

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut
Analüütilise keemia õppetool

Lola Sõukand

**ANALÜÜTILISE TESTI ARENDAMINE JA VALIDEERIMINE
ELAVHÕBE(II) IOONIDE MÄÄRAMISEKS**

Keemia õppekava
Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: Hanno Evard, PhD

Tartu 2025

INFOLEHT

Analüütilise testi arendamine ja valideerimine elavhõbe(II) ionide määramiseks

Käesolevas magistritöös arendati välja ja valideeriti analüütiline test anorgaanilise elavhõbe(II) ionide määramiseks veeproovidest. Arendatud analüütilises testis kasutati uuenduslikku silikageeli osakeste põhise materjali, kuhu kanti peale ditiison. Elavhõbe(II) ioon moodustab ditiisoniga oranži kompleksi, mida on võimalik mõõdetava signaalina kasutada. Töö käigus leiti parim lahusti ditiisonile ja lahuse pealekandmise viis. Samuti optimeeriti proovi kogus ja lisaetapid madalaima avastamispiiri saavutamiseks. Test valideeriti ja uuriti selle peamisi segajaid.

Märksõnad: Elavhõbe, joogivesi, veeanalüüs, test, silikageeli osakeste põhine materjal, ditiison

Development and validation of an analytical test for the determination of mercury(II) ions

In this master's thesis, an analytical test was developed and validated for detecting inorganic mercury(II) ions in water samples. The developed test utilizes an innovative silica particle-based material onto which dithizone was immobilized. Mercury(II) ions form an orange-colored complex with dithizone, which serves as a measurable signal. During the work, the most suitable solvent for dithizone and the optimal method of its application onto the material were determined. Additionally, sample volume and extra steps required for signal development were optimized. The analytical test was validated, and the main interfering substances were studied to assess the test's selectivity.

Keywords: Mercury, drinking water, water analysis, test, silica particle-based material, dithizone

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Elavhõbe.....	6
1.2 Elavhõbeda mõõtmine.....	7
1.3 Ditisoon	8
1.4 Paberipõhised analüütilised seadmed.....	9
1.5 Osakestepõhised analüütilised testid.....	10
1.6 Tahke faasi ekstraktsioon	11
2 METOODIKA.....	14
2.1 Reagendid.....	14
2.2 Silikageeli osakeste põhine materjal	14
2.3 Testi ehitus.....	17
2.4 Testi kasutamine	18
2.5 Pilditöötlus	19
2.6 Elavhõbeda lahused.....	20
3 TULEMUSED JA ARUTELU	21
3.1 Ditisooni lahusti	21
3.2 Ditisooni kandmine trükitud testile.....	22
3.3 Testi parameetrite optimeerimine.....	24
3.4 Valideerimine	29
3.5 Signaali saamismeetodite võrdlus	32
3.6 Segajad	33
3.7 Järeldused	34
KOKKUVÕTE.....	35
SUMMARY	36
KASUTATUD KIRJANDUS	37
LISAD	40

KASUTATUD LÜHENDID

AFS - *atomic fluorescence spectrometry* - aatomfluorestsentspektromeetria

CV-AAS - *cold vapour atomic absorption spectrometry* - külma auru aatomabsorptsioon-spektromeetria

CV-AFS - *cold vapour atomic fluorescence spectrometry* - külma auru aatomfluorestsentspektromeetria

DMSO - dimetüülsulfoksiid

FI-ICP-OES - *flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry* - voolu süstimisega induktiivsidestatud plasma optilise emissiooni spektromeetria

ICP-MS - *inductively coupled plasma mass spectrometry* - induktiivsidestatud plasma massi-spektromeetria

LoD - *limit of detection* - avastamispää

PADs - *paper-based analytical devices* - paberipõhised analüütilised seadmed

TFE - tahke faasi ekstraktsioon

SISSEJUHATUS

Elavhõbe on inimeste närvisüsteemile mürgine, kuid seda leidub igal pool meie ümber. 19. ja 20. sajandil kasutati elavhõbedat laialdaselt ning seda sattus suures koguses loodusesse. Kuna elavhõbe ei lagune, siis ei vähene see ka loodusest. Seetõttu on vajalik elavhõbede taseme jälgimine.

Hetkel määratakse elavhõbedat erinevate instrumentaalanalüüsi meetoditega, põhiliselt spektomeetriliste meetoditega, mis nõuavad spetsiaalseid seadmeid ja väljaõpet ning on kallid. Käesolevas töös pakutakse selleks alternatiivset lähenemist: osakestepõhised analüütilised testid, mis võimaldavad lihtsalt ja kiirelt määrata elavhõbedat. Samuti ei ole selleks vaja kalleid seadmeid ega eriteadmisi.

Töö eesmärk on arendada ja valideerida silikageeli osakeste põhine analüütiline test, millega oleks võimalik veeproovidest mõõta anorgaanilist elavhõbe(II) iooni. Selleks kasutatakse uudset osakestepõhiste testide tehnoloogiat, millel kombineeritakse tahkefaasi ekstraktsioon (TFE) analüüdi kontsentreerimiseks ning kolorimeetria mõõtmiseks. Silikageeli osakeste põhine materjal trükitakse siiditrüki abil mikroskoobi slaidile ja pärast materjali kuivamist kantakse ditisoon moodustunud materjalile. Proovi lisamisel materjalile moodustub elavhõbe(II)-ditisooni kompleks, mis muudab roosa ditisooni ala oranžiks. Ditisoon töötab nii indikaatori kui ka ligandina TFE alal, mis kontsentreerib analüüti. Proovid hapestatakse, et tagada ditisooni selektiivsus, mis tähendab, et muud proovi komponendid (maatriks) elueeritakse TFE alalt ära. Analüüdi kogust mõõdetakse värvisignaali pindala järgi.

Töö käigus arendati ja optimeeriti erinevad testi sammud. Seejärel valideeriti arendatud analüütiline test ja uuriti potentsiaalseid metalli katioone, mis võivad ditisooniga reageerides anda segava signaali.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Elavhõbe

Elavhõbe (Hg, *hydrargyrum*) esineb looduses kolmes erinevas vormis: lihtainena, anorgaanilisena ja orgaanilisena. Metalliline elavhõbe (Hg^0) on toatemperatuuril vedel (sulamistemperatuur $-38,8\text{ }^\circ\text{C}$). Seda saadakse kinaveri (HgS) mineraali kuumutamisel. Kinaveri soontes võib leida ka metallilist elavhõbedat. Anorgaaniliste ja orgaaniliste ühendite puhul võib elavhõbe olla ühendites katioonina kahe erineva laenguga: Hg^{1+} ja Hg^{2+} . Samuti saavad anorgaaniline ja orgaaniline elavhõbe olla polükatiooni kujul. Enamik anorgaanilisi elavhõbede soolasid on vees lahustumatud või vähelahustuvad. Vees hästi lahustuvad on näiteks elavhõbe(II)nitraat ($20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) [1] ning mõõdukalt lahustub elavhõbe(II)kloriid ($0,269\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($25\text{ }^\circ\text{C}$)) [2]. Orgaaniliseks elavhõbedaks loetakse ühendeid, millel on kovalentne side süsiniku ja elavhõbede (C-Hg) vahel. Mikrobioloogiliste metabolismiprotsessidega võib anorgaanilisest elavhõbedast saada dimetüülelavhõbe ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) ja metüülelavhõbeioon (CH_3Hg^+). [3–5]

Looduses leidub elavhõbedat maakoos, atmosfääris, elusolendites ning mere-, põhja- ja vihmavetes. Suur osa elavhõbedast satub loodusesse tööstuste tõttu. Praegu looduses ringlev elavhõbe on sinna sattunud ajaloolise ja tänapäeva inimtegevuse ja looduslike eraldumiste koosmõjul. Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) poolt koostatud raporti järgi on kaks kolmandiku inimtegevuse pärast meres olevast elavhõbedast sinna sattunud enne 1920. aastat. Selle põhjuseks on elavhõbede ajalooline tähtsus. Elavhõbedat on kasutatud kulla kaevandustes, leeliste ja kloori tootmisel Hg-katoodides, valgusallikates, difusioonpumpades, erinevates mõõteriistades (nt. termomeetrid, baromeetrid, manomeetrid) ja hambaplommides. Kuna elavhõbe ei lagune ja jääb ringlusesse, siis ei hakka ÜRO andmetel ka lähiajal elavhõbede tase merevees vähenema. [4–6]

Looduses on anorgaaniline Hg^{1+} tavatingimustes ebastabiilne ja seetõttu leidub teda väga vähe. Hg^0 on kõrge lenduvusega ja seda leidub atmosfääris. Samuti võib leida mullast Hg^0 inimtegevuse tõttu tekkinud reostustest. Mullas on elavhõbe tavaliselt Hg^{2+} soolade kujul või õigetest tingimustel ka orgaanilise elavhõbede ühenditena. Ookeanides leidub elavhõbedat põhiliselt Hg^0 , Hg^{2+} , metüülelavhõbedana ja dimetüülelavhõbedana. [1,7]

Elavhõbeda aurud ja ühendid on mürgised. Inimestel kahjustab elavhõbe peamiselt närvisüsteemi. Inimeseni võib elavhõbe jõuda otsese kokkupuutega või söögiga, põhiliselt kaladest. Seetõttu on kehtestatud erinevad piirmäärad. Eestis on joogivees leiduva elavhõbeda piirmäär $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ja pinnavee puhul $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. [3,5,8,9]

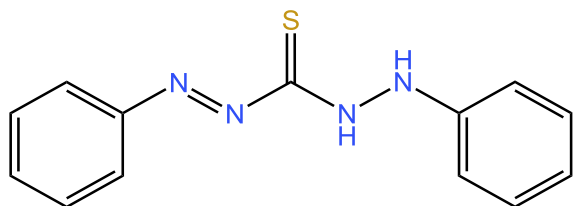
1.2 Elavhõbeda mõõtmine

Elavhõbedat on võimalik veest mõõta erinevate instrumentaalanalüüsi meetoditega. Madalate kontsentratsioonide (kuni $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) puhul kasutatakse külma auru aatomfluorestsentspektromeetriat (CV-AFS), külma auru aatomabsorptsioonspektromeetriat (CV-AAS), voolu süstimisega induktiivsidadestatud plasma optilise emissiooni spektromeetriat (FI-ICP-OES) ja induktiivsidadestatud plasma massispektromeetriat (ICP-MS). Lisaks kasutatakse veest elavhõbeda mõõtmiseks aatomfluorestsentspektromeetriat (AFS), millega on võimalik mõõta $1 \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ kuni $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Sellised meetodid on kallid ja nende kasutamine vajab spetsiifilist infrastruktuuri ning väljaõppega inimesi. Paljudes valdkondades, näiteks kalanduses, pole majanduslikult tasuv proove laborisse saata, et teostada pidevat kontrolli. Seetõttu on vaja odavamad, kiiremad ja lihtsamad meetodid, mida saab kasutada seire tegemiseks. Üheks võimalikuks meetodiks on kolorimeetria. [10–12]

Kolorimeetria on analüütilise keemia meetod, kus võrreldakse proovi analüüsist saadud värvi (neeldumise intensiivsust) eelneva kalibratsiooniga. Mõõtmiste teostamiseks kasutatakse erinevaid seadmeid. Ühed laialt levinud instrumendid on kolorimeeter ja spektrofotomeeter, kus mõõdetakse lahust läbiva valguse neeldumist. Kolorimeetriat saab kasutada ka näiteks paberil oleva värvi puhul, kasutades signaali mõõtmiseks skannerit. Sellist kolorimeetrilist mõõtmist kasutatakse laialdaselt näiteks paberipõhiste analüütiliste seadmete puhul. Kolorimeetrilised meetodid on lihtsad, odavad ja vajavad minimaalset infrastruktuuri. Seega sobivad hästi esialgsete tulemuste saamiseks. Kolorimeetriliste meetodite puuduseks, eriti elavhõbeda määramise puhul, on kõrged määramispiirid. [13,14]

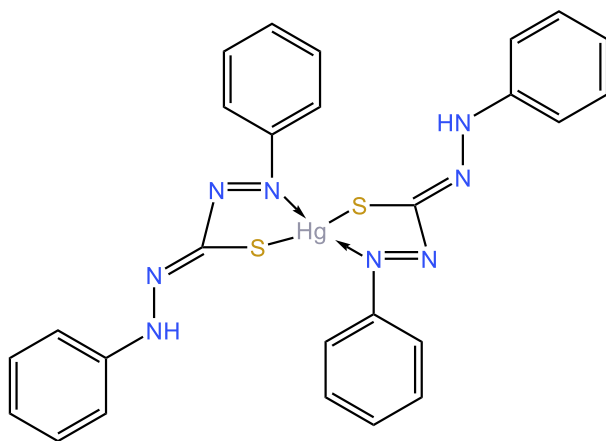
1.3 Ditsoon

Üheks kolorimeetrias kasutatavaks reagentiks on ditsoon ($C_{13}H_{12}N_4S$, Joonis 1) ehk difenüülitiokarbasoon, kuna see annab värvilisi komplekse metalli ionidega. Ka anorgaanilise elavhõbe(II) ionide kolorimeetriliseks analüüsiks kasutatakse reaktsiooni ditsooniga. [15,16]



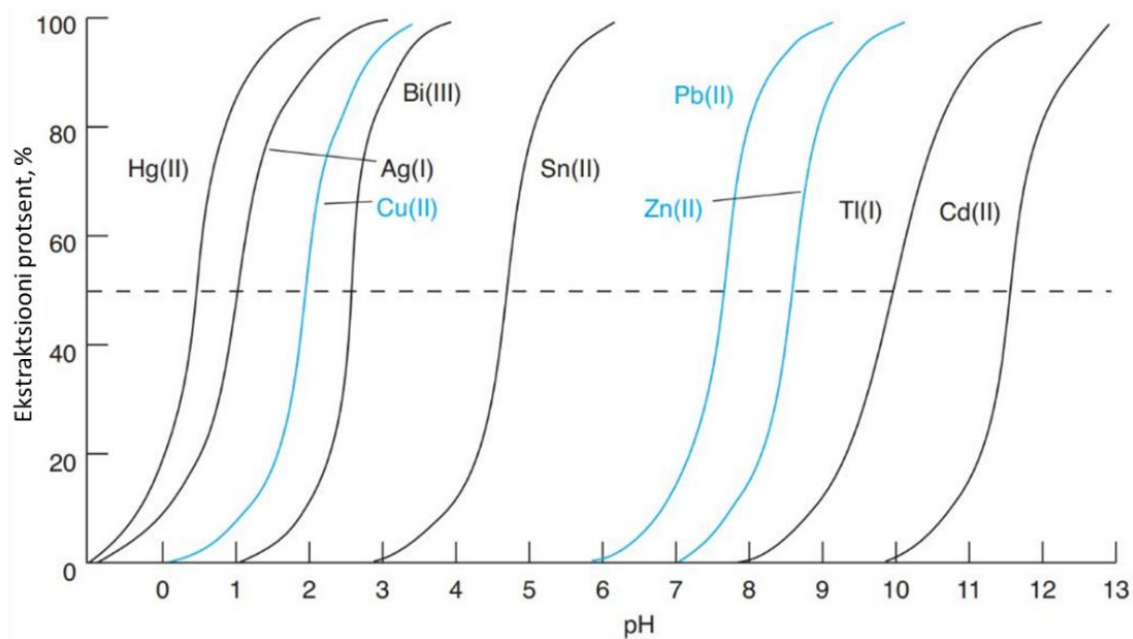
Joonis 1. Ditosooni struktuur. [16]

