka te pet različito obojenih kabela sa SHV konektorima (engl. *safe high voltage*) kojima je uređaj spojen na izvor visokog napona i na detektor.

3.1.4. Mikročip

Odabir materijala za izradu mikročipa utječe na učinkovitost separacije specija. Prvotno su u izradi mikročipova korišteni staklo, silicij i kvarc. Kasnije u upotrebu ulaze i drugi materijali koji su pokazali veliku prednost u odnosu na staklo zbog ekonomske prihvatljivosti i lakše izrade te se ubrzo na tržištu pojavljuju mikročipovi izrađeni od raznih polimera: PDMS (polidimetilsiloksan), PMMA (polimetil-metakrilat), PC (polikarbonat) i PET (poli(etilen-tereftalat)). Osim navedenih, koristi se još i materijale bazirane na cikličkim olefinskim polimerima kao što je Zeonex/Zeonar, i termoplastičnim olefinskim polimerima amorfne strukture (TOPAS, engl. *Thermoplastic Olefin Polymer of Amorphous Structure*). Na slici 15. može se vidjeti shematski prikaz mikročipa kakav se koristi u elektroforezi.



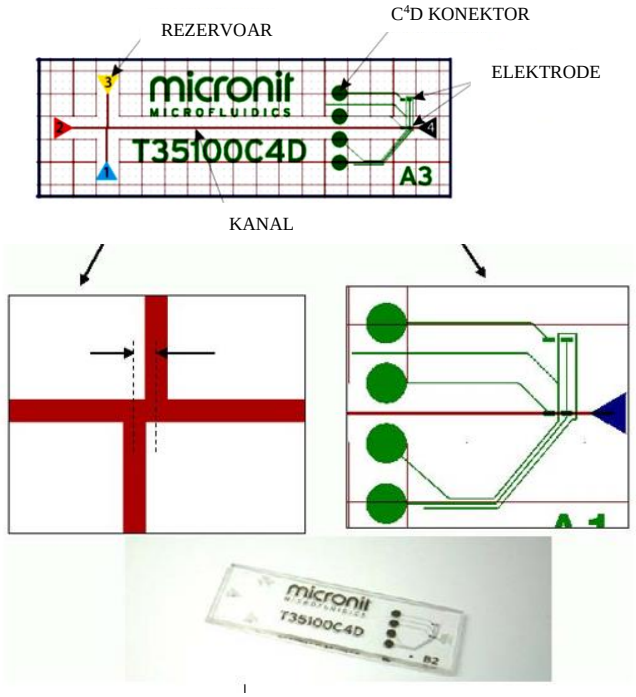
Slika 15. Shematski prikaz mikročipa [30].

Mikročip se sastoji od križno raspoređenih mikrokanala, od kojih je jedan produljen i u njemu se odvija proces separacije (Slika 10.). Njihove uobičajene dimenzije su: dubina 15-50 μm, širina 50-200 μm, a duljina separacijskog kanala 1-10 cm. Na kraju svakog kanala nalaze se rezervoari za tekućinu. Dva rezervoara služe za injektiranje uzorka koje se odvija elektrokinetički, puštanjem električnog polja duž kanala kroz uzorak, i BGE, a druga dva rezervoara služe za otpadnu tekućinu. Na kraju separacijskog kanala nalaze se elektrode od plemenitih metala na kojima se odvija detekcija signala. Injektiranje uzorka i separacija specija kontrolirani su visokim naponom

MCE-C^4D uređaj je dizajniran za mikročipove duljine 45 i 90 mm (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska). Mikročipovi koje koristimo u elektroforetskim mjerenjima su načinjeni od borosilikatnog stakla, dimenzija 15,0x45,0 ± 0,3 mm (wxh) debljine 1,1 mm ± 0,05 mm. Dimenzije mikrokanala su:

- Širina: 100 ± 5 μm
- Dubina: 10,0 ± 0,5 μm
- Duljina kanala: 40 mm [32]

Elektrode su otisnute pri kraju separacijskog kanala, a čini ih sloj platine i tantala debljine 200 nm, širine 200 μm i duljine 500 μm. Mikročip sadrži četiri točke za električni kontakt sa C^4D detekcijskim krugom. Dva kontakta se koriste kao ekscitacijska i osjetna elektroda dok ostala dva služe kao referentne elektrode. Mikročip korišten u elektroforetskim mjerenjima prikazan je na slici 16.



Slika 16. Mikročip korišten u elektroforetskim mjerenjima [34].

3.2. OSTALI PRIBOR

Za pripremu standardnih otopina kationa i otopine BGE koje su upotrijebljene u ispitivanjima koristilo se:

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga Kern, ABT 120 4M je korištena za pripremu standardnih otopina aminokiselina i otopina pufera koje su upotrijebljene u ispitivanjima (Slika 17.).



Slika 17. Prikaz vage korištene u pripremanju uzoraka.

3.2.2. Pipete

Pipete Hirschmann, Labopette, volumena 10-100 µL te volumena 100-1000 µL su korištene za pripremanje uzoraka i uzimanje uzoraka za analizu (Slika 18.)



Slika 18. Prikaz korištenih pipeta.

3.2.3. Ultrazvučna kupelj (Slika 19.)

UZV kupelj (Badelin RK-100, Germany) je korištena za uklanjanje plinova u pripremljenim otopinama. Rad kupke baziran je na ultrazvučnim vibracijama koje imaju sposobnost prenošenja velike količine energije putem ultrazvuka (Slika 19.).



Slika 19. UZV kupelj korištena u ispitivanjima.

3.2.4. Aparat za ultra čistu vodu

Za pripremanje i razrjeđivanje otopina kationa i pripremu otopine pufera korištena je voda visoke čistoće, elektrovodljivosti 0,067-0,10 μS/cm. Voda visoke čistoće dobiva se iz neobrađene, vodovodne vode, a pročišćuje u uređaju prikazanom na slici 20.



Slika 20. Aparat za ultra čistu vodu.

3.3. POPIS KORIŠTENIH KEMIKALIJA

Za pripremanje otopina uzoraka i otopine BGE korištene su sljedeće kemikalije:

- LiAc
- Na_2SO_4
- KNO_3
- $MgCl_2$
- $CaCl_2$
- HAc (konc.)
- NaOH

Za prethodno obrađivanje čipa korištena je 0,5 M otopina NaOH, a otopina 0,5 M HAc je korištena kao pomoćni elektrolit (BGE). Sve korištene kemikalije su analitičke čistoće. Pripremljene otopine su filtrirane kroz filtere za špricu od regenerirane celuloze s dijametrom pora 0,22 μm (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka) i stavljene u ultrazvučnu kupelj (5 min). Prije analize uzorci ruske flaširane vode su razrijeđeni u omjeru 1:2 (v:v).

3.4. PRIPREMA OTOPINA

3.4.1. Priprema otopine BGE koncentracije 0,5 M

Otpipetirati 2,87 mL koncentrirane octene kiseline (HAc) u volumetrijsku tikvicu od 100 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode, a zatim nadopuniti ultra čistom vodom do oznake. Ovako pripremljen pufer ima pH vrijednost 2,5 ± 0,1.

3.4.2. Priprema otopine NaOH koncentracije 0,5 M

Odvagati 0,5 g krutog NaOH, kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 25 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode. Zatim tikvicu nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.3. Priprema otopina LiAc

Priprema otopine LiAc koncentracije 10^{-2} M

Odvagati 0,06599 grama LiAc, kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode. Zatim tikvicu nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine LiAc koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati 0,1 mL priređene otopine LiAc koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine LiAc koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati 0,01 mL priređene otopine LiAc koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.4. Priprema otopina Na_2SO_4

Priprema otopina Na_2SO_4 koncentracije 10^{-2} M

Odvagati 0,14204 grama Na_2SO_4 i kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode. Tikvicu nadopuniti do oznake.

Priprema otopine Na_2SO_4 koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati 0,1 mL priređene otopine Na_2SO_4 koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine Na_2SO_4 koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati 0,01 mL priređene otopine Na_2SO_4 koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode i potom nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.5. Priprema otopina KNO_3

Priprema otopine KNO_3 koncentracije 10^{-2} M

Odvagati 0,1011 grama KNO_3, kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 100 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine KNO_3 koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati 0,1 mL priređene otopine KNO_3 koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine KNO_3 koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati 0,01 mL priređene otopine KNO_3 koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.6. Priprema otopina $MgCl_2$

Priprema otopine $MgCl_2$ koncentracije 10^{-2} M

Odvagati 0,047606 grama $MgCl_2$, kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine $MgCl_2$ koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati 0,1 mL priređene otopine $MgCl_2$ koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine $MgCl_2$ koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati 0,01 mL priređene otopine $MgCl_2$ koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.7. Priprema otopina $CaCl_2$

Priprema otopine $CaCl_2$ koncentracije 10^{-2} M

Odvagati 0,05549 grama $CaCl_2$, kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i otopiti u malom volumenu ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine $CaCl_2$ koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati 0,1 mL priređene otopine $CaCl_2$ koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

Priprema otopine $CaCl_2$ koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati 0,01 mL priređene otopine $CaCl_2$ koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL u koju je dodana mala količina ultra čiste vode te nadopuniti ultra čistom vodom do oznake.

3.4.8. Priprema otopina smjese kationa Li^+, K^+ i Na^+

Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+ i Na^+ koncentracije 10^{-4} M

Otpipetirati po 0,1 mL svake otopine kationa (Li^+, K^+ i Na^+) koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL te do oznake dopuniti ultra čistom vodom.

Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+ i Na^+ koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati po 0,01 mL svake otopine kationa (Li^+, K^+ i Na^+) koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL te do oznake dopuniti ultra čistom vodom.

3.4.9. Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+, Na^+ i Mg^{2+} koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati po 0,01 mL svake otopine kationa (Li^+, K^+, Na^+ i Mg^{2+}) koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL te do oznake dopuniti ultra čistom vodom.

3.4.10. Priprema otopine smjese kationa Li^+, K^+, Na^+ i Ca^{2+} koncentracije 10^{-5} M

Otpipetirati po 0,01 mL svake otopine kationa (Li^+, K^+, Na^+ i Ca^{2+}) koncentracije 10^{-2} M u volumetrijsku tikvicu od 10 mL te do oznake dopuniti ultra čistom vodom.

3.5. POSTUPAK MJERENJA

Prije upotrebe mikročip se prethodno obradi s NaOH (0,5 M). Nakon toga se mikrokanali elektrokinetički pripreme s BGE 10 min te potom ispiru s otopinom BGE dok se bazna linija ne stabilizira. Prije mjerenja i između svake serije mjerenja injekcijski i separacijski mikrokanal se ispiru profiltriranom ultra čistom vodom, a zatim s otopinom BGE. Stabilnost mjernog uređaja, propusnost kapilara mikročipa i električna vodljivost BGE testira se prije početka svake nove serije mjerenja snimanjem bazne linije. Napon injektiranja od +0,70 kV u trajanju od 12 sekundi korišten je za elektrokinetičko injektiranje uzorka. Za separiranje komponenata uzorka korišten je napon od +1,40 kV u trajanju 120 s. U rezervoar mikročipa za uzorak dodaje se 50 μL otopine uzorka, a u ostala tri rezervoara 50 μL otopine BGE i potom se uključuje mjerenje.

