



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija  
Smjer: Biokemija

Iva Vojtkuf

# **Ionska kromatografija u analizi fosfitnih spojeva eutrofičnih jezera**

**Kemijski seminar I**

Prema radu:

A. S. Baidya, E. E. Stüeken, Rapid Commun. Mass Spectrom. 38 (2023)

Zagreb, ožujak 2025.

## Sadržaj

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>§ 1. UVOD.....</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                       | <b>2</b>  |
| 2.1. Kruženje fosfora.....                                  | 2         |
| 2.2. Fosfiti.....                                           | 3         |
| 2.3. Eutrofična jezera.....                                 | 4         |
| 2.4. Utjecaj klorida.....                                   | 6         |
| 2.5. Ionska kromatografija .....                            | 7         |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                       | <b>8</b>  |
| 3.1. Eksperimentalne tehnike .....                          | 8         |
| 3.1.1. Reagensi i oprema.....                               | 8         |
| 3.1.2. Postavka uklanjanja klorida .....                    | 9         |
| 3.1.3. Povezivanje IC-a s ICPMS-om.....                     | 11        |
| <b>§ 4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>                     | <b>12</b> |
| 4.1. Uklanjanje klorida u ionskoj kromatografiji .....      | 12        |
| 4.2. Kalibracija i granice detekcije IC-a i IC/ICPMS-a..... | 14        |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>                                 | <b>17</b> |
| <b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>                         | <b>18</b> |

## § 1. UVOD

Ionska kromatografija (IC) u kombinaciji s induktivno povezanom plazma masenom spektrometrijom (ICPMS) idealan je alat za mjerenje niskih koncentracija anionskih vrsta poput fosfita. Međutim, visoke koncentracije klorida i drugih aniona u prirodnim otopinama mogu negativno utjecati na kromatografsku separaciju i kvalitetu podataka.

U ovom radu razvijen je mehanizam za uklanjanje klorida iz uzorka unutar ionske kromatografske jedinice, koristeći dodatni ventil i separacijsku kolonu koja preusmjerava klorid u otpad, dok fosfit i većina drugih aniona ostaju zadržani. Ovaj sustav instaliran je u povezani IC/ICPMS sustav (ICS 6000 i Element 2 u načinu srednje rezolucije) te je određena linearnost i granice detekcije.

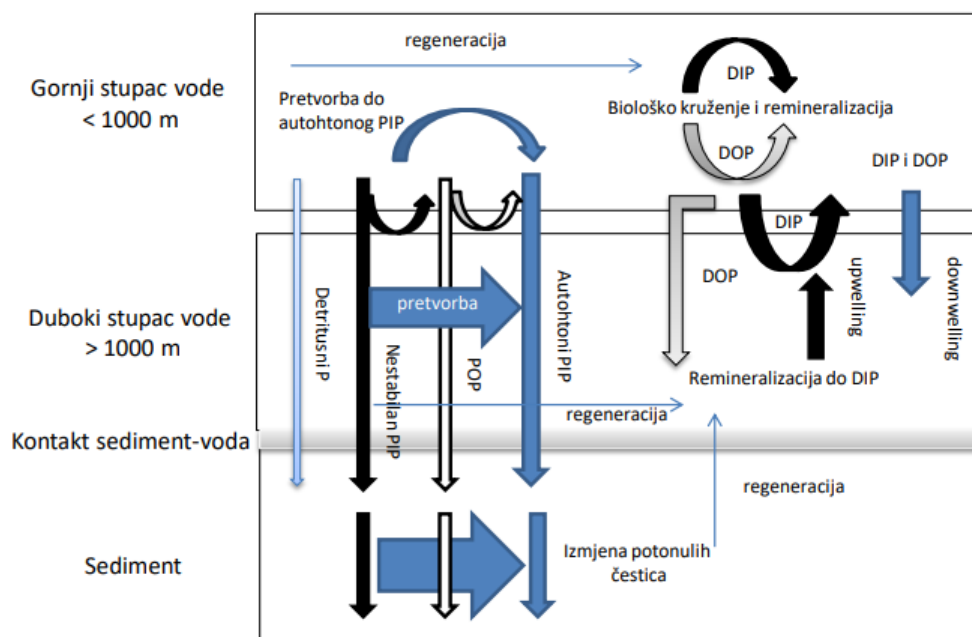
Klorid je u potpunosti uklonjen iz uzoraka, dok je fosfit zadržan i mogao se analizirati pomoću IC/ICPMS. Koncentracije su se mogle mjeriti do 0,003  $\mu\text{mol/L}$  i vjerojatno niže, uz dobru linearnost u istraživanom rasponu (do 1,615  $\mu\text{mol/L}$ ;  $r^2 = 0.999$ ).

Mehanizam uklanjanja klorida u stvarnom vremenu dobro funkcionira za pojednostavljivanje matrica uzorka. IC/ICPMS najmoćnija je tehnika za kvantifikaciju fosfita u prirodnim otopinama. Ova metoda uklanjanja klorida također bi se mogla primijeniti na analize drugih aniona. (Baidya i sur., 2023).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kruženje fosfora

Fosfor je zastupljen u Zemljinoj kori s 1,050 ppm, dok je u solarnom sustavu prisutan sa 7 ppm. U prirodi se ne pojavljuje kao slobodan element jer je vrlo reaktivan te je nađen u mnogim mineralima i organskim spojevima. Izvori fosfora u okolišu često su antropogenog karaktera i to kao točkasti izvori (kanalizacija i mjesta industrijskih otpuštanja) i raspršeni izvori (urbano i poljoprivredno ispiranje). Upravo iz razloga što je fosfor važan biološki čimbenik i makromineral za kopnene biljke i fitoplankton, važno je znati kako se fosfor mijenja u vodenim ekološkim sustavima. Izvor fosfata u jezeru može biti iz gnojiva, životinjskog otpada, erozije tla i otpada iz rudnika kao i atmosferskog odlaganja. Fosfati ulaze u jezera putem rijeka, podzemnim vodama ili direktnim odlaganjem i ispiranjem. Biljke, alge, cijanobakterije i bakterije koriste fosfate kao hranjive soli i oni se prenose kroz hranidbenu mrežu, dok se dio ovih čestica remineralizira u vodenom stupcu. Dio fosfata taloži se i u sediment, a uz anoksične uvjete fosfati se iz sedimenta mogu regenerirati nazad u vodu. Neotopljeni oblici fosfora prolaze niz pretvorbi kroz vodeni stupac i unutar sedimenta (slika 1), a također se mogu regenerirati i u otopljene oblike. Biološko kruženje i remineralizacija osnovni su mehanizmi promjena topivih faza i dominiraju u površinskim vodama, iako se mikrobna remineralizacija nastavlja u dubini. Otopljeni oblici fosfora gube se iz površinskih voda između ostaloga i biološkim preuzimanjem (nastaje neotopljeni organski fosfor; eng. particulate organic phosphorus - POP) te se vraćaju u površinske vode miješanjem. Regeneracijom iz sedimenta oslobađa se višak otopljenih fosfata u duboku vodu (Paytan i sur., 2011).