Esimesed meetodid elavhõbeda mõõtmiseks ditsooniga tehti koos vedelik-vedelik ekstraktiooniga. Kuna ditsoon lahustub orgaanilistes lahustes hästi, andes tumerohelise lahuse, aga vees ei lahustu, siis ekstraheeritakse proovis olev elavhõbe(II)ioon ditsooni-kloroformi lahusesse. Lahuses moodustavad ditsoon elavhõbedaga oranžikas-pruunikat värvi andva kompleksi (Joonis 2). Elavhõbe-ditsooni kompleksi lahustuvus on vees madal ja seega lubab selline meetod ka kontsentreerida metalli ioone. Sellise meetodi määramispiirideks on $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kuni $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Sarnaselt sellele meetodile on arendatud tahke faasi ekstraktiooni ja ditsooni baasil elavhõbeda ionide mõõtmise meetod. Selleks on põhiliselt kasutatud tahke faasi ekstraktiooni kolonne [17] või membraane [18], kus ditsoon on tahke materjali pinnal ning seob endaga elavhõbe(II) ioone. [15,16,19–21]



Joonis 2. Elavhõbe(II)-ditsooni kompleks. [22]

Ditsoon moodustab komplekse mitme metalli katiooniga nagu näiteks elavhõbe, antimon, kaadmium, koobalt, vask, kuld, raud, plii, mangaan, nikkel, plaatina, hõbe, tina, tsink, jne. Kuna paljud erinevad metalli katioonid moodustavad värvi andvaid ühendeid ditisooniga, võivad need põhjustada ditisooni madalast selektiivsusest tulenevaid valesid mõõtmistulemusi. Enamike veeproovide puhul on suurimateks segajateks eeldatavasti vask ja raud, kuna nende ühendite kontsentratsioon on proovides enamasti oluliselt kõrgem teistest metalli katioonidest. Metallid saavad moodustada ditisooniga komplekse erinevate pH-de juures (Joonis 3). Elavhõbe(II) iooni puhul moodustub kompleks madala pH juures ja seetõttu on võimalik pH-d kasutada elavhõbe(II) ionide mõõtmisel selektiivsuse saavutamiseks. [15,23,24]

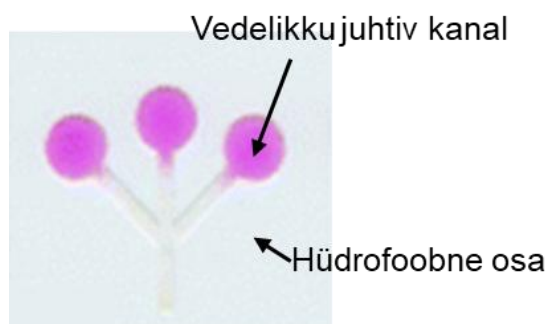


Joonis 3. Ditisooni ekstraheerimisvõime erinevatel pH-del. [23]

1.4 Paberipõhised analüütilised seadmed

Paberipõhiseid analüütilisi seadmeid (PADs, inglise keeles *paper-based analytical devices*) hakati arendama 2007. aastal. Nendes seadmetes kasutatakse paberit, sest see on odav, laialdaselt kättesaadav, keskkonnasõbralik ning ta märgub kapillaarjõudude tõttu spontaanselt. PADs valmistamiseks tehakse paberisse kanalid: osa paberist tehakse hüdrofoobseks (näiteks parafiini abil) või lõigatakse vajamineva kujuga paber lehest välja (Joonis 4). Selle tõttu on võimalik suunata

vedelikke kanalite kaudu läbi erinevate seadme osade ja seeläbi teostada mitmesammulist analüüsi. [25]



Joonis 4. Paperipõhine analüütiline seade. [14]

PADs-ides on ühendatud erinevad analüüsi etapid, proovi eeltötlusest (n. kromatograafia) kuni mõõtmismeetoditeni (n. kolorimeetria, fluorestsents, elektrokeemilised meetodid). Üks põhilisi motivatsioone PADs-ide arendamisel on vajadus teha analüütilisi mõõtmisi väljaspool laborit ja seetõttu on kolorimeetria üks populaarsemaid meetodeid. Kolorimeetria ei vaja keerukaid instrumente ning lubab teostada mõõtmisi ka lihtsalt testi värvi muutust vaadeldes. Kvantitatiivseteks mõõtmisteks kasutatakse laialdaselt kättesaadavaid ning odavaid seadmeid (nutitelefoniid, skannerid, kaamerad), kus mõõdetakse materjalilt peegeldatud valgust. Digitaalsetele piltidele tehakse seejärel pilditöötlus, et teada saada näiteks värvi intensiivsus ja värvitud ala suurus. Selleks, et mõõtmised oleks hea korduvusega, peab valgus olema piltide tegemisel iga kord sama. Kolorimeetriliste meetodite puhul on oluliseks puuduseks kõrged määramispiirid. [14,26]

1.5 Osakestepõhised analüütilised testid

Tartu Ülikooli keemia instituudi mikrofluidika uurimisgrupis on välja arenenud uused osakestepõhised analüütilised testid (Joonis 5). Võrreldes PADs-idega, kasutatakse paberi asemel testi valmistamiseks osakekestest ja siduvainest koosnevat poorset materjali. Vajaliku kuju saamiseks trükitakse siiditrükiga silikageeli osakesed koos ksantaankummiga klaasist mikroskoobi slaidile. Ksantaankumm käitub nii prinditava pasta paksendajana kui ka prinditud materjalil siduvainena. Selle uude tehnoloogia puhul on erinevate osakeste valimisel võimalik varieerida

poori suuruseid ja pinna keemilist koostist. Võrreldes PADs-iga võimaldab osakestepõhine materjal ka paremini ühendada erinevaid materjale ja seega erinevaid analüütilisi meetodeid ühele testile nagu näiteks tahke faasi ekstraktsioon ja kromatograafia. [24,27–29]



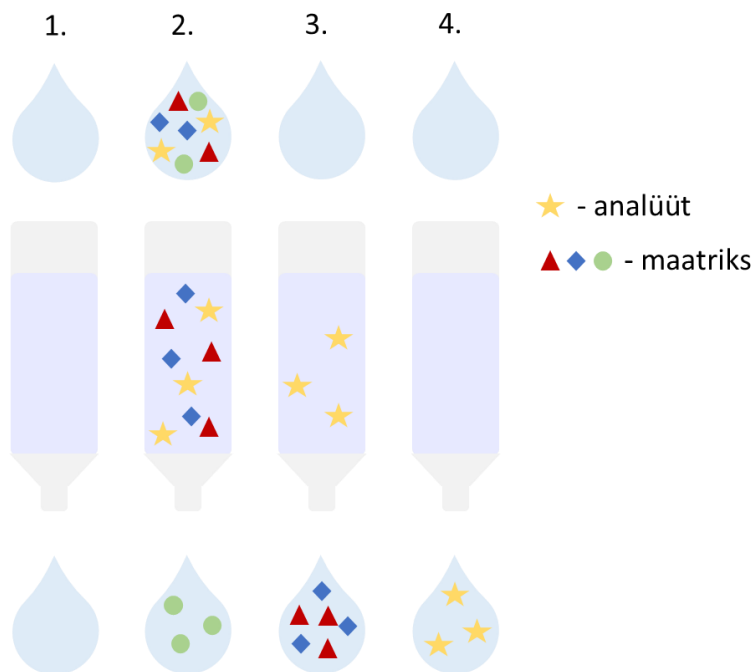
Joonis 5. Näide osakestepõhisest materjalist valmistatud testist, kus kasutatakse kromatograafiat, et eraldada metallikatioonid üksteisest ning seejärel kolorimeetriliselt tuvastada. [28]

1.6 Tahke faasi ekstraktsioon

Tahke faasi ekstraktsioon (TFE) on analüütiline meetod proovide ettevalmistamiseks. Ekstraktsiooni eesmärgiks on eemaldada analüüt maatriksist ning tõsta analüüdi kontsentratsiooni. TFE puhul on kasutusel kaks faasi: tahke ja vedel faas. Analüüdi ja maatriksi erinev interaktsioon tahke faasi pinnaga lubab need üksteisest eraldada ning analüüdi adsorptsioon pinnale lubab seda kontsentreerida. [30,31]

Traditsioonilise TFE puhul eemaldatakse maatriks proovist neljasammulise meetodiga (Joonis 6):

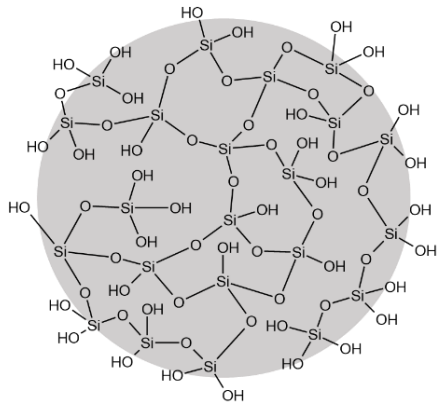
1. Tahke faasi ettevalmistus
2. Proovi lisamine
3. Maatriksi eemaldamine analüüdist
4. Analüüdi eraldamine tahkelt faasilt



Joonis 6. TFE etapid: 1.) tahke faasi ettevalmistus, 2.) proovi lisamine, 3.) maatriksi eemaldamine analüüdist ja 4.) analüüdi eraldamine tahkelt faasilt. [30]

Vastavalt analüüdile ja maatriksile saab valida sobiva pinnakeemiaga tahke faasi ning vajalikud eluendid, et saavutada selektiivsus (Joonis 6, etapp 1). Näiteks kasutatakse tihti hüdrofoobsete orgaaniliste ühendite analüüsil mittepolaarset (C18) pinnakeemiat. Proovi lisamisel (Joonis 6, etapp 2) adsorbeerib tahke faas proovis olevad hüdrofoobsed ühendid ning kõik muu liigub läbi kolonni. Seega kontsentreerib tahke faas analüüdi ja maatriksi, mis pinnale kinni jääb. Seejärel (Joonis 6, etapp 3) lisatakse pesusolventi (nt. metanool), et kolonnist välja pesta proovis olevad maatriksi ühendid. Kuna erinevate maatriksi osade kolonnist välja pesemiseks võib olla vaja erinevaid solvente, siis korratakse seda sammu vajadusel mitu korda ja erinevate solventidega. Viimaks (Joonis 6, etapp 4) lisatakse eluent, mis eemaldaks tahkest faasist analüüdi. [30,31]

Üheks kasutatavamaks tahkeks faasiks ehk sorbendi tüübiks on silikageeli osakesed. Silikageeli osakesed on suure poorsusega materjal, mille pindala ja pooride suurust on võimalik kontrollida polümeeriseerimise tingimusi muutes. Tänu väliskihil (Joonis 7) olevatele -OH rühmadele, mis moodustavad vesinksideme, on osakesel adsorbeerivad omadused. Silikageeli osakeste suureks plussiks on nende odavus, laialdane kättesaadavus, hea keemiline vastupidavus, pinnakeemia modifitseerimise võimalus, võimalus erineva poorsusega ja suurusega osakesi sünteesida. [31–34]



Joonis 7. Silikageeli osakese mudel. [34]

2 METOODIKA

2.1 Reagendid

Töös kasutatud reagendid on askorbiithape ($C_6H_8O_6$, Carl Roth GmbH, puhtus > 99%), atsetonitriil (Honeywell International Inc., puhtus 99,9%), atsetoon (CH_3COCH_3 , APChemicals OÜ, puhtusega 99,5%), ditisoon ($C_{13}H_{12}N_4S$, Alfa Aesari, puhtus 98%), DMSO (Dimetüülsulfoksiid, Aldrich[®], puhtus 99,9%), elavhõbe(II)nitraat ($Hg(NO_3)_2$, Thermo Fisher Scientific Inc., puhtus > 98%), etanool (Honeywell International Inc., puhtus 99,8%), isopropanool (Honeywell International Inc., puhtus 99,9%), kloroform (Thermo Fisher Scientific Inc., puhtus 99,88%), ksantaankumm (Sigma-Aldrich[®]), metanool (Sigma-Aldrich[®], puhtus > 99,85%), naatriumskorbaat ($C_6H_7NaO_6$, ThermoFisher GmbH, puhtus 99%), silikageeli osakesed (Merck KGaA, LiChroprep[®] Si 60 (15-25 μm)), toluen (Honeywell International Inc., puhtus > 99,7%), vesinikkloriid hape (HCl, Honeywell International Inc.), väävelhape (H_2SO_4 , Honeywell International Inc., puhtus 95-97%).

2.2 Silikageeli osakeste põhine materjal

Testide valmistamisel kasutatud silikageeli osakeste põhine materjal ja selle klaasile kandmine tehti varem Tartu Ülikooli mikrofluidika töörühmas välja töötatud meetodi järgi [28].

Osakestepõhise materjali trükkimisel kasutati ksantaankummi, Milli-Q vee ja silikageeli osakeste segu. Esmalt valmistati ksantaankummi $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ vesilahus. Selleks segati kokku 0,4 g ksantaankummi ja 100 ml vett ning seejärel kuumutati ja segati magnetsegajaga kuni lahus oli ühtlane. Segu oli võimalik kasutada seni kuni lahuses ei olnud näha osakesi, tavaliselt oli selleks 3-4 nädalat. Lahust hoiustati külmkapis (4 °C).