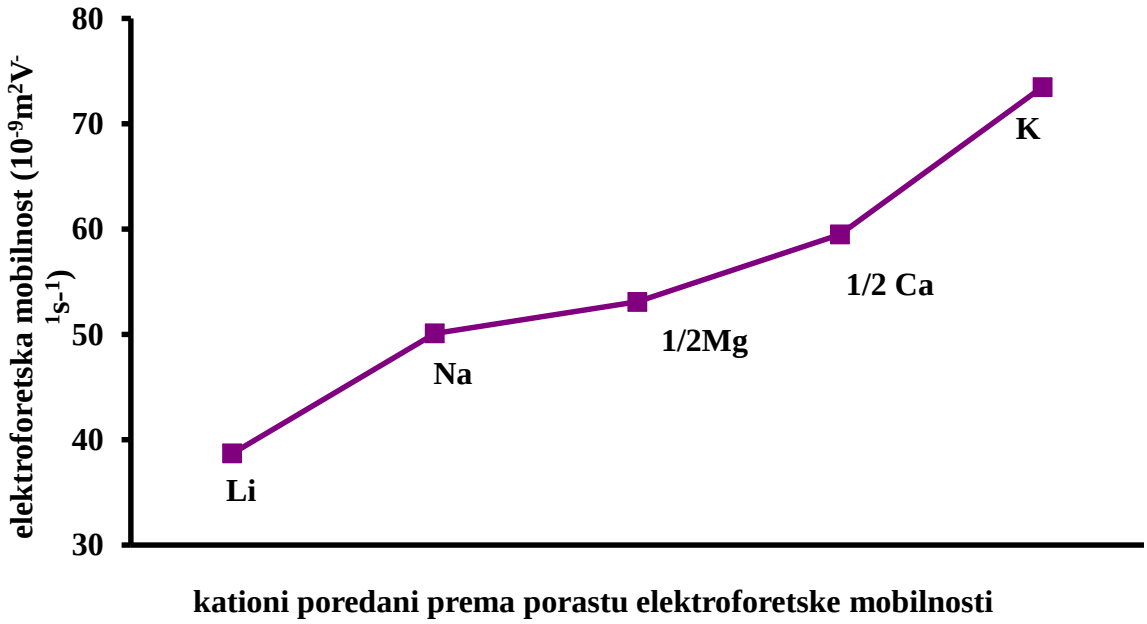
Posebno se provodi elektroforeza otopine samog BGE, potom uzorka, a po potrebi primjenjuje se i metoda poznatog dodatka.

Na kraju radnog dana injekcijsku i separacijsku kapilaru mikročipa ispire se profiltriranom ultra čistom vodom.

4. Rezulati i rasprava

4.1. Elektroforetska mobilnost

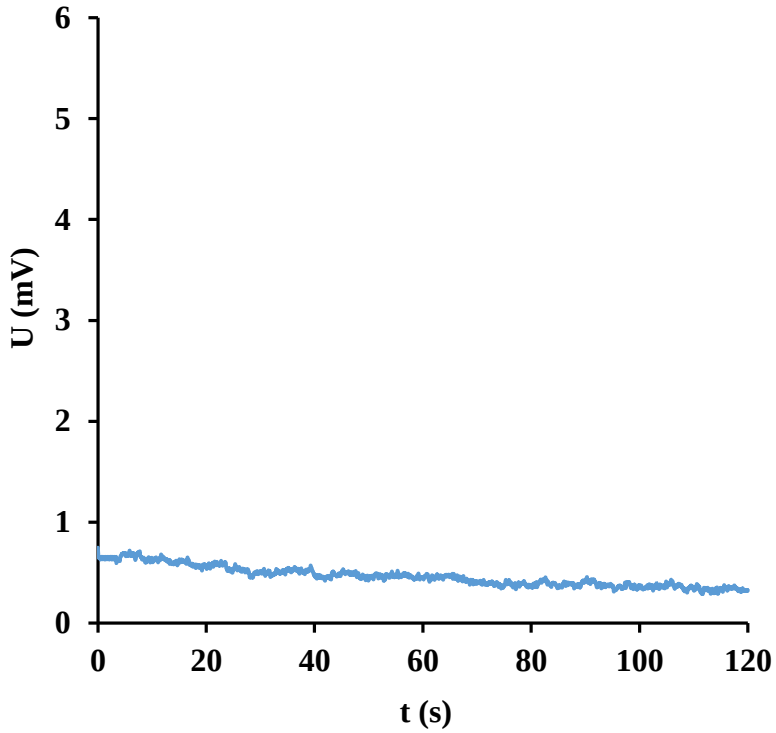
MCE je jednostavna tehnika visoke rezolucije koja razdvaja nabijene specije na temelju njihove relativne elektroforetske mobilnosti pod utjecajem primijenjenog električnog polja. Kod određivanja kationa, elektroda pozitivnog polariteta se nalazi na injekcijskoj strani mikročipa. Pod tim uvjetima migracijski slijed je takav da kation s najvišom pozitivnom elektroforetskom mobilnošću migrira prvi, a kation sa najnižom pozitivnom elektroforetskom mobilnošću migrira zadnji (Slika 21.). Što su bliže vrijednosti elektroforetskih mobilnosti određenih specija to je njihovo separiranje teže postići.



Slika 21. Elektroforetska mobilnost nekih alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa.

4.2. Bazna linija

Stabilnost mjernog uređaja, propusnost kapilara mikročipa, električna vodljivost pufera/pomoćnog elektrolita testira se prije početka svake nove serije mjerenja. Elektroferogram čiste otopine BGE koji ujedno predstavlja i baznu liniju mjerenja, prikazan je na slici 22.

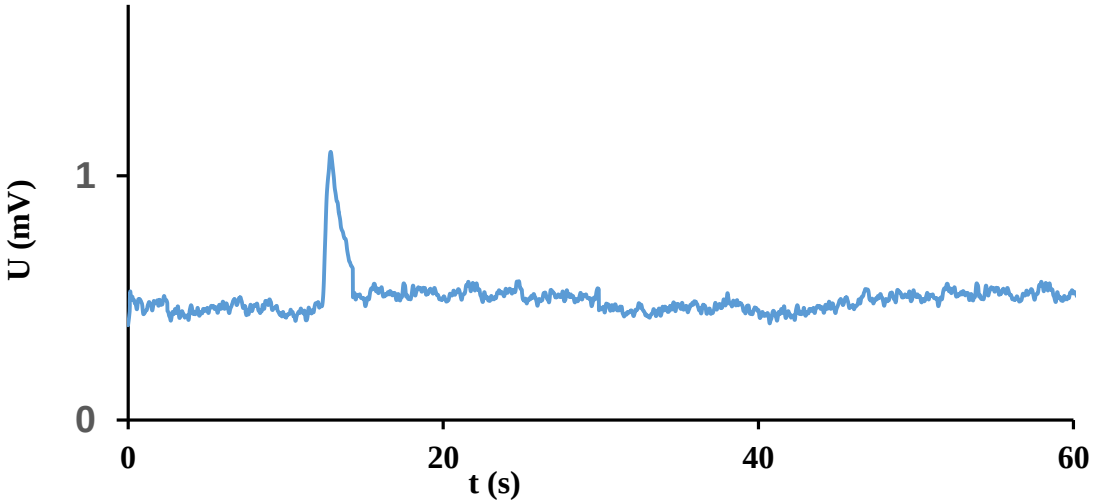


Slika 22. Elektroferogram otopine pufera, 0,5 M octena kiselina, pH = 2,5.

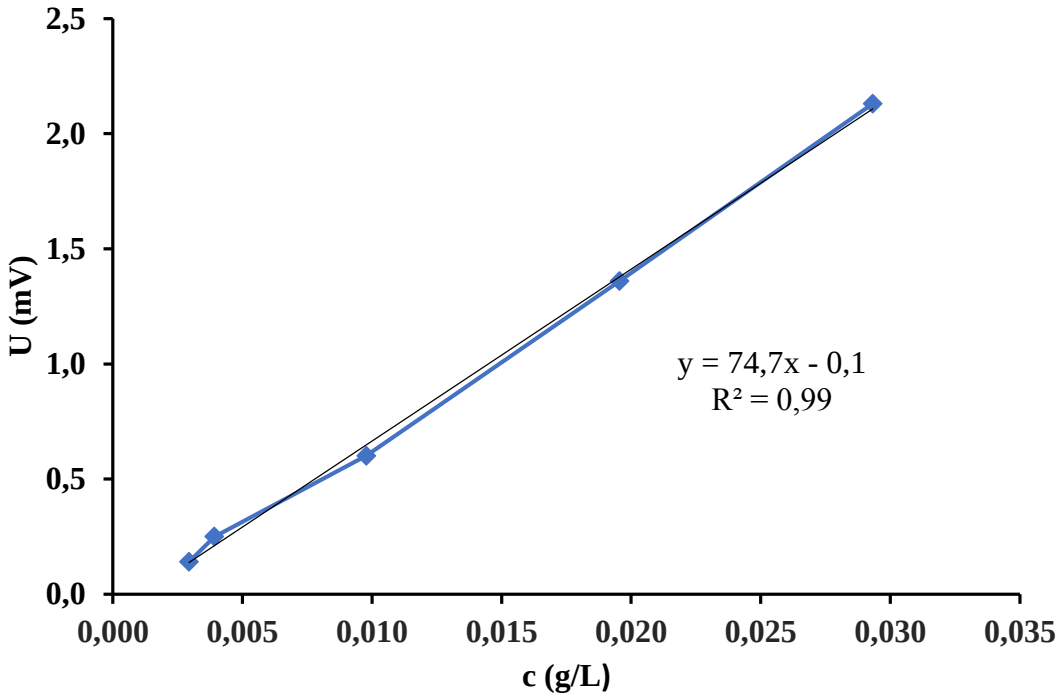
Pravilna bazna linija elektroferograma čistog BGE (Slika 22.) bez dodatnih interferirajućih pikova, ukazuje na njegovu analitičku podobnost za sva ispitivanja i mjerenja. Nestabilnost signala se očituje u mijenjanju napona s vremenom, što vjerojatno posljedica postupnog zagrijavanja pomoćnog elektrolita, rezultirajući promjenom njegovih električnih i reoloških osobina. Pomak signala prikazan na slici 22. prihvatljiv je za elektroforetska ispitivanja, s obzirom da sustav nije termostatiran.

4.3. Baždardni pravac za kalij

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za kalij u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M. Elektroferogram kalija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} M, prikazan je na slici 23.



Slika 23. Elektroferogram kalija (c = 2,5 x 10^{-4} M) u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



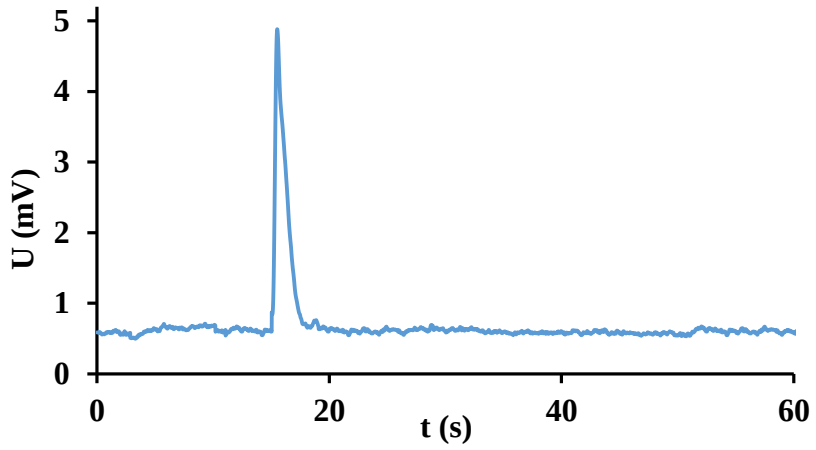
Slika 24. Baždarni pravac za kalij u 0,5 M octenoj kiselini.

Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 13 sekundi pripada kaliju pri pH = 2,5. Elektroferogrami otopine kalija ispoljavaju jasno izražen, dobro definiran i pravilan0 pozitivan pik, koji služi za kvantifikaciju kalija.