**Slika 1.** Pretvorbe između oblika fosfora u vodenom stupcu i sedimentu (preuzeto i prerađeno iz Paytan i sur., 2011)

## 2.2. Fosfiti

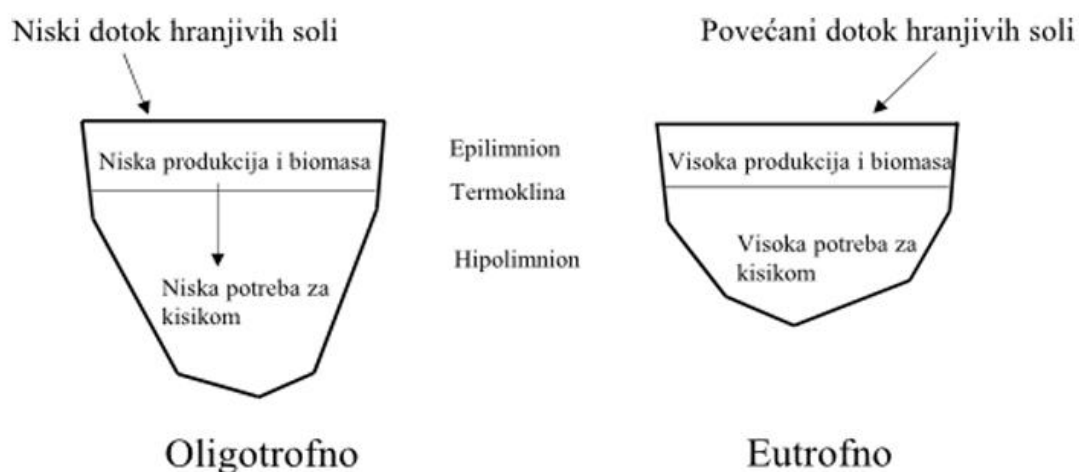
Posljednjih godina, s otkrićem reduciranih fosforinih vrsta u prirodnim okruženjima (Pasek i sur., 2014; McDowell i sur., 2004), fosfat, fosfit i hipofosfit u fokusu su anionske kromatografije (Han i sur., 2013). Fosfit je čak otkriven u drevnim sedimentnim stijenkama i pokazuje potencijal kao važan supstrat za prebiotičku kemiju i rani život (Pasek i sur., 2013; Herschy i sur., 2018). Rekonstrukcija njegove biogeokemijske povijesti tijekom geološkog vremena i njegova distribucija u modernim okruženjima obećavaju nova saznanja o evoluciji Zemljine biosfere. Fosfit je termodinamički nestabilan u vodi, ali je kinetički stabilan, jer je oksidacija u fosfat spora i danas je primarno katalizirana mikroorganizmima (Pasek i sur., 2013; Schink i sur., 2000). Fosfit se može proizvesti biološki (Liu i sur., 2023) ili abiotski pod suhim, vrućim uvjetima (Pasek i sur., 2022), munjama (Pasek i sur., 2009) ili iz otapanja meteorski FeP minerala (Pasek i sur., 2005). Međutim, budući da su ti putovi relativno rijetki, koncentracije fosfita mogu biti niske u prirodnim tekućinama (npr. do 0,45  $\mu\text{mol/L}$  u eutrofičkim jezerima (Han i sur., 2013), ali manje od 0,06  $\mu\text{mol/L}$  u nekim geotermalnim

vodama (McDowell i sur., 2004). Koncentracije na donjoj granici ovog raspona predstavljaju analitičke izazove jer je pik fosfita obično zasjenjen pikovima drugih aniona poput klorida, sulfata i fosfata.

Fosfor ulazi u vodena tijela ne samo kao anorganski fosfatni ioni ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) već također i kao anorganski polimer, kroz spojeve organskog fosfora i živeće mikroorganizme.

### 2.3. Eutrofična jezera

Autor Weber, 1907 (Dokulil i sur., 2011) uvodi pojmove eutrofno, mezotrofno i oligotrofno za opis različitih stanja flore cretova s obzirom na njihove promjene tijekom vremena. Navedene pojmove koristi i autor Naumann, 1919 (Dokulil i sur. 2011) u opisivanju voda u Švedskoj kao oligotrofnih, mezotrofnih ili eutrofnih ovisno o njihovom sadržaju hranjivih soli. S obzirom da u to vrijeme nisu postajale dostupne metode mjerenja koncentracije hranjivih soli, Naumann ponovno definira kategorije, ali prema stadiju jezera u ljetu i prema fitoplanktonskim grupama. Uspostavlja se obrazac oligotrofno-eutrofnog sustava koje označava oligotrofna jezera kao duboka jezera koja primaju hranjivim solima oslabljene pritoke i imaju malu proizvodnju organske tvari u epilimnionu, dok su tvari koje tonu u hipolimnionu u malim količinama te je niska potrošnja kisika. Eutrofna jezera su plića, bogatiji je utok hranjivih soli iz pritoka kao i podzemnih voda te je i primarna proizvodnja ujedno viša, dok u hipolimnion dolazi više organske tvari i povećana je potrošnja kisika (slika 2) (Dokulil i sur., 2011).



**Slika 2.** Obrazac oligotrofno-eutrofnog sustava (preuzeto i prerađeno iz Dokulil i sur., 2011)

Pojam eutrofikacije objašnjava se kao proces obogaćivanja vodenog tijela hranjivim solima, što rezultira pojačanim rastom fitoplanktona i makrofita. Eutrofikacija je ujedno i jedan od ozbiljnih problema onečišćenja vode koji direktno utječe na floru i faunu s obzirom na smanjivanje otopljenog kisika što u konačnici uzrokuje značajne promjene u bioraznolikosti i promjene u trofičkim strukturama ekološkog sustava. Kontinuirana eutrofikacija također može dovesti do podizanja sedimenta u jezerima, što posljedično uzrokuje terestifikaciju vodenog tijela (Ansari i sur., 2011). Većina hranjivih soli ulazi u vodotoke i jezera putem kanalizacijskog sustava, poljoprivrednim aktivnostima ili putem oborina te tako hranjive soli mogu biti urbanog porijekla (kanalizacija, industrijski otpad) ili ruralnog porijekla (poljoprivreda, upravljanje šumama) (Mason i sur., 2002).