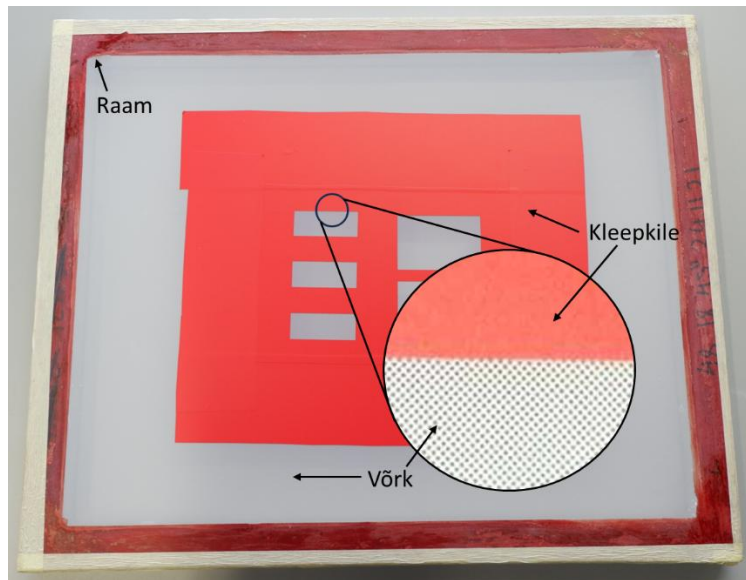
Silikageeli osakesi oli vaja enne kasutamist pesta, et eemaldada segavaid metalli katioone. Selleks kasutati sama töörühma poolt väljatöötatud meetodit.

1. Kaaluti 6,6 g silikageeli osakesi ja 600 mg naatriumskorbaati.
2. Lisati 28,75 ml destilleeritud vett ja 1,25 ml kontseentreeritud vesinikkloriid hapet.
3. Segu jäeti orbitaalloksutile 2 h ja seejärel eemaldati segu loksutilt.
4. Osakestel lasti settida ~1 h.

5. Lahus valati settinud osakeste pealt ära.
6. Osakestele lisati 25 ml destilleeritud vett ja segu raputati kuni see oli homogeenne.
7. Korrati samme 4 kuni 6, seejärel korrati samme 4 ja 5.
8. Osakestele lisati 600 mg naatriumaskorbaati, 1,25 ml kontsentreeritud HCl ja 18,75 ml destilleeritud vett ja jäeti üle öö orbitaalloksutile. Seejärel eemaldati segu loksutilt.
9. Korrati samme 4 kuni 6, kaks korda, seejärel korrati samme 4 ja 5.
10. Osakestele lisati 400 mg naatriumaskorbaati, 833 µl kontsentreeritud HCl ja 19,17 ml destilleeritud vett ja jäeti üle öö orbitaalloksutile. Seejärel eemaldati segu loksutilt.
11. Korrati samme 4 kuni 6, kaks korda, seejärel korrati samme 4 ja 5.
12. Osakestele lisati 400 mg naatriumaskorbaati, 167 mg askorbiithapet ja 20 ml destilleeritud vett ja jäeti üle öö orbitaalloksutile. Seejärel eemaldati segu loksutilt.
13. Korrati samme 4 kuni 6, kuus korda, seejärel korrati samme 4 ja 5.
14. Osakesed valati Petri tassile ja pandi ahju kuivama (120 °C).

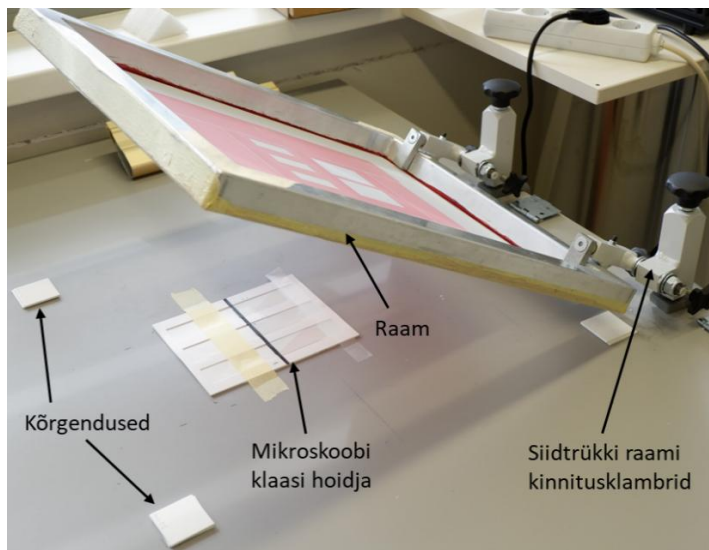
Trükkimiseseu valmistamiseks segati puhastatud silikageeli osakesed ja ksantaankummi lahus omavahel spaatliga kokku. Ainete kogused võeti nii, et silikageeli osakeste kontsentratsioon segus oleks $475 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Segu trükiti koheselt siiditrüki abil mikroskoobi slaidile (VWR[®] Microscope Slides).

Siiditrüki teostamiseks valmistati kõigepealt ette siiditrükki sõel ehk võrk (T48, ava suurusega $\sim 142 \text{ } \mu\text{m}$), millele kleebiti kleepkilest (Oracle[®], Economy Cat 641) väljalõigatud disain, mis vastab trükitava testi kujule (Joonis 8). Väljalõike disainimiseks kasutati Cricut programmi ja kleepkilest disaini väljalõikamiseks kasutati Cricut[®] Joy lõikemasinat.



Joonis 8. Siiditrüki raam, võrk ja võrgule kleebitud testi disainiga kleepkile.

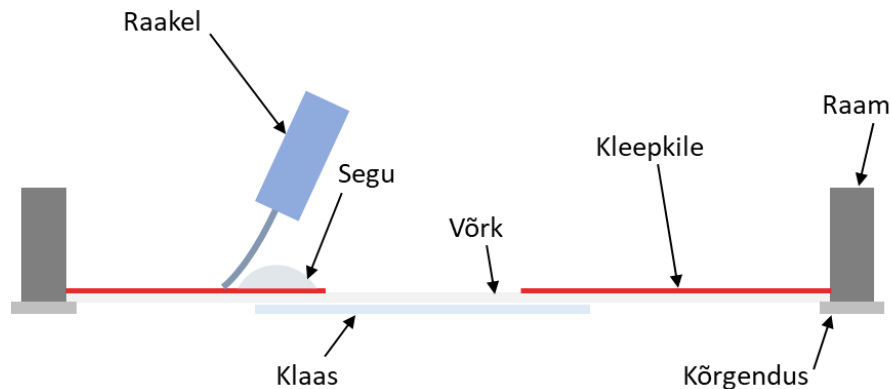
Siiditrüki raam kinnitati spetsiaalsete kinnitusklambritega lauale, et raami oleks trükkimiste vahepeal võimalik üles tõsta ja et ta ei liiguks selle käigus paigast (Joonis 9). Selleks, et raam oleks õigel kõrgusel, lisati enne klambritega paika panekut nurkadesse 4 mm kõrgendused. Võrgule kleebitud kleepkilel oleva disaini alla asetati mikroskoobi slaidid koos alusega, mis kinnitati lauale paberteibiga, et see paigalt ei liiguks.



Joonis 9. Siiditrüki süsteem.

Trükkimiseks pandi raam alla (võrgu ja klaasi vahele jäi 2mm). Seejärel lisati spaatliga võrgu peale silikageeli osakeste ja ksantaankummi segu. Segu liigutati raakliga üle testi disaini, et võrgu avad oleks täidetud seguga. Trükkimiseks suruti raakliga võrk vastu klaasi ja tõmmati üle disaini. Seda sammu korrati mõlemas suunas (trükkija poole ja trükkijast eemale). Trükitud segu läks läbi võrgu klaasile vastavalt disainile. Siiditrüki protsessi kirjeldav skeem on näha Joonisel 10. Seejärel eemaldati üleliigne segu võrgult ja tõsteti raam üles. Klaasslaidid koos trükitud seguga asetati ahju (120 °C) 2-3 h kuivama.

Trükitud disain oli ristküliku kujuline, mille laius oli 1 cm ja pikkus 5 cm. Teste trükiti tavaliselt korraga ligikaudu 30 tükki ja pärast kuivatamist ahjus säilitati need mikroskoobi slaidi karpides.



Joonis 10. Siiditrüki protsessi skeem ristlõikena.

2.3 Testi ehitus

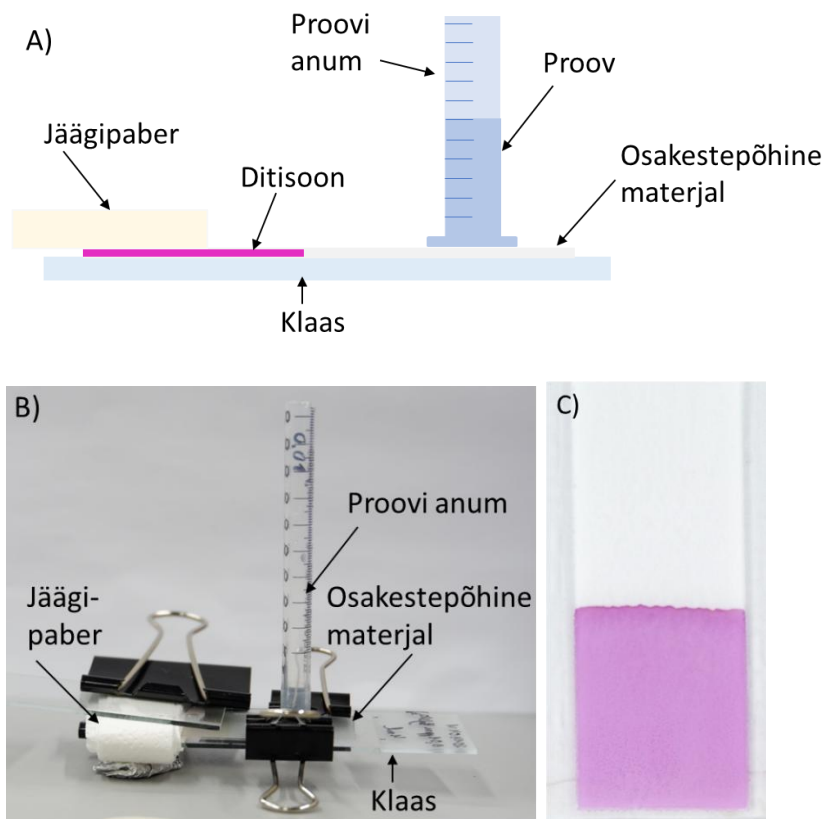
Joonisel 11 A ja B on näidatud kogu kokkupandud test, mis koosneb trükitud materjalist klaasil, materjalile lisatud ditisoonist, proovi lisamise anumast ja jäägipaberist. Joonisel 11 C on näha trükitud materjal, kuhu on lisatud ditisoon.

Ditisooni lahuse valmistamiseks kasutati ditisooni ja atsetooni. Lahust säilitati pimedas kuni kuu aega.

Ditisooni trükitud materjalile lisamiseks asetati test otsapidi ditisoon-atsetooni lahusesse, et lahus elueeruks trükitud materjalile ja kataks materjali otsast ~2 cm ditisooniga (Joonis 11 C). Seejärel

kuivatati testid 120 °C ahjus 1-2 min. Testid, millele oli ditisoon lisatud, kasutati samal päeval. Ditisooni osa toimib testis tahke faasi ekstraktsiooni alana.

Proovide lisamiseks testile valmistati spetsiaalne anum. Selle jaoks lõigati ära süstla (Injekt Duo, 1 ml) otsik ja eemaldati kolb ning nõel. Modifitseeritud süstla kinnitati klambritega trükitud testi osale, millel ei olnud ditisooni (Joonis 11 A ja B). Ditisooniga ala lõppu (testi alumisse äärde) lisati jäägipaberiks pabersalvrätik (Joonis 11 A ja B), AB Grigeo. Tagamaks jäägipaberi parema kontakti materjaliga kinnitati see klambritega.

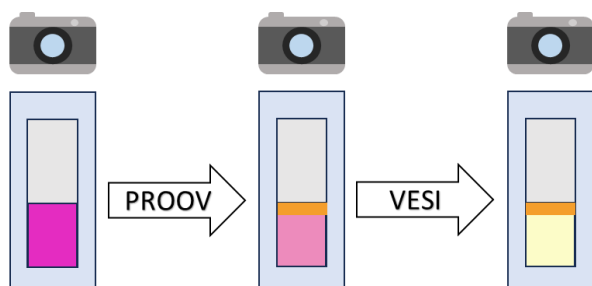


Joonis 11. Testi kasutamiseks vajaliku süsteemi A) skeem ja B) pilt ning C) kasutuseks valmisolev trükitud materjal, kuhu on lisatud ditisoon.

2.4 Testi kasutamine

Testi kasutamiseks hapestati proov, et tagada selektiivsus. Hapestamiseks kasutati 0,5 M väävelhapet. Seejärel lisati anumasse proovi vahemikus 1-10 ml, mille järel hakkas proov trükitud

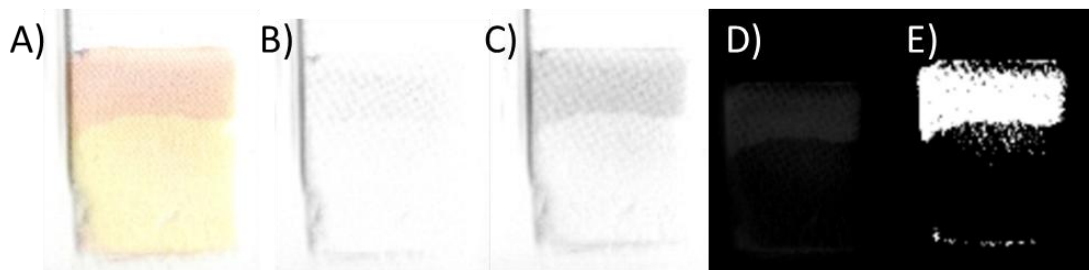
materjali märgama ja liikuma jäägipaberi poole. Proovi lisati 500 µl kaupa. Jäägipaberit vahetati uue kuiva vastu vastatavalt vajadusele. Pärast proovi lisati vajadusel samasse proovi anumasse Milli-Q vett, et pesta üleliigne hape maha. Selleks pesusammuks kasutati 1 ml Milli-Q vett. Töövoogu on näha Joonisel 12. Kõikidest testidest tehti pildid enne proovi lisamist, pärast proovi lisamist ja pärast pesusammu. Testidest pildi tegemiseks kasutati Fujifilm X-A3 kaamerat või Epson perfection v39ii skannerit. Kaamera puhul kasutati valguskasti (*whitebox*), et kõikidel pildidel oleks valgus ja taust võrreldavad ja signaali erinevused ei tuleneks pildistamisest.