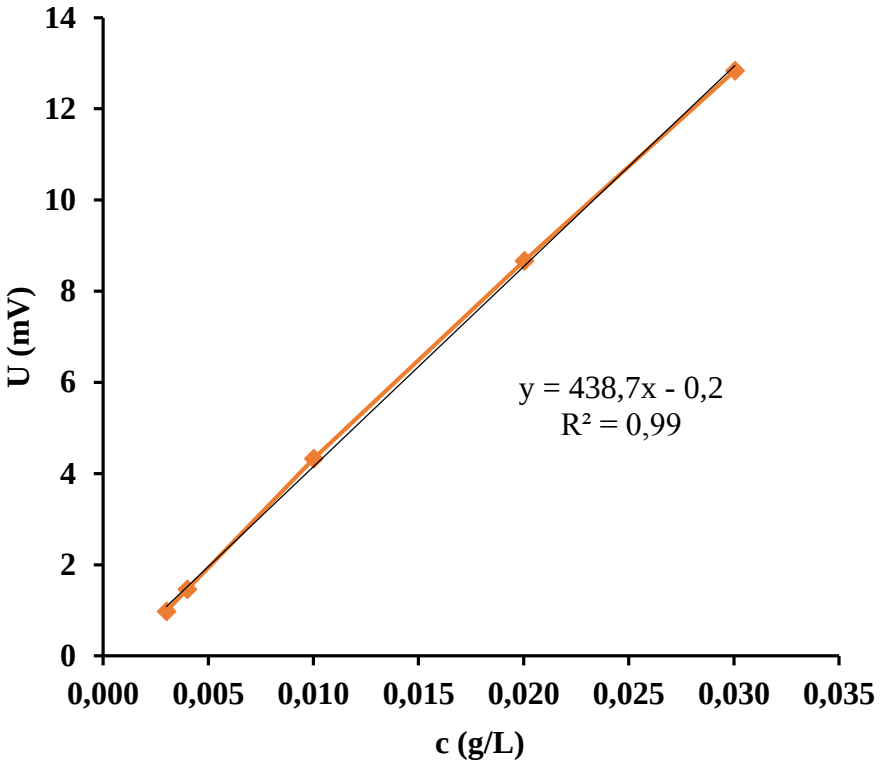
Baždarni pravac za kalij je prikazan na slici 24. Prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije kalija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99) (R^2 - koeficijent determinacije engl. *coefficient of determination*). Područje linearnog odziva je 7,5 x 10^{-5} M – 7,5 x 10^{-4} M (0,00293 – 0,0293 g/L).

4.4. Baždardni pravac za kalcij

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za kalcij u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M. Elektroferogram kalcija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} M, prikazan je na slici 25.



Slika 25. Elektroferogram kalcija (c = 2,5 x 10^{-4} M) u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



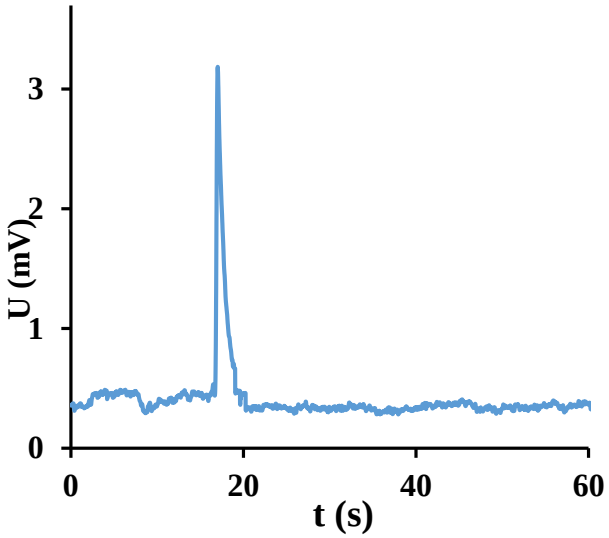
Slika 26. Baždarni pravac za kalcij u 0,5 M octenoj kiselini.

Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 15 sekundi pripada kalciju pri pH = 2,5. Elektroferogram otopine kalcija ispoljava jasno izražen, dobro definiran i pravilan pozitivan pik, koji služi za kvantifikaciju kalcija.

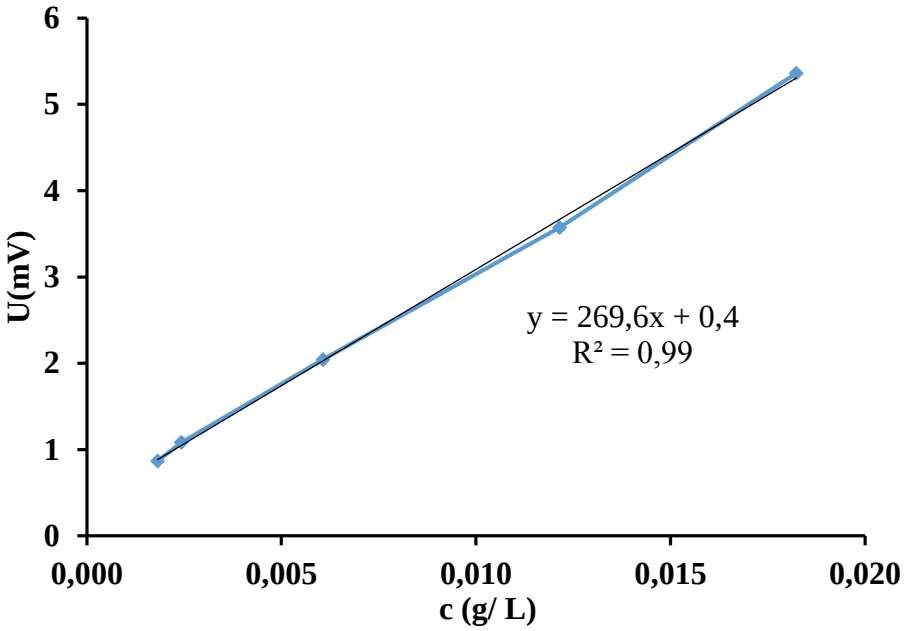
Baždarni pravac za kalcij je prikazan na slici 26. Prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije kalcija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Područje linearnog odziva je $7,5 \times 10^{-5}$ M – $7,5 \times 10^{-4}$ M (0,00301 – 0,03006 g/L).

4.5. Baždardni pravac za magnezij

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za magnezij u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M. Elektroferogram magnezija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} M, prikazan je na slici 27.



Slika 27. Elektroferogram magnezija (c = 2,5 x 10^{-4} M) u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



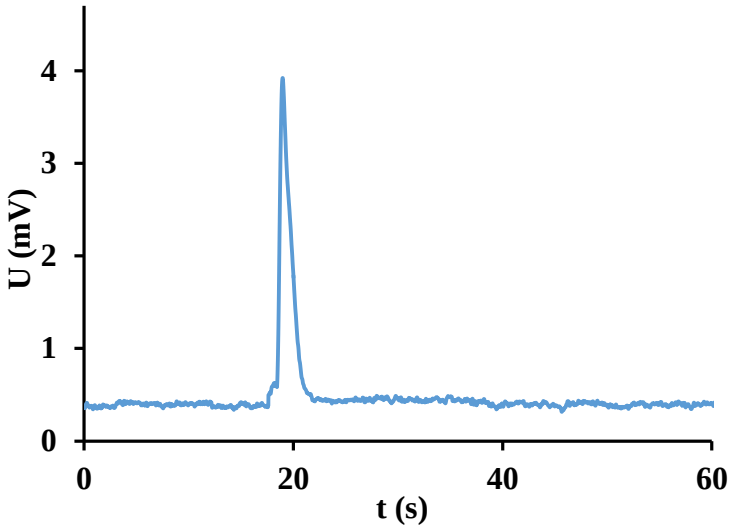
Slika 28. Baždarni pravac za magnezij u 0,5 M octenoj kiselini.

Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 17 sekundi pripada magneziju pri pH = 2,5. Elektroferogram otopine magnezija ispoljava jasno izražen, dobro definiran i pravilan pozitivan pik, koji služi za kvantifikaciju magnezija.

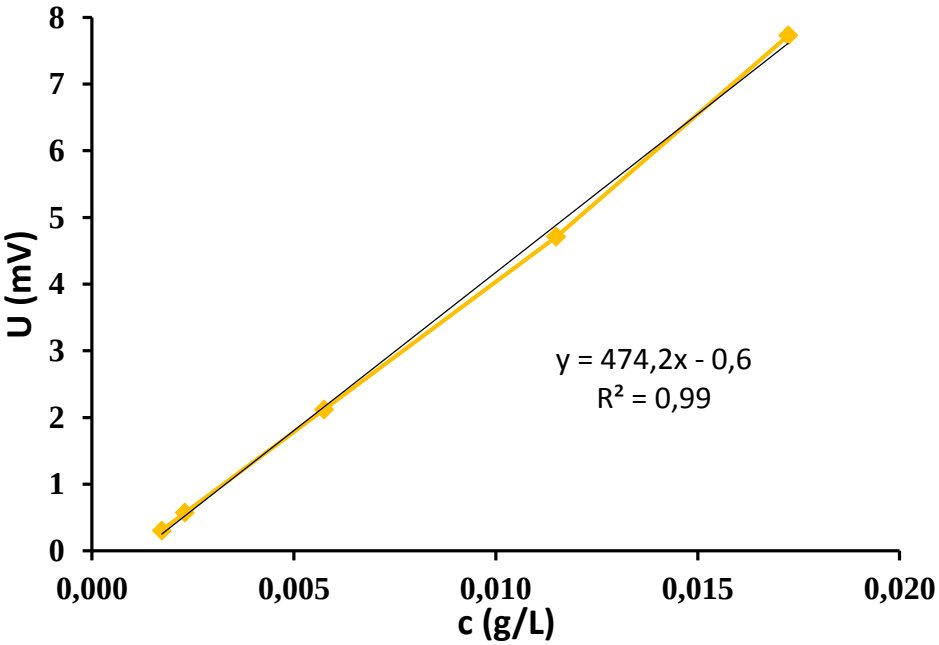
Baždarni pravac za magnezij je prikazan na slici 28. Prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije magnezija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Područje linearnog odziva je 7,5 x 10^{-5} M – 7,5 x 10^{-4} M (0,00182 – 0,01823 g/L).

4.6. Baždardni pravac za natrij

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za natrij u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M. Elektroferogram natrija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} M, prikazan je na slici 29.



Slika 29. Elektroferogram natrija (c = 2,5 x 10^{-4} M) u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



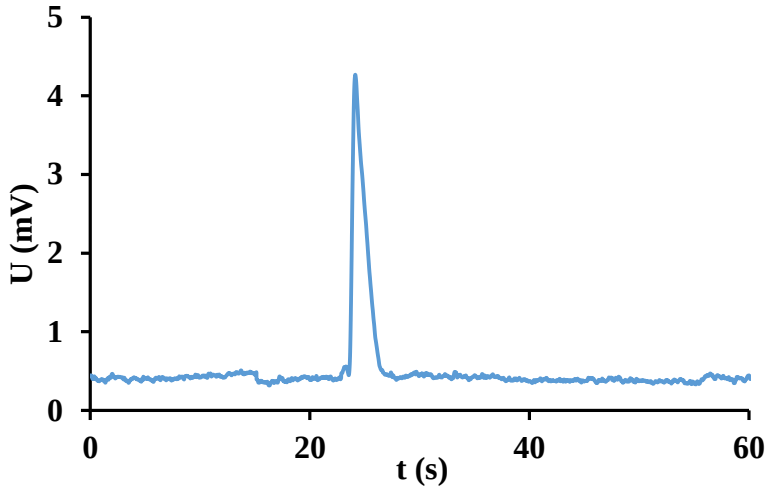
Slika 30. Baždarni pravac za natrij u 0,5 M octenoj kiselini.

Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 19 sekundi pripada natriju pri pH = 2,5. Elektroferogram otopine natrija ispoljava jasno izražen, dobro definiran i pravilan pozitivan pik, koji služi za kvantifikaciju natrija.