U Eksperimentalnom jezerskom području sjeverozapadnog dijela grada Ontario u Kanadi, 1972. godine ispitivao se utjecaj dodavanja fosfora i dušika u pokusno jezero 227 koje je imalo iznimno niske vrijednosti otopljenog anorganskog ugljika kako bi se razjasnilo može li nedostatak ugljika spriječiti eutrofikaciju. No, unutar par tjedana od početka pokusa, jezero je poprimilo zelenu boju i značajno je porasla primarna proizvodnja. Pokus je nastavljen i u malom jezeru 226, 1973. godine te je tom prilikom jezero podijeljeno na dva dijela (slika 3). U oba dijela dodani su dušik i ugljik dok je fosfor dodan samo u sjeveroistočnom dijelu. Tamnozeleni boja dijela jezera u kojem je bio dodan fosfor uzrokovana je cvjetanjem modrozelenih algi *Anabaena spiroides* Klebahn 1895. Drugi dio jezera ostao je u istom stanju kao i prije obogaćivanja. Zaključeno je da je svakako potrebna regulacija utoka fosfora u vode kao prevencija eutrofikacije. Ovim pokusom je također utvrđeno da se malo ili gotovo ništa fosfora oslobađa iz sedimenta u jezero čak i uz anoksične uvjete. U jezeru 304 koje godinama nije bilo obogaćivano hranjivim solima i ugljikom pratila se koncentracija klorofila a koja je znatno porasla 1972. godine kada je u jezero dodana određena koncentracija dušika, fosfora i ugljika. Tijekom 1973. godine nastavljeno je dodavanje dušika i ugljika, ali bez dodavanja fosfora, a cijeli proces zapravo simulira uvjete eutrofnog jezera u slučaju poduzimanja osnovnih mjera za sprječavanje eutrofikacije. Opadanje koncentracije klorofila a upućivalo je na oporavak jezerskog sustava (Schindler i sur., 1974).



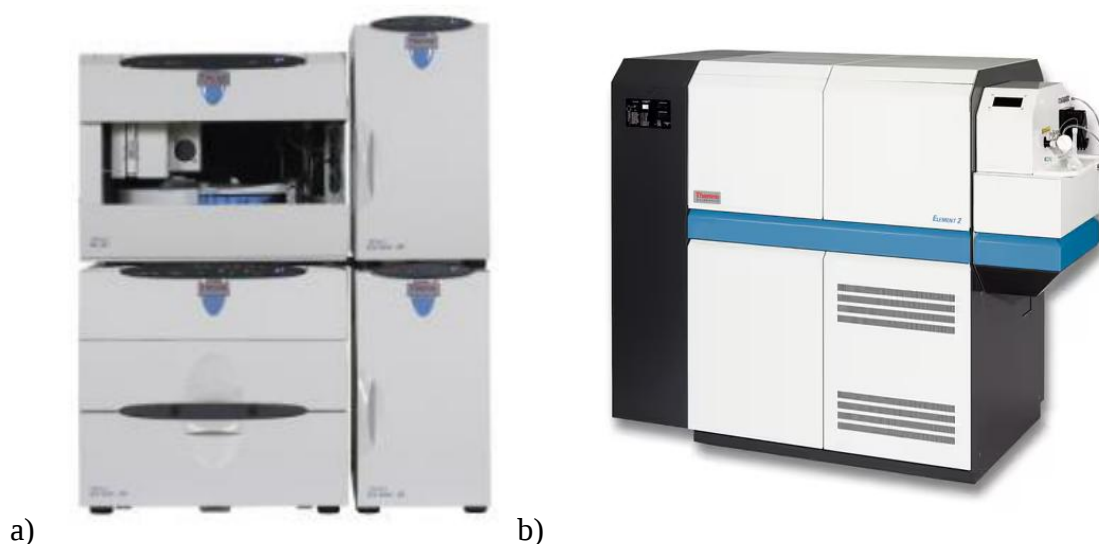
**Slika 3.** Pokusno jezero 226 podijeljeno barijerom. U gornjem dijelu jezera dodani su dušik, ugljik i fosfor a u donjem dijelu dušik i ugljik (preuzeto sa stranice <https://www.minnpost.com/earth-journal/2013/11/leading-canadian-ecologist-calls-scientists-recover-policy-influence>)

## 2.4. Utjecaj klorida

Kloridi su najčešća anionska vrsta u većini prirodnih sustava. Antropogeni izvori klorida u slivu jezera, uključujući sol na cestama, gnojiva i otpadne vode, mogu povećati koncentraciju klorida u slatkovodnim jezerima. Povećanje koncentracija klorida može utjecati na ekologiju jezera i ekosustavnih usluga, poput ribarstva i korištenja jezera kao izvora pitke vode. Pik fosfita obično je zasjenjen pikovima drugih aniona poput klorida u tipičnim kromatografskim postavkama. Zasićenje kolone i/ili detektora tim drugim, obilnijim anionima može utjecati na separaciju elemenata i detekciju fosfita (Han i sur., 2012).

## 2.5. Ionska kromatografija

Ionska kromatografija (IC) je fizikalno-kemijska metoda separacije koja se temelji na raspodjeli analita između tekuće pokretne faze i čvrste stacionarne faze. Najvažniji dio kromatografskog sustava je separatorska kolona. Najčešće korišteni detektor u ionskoj kromatografiji je detektor za vodljivost, koji se obično koristi u kombinaciji sa supresorom. Glavna funkcija supresora je kemijski smanjiti visoku pozadinsku vodljivost elektrolita u eluentu i pretvoriti ionske uzorke u vodljiviji oblik. Na taj način značajno se povećavaju osjetljivost i selektivnost metode. (Weiss i sur., 2020). Ionska kromatografija (IC) je uobičajeni alat za kvantificiranje koncentracije različitih vrsta istog elementa u prirodnim i eksperimentalnim otopinama. Ionski kromatograf korišten u ovom radu je Dionex ICS-6000 od Thermo Fisher, a instrument ICPMS je Element 2 tvrtke Thermo Fisher (slika 4.). Razvijen je nelinearni mehanizam za uklanjanje klorida iz uzorka unutar anionskog kromatografa, koristeći dodatni ventil i separacijsku kolonu koja odvaja klorid u otpad, dok se fosfit i većina drugih aniona zadržavaju. Sustav je instaliran u spojeni IC/ICP-MS sustav (ICS6000 i Element 2 u načinu rada srednje rezolucije) te su određeni linearnost i granice detekcije.