Joonis 12. Analüütilise testi töövoog: 1) tehakse pilt ditisooniga materjalist ja lisatakse proov, 2) pärast proovi tehakse testist pilt ja lisatakse vesi pesuetapiks, 3) pärast pesuetappi tehakse testist pilt, millest leitakse signaal.

2.5 Pilditöötlus

Testi tulemuste kvantifitseerimiseks kasutati skanneriga tehtud pilte, kuna need olid korratavamad võrreldes kaamera piltidega. Signaali saamiseks kasutati pärast pesuetappi saadud pilte. Piltidele tehti pilditöötlust ImageJ (versioon 1.54g) programmiga. Kvantifitseerimiseks kasutati pildilt nähtava signaali pikslite arvu. Pilditöötluseks laeti pilt programmi ja lõigati nii, et ainult testi ditisooni osa oleks näha (Joonis 13 A). Seejärel lahutati pilt punaseks, rohelineks ja siniseks kanaliks (Joonis 13 B ja C). Rohelise kanali väärtustest lahutati punase omad (Joonis 13 D). Viimaseks muudeti kõik pikslid kas mustaks või valgeks vastavalt paika seatud piksli intensiivsuse lävendile. Lävendiks oli peamiselt 21, kuid mõnedel juhtudel oli lävend madalam või kõrgem (täpsustused Peatükis 3.4). Pikslid, mis olid lävendist kõrgema väärtusega (signaal), muudeti valgeks, ja pikslid, mis olid taustal, muudeti mustaks (Joonis 13 E). Pikslid loeti programmi abiga kokku ja saadud arv võeti signaali väärtuseks.



Joonis 13. Pilditöötluste etapid: A) skanneeritud pilt, B) punase kanali väärtus, C) rohelise kanali väärtus, D) rohelise kanali väärtusest on lahutatud punase omad, E) lõpptulemus, millest saadi signaal.

2.6 Elavhõbeda lahused

Hg^{2+} lahuste valmistamiseks kasutati elavhõbe(II)nitraati. Töös kasutati lahuseid, kus oli $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kuni $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ehk $6,18 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kuni $618 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+} ioone. Need lahused valmistati standardlahuse lahjendamise teel, mille saamiseks kaaluti 10 mg $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ja lisati 10 ml Milli-Q vett (lahuse kontsentratsioon $618 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+}). Seejärel tehti lahjendus Milli-Q veega, et saada $61,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+} . Edasisteks ($6,18 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kuni $618 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) lahjendusteks kasutati Milli-Q vee asemel väävelhappe $0,5 \text{ M}$ või $0,05 \text{ M}$ lahuseid.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Ditisooni lahusti

Töö esimese sammuna oli vajalik optimeerida ditisooni lahustamiseks kasutatav lahusti ning seejärel kasutatav ditisooni kontsentratsioon.

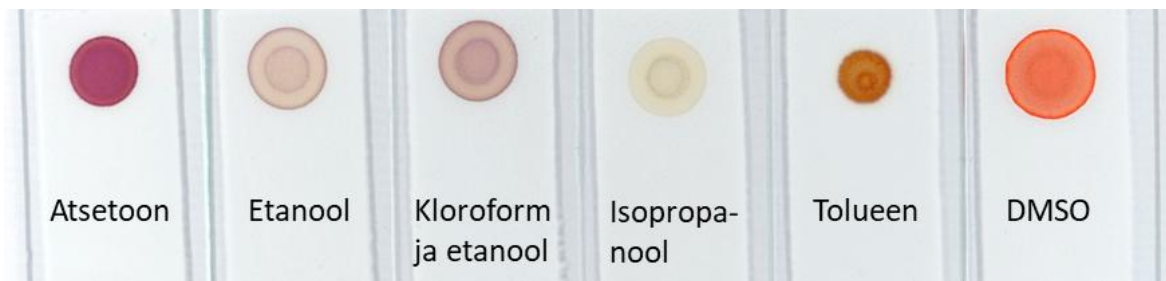
Optimaalse lahusti valimiseks uuriti erinevaid lahusteid: atsetoon, etanool, kloroformi ja etanooli segu (1:10 v/v), isopropanool, toluen ja DMSO (dimetüülsulfoksiid). Katsete käigus uuriti visuaalselt, kas lahusti lahustab ära $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ditisooni. Seejärel lisati väike kogus (10 μl) lahust trükitud testile. Testid pandi seejärel üheks minutiks ahju (120 °C) kuivama ning jälgiti testile tekkiva aine värvust ning ühtlust. Kuivanud ditisooni värvus testil peab olema võimalikult erinev elavhõbe(II)-ditsioon kompleksi värvusest (oranž), et eristada signaali taustast. Lisatud ditisooni ühtlane jaotus testil on oluline mõõtmiste korduvuse saavutamiseks.

Etanooli ja isopropanooli puhul oli visuaalselt näha, et kogu ditisoon ei lahustu. Atsetooni, tolueni, DMSO ning kloroformi ja etanooli segu puhul ei olnud lahuses näha lahustamata ditisooni.

Seejärel pipeteeriti lahused trükitud testile (tulemused Joonisel 14). Tulemustest on näha, et isopropanooli, kloroform-etanooli segu, etanooli, tolueni ja DMSO lisamisel materjalile tekkisid tugevalt ebaühtlased laigud ehk frondid, kuhu koguneb rohkem ditisooni. Frondi tekkimise põhjuseks on eeldatavasti solventi võime ditisooni trükitud materjalil edasi kanda. Solvent aurustub kiiremini märgunud ala äärtest, mis põhjustab materjalis oleva lahuse elueerumist äärte poole. Seetõttu tekivad tugevama elueeriva jõuga solventil tugevamad frondid. Pärast kuivamist olid DMSO ja tolueniga tulemuste värvused sarnased elavhõbe(II)-ditsiooni kompleksi värvusele ja seepärast nendega edasi ei töötatud. Joonisel 14 nähtav peale kantud lahuste värvi erinevus võib tulla ditisooni võimest eri keskkondades anda eri värve [35]. DMSO ja tolueni kõrgemad keemistemperatuurid võivad viia selleni, et kogu lahusti ei lendu trükitud materjalilt täielikult ära, andes ditisoonile teistsuguse värvuse. Nendest tulemustest järeldati, et optimaalne lahusti on atsetoon. Seetõttu kasutatakse kõigis järgnevatel katsetel ditisooni lahustamiseks atsetooni.

Atsetooniga tehtud ditisooni lahuse puhul leiti, et lahuse kontsentratsiooniks sobib $0,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Sellest kõrgema kontsentratsiooni puhul oli testil oleva ditisooni värvitooni erinevus minimaalne.

Madalama kontsentratsiooni puhul olid ditisooni toonid heledamad ning signaali ja tausta värvide erinevuste tuvastamine võib olla sellisel juhul keerulisem.



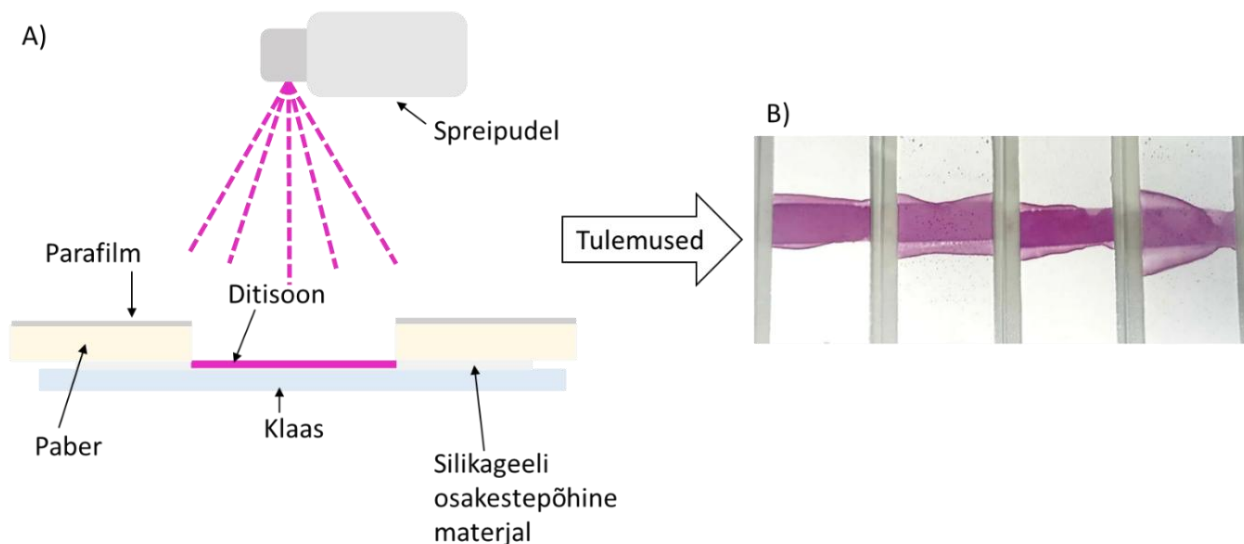
Joonis 14. Erinevates lahustites lahustatud ditisoon, mis on lisatud trükitud materjalile.

3.2 Ditisooni kandmine trükitud testile

Järgnevad eksperimendid näitasid, et ka atsetooni puhul on probleemiks ebaühtlane ditisooni jaotus trükitud materjalil (ehk frondi tekkimine). Selle jaoks katsetati nelja erinevat meetodit ditisooni lahuse lisamiseks trükitud testile, et saavutada võimalikult ühtlane ditisooni jaotus materjalil. Selleks, et analüüsi tulemused oleks võrreldavad, oli vaja, et ditisooniga kaetud ala kataks silikageeli materjali äärest ääreni. Muidu tekib võimalus, et osa analüüti ei elueeru läbi ditisooni ala, vaid selle kõrvalt mööda.

Esimese meetodina prooviti lahuse pipeteerimist materjalile keskkonnas, mis oli küllastunud atsetooni aurudest, et aeglustada atsetooni aurustumist. Selleks, et ditisooniga ala oleks kindla kujuga, prooviti ülejäänud ala ära katta pabersalvrätiga. Sellega loodeti, et kui ditisoon hakkab voolama paberist kaugemale, siis imab see suurema osa ditisooni lahust endasse. See meetod ei töötanud, sest ditisoon jooksis paberi alla ja ditisooni ala piirid ei jäänud selged ning tekkisid ka frondid, mis oleks seganud edasisi mõõtmisi.

Teise meetodina katsetati ditisooni lahuse pihustamist materjalile. Spreipudelisse pandi eelnevalt valmistatud ditisooni lahuse. Silikageeli osakestega materjal kaeti pabersalvrätiga ning parafilmiga, et moodustada mask testile, kuhu lahust pihustada (Joonis 15 A). Korduskatsete puhul oli näha, et tulemused ei olnud korduvad ning ditisoon ei olnud alati ühtlaselt testile kantud (Joonis 15 B).



Joonis 15. Ditisooni lisamine trükitud materjalile pihustamisega: A) skeem ditisooni lahuse testi peale pihustamisest ja B) eksperimendist saadud tulemused.

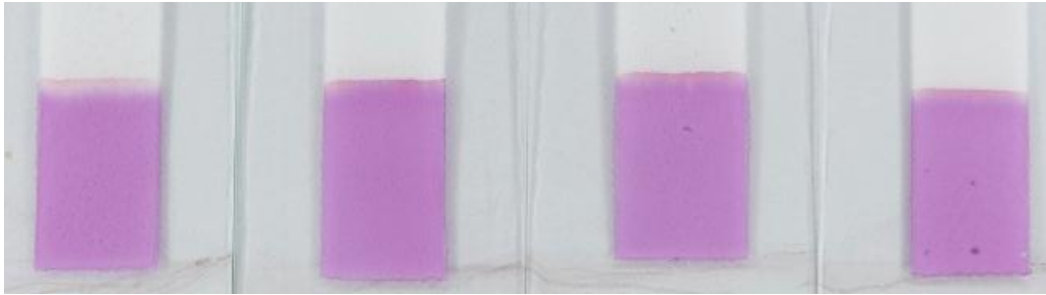
Kolmandaks katsetati meetodi, kus 30 μl ditisooni lahust pipeteeriti testile, kuivatati (1 min ahjus 120 °C temperatuuril) ja seejärel elueeriti ditisoon orgaaniliste lahustega ühte fronti (Joonis 16). Eluentidena katsetati isopropanooli, metanooli, atsetooni ja atsetonitriili kasutamist. Elueerimiseks pandi test otsapidi orgaanilisse lahusesse, et lahus elueeriks ditisooni ühte fronti kokku. Kõikidel juhtudel tekkis kitsas ditisooni ala, mis pole sobilik elavhõbeda kvantitatiivseks analüüsiks.



Joonis 16. Ditisooni ala moodustamine testil elueerides ditisooni orgaanilise lahusega ühte fronti.

Viimase meetodina prooviti ditisooni lahuse elueerimist materjali peale, et saavutada ühtlane ditisooni jaotus. Selleks valati ditisoon-atsetooni lahus ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) keeduklaasi, trükitud materjaliga klaasslaid asetati otsapidi lahusesse ja oodati kuni lahus elueerus materjalis 2 cm kõrgusele. Seejärel asetati testid 120 °C juures ahju 1-2 minutiks, mille käigus muutus ditisooni kaetud ala tumerohelisest roosaks. Selle meetodiga materjalile fronti ei jäänud (Joonis 17) ja

tulemused olid korratavad. Seetõttu kasutati edaspidi kõikides katsetes seda meetodit ditisooni lisamiseks.



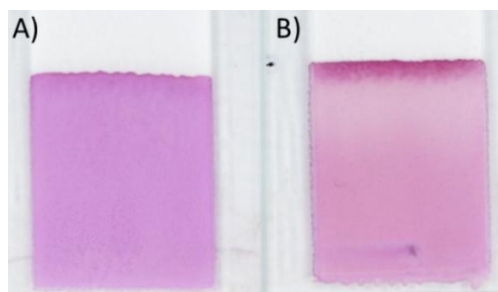
Joonis 17. Korduskatsed eksperimendist, kus ditisoon lisati elueerides ditisooni lahust trükitud osakestepõhisele materjalile.