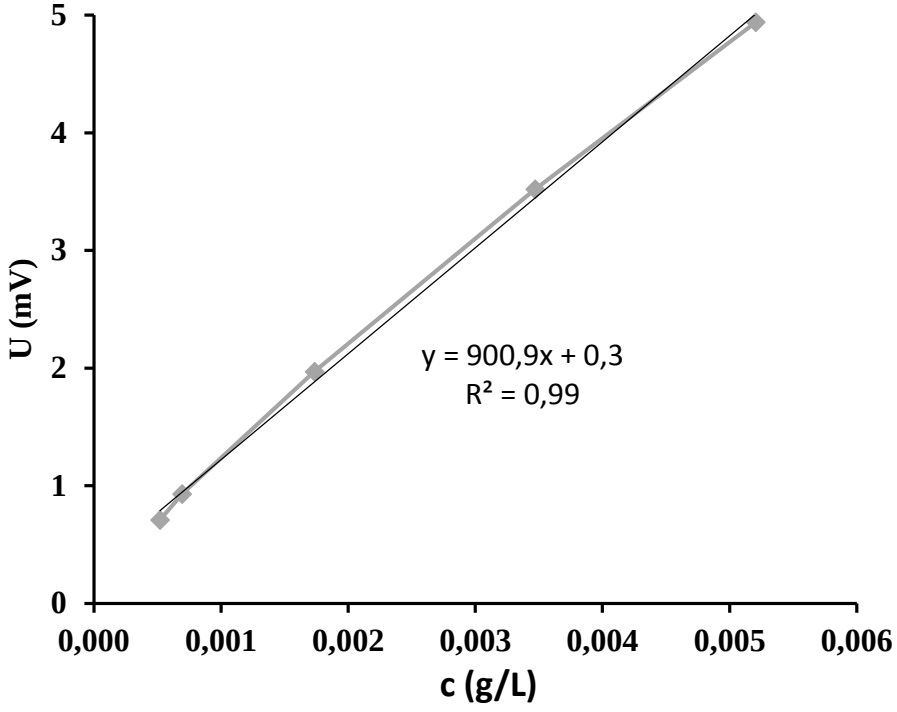
Baždarni pravac za natrij je prikazan na slici 28. Prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije natrija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Područje linearnog odziva je $7,5 \times 10^{-5}$ M – $7,5 \times 10^{-4}$ M (0,00172 – 0,01724 g/L).

4.7. Baždardni pravac za litij

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za litij u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M. Elektroferogram litija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} M, prikazan je na slici 31.



Slika 31. Elektroferogram litija (c = 2,5 x 10^{-4} M) u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).



Slika 32. Baždarni pravac za litij u 0,5 M octenoj kiselini.

Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 24 sekundi pripada litiju pri pH = 2,5. Elektroferogram otopine litija ispoljava jasno izražen, dobro definiran i pravilan pozitivan pik, koji služi za kvantifikaciju litija.

Baždarni pravac za litij je prikazan na slici 32. Prisutna je jaka linearna zavisnost između koncentracije litija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Područje linearnog odziva je $7,5 \times 10^{-5}$ M – $7,5 \times 10^{-4}$ M (0,00052 – 0,00521 g/L).

U Tablici 10. su prikazani parametri pravca regresije odziva C^4D detektora. Navedene su srednje vrijednosti (N = 5) u područjima koncentracija kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija.

Tablica 10. Parametri pravca regresije odziva C^4D detektora u području koncentracija kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija $7,5 \times 10^{-5}$ M – $7,5 \times 10^{-4}$ M (BGE: HAc).

Kation	Vrijeme zadržavanja (s)	Jednadžba regresije	R^2	Područje linearnog odziva (M)	Područje linearnog odziva (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Kalij	12,75	y = 74,7x – 0,1	0,99	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-4}$	2,93 – 29,32	53,0	17,8
Kalcij	15,25	y = 438,7x – 0,2	0,99	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-4}$	3,01 – 30,06	70,0	23,3
Magnezij	17,36	y = 269,6x + 0,4	0,99	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-4}$	1,82 – 18,23	10,6	35,5
Natrij	19,24	y = 474,2x – 0,6	0,99	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-4}$	1,72 – 17,24	71,0	23,7
Litij	24,35	y = 900,9x + 0,3	0,99	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-4}$	0,52 – 5,21	69,0	22,9

LEGENDA

R^2 = koeficijent determinacije (engl. *coefficient of determination*)

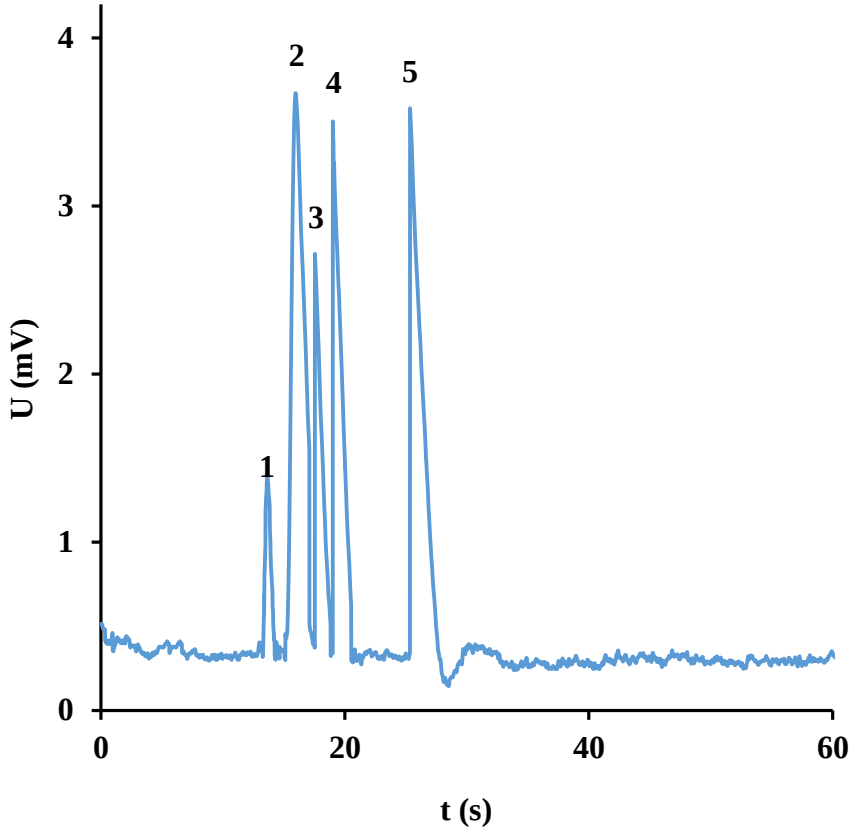
LOD = limit detekcije (engl. *limit of detection*)

LOQ = limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification)*

Iz Tablice 10. vidljivo je da najveću osjetljivost prema C^4D detektoru pokazuju određivani kationi u sljedećem nizu: litij > kalcij > natrij > magnezij > kalij. Kalij pokazuje znatno nižu osjetljivost prema C^4D detektoru od ostalih određivanih kationa. Naime, vrijednosti nagiba pravca srazmjerne su s osjetljivošću mjerenja: viši nagib pravca regresije znači i veću osjetljivost. S druge strane, veći koeficijent determinacije (R^2) ukazuje na jaču linearnu ovisnost mjerenja.

4.8. Baždardni pravac za smjesu kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija

Preliminarna ispitivanja pokazuju linearni odziv C^4D detektora za smjesu kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u području od 7,5 x 10^{-5} M do 7,5 x 10^{-4} M u odnosu na kalij, kalcij, magnezij, natrij i litij. Elektroferogram smjese kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija za koncentraciju 2,5 x 10^{-4} u odnosu na kalij, kalcij, magnezij, natrij i litij prikazan je na slici 33.

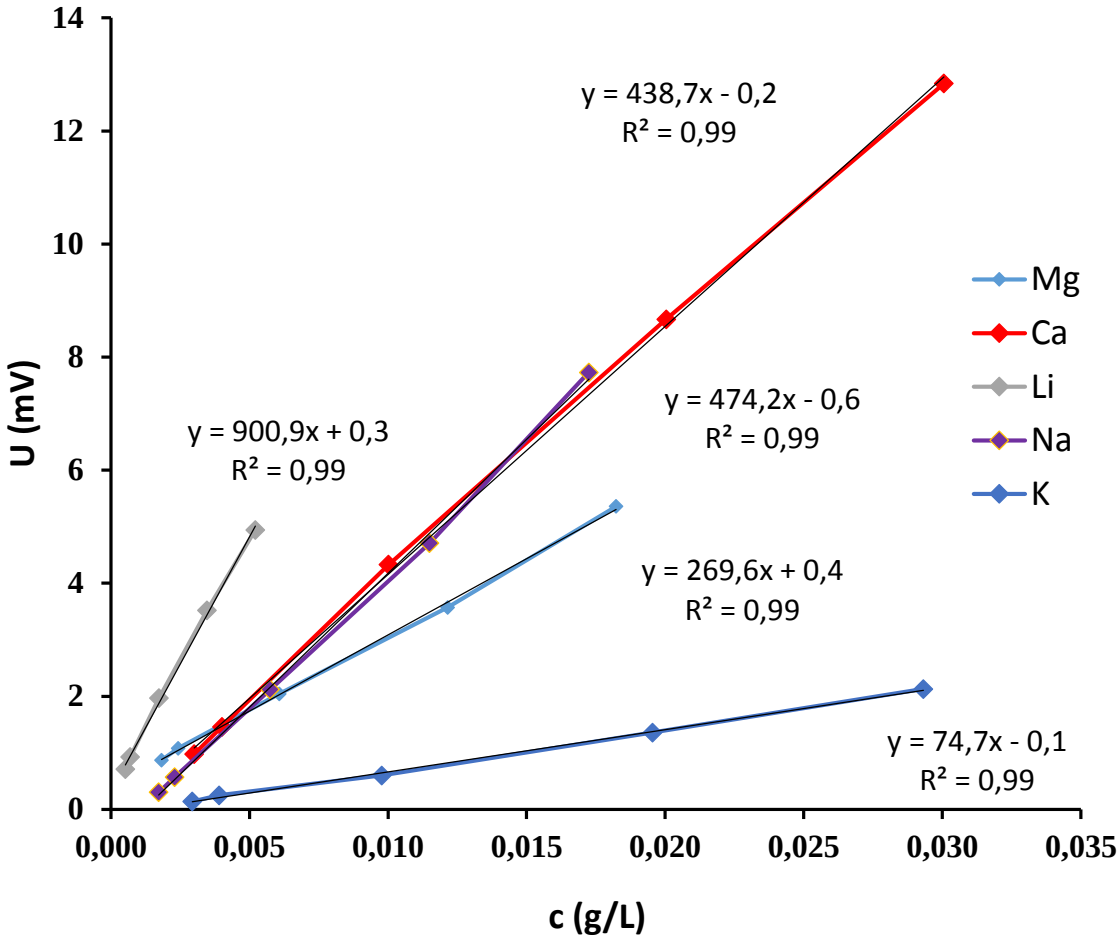


Slika 33. Elektroferogram smjese kalija (1), kalcija (2), magnezija (3), natrija (4) i litija (5) c = 2,5 x 10^{-4} M u odnosu na kalij, kalcij, magnezij, natrij i litij, u 0,5 M octenoj kiselini (pH = 2,5).

Na elektroferogramu je prisutno nekoliko pikova. Pik koji odgovara retencijskom vremenu od 13 sekundi pripada kaliju, pik koji odgovara retencijskom vremenu od 16 sekundi pripada kalciju, pik koji odgovara retencijskom vremenu od 17,5 sekundi pripada magneziju, pik koji odgovara retencijskom vremenu od 19 sekundi pripada natriju, dok pik koji odgovara retencijskom vremenu od 25 sekundi pripada litiju, pri pH = 2,5.