Slika 4. a) Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000+ b) Element™ Series HR-ICP-MS  
(Weiss i sur., 2020)

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Eksperimentalne tehnike

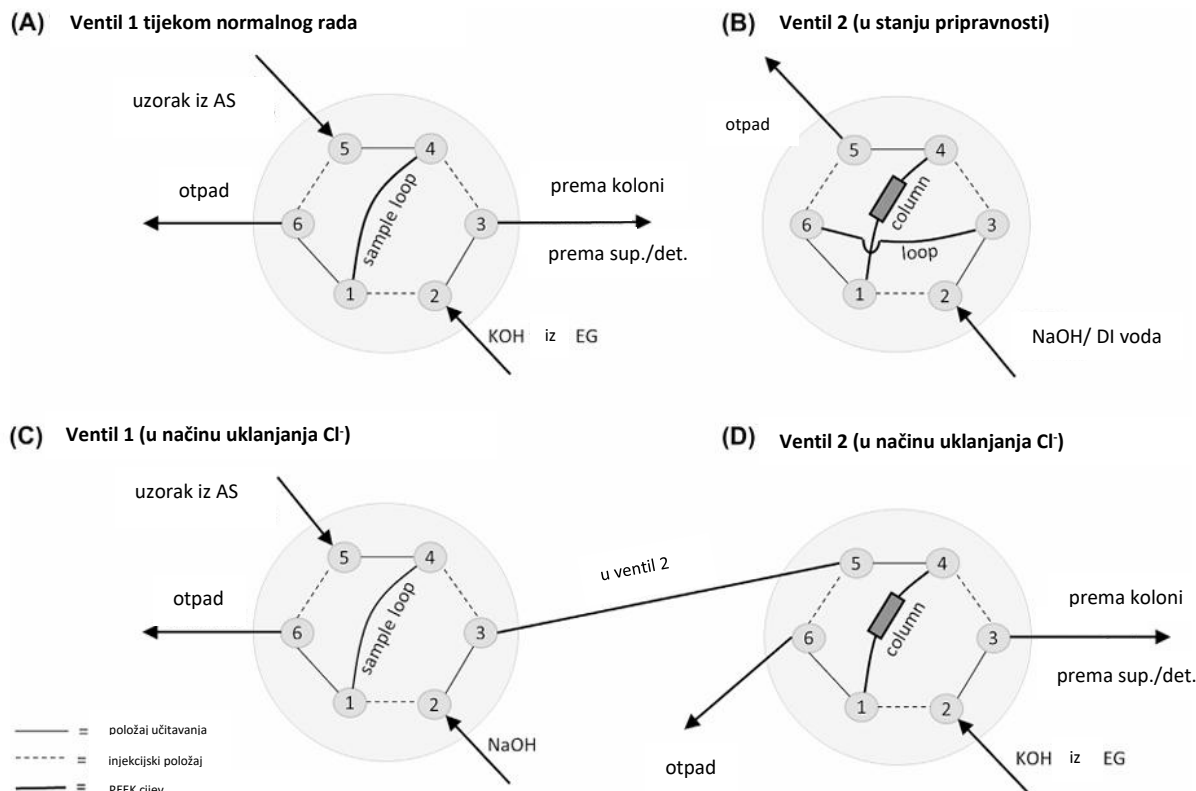
#### 3.1.1. Reagensi i oprema

Sva priprema uzoraka i IC/ICPMS analize provedene su u laboratoriju za izotopnu geokemiju u St. Andrews (Stag). Otopine koje sadrže klorid, nitrit, nitrate, sulfate, fosfit, fosfat i u nekim slučajevima hipofosfit i pirofosfat pripremljene su u LDPE bocama od čistih reagensa (NaCl, Sigma-Aldrich p/n 106404.0500;  $\text{KNO}_2$ , Fisher Scientific p/n 11328016;  $\text{NaNO}_3$ , Fisher Scientific p/n 10696842;  $\text{MgSO}_4$ , Fisher Scientific p/n 11377658;  $\text{Na}_2\text{HPO}_2$ , Fisher Scientific p/n 222791000;  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Fisher Scientific p/n 11994281;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Acros Organics p/n 204855000;  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , Fisher Scientific p/n 10378860) otopljeni u deioniziranoj vodi s otporom  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , koja je generirana pomoću sustava Smart2Pure. Tijekom analize korištena je  $1 \text{ mmol/L}$  NaOH otopina koja je svakodnevno pripremljena razrjeđivanjem koncentrirane osnovne otopine ( $500 \text{ g/L}$ , NaOH bez karbonata, VWR p/n 87938,290). Ionski kromatograf korišten u ovoj studiji bio je Dionex ICS-6000 od Thermo Fisher, opremljen AS-AP autosamplerom,  $37,5 \mu\text{L}$  petljom za uzorak, gradijentnim pumpama, generatorom eluenta s RFIC degasifikatorom, CR-ATC 600, EGC 500 KOH uložak kolone, AG17-C zaštitnom kolonom, AS17-C analitičkom kolonom, ADRS 600  $2 \text{ mm}$  supresorom i detektorom provodljivosti (Thermo Scientific p/n 061830). Sustav je radio s konstantnim protokom od  $0,5 \text{ mL/min}$ . KOH je korišten kao eluent, a njegova koncentracija povećavana je od  $1$  do  $40 \text{ mmol/L}$  tijekom svake analize. Instrument ICPMS bio je Element 2 tvrtke Thermo Fisher. Protoci argonskog plina bili su  $16 \text{ L/min}$  za protok hladnog plina,  $0,8 \text{ L/min}$  za pomoćni protok i  $1 \text{ L/min}$  za protok nosača uzorka. RF snaga bila je postavljena na  $1250 \text{ W}$  (Baidya i sur., 2023).

### 3.1.2. Postavka uklanjanja klorida

U standardnoj IC postavci, uzorak se prenosi iz autosamplera u petlju koja je priključena na injekcijski ventil (dalje u tekstu ventil 1). Na početku, ventil 1 ostaje u poziciji za učitavanje dok prijenos uzorka ne bude završen. Zatim se prebacuje u poziciju za injektiranje, a KOH koji dolazi iz eluent generatora gura uzorak iz petlje uzorka prema zaštitnoj i separacijskoj koloni. Za uklanjanje klorida online, IC je modificiran instalacijom dodatnog injekcijskog ventila (dalje u tekstu ventil 2). Ovaj je ventil postavljen između petlje uzorka na ventilu 1 i zaštitne kolone, slijedeći dizajn Lloyda Billinghama iz Sunquest Scientific. Softver (Chromeleon) je modificiran tako da ventil 2 ostane u poziciji za učitavanje dodatnih 2,5 minute nakon što se ventil 1 prebaci iz 'učitavanja' u 'injektiranje'. Tijekom tog vremena, korištena je 1 mmol/L NaOH otopina protoka 1 mL/min kako bi gurnula uzorak iz petlje na ventilu 1 prema koloni za čišćenje instaliranoj na ventilu 2. Ova dodatna NaOH otopina bila je opskrbljena vanjskom pumpom (Dionex GP50 gradijentna pumpa). Kolona za čišćenje na ventilu 2 bila je AG11-HC 4 x 50 mm kolona, koja separira anione sadržane u otopini slično zaštitnoj i analitičkoj koloni. Klorid je prvi eluirao i dozvoljeno mu je da prođe u otpad. Ventil 2 prebacivao se iz 'učitavanja' u 'injektiranje' nakon što je klorid prošao, ali prije nego što su drugi anioni eluirali iz kolone za čišćenje. Vrijeme je ručno kalibrirano nakon instalacije. Nakon 2,5 minute, ventil 2 automatski prelazi u 'injektiranje', a KOH eluent gura uzorak iz kolone za čišćenje na zaštitnu kolonu.