3.3 Testi parameetrite optimeerimine

Järgmise sammuna optimeeriti testi erinevaid parameetreid, et saavutada võimalikult madal avastamispiir.

3.3.1 Silikageeli osakeste pesemine enne trükkimist

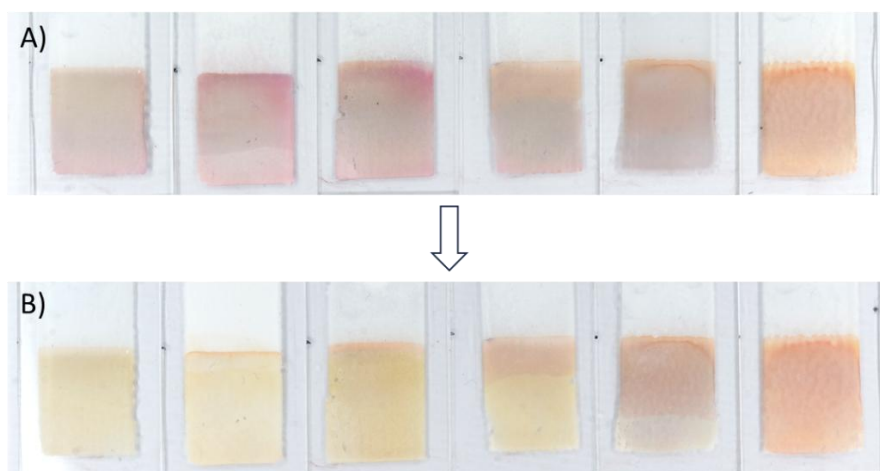
Esmaste katsete tulemustest oli näha, et tühiproovid andsid signaali. Sarnane probleem oli esinenud ka eelnevates TÜ mikrofluidika töörühma uurimustöodes, kus arendati teiste metallikatioonide tuvastamiseks teste, ning selle vältimiseks loodi meetod silikageeli osakeste pesemiseks enne trükkimist. Pesemine eemaldab silikageeli osakestel olevaid metalli katioone. Segajate eemaldamiseks pesti osakesi nelja päeva jooksul vesinikkloriid happe, naatriumaskorbaadi, askorbiithappe ja veega. Täpsem silikageeli osakeste pesu kirjeldus on Peatükis 2.2. Joonisel 18 on näha võrdlus pestud ja pesemata osakestest valmistatud testidest. Selle põhjal on näha, et pestud osakeste puhul on lisatud ditisoon ühtlasemalt testil. Selle põhjus võib olla see, et pesemata osakeste materjalil olevad segavad metallikatioonid seonduvad ditisooniga ja moodustunud kompleksi retentsioon materjalil on nõrgem. Seega on atsetooni frondis tugevam värv. Kõigis järgnevatel katsetel kasutati pestud osakesi testide valmistamiseks.



Joonis 18. Testide võrdlus, mis on trükitud A) pestud osakestega ja B) pesemata osakestega.

3.3.2 Pesuetapi lisamine testimise meetodile

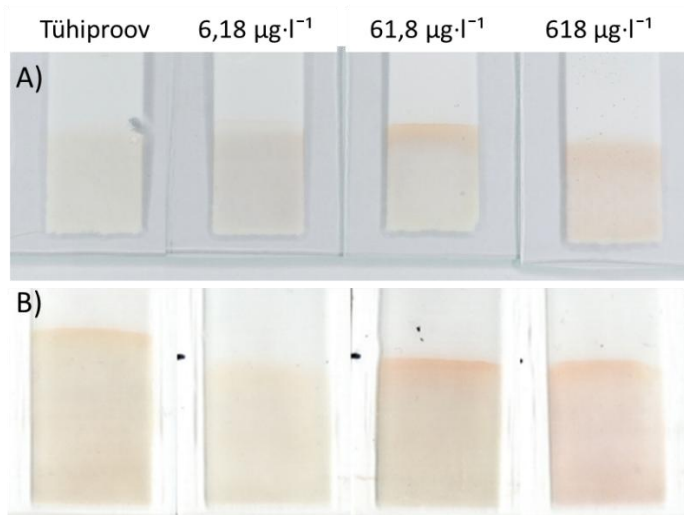
Üheks võimalikuks viisiks, kuidas saavutada madalam avastamispiir, oli värvide kontrasti parandamine piirkondade vahel, kus on ditisooni (taust) ja elavhõbe(II)-ditisooni kompleks (signaal). Algsetes katsetes oli elavhõbe(II)-ditisooni kompleks ja ditisooni ala sarnase värviga ning neid oli keeruline eristada (Joonis 19 A). Selle vältimiseks elueeriti pärast proovi testist läbi Milli-Q vett. Sarnaselt prooviga lisati vesi (1 ml) proovi lisamise anumasse. Selle etapi lisamise tulemusena oli ditisooni ala testil heledama ja seetõttu oli ka kompleksi ala sellest paremini eristatud (Joonis 19 B). Värvimuutuse põhjus võib olla veega happe välja elueerimine, kuna ditisooni ala muudab värvi olenevalt pH-st.



Joonis 19. Eksperiment, kus võrreldi tulemusi A) ilma pesuetapita ja B) koos pesuetapiga. Proovide kontsentratsioonid paremalt vasakule on tühiproov, $30,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $61,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $154,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $309 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $618 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.3.3 Proovi happe kontsentratsiooni vähendamine

Samuti optimeeriti proovi lisatava happe (H_2SO_4) kontsentratsiooni. Katsete käigus võrreldi kahte erinevat H_2SO_4 kontsentratsiooni proovis: 0,5 M ja 0,05 M. Madalama happe kontsentratsiooni eeliseks võib eeldatavalt pidada nõrgemat elueerimise võimekust ning seetõttu efektiivsemat elavhõbeda kontsentreerimist ja madalamat avastamispiiri. Tulemustest (Joonis 20) oli näha, et 0,05 M H_2SO_4 puhul ei ole signaali ala oluliselt suurem, kui 0,5 M H_2SO_4 puhul. Seetõttu edasistes katsetes oli proovis H_2SO_4 kontsentratsioon 0,5 M, et vähendada võimalike segajate (teiste metalli kationide) seondumist ditisoonile ning seeläbi segava signaali tekkimist.



Joonis 20. Võrdlus proovi hapestamiseks lisatava H_2SO_4 kontsentratsioonide A) 0,05 M ja B) 0,5 M vahel.

3.3.4 Pöördfaas pinnaga osakeste lisamine ditisooni alale

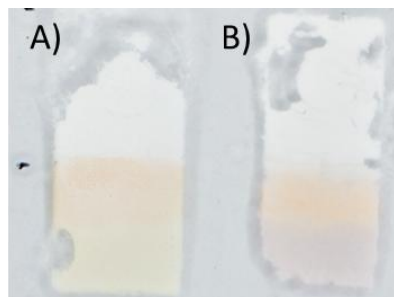
Katsetes, kus kasutati suuri proovi koguseid (n. 10 ml) ning kõrget Hg^{2+} kontsentratsiooni (n. $618 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), oli näha, et signaali värv hajub (s.t. väheneb gradiendiga) jäägipaberi poole (Joonis 21). Seega võib eeldada, et proovi elueerimise ajal elueerub ka osaliselt elavhõbe(II)-ditisooni kompleks ditisooni alalt ära. See viib osaliselt signaali kaotamiseni ning madalama tundlikkuseni. Kuna elavhõbe(II)-ditisooni kompleks ei ole laenguga ning seda saab ekstraheerida veest kloroformi faasi [19], katsetati TFE alale silikageeli osakeste lisamist, mille pind on modifitseeritud

pöördfaas kromatograafia jaoks (C18). Pöördfaasi pinnaga osakesed võiksid suurendada elavhõbe(II)-ditisooni kompleksi retentsiooni materjalis. C18 osakesi lisati juurde 20% (massist) selles töös tavaliselt kasutatud silikageeli osakestele, mis on normaalfaas pinnaga. Muud testi trükkimise parameetrid jäid samaks. Nii C18-ga testile kui ka tavatestile lisati 4 ml proovi, kus elavhõbe(II) iooni kontsentratsioon oli $61,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.



Joonis 21. 10 ml kõrge kontsentratsiooniga proovi lisamisel tekkiv värvi gradient.

Tulemustest (Joonis 22) on näha, et C18 osakeste lisamine ei parandanud signaali ala suurust. See viitab sellele, et materjalile C18 pinnaga osakeste lisamine ei suurenda kompleksi retentsiooni. Küll aga parandas C18 lisamine mõnevõrra signaali ja tausta vahelist kontrasti. Selle segu trükkimine oli aga keerulisem, sest C18 on hüdrofoobne ja trükkimissegu ei segunenud ühtlaselt. Lisaks oli mõõtmine kolm korda aeganõudvam (aeglasema proovi elueerumise tõttu testil). Näiteks 4 ml proovi puhul oli elueerimisaeg 11 tundi. Kuna signaali ja tausta kontrast oli sobiv ka normaalfaas pinnaga silikageeli osakeste materjalil, siis seetõttu tehti edasised katsed ilma C18 osakesteta.



Joonis 22. Tulemuste võrdlus A) 100% silikageeli põhisel ja B) 20% pöördfaas osakestega testil.

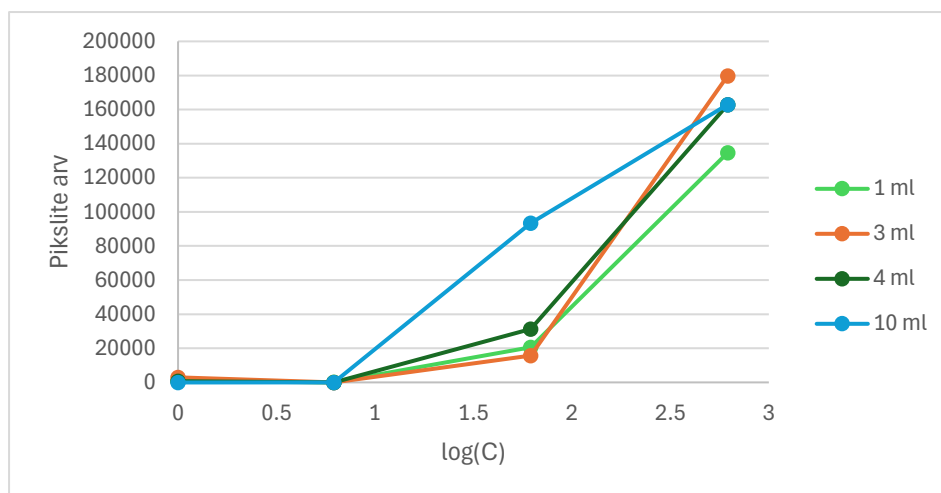
3.3.6 Proovi koguse optimeerimine

Järgmise sammuna optimeeriti testile lisatava proovi kogust, et saavutada madalam avastamispiir. Võrreldi nelja erinevat proovi ruumala: 1 ml, 3 ml, 4 ml ja 10 ml.

Katsete tulemused on näha Tabelis 1, Graafik 1 ja skanneri pildid on Lisas 1. Tulemustest on näha, et proovi ruumala suurendamine viib küll mõnevõrra signaali tugevuse kasvuni (10 ml puhul on selgelt signaal tugevam $61,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ juures). Siiski ei ole ühegi proovikoguse puhul võimalik elavhõbedat tuvastada $6,18 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ juures ja seega ei ole võimalik käesoleva testi puhul proovi koguse tõstmisega saavutada vajalikku $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ avastamispiiri. Kuna 10 ml puhul võtab ühe analüüsi läbi viimine ligikaudu 15 tundi (4 ml puhul kulus mõõtmiseks 6-7 tundi), siis edaspidi kasutati katsetes proovi koguseks 4 ml.

Tabel 1. Erinevate proovi ruumaladega testide signaali väärtused.

Proovi ruumala, ml	Tühiproov	$6,18 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$	$61,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$	$618 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$
1	828	47	20556	134698
3	3012	0	15720	179833
4	760	18	31305	162824
10	41	2	93458	162944



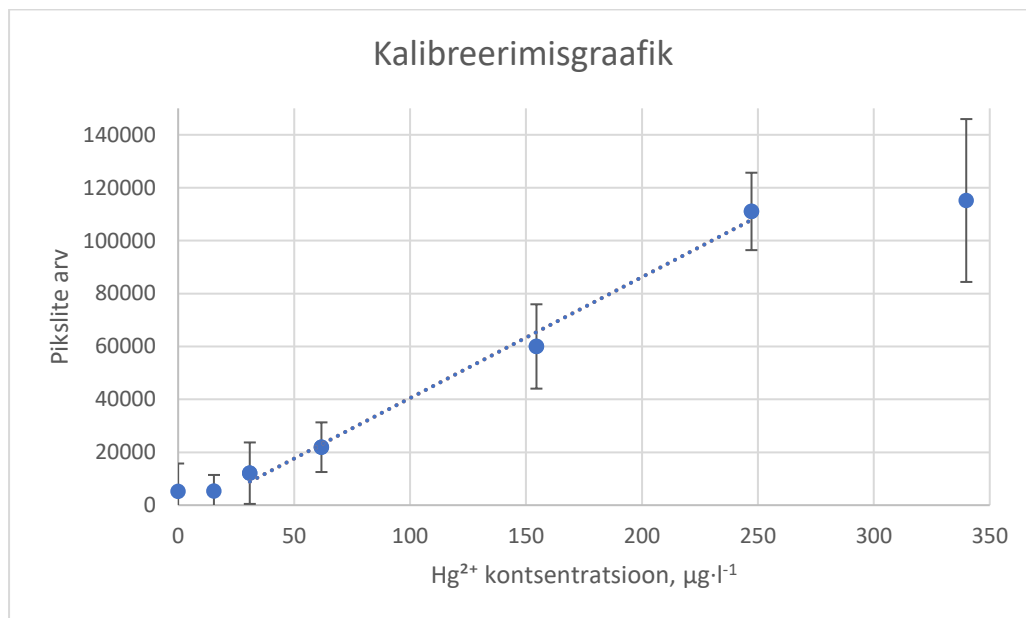
Graafik 1. Graafik näitab erinevatel ruumaladel signaali pikslite arvu erinevate proovi kontsentratsioonide puhul. Hg^{2+} kontsentratsiooni telg (x-telg) on logaritmilises skaalas.