Elektroferogram smjese kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija ispoljava pet jasno izraženih, oštrih, dobro definiranih, dobro separiranih i pravilnih pozitivnih pikova, koji služe za kvantifikaciju kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija.

Baždarni pravac za smjesu kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija je prikazan na slici 34.



Slika 34. Kalibracijski graf za smjesu kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u 0,5 M octenoj kiselini.

U smjesi je moguća kvantifikacija svih navedenih kationa sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije. Kao što je prikazano na slici 33., prisutna je jaka linearna povezanost između koncentracije kalija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Prisutna je i zadovoljavajuća linearna povezanost između koncentracije kalcija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Prisutna je i zadovoljavajuća linearna povezanost između koncentracije magnezija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Prisutna je i zadovoljavajuća linearna

povezanost između koncentracije natrija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Također, prisutna je i linearna povezanost između koncentracije litija i odgovarajućih visina pikova (R^2 = 0,99). Parametri linearne regresijske linije za svih pet ispitivanih kationa su prikazani na slici 34. Područje linearnog odziva je 7,5 x 10^{-5} M 7,5 x 10^{-4} M.

Parametri regresijske analize za pojedinačno određivanje kationa: kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u smjesi navedeni su u tablici 12.

Iz tablice 11 vidljiva je visoka linearna korelacija između visine pikova i koncentracije kalija (R^2 = 0,99), kalcija (R^2 = 0,99), magnezija (R^2 = 0,99), natrija (R^2 = 0,99) i litija (R^2 = 0,99) u smjesi koja sadrži od 2,93 do 29,32 g/L kalija, od 3,01 do 30,06 g/L kalcija, od 1,82 do 18,23 g/L magnezija, od 1,72 do 17,24 g/L natrija i od 0,52 do 5,21 g/L litija, tj. od 7,5 x 10^{-5} do 7,5 x 10^{-4} M navedenih kationa.

Razlika u vremenima zadržavanja iznosi približno 1,5 s i dovoljna je za kvantitativnu separaciju navedenih kationa u smjesi. Zadovoljavajuće visoke vrijednosti nagiba pravca za kalij (72,35), kalcij (441,49), magnezij (265,08), natrij (451,78), i litij (867,62) ukazuju na dovoljno veliku osjetljivost MCE elektroforetskog određivanja određivanih kationa u smjes

Tablica 11. Parametri pravaca regresije za visine pikova smjese kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija (srednje vrijednosti, N = 5) (BGE: 0,5 M HAc).

Kationi	Vrijeme zadržavanja (s)	Jednadžba regresije	R^2	Područje linearnog odziva (M)	Područje linearnog odziva (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Kalij	13,45	y = 72,4x – 0,1	0,99	$7,5 \times 10^{-5} – 7,5 \times 10^{-4}$	2,93 – 29,32	13,9	46,5
Kalcij	16,14	y = 441,5x – 0,2	0,99	$7,5 \times 10^{-5} – 7,5 \times 10^{-4}$	3,01 – 30,06		
Magnezij	17,58	y = 265,1x + 0,3	0,99	$7,5 \times 10^{-5} – 7,5 \times 10^{-4}$	1,82 – 18,23		
Natrij	19,44	y = 451,8x – 0,5	0,99	$7,5 \times 10^{-5} – 7,5 \times 10^{-4}$	1,72 – 17,24		
Litij	25,55	y = 867,6x + 0,3	0,99	$7,5 \times 10^{-5} – 7,5 \times 10^{-4}$	0,52 – 5,21		

LEGENDA

R^2 = koeficijent determinacije (engl. *coefficient of determination*)

LOD = limit detekcije (engl. *limit of detection*)

LOQ = limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification)*

4.9. Određivanje kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija

U tablici 13. prikazani su rezultati određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija pojedinačno, dok je u tablici 14. prikazan sadržaj spomenutih kationa u smjesi.
Točnost rezultata pojedinačnog određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija izraženih kao iskorištenje (engl. *recovery*) testirana metodom poznatog dodatka, kreće se u rasponu od od 89,8 do 107,1%, od 98,2 do 103,4%, od 96,8 do 104,6%, od 99,2 do 103,2%- i od 89,2 do 106,8%, respektivno (na bazi srednjih vrijednosti od 5 mjerenja za svaki nivo koncentracija).

MCE je uspješno primijenjena za separaciju i kvantifikaciju kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u smjesi svih navedenih kationa.

Točnost određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija testirana je na smjesi svih pet kationa i rezultati su prikazani u tablici 13.

Iz tablice 13. vidljivo je da se rezultati za pojedinačno određivanje kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u smjesi kreću u rasponu od 95,6 do 106,3%, 88,4 do 102,2%, 98,7 do 106,0%, 96,6 do 108,0% i 87,0 do 107,2%, respektivno. Rezultati su dobiveni metodom poznatog dodatka na bazi srednjih vrijednosti od 5 mjerenja za svaki nivo koncentracija.

Tablica 12. Rezultati pojedinačnog određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u smjesi (srednje vrijednosti, N = 5) primjenom metode standardnog dodatka.

ANALIZA POJEDINAČNOG ODREĐIVANJA KATIONA														
Kalij			Kalcij			Magnezij			Natrij			Litij		
Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorištenje (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorištenje (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorištenje (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorištenje (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorištenje (%)
2	1,98	99,0	2	2,05	102,5	1,5	1,57	104,6	1,5	1,53	102,0	0,25	0,26	104,0
5	5,21	104,2	5	5,17	103,4	2,5	2,42	96,8	2,5	2,58	103,2	1	0,93	93,0
10	8,98	89,6	10	9,84	98,4	5	5,09	101,8	5	4,97	99,4	2,5	2,23	89,2
15	15,41	102,7	15	15,07	100,5	10	10,12	101,2	10	9,92	99,2	5	5,34	106,8
30	32,14	107,1	30	29,45	98,2	20	19,89	99,5	20	20,07	100,4	10	9,02	90,2

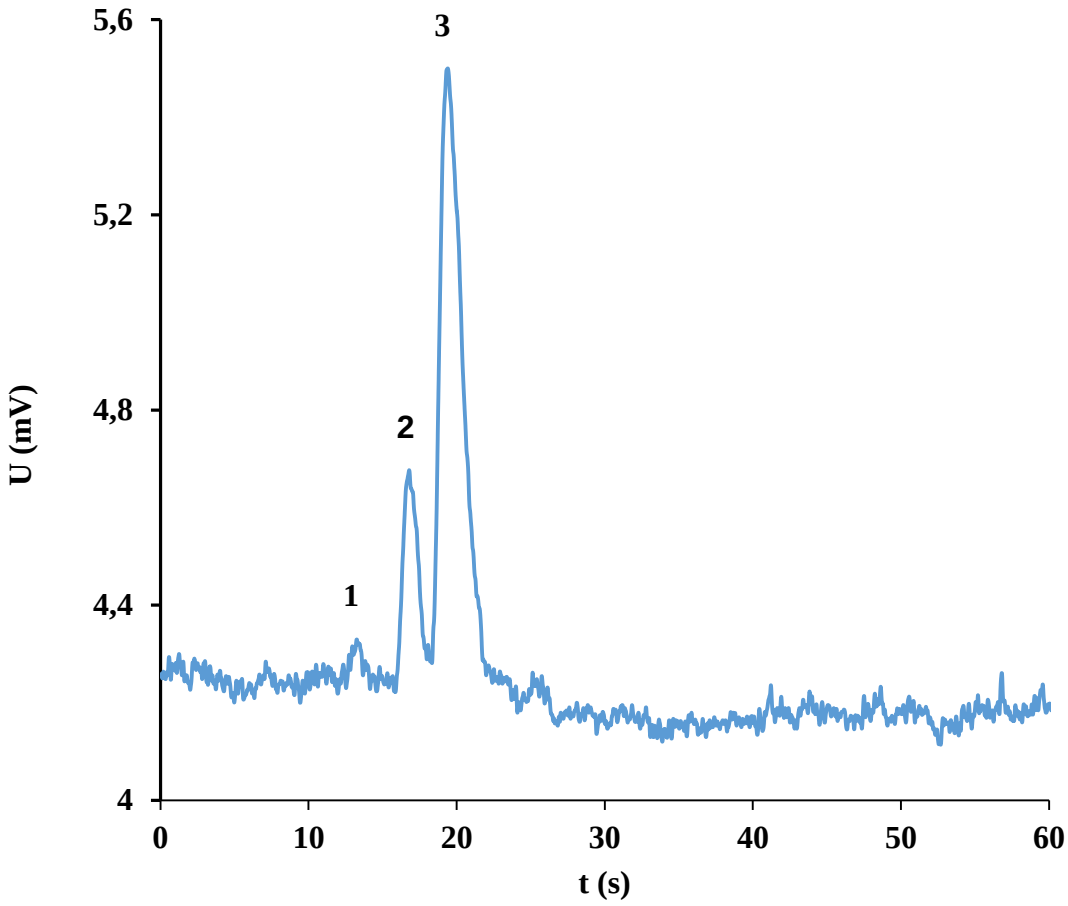
Tablica 13. Rezultati određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija u smjesi (srednje vrijednosti, N = 5) primjenom metode poznatog dodatka.

ANALIZA SMJESE KATIONA														
Kalij			Kalcij		Magnezij			Natrij			Litij			
Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorišten je (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorišten je (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorišten je (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorišten je (%)	Dodano (g/L)	Nađeno (g/L)	Iskorišten je (%)
2	2,07	103,5	2	2,03	101,5	1,5	1,59	106,0	1,5	1,62	108,0	0,25	0,26	104,0
5	5,16	103,2	5	5,11	102,2	2,5	2,59	103,6	2,5	2,07	103,5	1	0,87	87,0
10	9,56	95,6	10	8,84	88,4	5	5,13	102,6	5	4,83	96,6	2,5	2,68	107,2
15	15,31	102,1	15	14,89	99,3	10	9,87	98,7	10	10,13	101,3	5	5,09	101,8
30	31,89	106,3	30	29,75	99,2	20	19,78	98,9	20	22,14	107,0	10	10,23	102,3

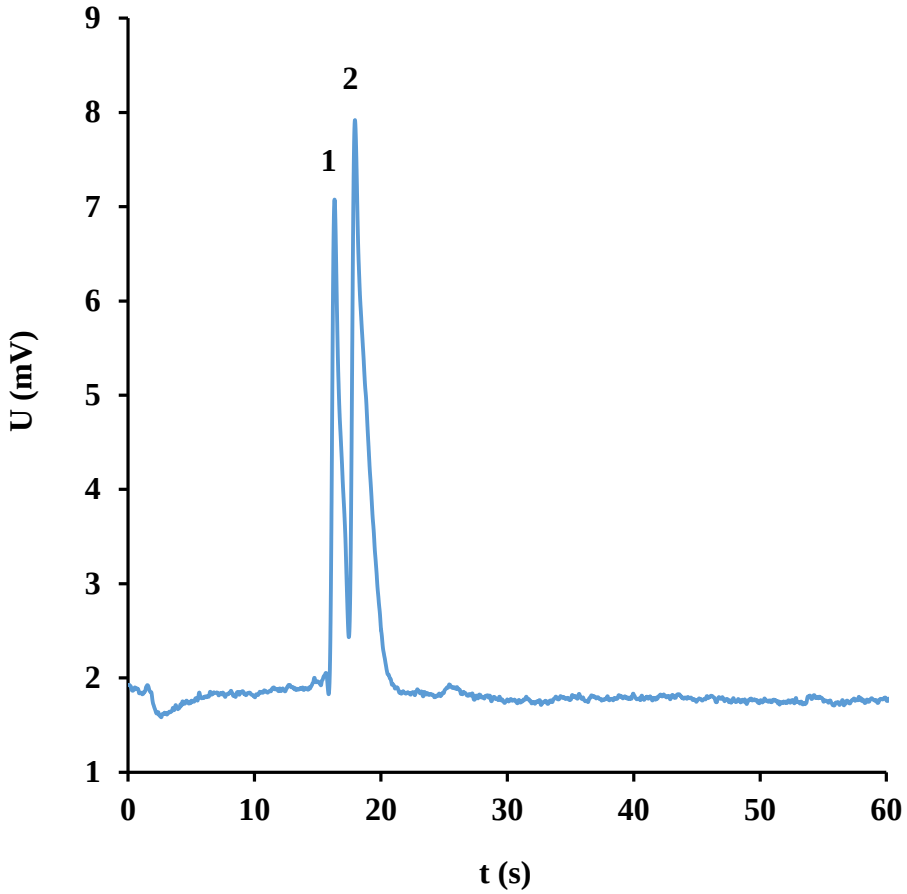
4.10. Određivanje sadržaja alkalijskih i zemnoalkalijskih metala u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu

Analiza kationa u uzorcima prirodnih voda vrlo je zahtjevan zadatak. Glavni problem je složenost kemijskog sastava uzorka voda iz različitog izvora.