Kada instrument nije bio u načinu uklanjanja klorida, ventil 2 bio je u stanju pripravnosti. Kolona za čišćenje bila je isprana s NaOH i održavana vlažnom putem vanjske gradijentne pumpe. Ova otopina bila je poslana u otpad i stoga nije ometala analize provedene u standardnom načinu rada (Baidya i sur., 2023).



Slika 5. Shematski prikaz preklopnih ventila u ionskom kromatografu. Ventil 1 dio je standardne konfiguracije, dok su ventil 2 i pripadajuća mala kolona za pročišćavanje dodani za uklanjanje klorida. (A) Ventil 1 tijekom normalnog rada bez koraka uklanjanja klorida. Cijev koja vodi do kolone, supresora i detektora provodnosti može se dodatno produžiti za prijenos uzorka u ICP-MS. (B) Ventil 2 u stanju pripravnosti kada uklanjanje klorida nije potrebno. Mala kolona se neprestano ispiri vodom kako bi ostala hidratizirana. (C) Ventil 1 u načinu uklanjanja klorida. NaOH se uvodi pomoću dodatne pumpe. (D) Ventil 2 u načinu uklanjanja klorida, prima otopinu iz ventila 1 kada je ventil 1 u položaju inektiranja. Ventil 2 je u položaju učitavanja dok prima uzorak iz ventila 1 te se prebacuje u položaj inektiranja nakon 2,5 minute. (preuzeto i prerađeno iz Baidya i sur., 2023)

### 3.1.3. Povezivanje IC-a s ICPMS-om

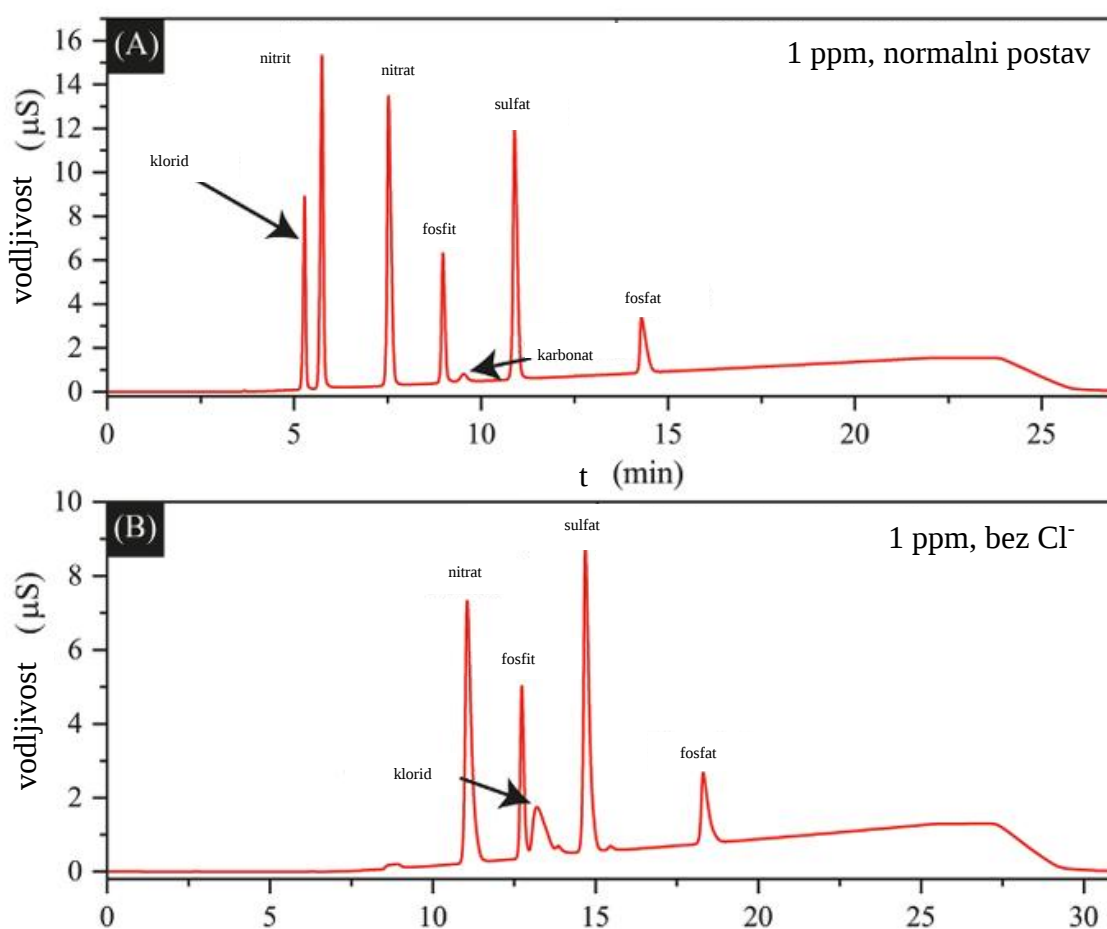
IC instrument bio je fizički povezan s ICPMS sustavom crnim PEEK cjevima. Ove cijevi bile su povezane između izlaza detektora provodljivosti na IC-u i ulaza nebulizatora na ICPMS-u. Kada su instrumenti bili povezani na ovaj način, supresor na IC-u bio je regeneriran s vanjskim izvorom vode pri protoku od približno 0,5–1 mL/min, koji je bio isporučen iz N<sub>2</sub>-preglednog spremnika (kada IC nije povezan s ICPMS-om, supresor se regenerira s otpadnom otopinom iz detektora).