3.4 Valideerimine

Testi valideerimiseks mõõdeti lahuseid kontsentratsioonidega $15,45 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $30,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $61,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $154,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $247,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $339,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+} . Kõigist nendest lahustest tehti 5 kordusmõõtmist. Lisaks mõõdeti igas mõõtmisseerias tühiproov. Skanneri pildid, millele tehti pilditöötlus, ja pilditöötlusest saadud signaalid, on näha Lisas 2. Mõõtmistulemused on Tabelis 2 ja graafiliselt esitatud Graafikul 2. Graafikul märgitud veamäärad on leitud kasutades standardhälvet.

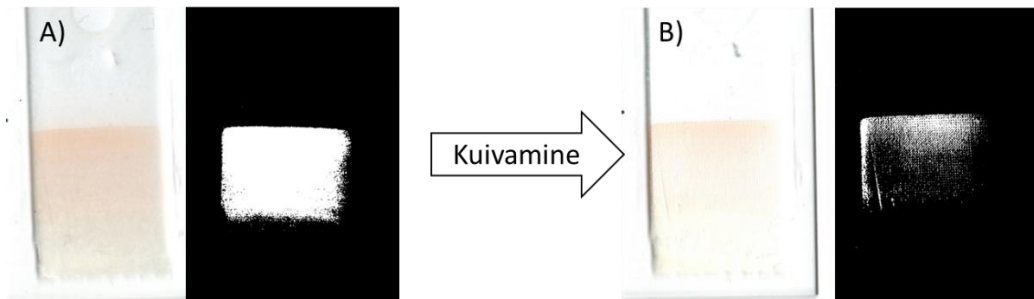
Tabel 2. Valideerimistulemused.

Hg^{2+} kontsentratsioon, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Seeria 1	Seeria 2	Seeria 3	Seeria 4	Seeria 5	Keskmine	Standardhälve	Suhteline standardhälve, %
0	199	8	24005	1547	388	5229	10513	201
15,45	9641	1431	13857	1838	14	5356	6061	113
30,9	29622	10363	16481	3717	248	12086	11619	96
61,8	31564	19180	32044	14683	12089	21912	9381	43
154,5	70766	32100	64904	62648	69526	59989	15938	27
247,2	98237	101183	135150	107762	112828	111032	14631	13
339,9	109944	68969	141750	110064	145114	115168	30786	27



Graafik 2. Valideerimistulemustest saadud kalibreerimisgraafik.

Signaali saamiseks skaneeriti nii kuivanud testid kui ka testid, mis ei olnud veel täiesti ära kuivanud. Pilditöötlemise käigus oli näha, et testide puhul, mis pole täielikult ära kuivanud, suudab programm signaali paremini tuvastada (Joonis 23). Seetõttu kasutati valideerimisel pilte, kus testid pole täielikult ära kuivanud.



Joonis 23. Võrdlus A) märja ja B) kuiva testi pilditöötlemisel saadud signaali erinevusest. Mõlemal pilditöötlemise pildil on lävendiks 12.

Pilditöötlemise olulise sammuna pandi paika signaali intensiivsuse lävend. Juhul kui piksli intensiivsus oli võrdne või üle lävendi väärtuse, siis arvestati, et sellel pikslil on analüüdi signaal. Läveni väärtus (skaalal 0 kuni 255) näitab, mis heleduse väärtusest alates hakatakse lugema signaali. Kui lävendiks on 21, siis kõik pikslid, mille heleduse väärtus on 21 või suurem, muudetakse valgeks ja kõik, mille väärtus on madalam, muudetakse mustaks. Läveni paika panemisel võrreldi visuaalselt ka esialgset pilti, et näha, kas lävend (tavaliselt 21) võtab arvesse kogu pildil oleva signaali. Kõrgemate kontsentratsioonide puhul see alati nii ei olnud ja nende puhul kasutati automaatset ImageJ läveni sättemise algoritmi, mis tavaliselt sättis läveni väärtuseks 12-18. Kõrgemate kontsentratsioonide puhul olid signaali toonid sarnasemad taustaga ja seetõttu keerulisem programmil eristada. Üheks põhjuseks võib olla signaali elueerumine testilt jäägipaberi peale, mis tekitab värvi gradiendi. Selleks, et kõrgematel kontsentratsioonidel oleks võimalik paremini mõõtmisi teha, tuleks ditisooni ala suurendada. Reaalsete proovide puhul pole see ilmselt vajalik, sest elavhõbe(II) sisaldus vees on suure tõenäosusega madalam kui $339,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$.

Arendatud testi dünaamiline ala on ligikaudu $30,9$ kuni $247,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ (Graafik 2). Signaali tulemustest ja graafikult on näha, et tühiproovides on vahepeal signaal tugevam kui võiks oodata (vt. Tabel 2, Seeria 3). Üheks põhjuseks võib olla testide reostumine segava ühendiga. Eelnevalt

mikrofluidika uurimisgrupis arendatud raua mõõtmise testide puhul märgati, et mõnede testide puhul on näha ootamatut metallide reostust. Ühe hüpoteesina on reostuse allikaks pakutud tolmu laboris. Kuna raud võib tekitada sarnast signaali elavhõbedaga (arutatud täpsemalt peatükis 3.5), siis võib olla reostus sellest. Samuti võib olla, et tühiproovide puhul on reostus tulnud kontsentreeritud väävelhapest, mida kasutatakse tühiproovi valmistamisel. Kontsentreeritud väävelhapet hoiti klaasviaalis, millel oli plastikkork. Pärast paari nädalast seismist oli happele tekkinud kollakas värvus ja korgi sisemisel poolel oli näha pruuni vedeliku, mis võib viidata, et hape on korki hakanud lagundama. Seetõttu võib olla happesse sattunud aineid, mis annavad koos ditisooniga signaali, mis sarnaneb elavhõbeda omale.

Tabel 2 Seeria 3 ja 5 puhul on näha, et $15,45 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ puhul on signaal madalam kui tühiproovide puhul. Sarnast tulemust on näha ka Tabelis 1, kus kõikide ruumalade puhul on näha, et $6,18 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ juures on signaal madalam kui tühiproovide omad. Üheks põhjuseks võib olla, et tühiproovidest saadud signaal on tulnud metalli kationidest, kuid nende tulemuste järgi võib eeldada, et elavhõbe(II) ioon seondub madala pH juures ditisooniga tugevamini kui teised metalli katioonid ja juba väikse koguse elavhõbeda lisamisel tõrjub ta teised metallid kompleksist välja.

Saadud tulemustest arvutati välja avastamispiir (LoD, *Limit of Detection*). Selleks kasutati järgmist valemit:

$$LoD = 3,3 \cdot \frac{S_{x,y}}{b} \quad (1)$$

kus $S_{x,y}$ on jääkliikmete standardhälve ja b on tõus. Selline LoD arvutamise meetod annab enamasti konservatiivsed (s.t. pigem kõrged) avastamispiiri väärtused [36,37]. Saadud avastamispiiriks oli $93 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$.

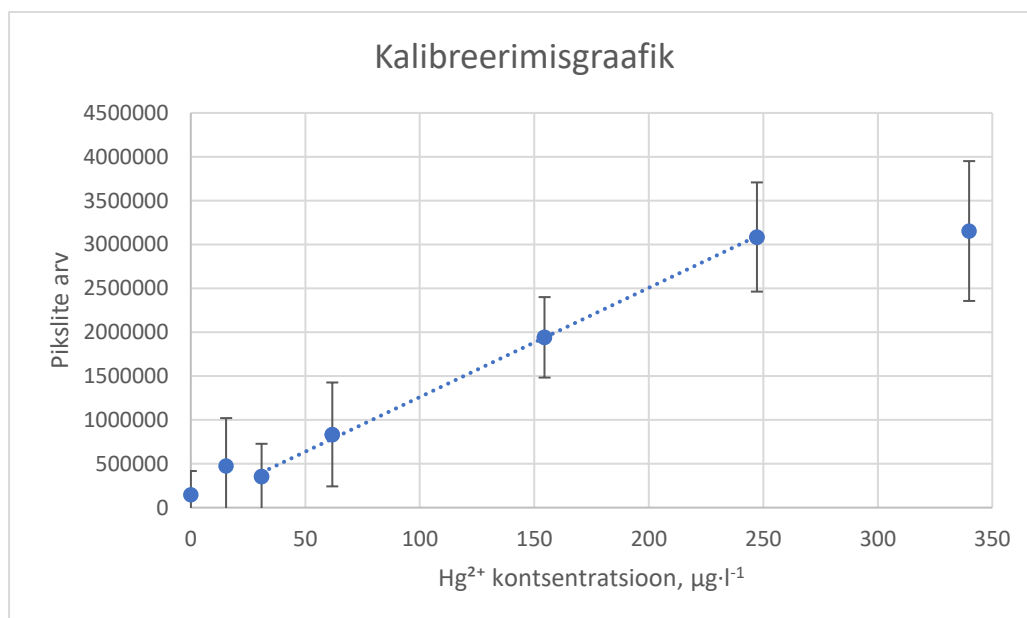
Arendatud testiga ei saaks loodusest võetud veeproove analüüsida, sest testi avastamispiir on liiga kõrge. Testi oleks võimalik kasutada valdkondades, kus on vees väga kõrge elavhõbe(II) reostus. Selle töö käigus ei olnud võimalik tuvastada kindlat põhjust, miks isegi 10 ml proovi puhul ei anna test piisavalt head tundlikkust. Eeldatavasti on põhjus selles, et suurema proovi koguse puhul väheneb ka elavhõbeda kontsentreerimise efektiivsus (Hg^{2+} ioonid elueeritakse ditisoonilt ära). Ühe võimaliku lahendusena sellele probleemile oleks uudse osakestepõhise testi arendus, mis töötaks mitmesammulisena. Esimeses sammus kontsentreeritakse Hg^{2+} TFE pinnale, mis seob

tugevasti metalli katioone (näiteks kelateerivad või tugevad katioonvahetiga osakesed). Seejärel elueeritakse hapet sisaldava eluendiga katioonid TFE materjalilt ära ditisooni sisaldava ala poole. Seetõttu oleks võimalik elueerida läbi ditisooni ala vaid väike kogus happega eluenti, mis sisaldab juba eelkontsentreeritud elavhõbeda ioone.

3.5 Signaali saamismeetodite võrdlus

Lisaks signaali pindalaga saadud tulemustele leiti signaali väärtus ka intensiivsust ja pindala arvesse võtva meetodiga. Intensiivsuse arvesse võtmiseks tehti lisaks Peatükis 2.5 kirjeldatule kaks lisaammu: lõpptulemus (Joonis 13 E) inverteeriti ja lahutati punase ja rohelse kanalite vahest (Joonis 13 D). Seejärel summeeriti kogu pildil olevate pikslite väärtused.

Tulemused on Lisa 3 Tabelis 1. Tulemused on saadud samadest skanneri piltidest ja samade lävenditega, mis on Peatükis 3.4. Selle meetodiga saadi, et LoD on $131 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$. Sarnaselt pindala meetodiga on ka selle meetodi puhul graafikul nähtav dünaamiline ala ligikaudu 30,9 kuni $247,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ (Graafik 3). Tulemustest on näha, et ainult signaali pindala arvesse võtmine on praeguse testi juures sobivam.

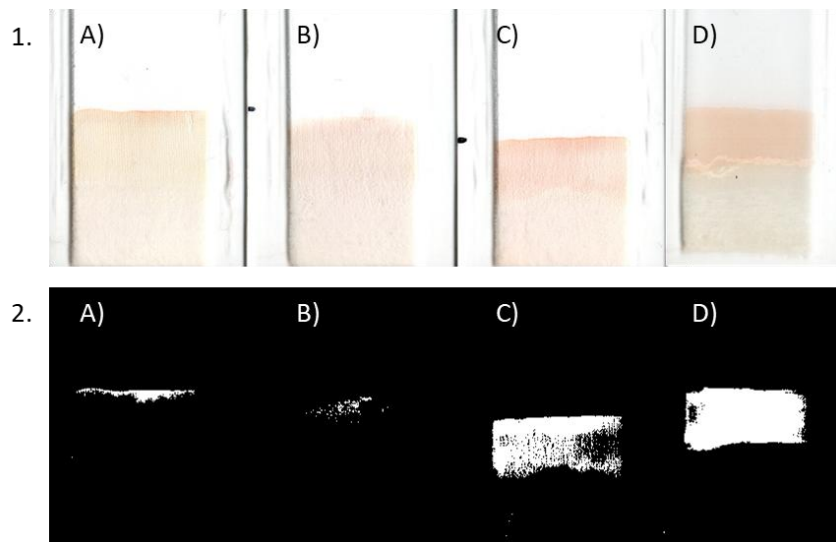


Graafik 3. Intensiivsust arvesse võtva meetodi kalibreerimisgraafik.

3.6 Segajad

Töö käigus sooviti hinnata ka arendatud analüütilise testi selektiivsust. Selleks valiti neli potentsiaalselt segavat metalli katiooni: raud(II), vask(II), plii(II) ja tsink(II). Raud ja vask valiti seetõttu, et neid leidub suures koguses vees. Nende kontsentratsiooniks võeti $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, kuna need kontsentratsioonid on eelnevas uurimuses olnud sobilikud [24]. Plii ja tsink valiti, kuna nendega tekkivad ditisooni kompleksid annavad tugeva värviga signaalid ning värvus on sarnane elavhõbedale. Kontsentratsiooniks võeti plii puhul $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, sest see on joogivees lubatud piirmäär ja tsingi jaoks võeti $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, sest see on ligikaudu AS Tartu Veevärk poolt mõõdetud kõige kõrgem kontsentratsioon Tartu joogivees [38]. Potentsiaalsete segajatega tehti lahus, kus lahjendamiseks kasutati $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Mõõtmised tehti lahustega, kus olid kõik segajad koos ilma elavhõbe(II)-ta ning segajad koos elavhõbe(II) iooniga ($154,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) ning tühiproov, kus oli ainult $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$.