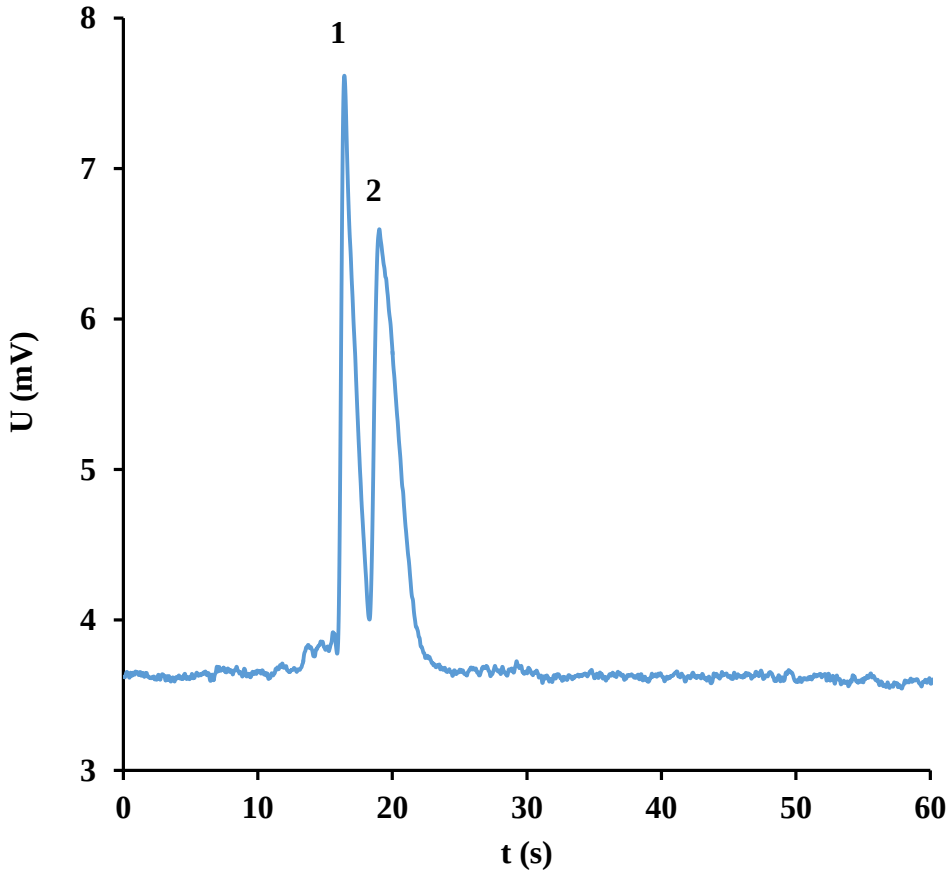
Tipični elektroferogrami uzorka prirodnih voda prikazani su na slikama 35., 36. i 37.



Slika 35. MCE elektroferogram kišnice (Hrvatska, Osijek, travanj 2016.) dobiven u BGE 0.5 M HAc uz primjenu C^4D detekcije. Identifikacija pikova: 1, kalij; 2, kalcij; 3, natrij.



Slika 36. MCE elektroferogram vode iz boce (Rusija) dobiven u BGE 0.5 M HAc uz primjenu C^4D detekcije. Identifikacija pikova: 1, kalcij; 2, natrij.



Slika 37. MCE elektroferogram vode iz slavine (Rusija, St. Petersburg, veljača 2016.) dobiven u BGE 0.5 M HAc uz primjenu C^4D detekcije. Identifikacija pikova: 1, kalcij; 2, magnezij.

Elektroferogram uzorka kišnice (Slika 35.) sadrži pikove kalija, kalcija i natrija, no količina kalija u uzorku je ispod granice kvantifikacije korištene metode.

Elektroferogram uzorka vode iz boce (Slika 36.) sadrži pikove kalcija i natrija, dok elektroferogram vode iz slavine (Slika 37.) sadrži pikove kalcija i magnezija.

Rezultati MCE određivanja koncentracija ispitivanih kationa u uzorcima prirodnih voda s pripadajućom statističkom obradom prikazani su u tablici 15.

Tablica 14. Rezultati MCE određivanja koncentracije ispitivanih kationa u uzorcima prirodnih voda s pripadajućom statističkom obradom (srednje vrijednosti, N = 5) (BGE: 0,5 M HAc).

Uzorak	Kation	X_{sr} (mg/L)	SD(mg/L)	CV (%)	CL (%)
Kišnica	**Ca^{2+}**	0,59	0,04	6,8	5,3
	Na^{+}	0,63	0,09	14,3	12,5
Voda iz slavine	**Ca^{2+}**	9,0	0,6	6,7	5,5
	Na^{+}	5,8	0,4	6,9	5,4
Voda iz boce	**Ca^{2+}**	12,8	0,9	7,0	8,0
	Mg^{2+}	20	2	7,7	8,7

LEGENDA

SD = standardno odstupanje (engl. *standard deviation*)

CV (%)= koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*)

CL = interval pouzdanosti (engl. *confidence limit)*

Rezultati određivanja alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa u prirodnim vodama pokazuju da je u kišnici prisutna najmanja koncentracija kationa, što je u skladu s poznatom činjenicom da je kišnica meka voda. Voda iz slavine sadrži oko deset puta veće koncentracije kationa od kišnice, no voda iz boce je najtvrđa i sadrži oko sto puta veće koncentracije kationa od kišnice. Odstupanja rezultata dobivena na različitim uzorcima prirodnih voda kreću se u intervalu od 5,3 do 12,5%.

4.11. Usporedba rezultata određivanja kationa elektroforezom na mikročipu s rezultatima dobivenim ICP-OES metodom

Za mjerenje sadržaja alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa u uzorcima prirodnih voda najčešće se primjenjuje ionsku kromatografiju.

U Tablici 16. su prikazani rezultati dobiveni na istim uzorcima primjenom naše MCE metode i ICP-OES metode.

Prema očekivanju, primjenom ICP-OES metode dobivena su manja odstupanja (± 1,6 tj. 2,4 %) u odnosu na MCE metodu (± 5,4, tj. 12,5 %).

Rezultati ICP-OES određivanja koncentracija ispitivanih kationa u uzorcima prirodnih voda prikazani su u tablici 17.

Tablica 16. Usporedba rezultata dobivenih ICP-OES metodom i našom MCE metodom (srednje vrijednosti, N = 5).

Uzorak	Kation	ICP-OES (mg/L vode) X_{sr} ± CL (%, p = 0,05)	MCE (mg/L vode) X_{sr} ± CL (%, p = 0,05)
Kišnica	**Ca^{2+}**	0,58 ± 2,1%	0,59 ± 5,3%
	Na^{+}	0,64 ± 1,7%	0,63 ± 12,5%
Voda iz slavine	**Na^{+}**	8,97 ± 2,4%	9,04 ± 5,5%
	Ca^{2+}	5,97 ± 1,9%	5,83 ± 5,4%
Voda iz boce	**Na^{+}**	13,134 ± 1,6%	12,84 ± 8,0%
	Mg^{2+}	20,018 ± 2,2%	19,51 ± 8,7%

Tablica 17. Rezultati ICP-OES određivanja koncentracije ispitivanih kationa u uzorcima prirodnih voda (korišteno je izravno mjerenje koncentracija uređajem ICP-OES, bez prethodnih tretmana uzoraka) (srednje vrijednosti, N = 5).

Uzorak	Kation	X_{sr} ± SD (mg/L)
Kišnica	**Ca^{2+}**	0,46 ± 0,02
	Na^{+}	0,60 ± 0,01
Voda iz slavine	**Ca^{2+}**	9,21 ± 0,03
	Na^{+}	6,27 ± 0,02
Voda iz boce	**Ca^{2+}**	11,25 ± 0,03
	Mg^{2+}	15,72 ± 0,05

5. Metodička obrada nastavne jedinice „Osnovna svojstva tekućina“

5.1. Priprema za nastavni sat

Obradom ove nastavne jedinice nastoji se učenike upoznati s osnovnim svojstvima tekućina. Izvedba zanimljivih pokusa pobuditi će u njima interes za navedeno gradivo te im pomoći da lakše svladaju potrebna znanja. Za obradu ove nastavne jedinice predviđen je jedan školski sat. Tijek i detaljna razrada sata opisani su u pripremi. Prije početka sata potrebno je namjestiti učionicu te pripremiti sav pribor i kemikalije za izvođenje pokusa.

PREDMETNI PROFESOR	Marija Kraševac
PREDMET	Kemija
ŠKOLA	Gimnazija
RAZRED	2.
DATUM	
NASTAVNA CJELINA	Tekućine
NASTAVNA JEDINICA	Osnovna svojstva tekućina
TIP SATA	Obrada novog gradiva
KLJUČNI POJMOVI	Međumolekulske sile, polarnost, gustoća, viskoznost, napetost površine, tlak pare, vrelište, fazni dijagram, trojna točka, latentna toplina, kritični tlak, kritična temperatura
NASTAVNE METODE	Razgovor, usmeno izlaganje, demonstracija
OBLICI RADA	Frontalni, rad u grupi
NASTAVNA SREDSTVA I POMAGALA	PowerPoint prezentacija, računalo, LCD projektor, udžbenik, pribor i kemikalije
POTREBNO PREDZNANJE	Kovalentna veza, elektronegativnost, polarnost molekula, inducirani dipoli, vodikova veza
KORELACIJA S DRUGIM PREDMETIMA	Biologija, fizika

LITERATURA	Aleksandra Habuš, Dubravka Stričević, Snježana Liber, Opća kemija 2 (udžbenik i radna bilježnica za drugi razred gimnazije), Profil
ISHODI UČENJA	
Obrazovni (kognitivno-spoznajno područje; intelektualne vještine)	Objasniti koja su osnovna svojstva tekućina, opisati utjecaj temperature na gustoću i viskoznost tekućina, opisati i objasniti fazni dijagram vode, objasniti pojmove: tlak pare, temperatura vrelišta, trojna točka, latentna toplina, kritična temperatura, kritični tlak
Funkcionalni (psihomotoričko područje; praktične vještine)	Poticati učenike na povezivanje naučenog gradiva s novim te primjenu stečenog znanja
Odgojni (afektivno; odgojno područje; stavovi)	Razviti navike samostalnog zaključivanja kod učenika nakon izvedenih pokusa, poticati aktivnost učenika