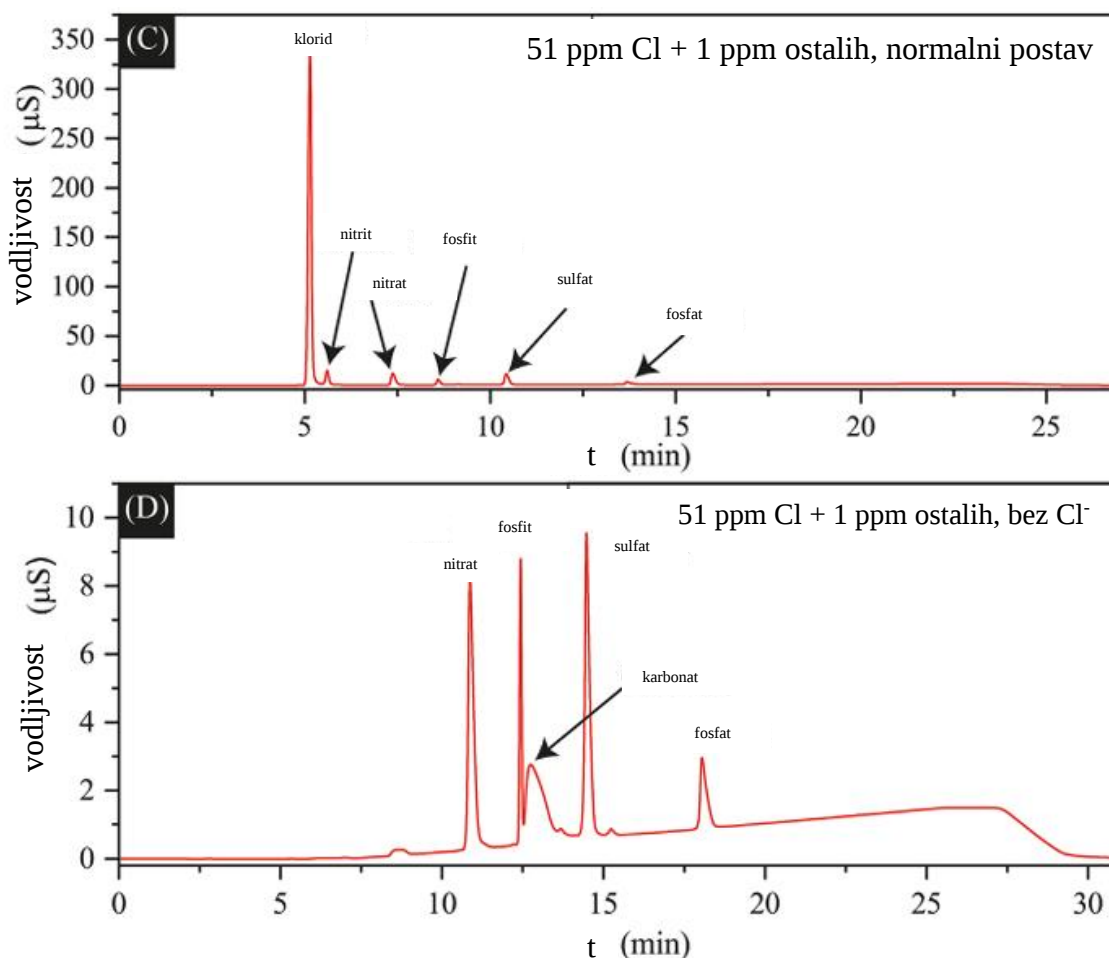
Plazma ICPMS-a bila je uključena tijekom cijelog dana; međutim, podaci su prikupljeni samo tijekom 3-minutnog razdoblja oko dolaska vrha fosfita iz svake otopine. Ovo je zahtijevalo da se analiza na ICPMS-u pokrene ručno nakon približno 12 minuta od početka IC analize svake otopine. ICPMS metoda za ovu analizu postavljena je s 750 pokretanja i 1 prolazom, što je ekvivalentno 3 minute po analizi. U datoteci sekvence, način izlaza kromatografije bio je odabran za svaki uzorak. Ručno je započeto prikupljanje podataka na ICPMS-u otprilike 1 minutu prije očekivanog dolaska vrha fosfita na detektoru provodljivosti na IC-u. Sam vrh trajao je oko 40 sekundi (Baidya i sur., 2023).

## § 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Uklanjanje klorida u ionskoj kromatografiji

Kromatogrami IC-a u načinu uklanjanja klorida (Slike 5C i 5D) pokazali su potpuno uklanjanje klorida, dok su fosfit i drugi ioni u otopini zadržani (Slike 6B i 6D). U usporedbi s normalnim načinom (Slike 6A i 6C), pokazalo se da je i nitrit uklonjen ovom metodom jer eluira blizu klorida. Međutim, nitrati, fosfiti, sulfati i fosfati su zadržani. Uklanjanje klorida nije bilo potpuno kada je odgoda na ventilu 2 (tj. vrijeme prije nego što ventil 2 prelazi iz pripravnosti u injektirani način) bilo kraće od 2 minute. Moguće je također eliminirati ione koji eluiraju nakon fosfita (kao što su sulfat ili fosfat) prebacivanjem ventila 2 natrag u stanje pripravnosti čim fosfit bude pomaknut iz kolone za čišćenje u zaštitnu kolonu.





Slika 6. IC kromatogrami s i bez sustava za uklanjanje klorida. (A) Pikovi 1  $\mu\text{g/g}$  otopine (sve vrste su u istoj koncentraciji) u standardnoj konfiguraciji. (B) Pikovi iste otopine u sustavu s uklanjanjem klorida. (C) Standardna konfiguracija s otopinom koja sadrži 51  $\mu\text{g/g}$  klorida i 1  $\mu\text{g/g}$  za sve ostale ione. (D) Ista otopina kao u (C), ali analizirana pomoću sustava za uklanjanje klorida, što pokazuje da uklanjanje klorida djeluje i pri visokim koncentracijama klorida (preuzeto i prerađeno iz Baidya i sur., 2023).

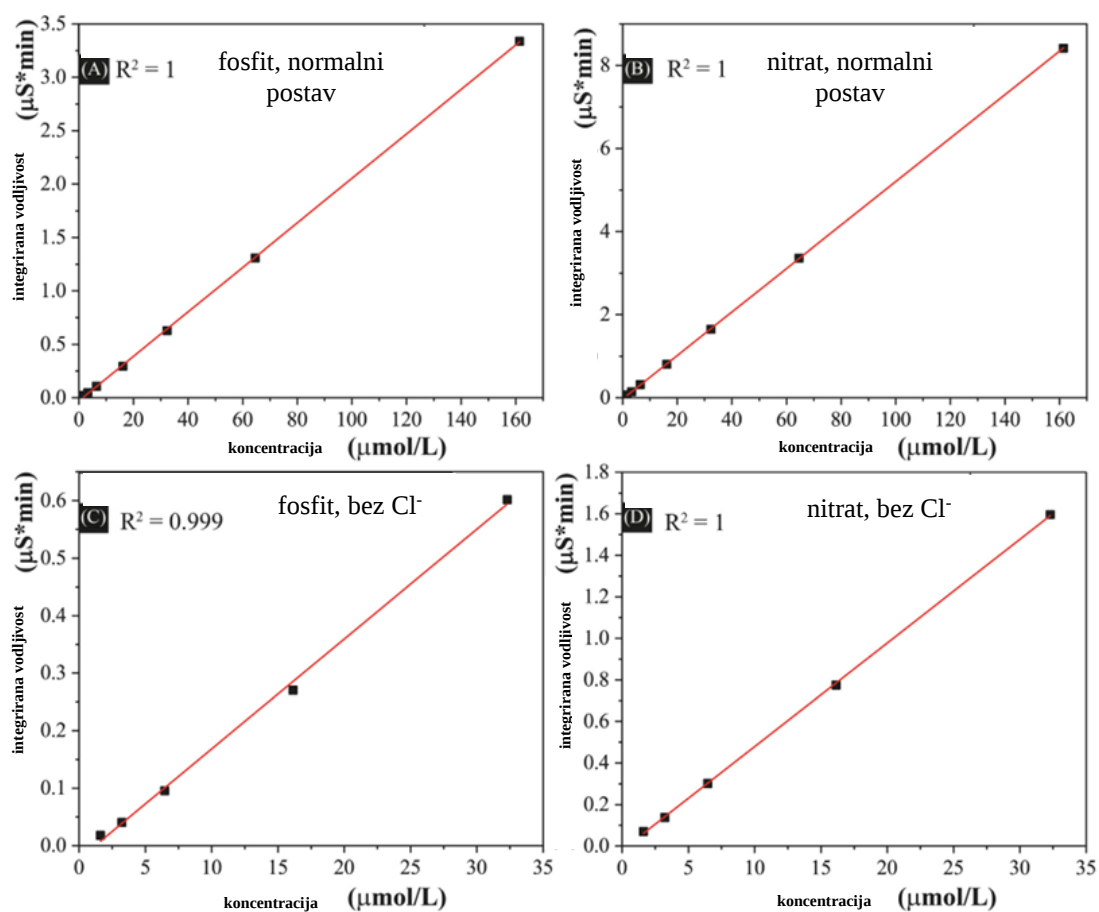
Kromatogrami u (B) i (D) ne sadrže klorid ni nitrit, ali prikazuju nešto veći karbonatni pik u usporedbi s (A) i (C). Pomak vremena zadržavanja za sve ione u (B) u odnosu na (A) je očekivan jer sustav za uklanjanje klorida produljuje put otopine od automatskog uzorkivača do detektora. Na oba prikaza vidljivo je povećanje osnovne linije tijekom analize, što je posljedica postupnog povećanja koncentracije KOH. U (D), fosfitni pik se nalazi na većem karbonatnom piku u usporedbi s (B), što je posljedica starenja NaOH otopine i pripadajućeg povećanja karbonata. Iako je fosfitni pik i dalje moguće razlučiti, ova bliska povezanost fosfita i karbonata naglašava