Tulemustest on näha, et tühiproov (Joonis 24 A) ei erine valideerimisel saadud tulemustest. Signaal, mida on tühiproovil näha, oli näha ka mõnedel teistel tühiproovidel (nt. Tabel 2 Seeria 3). Kui võrrelda tühiproovi ja segajatega testi (Joonis 24 B), siis on näha, et värv ei ole sama, mis viitab sellele, et segajad tekitavad mõningast värvi muutust ditisooni alal. Kui võrrelda segajaid (Joonis 24 B) ja elavhõbedat sisaldava proovi tulemust (Joonis 24 C), siis on näha, et elavhõbe(II) ioonilt tulev signaal on selgelt taustast eristatav. Võrreldes elavhõbedat ja segajaid sisaldava proovi tulemust (Joonis 24 C) ning ainult elavhõbe(II) sisaldava proovi tulemust (Joonis 24 D), siis signaal on sarnase pindalaga. Ka pilditöötusega on nende signaalid samas vahemikus. Erinevus on ainult tausta värv, kuid see ei sega signaali lugemist. Seega võib järeldada, et segajad muudavad küll ditisooni ala värvust, kuid elavhõbe(II) signaali on võimalik siiski korrektselt mõõta.



Joonis 24. Eksperiment, et näha kuidas segajad mõjutavad testi 1. skanneri pilt ja 2. pilditöötluselt leitav signaal (lävend 21). Joonisel on näha A) tühiproov, B) segajatega test, C) segajate ja elavhõbe(II) iooniga test ja D) elavhõbe(II) iooniga test.

3.7 Järeldused

Töö käigus saadi kinnitust, et ditisooni ja elavhõbe(II) reaktsioonil tekkiva kompleksiga on võimalik veeproovidest mõõta elavhõbeda sisaldust. Kuid praegusel testil esinevad probleemid, mis vajavad lahendamist enne kui tavakasutaja saab seda kasutada. Põhiprobleemiks on hetkel liiga kõrge avastamispiir. Praeguse testi avastamispiir on $93 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ samas on nt. Tartu Veevärgi mõõdetud elavhõbeda sisaldus Tartu joogivees alla $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ja joogivee piirmääraks Eestis on $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [8,38]. Üheks lahenduseks oleks arendada uue disainiga test, kus TFE kogub kokku elavhõbe(II) proovist ja seejärel elueeritakse see ditisooni alale (täpsem kirjeldus Peatükis 3.4). Lisaks on probleemiks ka kehv korduvus ja reostus (st. signaal tühiproovide puhul). Need mõlemad suurendavad avastamispiiri. Kui need probleemid saavad lahendatud, oleks edasine eesmärk arendada analüütiline test kasutajasõbralikumaks ja ohutumaks. Samuti oleks võimalik uurida, kas arendatud testiga on võimalik mõõta ka orgaanilise elavhõbeda sisaldust veeproovidest.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli arendada ja valideerida silikageeli osakeste põhine analüütiline test, millega oleks võimalik veeproovidest mõõta anorgaanilist elavhõbe(II) iooni. Silikageeli osakeste põhine materjal kanti siiditrüki abil mikroskoobi klaasile. Saadud materjalile kombineeriti tahke faasi ekstraktsioon ja kolorimeetria. Selleks lisati trükitud materjalile ditisoon. Elavhõbe(II) reageerib ditisooniga ning annab oranži värvi signaali. Testist tehti skanneri pilt, millelt leiti kvantifitseerimiseks signaalile kuuluvate pikslite arv.

Töö käigus leiti, et sobiv lahusti ditisoonile on atsetoon ja selle lahuse peale kandmiseks on parim viis lahuse elueerimine materjalile. Lisaks leiti, et sobivaks proovi koguseks on 4 ml. Samuti avastati, et silikageeli osakesed peab enne siiditrükkimist puhastama vee, vesinikkloriidhappe, askorbiinhape ja naatriumaskorbaadiga, et eemaldada silikageeli osakestes leiduvad metalli katioonid. Analüüsi meetodile lisati ka pärast proovi lisamist pesu veega, et eemaldada testilt liigne hape ja parandada sellega signaali tugevust.

Analüütilise testi valideerimisel saadi avastamispiiriks $93 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$, mis on liiga kõrge, et seda saaks laialdaselt kasutada, sest Eestis on joogivee elavhõbeda piirmääraks $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Segajate uurimisest selgus, et raud(II), vask(II), plii(II) ja tsink(II) mõjutavad analüütilise testi tausta signaali, kuid elavhõbeda mõõtmist see ei sega.

Töö eesmärk sai täidetud, kuid analüütilise testi tavakasutajani jõudmiseks on vaja alandada avastamispiiri ning muuta test kasutajasõbralikumaks.

SUMMARY

Development and validation of an analytical test for the determination of mercury(II) ions

This master's thesis aims to develop and validate an analytical test based on silica gel particles, which would enable the measurement of inorganic mercury(II) ions in water samples. A silica gel particle-based material was applied onto microscope slides using screen printing. Solid-phase extraction and colorimetry were combined with the obtained material. For this purpose, dithizone was added to the printed material. Mercury(II) reacts with dithizone and produces an orange-colored signal. An image of the test was taken with a scanner, and the number of pixels corresponding to the signal was determined for quantification.

During the course of the work, it was found that acetone is a suitable solvent for dithizone, and the best method for applying the solution is to elute it onto the material. Additionally, it was found that 4 ml is an appropriate sample volume. It was also discovered that the silica gel particles must be cleaned with water, hydrochloric acid, ascorbic acid, and sodium ascorbate before screen printing to remove metal cations present in the silica gel particles. After sample addition, a water rinse was added to the analytical method to remove excess acid from the test and enhance signal.

During the validation of the analytical test, a detection limit of $93 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ was obtained, which is too high for widespread use, as the limit for mercury in drinking water in Estonia is $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Interference studies revealed that iron(II), copper(II), lead(II), and zinc(II) affect the background signal of the analytical test but do not interfere with mercury measurement.

The objective of the work was achieved, but to reach everyday users, the detection limit needs to be lowered, reproducibility improved, and the test made more user-friendly.

KASUTATUD KIRJANDUS

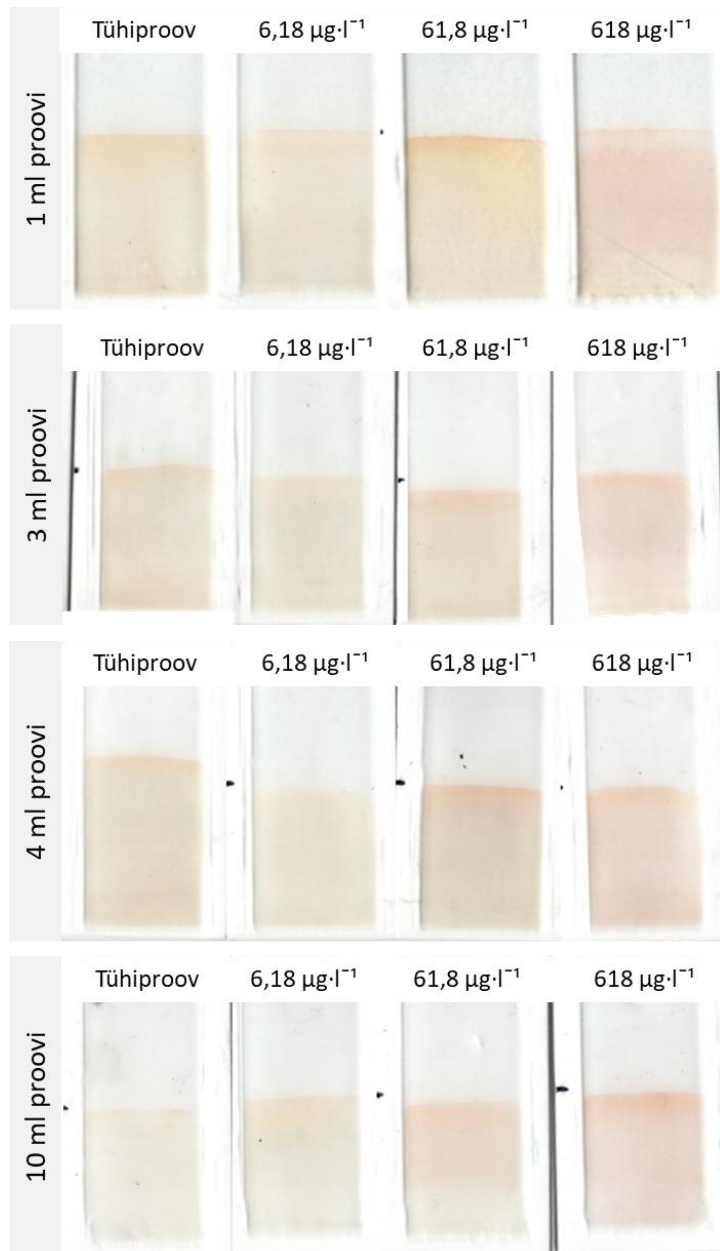
1. O'Connor, D., Hou, D., Ok, Y.S., Mulder, J., Duan, L., Wu, Q., Wang, S., et al. Mercury speciation, transformation, and transportation in soils, atmospheric flux, and implications for risk management: A critical review. *Environment International*. 2019. 126. 747–761
2. Clever, H.L., Johnson, S.A., Derrick, M.E. The Solubility of Mercury and Some Sparingly Soluble Mercury Salts in Water and Aqueous Electrolyte Solutions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1985. 14. 631–680
3. Pavithra, K.G., SundarRajan, P., Kumar, P.S., Rangasamy, G. Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. *Chemosphere*. 2023. 312. 137314
4. McAuliffe, C.A., toim. The Chemistry of Mercury. Palgrave Macmillan UK: London; 1977
5. Karik, H., Truus, K. Elementide keemia. Kirjastus Ilo: Tallinn; 2003
6. Global Mercury Assessment 2018.
7. Gworek, B., Bemowska-Kalabun, O., Kijeńska, M., Wrzosek-Jakubowska, J. Mercury in Marine and Oceanic Waters—a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2016. 227. 371
8. Joogivee kvaliteedi- ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid–Riigi Teataja; <https://www.riigiteataja.ee/akt/13256473> viimati alla laetud 25.veebbruar.2025
9. Keskkonnaministri 24.07.2019 määruse nr 28 „Prioriteetsete ainete ja prioriteetsete ohtlike ainete nimekiri, prioriteetsete ainete, prioriteetsete ohtlike ainete ja teatavate muude saasteainete keskkonna kvaliteedi piirväärtused ning nende kohaldamise meetodid, vesikonnaspetsiifiliste saasteainete keskkonna kvaliteedi piirväärtused, ainete jälgimisnimekirjaga seotud tegevused“ muutmise–Riigi Teataja; <https://www.riigiteataja.ee/akt/131122021002> viimati alla laetud 25.veebbruar.2025
10. Dinu, C., Vasile, G., Cruceru, L. Advanced Analytical Methods for Mercury Determination in Slightly Contaminated Water Samples.
11. Shrader, D.E., Hobbins, W.B. The Determination of Mercury by Cold Vapor Atomic Absorption.
12. EVS-EN ISO 17852:2008. EVS-EN ISO 17852:2008; <https://www.evs.ee/et/evs-en-iso-17852-2008> viimati alla laetud 25.veebbruar.2025
13. Ritgen, U. Analytical Chemistry I. Springer: Berlin, Heidelberg; 2023
14. Noviana, E., Ozer, T., Carrell, C.S., Link, J.S., McMahon, C., Jang, I., Henry, C.S. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. *Chemical Reviews*. 2021. 121. 11835–11885

15. Irving, H.M.N.H., Iwantscheff, G. The Analytical Applications of Dithizone. *C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 1980. 8. 321–366
16. R. Rice, C., A. Faulkner, R., A. Jewsbury, R., Bullock, S., Dunmore, R. A structural study of dithizone coordination chemistry. *CrystEngComm*. 2017. 19. 3414–3419
17. Mahmoud, M.E., Osman, M.M., Amer, M.E. Selective pre-concentration and solid phase extraction of mercury(II) from natural water by silica gel-loaded dithizone phases. *Analytica Chimica Acta*. 2000. 415. 33–40
18. Simple Detection of Mercury Ion Using Dithizone Nanoloaded Membrane. Simple Detection of Mercury Ion Using Dithizone Nanoloaded Membrane; https://www.researchgate.net/publication/228818164_Simple_Detection_of_Mercury_Ion_Using_Dithizone_Nanoloaded_Membrane viimati alla laetud 26.veebruar.2025
19. Elly, C.T. Dithizone Procedure for Mercury Analysis. *Journal (Water Pollution Control Federation)*. 1973. 45. 940–945
20. J. Shaw, M., Jones, P., R. Haddad, P. Dithizone derivatives as sensitive water soluble chromogenic reagents for the ion chromatographic determination of inorganic and organo-mercury in aqueous matrices. *Analyst*. 2003. 128. 1209–1212
21. Nascimento, F.H. do, Masini, J.C. Porous-polymer monolith decorated with dithizone for greener visual and spectrophotometric sensing of Hg(II). *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023. 381. 133385
22. Paci, B., Nunzi, J.-M., Sertova, N., Petkov, I. Picosecond anisotropy of the transient absorption of the photochromic mercury dithizone complex in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2000. 137. 141–144
23. Harris. Quantitative Chemical Analysis.
24. Saar, I., Evard, H. Real-World Implementation of Particle-Based Microfluidics: On-Spot Test for Iron and Copper Ions in Water. *ACS Omega*. 2025. 10. 1800–1808
25. Chailapakul, O., Siangproh, W., Jampasa, S., Chaiyo, S., Teengam, P., Yakoh, A., Pinyoropathum, C. Paper-based sensors for the application of biological compound detection. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2020. p. 31–62
26. Fernandes, G.M., Silva, W.R., Barreto, D.N., Lamarca, R.S., Lima Gomes, P.C.F., Flávio Da S Petrucci, J., Batista, A.D. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. *Analytica Chimica Acta*. 2020. 1135. 187–203
27. Evard, H., Priks, H., Saar, I., Aavola, H., Tamm, T., Leito, I. A New Direction in Microfluidics: Printed Porous Materials. *Micromachines*. 2021. 12. 671