5.2. Struktura nastavnog sata

ETAPE	SADRŽAJ	METODE	SREDSTVA I POMAGALA
UVOD 10 min	Ponoviti polarnost molekula, dipol-dipol i inducirani dipol-inducirani dipol reakcije, elektronegativnost i vodikovu vezu, dati definiciju tekućina te objasniti prostorni razmještaj molekula u tekućini (usporediti sa krutinom/plinom)	Razgovor	PowerPoint prezentacija
GLAVNI DIO 10 min	RAD U SKUPINAMA Izvođenje pokusa: Što se događa pri miješanju tekućina različitih gustoća? Učenici izvode pokus, zapažaju promjene do kojih dolazi te sami zaključuju zbog čega je do njih došlo, u bilježnicu upisuju svoje bilješke o pokusu i rješavaju radni listić	Rad u skupinama po 4-5 učenika	Radni listić, bojice, pribor i kemikalije

5 min	Zajedničko komentiranje pokusa i radnog listića	Razgovor, diskusija, postavljanje pitanja	Kreda, ploča
5 min	Objasniti što je gustoća te promjenu gustoće u ovisnosti o temperaturi, objasniti anomaliju vode, objasniti viskoznost i navesti tekućine različitih viskoznosti iz svakodnevnog života	Izlaganje, razgovor	PowerPoint prezentacija, kreda, ploča
10 min	Izvođenje demonstracijskog pokusa: Površinska napetost vode Učenici u bilježnicu zapisuju zapažanja o pokusu, razgovorom ih potaknuti na razmišljanje i da sami zaključe zbog čega spajalica pluta na površini vode, odnosno potone nakon dodatka deterdženta, objasniti djelovanje detergenta na vodu te proces pranja sapunom	Metoda demonstracije, razgovor, postavljanje pitanja	Pribor i kemikalije, PowerPoint prezentacija

10 min	Objasniti promjene do kojih dolazi pri zagrijavanju tekućina te pojmove: tlak pare tekućine, ravnotežni tlak pare, dinamička ravnoteža, vrelište Nacrtati, opisati i objasniti fazni dijagram vode te definirati krivulju isparavanja, trojnu točku i latentnu toplinu	Izlaganje, razgovor	PowerPoint prezentacija, kreda, ploča
ZAVRŠNI DIO	Ponavljanje gradiva, rješavanje radne bilježnice	Razgovor	Radni listić, radna bilježnica

5.3. Plan ploče

Osnovna svojstva tekućina

Tekućine – čiste tvari pri sobnoj temperaturi u tekućem agregacijskom stanju

Međumolekulske sile u tekućinama:

-inducirani dipol - inducirani dipol

-dipol - inducirani dipol

-dipol - dipol

Pokus 1: Što se događa pri miješanju tekućina različitih gustoća?

tetraklormetan + heksan →slabe privlačne sile (inducirani dipol-inducirani dipol privlačenje)

tetraklormetan + voda, heksan + voda → jače privlačne sile (dipol-inducirani dipol privlačenja)

gustoća-omjer mase i volumena

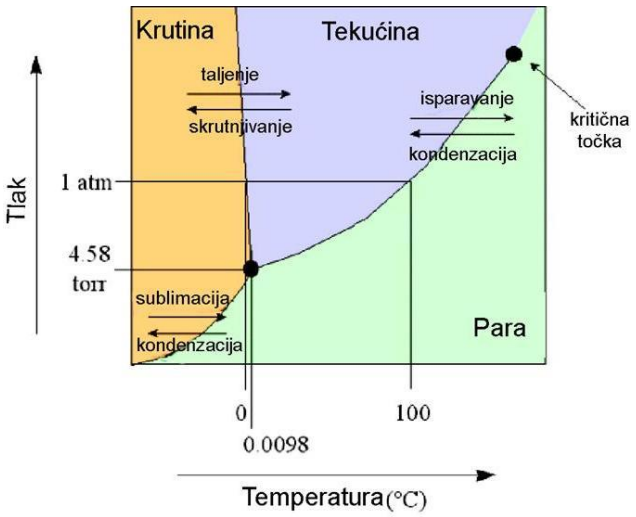
$$\rho = \frac{m}{V}$$

Pokus 2: Površinska napetost

Površinska napetost-sila koja nastaje u unutrašnjosti i na površini tekućine

-mjerna jedinica: N m^{-1}

Fazni dijagram vode:



5.4. Pokusi

5.4.1. Pokus 1: Što se događa pri miješanju tekućina različitih gustoća?

Pribor i kemikalije:

Epruveta, heksan ($\rho(C_6H_{14}) = 0{,}655$ g cm^{-3}), tetraklormetan ($\rho\ (CCl_4) = 1{,}584$ g cm^{-3}, modra galica ($CuSO_4$ x $5H_2O$ (s)), destilirana voda ($\rho(H_2O) = 1{,}00$ g cm^{-3})

Postupak:

U destiliranoj vodi otopiti nekoliko kristalića modre galice (modra galica nema nikakav utjecaj na tijek pokusa, koristi se samo za bojanje vode, budući da su sve tekućine prozirne)

U epruvetu oprezno ulijevati redom: 2 mL tetraklormetana, 2 mL vode obojene modrom galicom, 2 mL heksana

Skica aparature:

Opažanja:

_____

_____

_____

_____

Zaključak:

_____

_____

_____

_____

5.4.2. Pokus 2: Površinska napetost

Pribor i kemikalije:

Staklena zdjelica, čelična spajalica (igla za šivanje), tekući deterdžent ili sapun

Postupak:

Staklenu zdjelicu napuniti vodom. Na površinu vode staviti spajalicu ili iglu za šivanje i nakon nekoliko minuta dodati nekoliko kapi tekućeg deterdženta.

Skica aparature:

Opažanja:

_____

_____

_____

_____

Zaključak:

_____

_____

_____

_____

5.5. Radni listić

5.5.1. Pokus 1

1. Koje su od navedenih molekula polarne, a koje nepolarne? Obrazloži svoj odgovor

_____

_____

_____

2. Koja međumolekulska djelovanja su prisutna unutar pojedinog sloja tekućina i na granici dviju tekućina te zašto se tekućine ne miješaju?

_____

_____

_____

3. Kakva su privlačenja između molekula u graničnim slojevima u odnosu na privlačenja molekula u pojedinim slojevima tekućina?

_____

_____

_____

5.5.2. Pokus 2

1. U kakvom su odnosu gustoća vode i gustoća spajalice? Što očekujete, hoće li spajalica potonuti ili plutati na površini vode?

_____

_____

_____

2. Koju pojavu uzrokuju sile između molekula i na granici voda-zrak?

_____

_____

_____

3. Navedi važnost ove pojave za živa bića u prirodi.

_____

_____

_____

4. Zašto spajalica potone nakon dodatka deterdženta?

_____

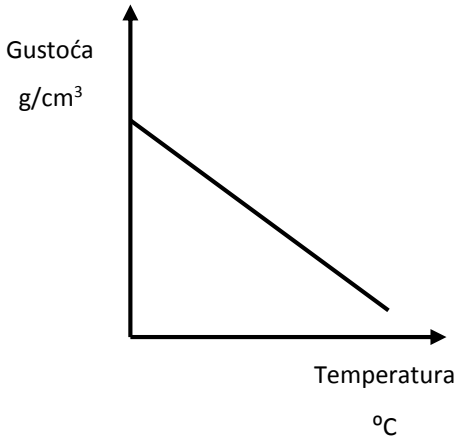
_____

_____

5.6. Pitanja za ponavljanje i domaću zadaću

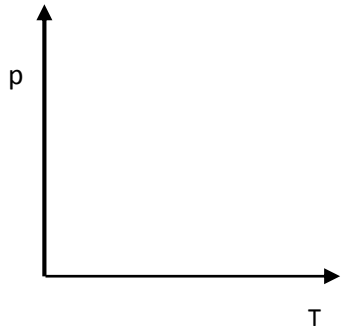
1. Nabroji osnovna svojstva tekućina.

2. Grafički prikaži i opiši dijagrame ovisnosti gustoće i viskoznosti o temperaturi.



3. Objasni pojavu površinske napetosti vode te njenu važnost za organizme u prirodi. Kakvo djelovanje ima sapun koji u prirodne vode dođe otpadnim vodama?

4. Nacrtaj fazni dijagram vode te objasni njenu anomaliju.



5. Promatrajući dijagram iz prethodnog zadatka definiraj pojmove:

a) krivulja sublimacije

b) krivulja isparavanja

c) krivulja taljenja

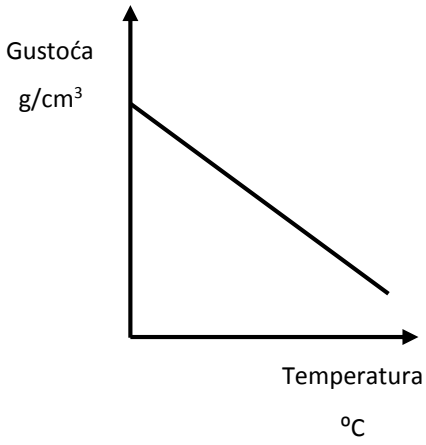
d) temperatura vrelišta

e) temperatura ledišta

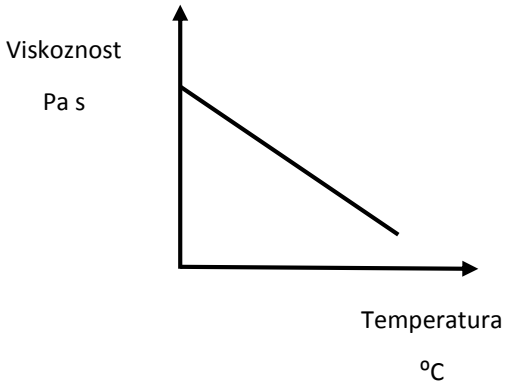
5.7. Očekivani odgovori na pitanja za ponavljanje i domaću zadaću

1. Gustoća, viskoznost i napetost površine.

2.



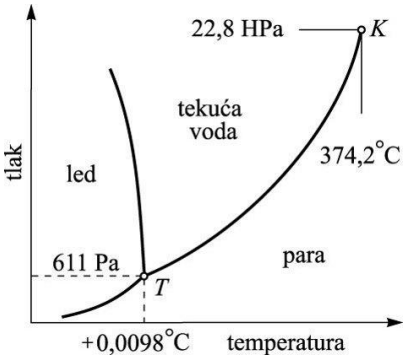
Povišenjem temperature tvarima se povećava se kinetička energija čestica, dolazi do povećanja volumena tvari i smanjenja njene gustoće. Izuzetak je voda koja pokazuje anomaliju.



Povišenjem temperature povećava se kinetička energija čestica te viskoznost opada, dok pri nižim temperaturama, smanjenjem kinetičke energije viskoznost tekućina raste.

3. Površinska napetost vode omogućuje sitnim organizmima (kukcima) da hodaju po površini rijeka i jezera. Sapun djeluje na vodu tako da smanjuje njenu napetost na način da senepolarni dijelovi sapuna (ugljikovodični lanac) okrenu prema zraku, a polarni dijelovi prema vodi.

4.



Anomalija vode je pojava da voda ima najveću gustoću pri 4°C, što je suprotno uobičajenom, da tvari imaju najveću gustoću u čvrstom agregacijskom stanju. Povišenjem temperature od 0 do 4°C njena gustoća se povećava. Iznad 4°C voda se ponaša uobičajeno, tj. daljnjim povećanjem temperatur njena gustoća se smanjuje.

5. a) krivulja sublimacije

Krivulja sublimacije predstavlja skup točaka u kojima su pri određenoj temperaturi led i vodena para u ravnoteži.

b) krivulja isparavanja

Krivulja isparavanja predstavlja skup točaka u kojima su pri određenoj temperaturi i tlaku voda i vodena para u ravnoteži.

c) krivulja taljenja

Krivulja taljenja predstavlja skup točaka u kojima su pri određenoj temperaturi i tlaku led i voda u ravnoteži.

d) temperatura vrelišta

Temperatura vrelišta je temperatura pri kojoj je tlak para tekućine jednak atmosferskom tlaku.

e) temperatura ledišta

Temperatura ledišta je temperatura pri kojoj neka tvar prelazi iz tekućeg u čvrsto agregacijsko stanje.