prednost IC/ICP-MS spregnutog sustava, u kojem se fosfit može analizirati kao pik neovisno o prisutnosti karbonata.

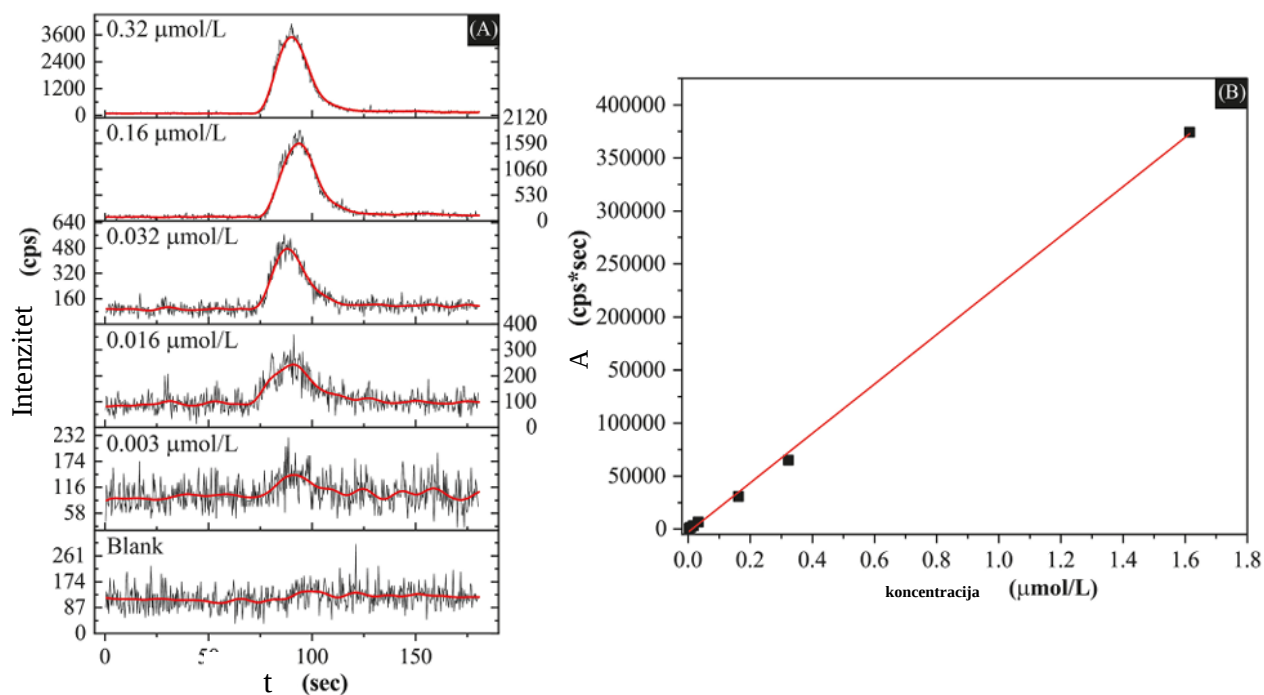
Kromatogrami s metodom uklanjanja klorida prikazuju veći vrh karbonata od onih generiranih u normalnom načinu (Slika 6A), unatoč korištenju NaOH bez karbonata. Sumnja se da je neki karbonat već bio otopljen u uzorcima i standardima, potekao od atmosferskog CO<sub>2</sub>. Dodatni CO<sub>2</sub> mogao je biti otopljen u NaOH otopini tijekom pripreme. Poduzete su mjere opreza kako bi se smanjio unos atmosferskog CO<sub>2</sub>, no nije bilo moguće jamčiti potpuno izbjegavanje. Vrijeme zadržavanja karbonata je samo malo duže od vremena zadržavanja fosfita, te bi stoga vrh karbonata mogao smanjiti povjerenje u detekciju i kvantifikaciju fosfita s detektorom električne provodljivosti u IC-u. Međutim, ovaj problem se rješava povezivanjem IC/ICP-MS, jer ICP-MS mjeri fosfit prema masi i stoga nije pod utjecajem prisutnosti iona karbonata (Baidya i sur., 2023).

## 4.2. Kalibracija i granice detekcije IC-a i IC/ICPMS-a

Generirane su kalibracijske krivulje s IC-om u standardnom načinu (bez uklanjanja klorida) i s povezanim IC/ICP-MS sustavom s uklanjanjem klorida, koristeći i detektor provodljivosti IC-a i SEM detektor ICP-MS-a. U svim slučajevima, podaci pokazuju dobru linearnost u koncentracijskim rasponima koji su testirani, s koeficijentima korelacije ( $r^2$ ) boljim od 0,999 (Slike 7). Kao što je prikazano na Slici 7, izvedba detektora provodljivosti u IC-u nije negativno pogođena prisutnošću postavke za uklanjanje klorida. Dobra linearnost dobivena je i s uklanjanjem i bez uklanjanja klorida, što je prikazano s fosfitom i nitratom. Ova opažanja ukazuju na to da uklanjanje klorida može biti korisno i za analize iona kao što je nitrat koji se ne može analizirati pomoću ICP-MS-a. Nadalje, ovo daje povjerenje da kolona za čišćenje ne uvodi slučajnu pogrešku. Što se tiče granica detekcije, povezivanje IC-a s ICP-MS-om rezultiralo je značajnim poboljšanjem, kao što se i očekivalo. U standardnom načinu bez uklanjanja klorida (Slika 7A), vrhovi fosfita mogli su se pouzdano kvantificirati do približno 0,32  $\mu\text{mol/L}$  (10 ng/g P) koristeći samo detektor provodljivosti. S IC/ICP-MS postavkom i SEM detektorom u ICP-MS-u, vrh je dobiven za samo 0,003  $\mu\text{mol/L}$  (0,1 ng/g P; Slika 8A). Također bi se mogle detektirati i nešto niže koncentracije (Baidya i sur., 2023).



Slika 7 Kalibracijske krivulje za fosfit i nitrat u normalnoj i postavci za uklanjanje klorida s IC detektorom provodljivosti. (A, B) Kalibracija za fosfit i nitrat u normalnoj postavci. (C, D) Kalibracija za fosfit i nitrat u postavci za uklanjanje klorida. Vrijednosti koeficijenta korelacije ( $r^2$ ) su  $> 0,999$  za sve slučajeve, što sugerira da uklanjanje klorida ne ometa druge vrhove (preuzeto i prerađeno iz Baidya i sur., 2023).



Slika 8. IC/ICP-MS kromatogrami i kalibracijska krivulja za fosfit. (A) Kromatogram praznog uzorka i otopina koje sadrže fosfit s koncentracijama od 0,1 do 10 ng/g (0,003 do 0,32 μmol/L). Crvene linije predstavljaju izravnanje krivulje dobivene filtriranjem brzom Fourierovom transformacijom s vrijednošću od 15 točaka. Otopina koncentracije 0,003 μmol/L (0,1 ppb) ima detektabilni fosfitni pik u usporedbi s praznim uzorkom. (B) Kalibracijska krivulja za fosfit s podacima integrala pika (preuzeto i prerađeno iz Baidya i sur., 2023).

## § 5. ZAKLJUČAK

Rezultati pokazuju da je uklanjanje klorida s kolonom za čišćenje i podijeljenim ventilom (ventil 2 na Slici 5D) u ionskoj kromatografiji održiva metoda za pojednostavljenje matriksa prirodnih i eksperimentalnih otopina za analizu fosfita. Za specije poput fosfita, ovaj alat može se kombinirati s povezivanjem IC-a na ICPMS sustav kako bi se postigla granica detekcije ispod  $0,003 \mu\text{mol/L}$  ( $<0,1 \text{ ppb P}$ ), u skladu s prethodnim istraživanjima, ali bez potrebe za velikim uzorkovnim petljama ili predanalitičkim tretmanom uzoraka. Rezultati pokazuju dobru linearnost u detektoru provodljivosti kako sa tako i bez postavke za uklanjanje klorida. Osim toga, možda će biti moguće dodatno modificirati vrijeme u softveru kako bi se dodatni ioni mogli eliminirati iz uzorka. Ovo istraživanje stoga predstavlja novi pristup za optimizaciju IC-a i potpuno iskorištavanje niskih granica detekcije ICPMS-a (Baidya i sur., 2023).

Koristeći modificiranu analitičku metodu i protokole, prisutnost fosfita otkrivena je u širokom skupu okolišnih uzoraka (površinska voda, voda s dna i međuprostorne vode izdvojene iz sedimenata na različitim dubinama). Izvještaji pokazuju da je u eutrofnim jezerima s ograničenom količinom fosfora koncentracija otopljenog reaktivnog fosfora od  $0,32 \mu\text{M}$  dovoljna da zadovolji potrebe fitoplanktona, dok bi pri višim koncentracijama od 1 do  $3,2 \mu\text{M}$  vjerojatno došlo do pojave algalnih cvjetanja. Potvrđeno je da fosfit može sudjelovati u biogeokemijskom ciklusu fosfora i pridonijeti eutrofikaciji u jezerima (Han, 2012)

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. A. S. Baidya, E. E. Stüeken, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 38 (2023) e9665. <https://doi.org/10.1002/rcm.9665>.
2. K. McLaughlin, J. A. Sohm, G. A. Cutter, M. W. Lomas, A. Paytan, *Global Biogeochem. Cycles* 27 (2013) 375–387. <https://doi.org/10.1002/gbc.20037>.
3. M. A. Pasek, J. M. Sampson, Z. Atlas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 15468–15473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408134111>.
4. W. Han, L. Tang, Y. Chen, J. Fang, *PLoS ONE* 8 (2013) e83366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083366>.
5. M. A. Pasek, J. P. Harnmeijer, R. Buick, M. Gull, Z. Atlas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 10089–10094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303904110>.
6. B. Herschy, S. J. Chang, R. Blake, et al., *Nat. Commun.* 9 (2018) 1346. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03835-3>.
7. B. Schink, M. Friedrich, *Nature* 406 (2000) 37. <https://doi.org/10.1038/35017644>.
8. H. Liu, N. Lyczko, A. Nzihou, C. Eskicioglu, *Water Res.* 241 (2023) 120138. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120138>.
9. J. L. Pasek-Allen, R. K. Wilharm, Z. Gao, V. C. Pierre, J. C. Bischof, *J. Mater. Chem. B* 10 (2022) 3734.
10. M. Pasek, K. Block, *Nat. Geosci.* 2 (2009) 553–556. <https://doi.org/10.1038/ngeo580>.
11. M. A. Pasek, D. S. Lauretta, *Astrobiology* 5 (2005) 4.
12. R. W. McDowell, B. J. F. Biggs, A. N. Sharpley, L. Nguyen, *Chem. Ecol.* 20 (2004) 1–40. <https://doi.org/10.1080/02757540310001626092>.
13. M. T. Dokulil, K. Teubner, u A. A. Ansari et al. (ur.), *Eutrophication: Causes, Consequences and Control*, Springer, 2011, str. 1–25.
14. A. A. Ansari, S. S. Gill, G. R. Lanza, W. Rast (ur.), *Eutrophication: Causes, Consequences and Control*, Springer, 2011.
15. C. F. Mason, *Biology of Freshwater Pollution*, 4. izd., Prentice Hall, London, 2002, str. 1–300.
16. D. W. Schindler, *Science* 184 (1974) 897–899. <http://www.jstor.org/stable/1738185>.

17. <https://www.minnpost.com/earth-journal/2013/11/leading-canadian-ecologist-calls-scientists-recover-policy-influence> (datum pristupa 13. ožujka 2025.)
18. Y. Sun, J. Han, Heterogeneous Information Networks: Principles and Methodologies, Morgan & Claypool, 2012.
19. J. Weiss, Basics of Ion Chromatography, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, 2020, str. 1–150.
20. Ch. Han, J. Geng, X. Xie, X. Wang, H. Ren, S. Gao, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 10667–10674.