6. Zaključak

Pet važnih kationa, kalij, kalcij, magnezij, natrij i litij, uspješno su separirani te kvantificirani u modelnim i realnim sustavima primjenom elektroforeze na mikročipu (MCE) sa C^4D detektorom.

Razvijena je brza, jednostavna, jeftina i reproducibilna metoda za katione koje najčešće nalazimo u prirodnim vodama različitog porijeka. Elektroforetska separacija je postignuta u 60 sekundi, sa dobrom ponovljivošću između zasebnih serija.

Ispitan je utjecaj sljedećih parametara na efikasnost separacije: napon injektiranja, vrijeme injektiranja, napon separacije. U cilju optimiranja postupka separacije temeljito je ispitan i optimiran sastav pomoćnog elektrolita (BGE).

Podatci dobiveni elektroforetskim postupkom izraženi su mjerenjem visine odzivnog pika. Vremena zadržavanja su konstantna i reproducibilna te neovisna o koncentraciji uzorka. Primjenom regresijske analize ispitano je područje linearnog odziva za svaki kation, pojedinačno i u smjesi. Točnost i reproducibilnost mjerenja određeni su metodom poznatog dodatka. Točnost rezultata određivanja kalija, kalcija, magnezija, natrija i litija primjenom poznatog dodatka u prirodnim vodama iznosi od 87 do 108 % (Tablica 13.).

Rezultati MCE određivanja kationa u prirodnim vodama na MCE uređaju uspoređeni su s rezultatima dobivenim ICP-OES metodom. Nešto veća odstupanja rezultata dobivena su za MCE metodu.

S obzirom na prednosti koje nudi MCE/C^4D, ova metoda se može upotrijebiti za terenske analize jer je ovaj sustav lako prenosiv.

7. Literatura

[1] http://ocelici.weebly.com/voda.html (25.4.2016.)

[2] https://bs.wikipedia.org/wiki/Te%C4%8Dnost#/media/File:Solid_liquid_gas.svg (25.4.2016.)

[3] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove Analitičke Kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

[4] T. Bolanča, Š. Ukić, Ionska kromatografija, skripta, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.

[5] http://www.dionex.com/en-us/webdocs/115413-AN-1105-IC-Anions-Cations-Produced-Water-AN71255-EN.pdf (22.4.2016.)

[6] M. N. Calisevici, D. Perju, G. A. Dumitrel, M. Glevitzky, R. C. Moldovan, Determination of Anions and Cations Content in Romanian Drinking Waters by HPIC Method, Chem. Bull. "Politehnica", **54** (2009.), 26-30

[7] http://www.nos.org/media/documents/dmlt/Biochemistry/Lesson-21.pdf (16. 4. 2016.)

[8] S. Luterotti, D. Bičanić, Odabrane teme iz bioanalitike, skripta, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.

[9] V. Mraz, T. Marković, G. Larva, Hidrogeološka i hidrokemijska obilježja masiva Kalnika, *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, **20** (2008), 13 - 25

[10] http://www.nos.org/media/documents/dmlt/Biochemistry/Lesson-21.pdf (31.4.2016.)

[11] I. Piljac, Elektroforeza, Media Print, Zagreb, 2006.

[12] M. Vlčková, Microchip electrophoresis bioanalytical applications, Doktorska dizertacija, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Basel, 2008.

[13] C. Sale, B. Saunders, R. C. Harris, Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance, *Amino Acids*, **39** (2010) 321 - 333

[14] A. Stavljenić Rukavina, D. Matišić, Elektroforeza i pridružene tehnike, Fizikalne osnove i klinički aspekti medicinske dijagnostike (S. Janković, D. Eterović), Medicinska naklada, Zagreb, 2002, 224 - 227

[15] www.chem.uky.edu/courses/che554/3_Chromatography/Chapter4_Electrophoresis_ExperimentalBiochemistry.pdf (27. 5. 2016.)

[16] A. Guiotto, A. Calderan, P. Ruzza, G. Borin, Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review, *Curr. Med. Chem.,* **12** (2005) 2293 - 2315

[17] J. R. Catai, G. J. de Jong, G. W. Samson, Capillary electrophoresis of biopharmaceuticals (W. Jiskoot, D. J. A. Crommelin), Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals, American Association of Pharmaceutical Scientists, Arlington, VA, USA, 2005, 331 – 377

[18] F. R. Rocha, J. A. Fracassi da Silva, C. L. Lago, A. Fornaro, I. G. R. Gutz, Wet deposition and related atmospheric chemistry in the Sao Paulo metropolis, Brazil: Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Atmospheric Environment*, **37** (2003) 105 – 115

[19] http://www.mcm.ar.krakow.pl/uploads/documents/kapilara_2014-15.pdf (27. 5. 2016.)

[20] C. D. Garcia, K. Y. Chumbimuni-Tores, E. Carrilho, Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis, Wiley, New Jersey, 2013

[21] X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **60** (1988), 1837 - 1838

[22] T.P. Segato, S.A. Bhakta, M. T. Gordon, E. Carrilho, P. A. Willis, H. Jiaod, C. D. Garcia. Microfab-less microfluidic capillary electrophoresis devices, *Analytical Methods*, **5** (2013), 1631 – 1888

[23] E. X. Vrouwe, R. Luttge, W. Olthuis, A. van der Berg, Rapid inorganic ion analysis using quantitative microchip capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **1102** (2006) 287 – 293

[24] J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M. A. Schwarz, P. C. Hauser, Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis, *Analyst*, **127** (2002) 214-218

[25] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper, Contact conductivity detection in poly (methyl methacylate)-based microfluidic devices for analysis of mono-and polyanionic molecules, *Anal Chem.*, **74** (2002) 2407 - 2415

[26] E. McEvoy, A. Marsh, K. Altria, S. Donegan, J. Pavver, Capillary Electrophoresis for Pharmaceutical Analisys, Capillary and Microchip Electrophoresis and asociated microtehniques (Landers), CrcPress, NewYork, 2007., 145

[27] http://www.edaq.com/c4d-contactless-conductivity-introduction (25.4.2016.)

[28] K. A. Mahabadi, I. Rodriguez, L. Hong, P. C. Hauser, N. F. Rooij, Restrictive dual capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip electrophoresis, *Procedia Chem.*, **1** (2009) 1351 - 1354

[29] D. J. Harrison, A. Manz, Z. H. Fan, H. Ludi, H. M. Widmer, Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1926 - 1932

[30] https://www.researchgate.net/figure/8015278_fig7_Glass-microchip-Micralyne-Inc-with-double-T-intersection (3.5.2016.)

[31] http://www.edaq.com/product_sheets/hardware/ER430_HV_Sequencer.pdf

(3.5.2016.)

[32] http://www.edaq.com/product_sheets/hardware/ER225_C4D_Data_System.pdf

(3.5.2016.)

[33] https://www.edaq.com/ET225_Micronit-Chip-Electrophoresis-Platform

(3.5.2016.)

[34] https://www.edaq.com/ET145-4_Micronit-CE-Chip-for-C4D (45-mm)

(3.5.2016.)

[35] R. Hergenröder, B. Graβ, Conductivity Detection on Microchips, Microchip capillary electrophoresis (C.S. Henry), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006., 113 - 129

[36] B.A. Fogarty, N.A. Lacker, S.M. Lunte, Application to Peptide Analysis, Microchip capillary electrophoresis (C.S. Henry), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006., 159 - 187

[37] J. L. Felhofer, K.Y. Chumbimuni-Torres, M. F. Mora, G.G. Haby, C. D. Garcia, Critical Evaluation of the Use of Surfactants in Capillary Electrophoresis, Capillary

electrophoresis and microchip capillary electrophoresis (C. D. Garcia, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho), Wiley, New Jersey, 1 - 17

[38] P. Kubàñ, A. Seiman, M. Kaljurand, Sampling and Quantitative Analysis in Capillary Electrophoresis, Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis (C. D. Garcia, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho), Wiley, New Jersey, 42 - 62

[39] M. T. Fernàndez-Abedul, I. Alvarez-Martos, F. Javier, Garcià Alonso, A. Costa-Garcià, Improving the Separation in Microchip Electrophoresis by Surface Modification, Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis (C. D. Garcia, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho), Wiley, New Jersey, 95-110

[40] J. A. Fracassi da Silva, C. L. do Lago, D. P. de Jesus, W. K. Tomazelli Coltro, Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection (C^4D) Applied to Capillary Electrophoresis (CE) and Microchip Electrophoresis (MCE), Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis (C. D. Garcia, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho), Wiley, New Jersey, 145- 157

[41] B. White, Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection, Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis (C.D. Garcia, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho), Wiley, New Jersey, 161 - 173

[42] A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, Opća kemija 2 (udžbenik za drugi razred gimnazije), Profil, Zagreb, 2009.

[43] A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, Opća kemija 2 (radna bilježnica za drugi razred gimnazije), Profil, Zagreb, 2009.

8. Životopis

Rođena sam 1. 9. 1991. godine u Koprivnici. U rodnom mjestu Virju sam pohađala i završila OŠ prof. F. V. Šignjara. Nakon toga sam upisala Srednju školu u Koprivnici, smjer medicinska sestra/tehničar, i maturirala 2010. godine te upisujem Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju. Za završni rad sam odabrala kolegij Biokemija i napisala ga pod vodstvom dr. sc. Elizabete Has - Schön, a naslov rada je *„Metabolizam tumorskih stanica i tumorski markeri“*. Preddiplomski studij sam završila 2014. godine i iste upisala diplomski studij Odjela za kemiju, nastavnički smjer. Diplomsku radnju sam pisala u okviru kolegija Analitička kemija, pod vodstvom doc. dr. sc. Nikole Sakača, dok me kroz znanstvena istraživanja vodila dr. sc. Marija Jozanović. Tema i naslov diplomskog rada je *„Određivanje kationa u prirodnim vodama elektroforezom na mikročipu sa C^4D detektorom“*. Dio znanstvenog rada sam predstavila posterskom prezentacijom na II. međunarodnom i VI. domaćem znanstveno - stručnom skupu „*Voda za sve*“ u Osijeku, 18. 3. 2016. godine na Poljoprivrednom fakultetu. Također, sudjelovala sam i u projektu koji je predstavljen na XVI. Ružičkinim danima u Vukovaru, 21. - 23. 9. 2016. pod naslovom *„MWCNT tenzidni senzor: Utjecaj geometrije senzora na karakteristike odgovora“* i u radu predstavljenom na II. međunarodnom kongresu kemičara i kemijskih inženjera Bosne i Hercegovine u Sarajevu, 21. - 23. 10. 2016. pod naslovom *„Separation and determination of anti - oxidative histidine dipeptides by microchip capillary electrophoresis with C^4D detection“*. Tijekom studiranja sam radila u laboratoriju analitičke kemije kao demonstrator.

2014. godine sam također upisala i Umjetničku akademiju u Osijeku, smjer glazbena pedagogija. Na akademiji sam aktivno sudjelovala u raznim projektima i nastupima, od kojih bih istaknula sudjelovanje u izvedbi opere Così fan tutte, W. A. Mozarta, koja je premijerno izvođena u Osijeku, 11. srpnja 2015. godine u suradnji s umjetničkom akademijom iz Pečuha i sudjelovanje u izvedbi opere Ljubavni napitak, čiji je autor G. Donizetti, također premijerno izvedene u Osijeku, 14. lipnja 2016. godine. Aktivna sam članica i Vokalnog ansambla Brevis s kojim brojim nizove uspješnih nastupa i natjecanja na nacionalnoj i međunarodnoj razini od kojih bih istaknula međunarodno natjecanje u Bugarskoj (Varna), s osvojenim prvim mjestom te svjetsko natjecanje u Rusiji (St. Petersburg), s osvojenim prvim mjestom i posebnom nagradom žirija - zvijezde natjecanja.