28. Saar, I., Evard, H. Screen Printed Particle-Based Microfluidics: Optimization and Exemplary Application for Heavy Metals Analysis. *Micromachines*. 2023. 14. 1369
29. Laaneväli, A., Saar, I., Nasirova, N., Evard, H. Multi-step particle-based microfluidic test for biotin measurement. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2024. 28. 71
30. Christian, G.D. Analytical chemistry. Wiley: Hoboken, NJ; 2004
31. Simpson, N.J.K., toim. Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. Dekker: New York, NY; 2000
32. Weintraub, S. Demystifying silica gel.
33. Zhuravlev, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2000. 173. 1–38
34. Bergna, H.E. The colloid chemistry of silica: developed from a symposium sponsored by the Division of colloid and surface chemistry, at the 200th National meeting of the American society, Washington, DC, August 26-31, 1990. American chemical society: Washington (D.C.); 1994
35. Ntoi, L.L.A., Buitendach, B.E., Eschwege, K.G. von. Seven Chromisms Associated with Dithizone. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2017. 121. 9243–9251
36. Evard, H., Kruve, A., Leito, I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. *Analytica Chimica Acta*. 2016. 942. 23–39
37. Evard, H., Kruve, A., Leito, I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part II: Practical aspects. *Analytica Chimica Acta*. 2016. 942. 40–49
38. Tartu joogivee kvaliteedinäitajad – Tartu Veevärk. Tartu joogivee kvaliteedinäitajad – Tartu Veevärk; <https://tartuvesi.ee/vee-kvaliteet/tartu-joogivee-kvaliteedinaitajad/> viimati alla laetud 28.aprill.2025

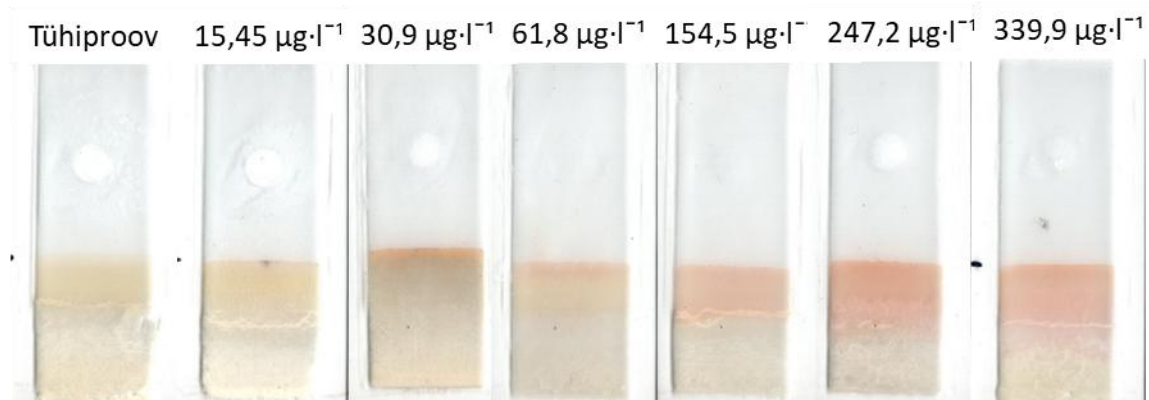
LISAD

Lisa 1

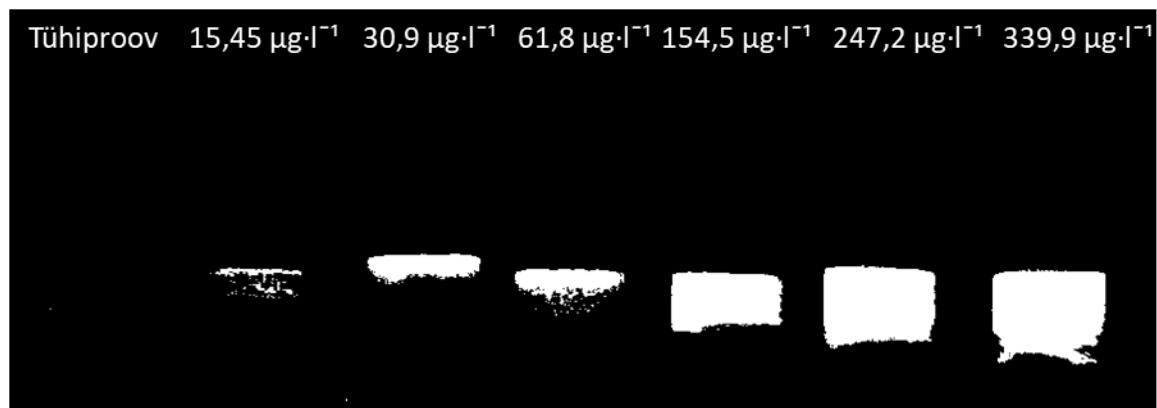


Joonis 1. Erinevate proovi kogustega saadud tulemused.

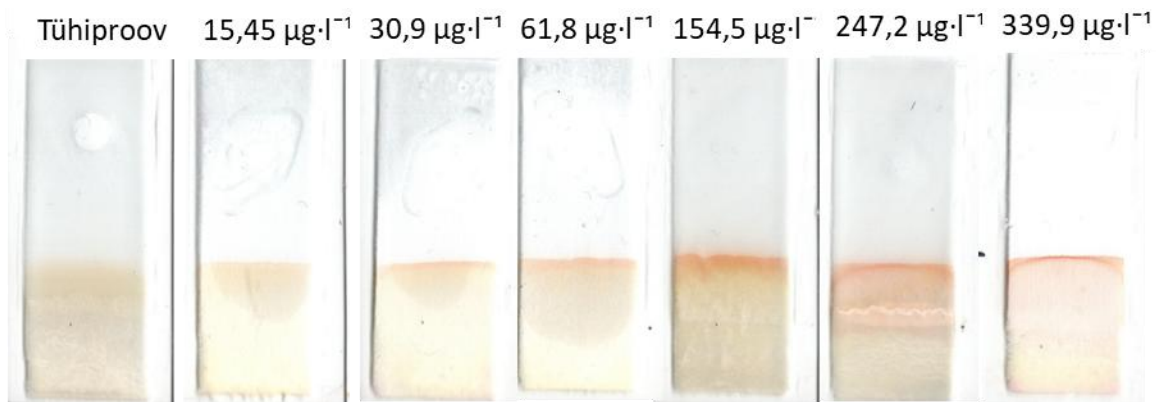
Lisa 2



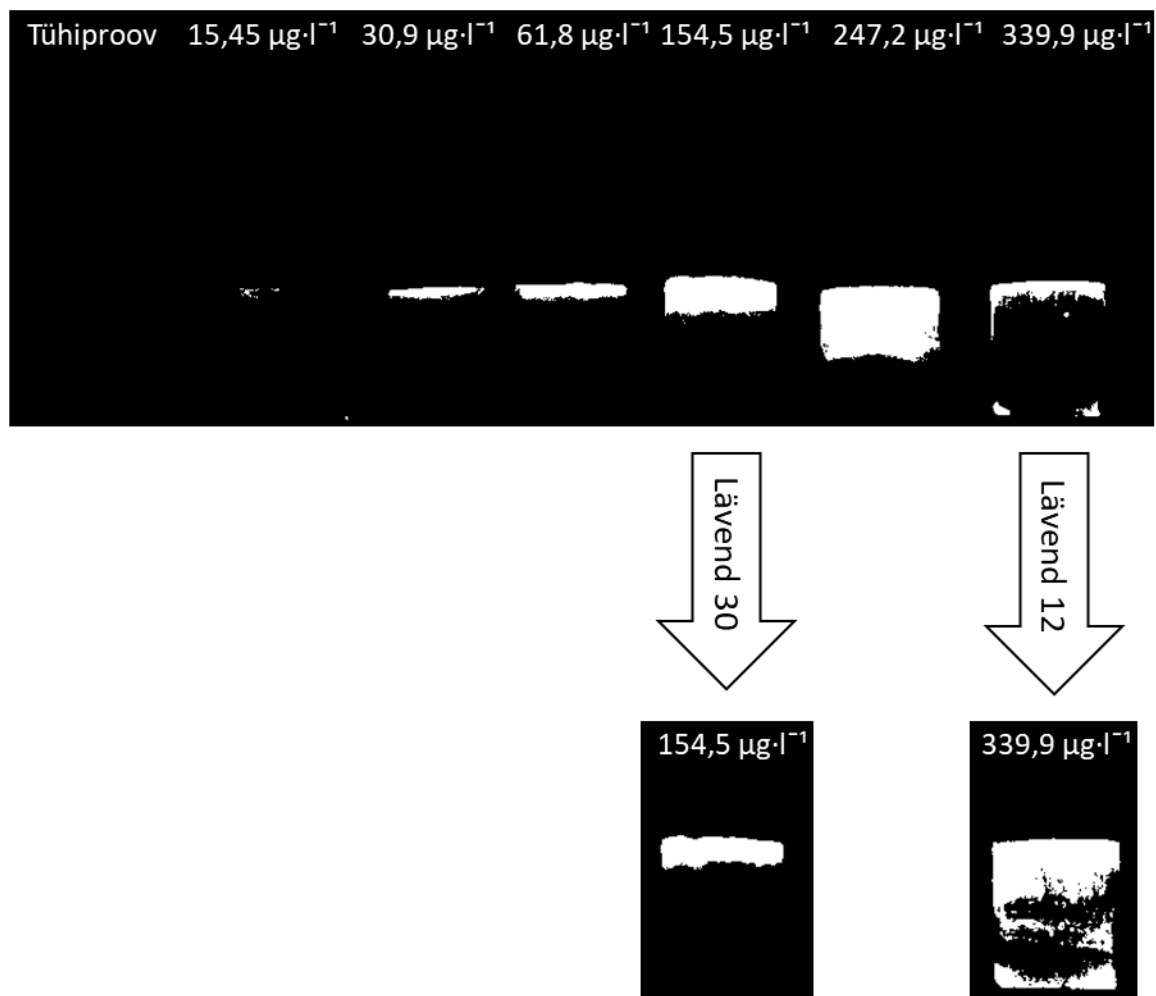
Joonis 2. Valideerimise esimese seeria skanneri pildid.



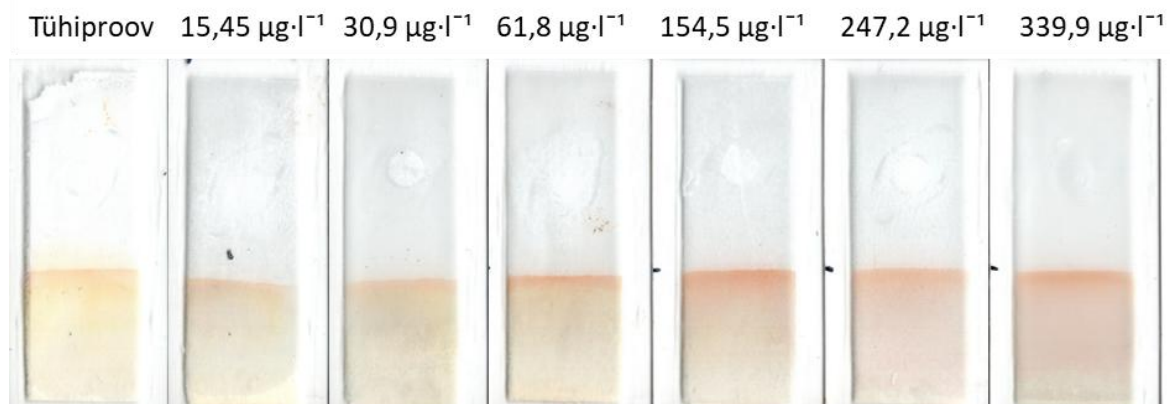
Joonis 3. Valideerimise esimese seeria pilditöötlusel (lävend 21) saadud signaal.



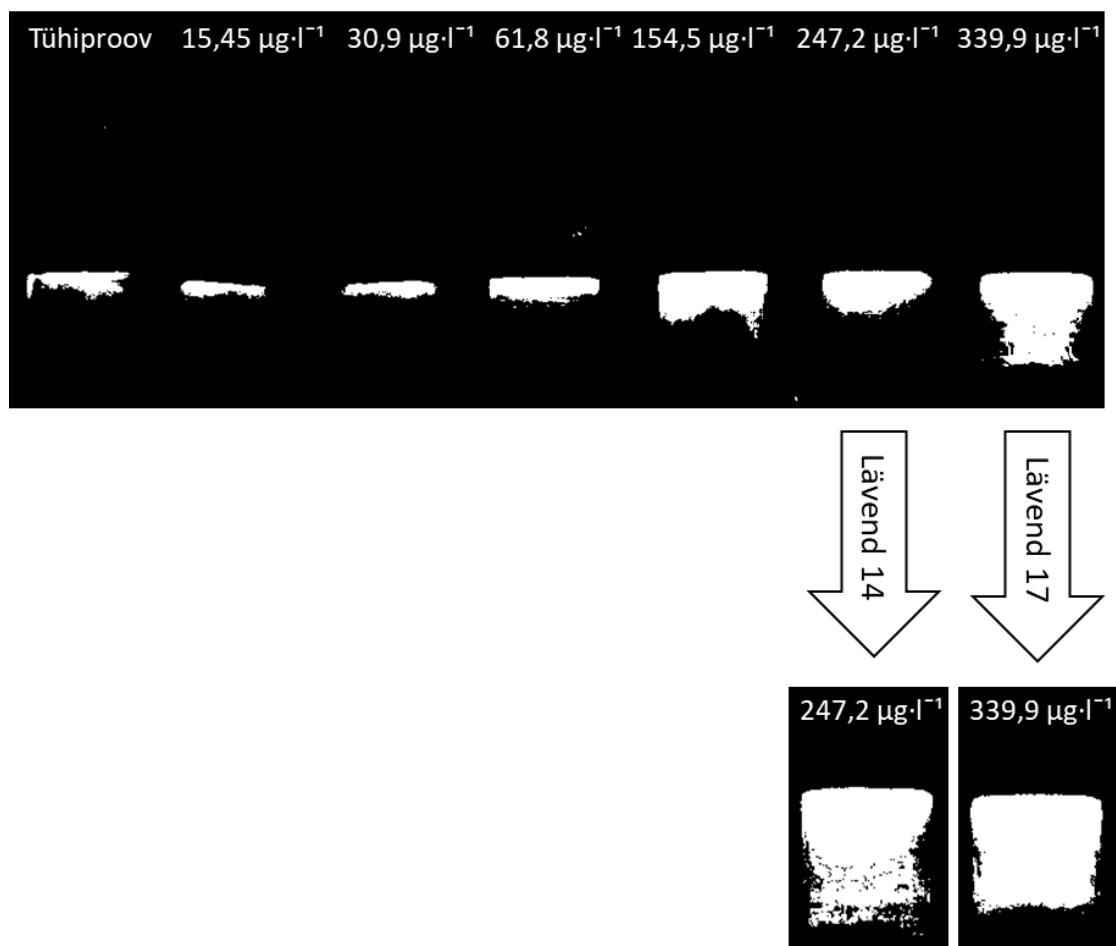
Joonis 4. Valideerimise teise seeria skanneri pildid.



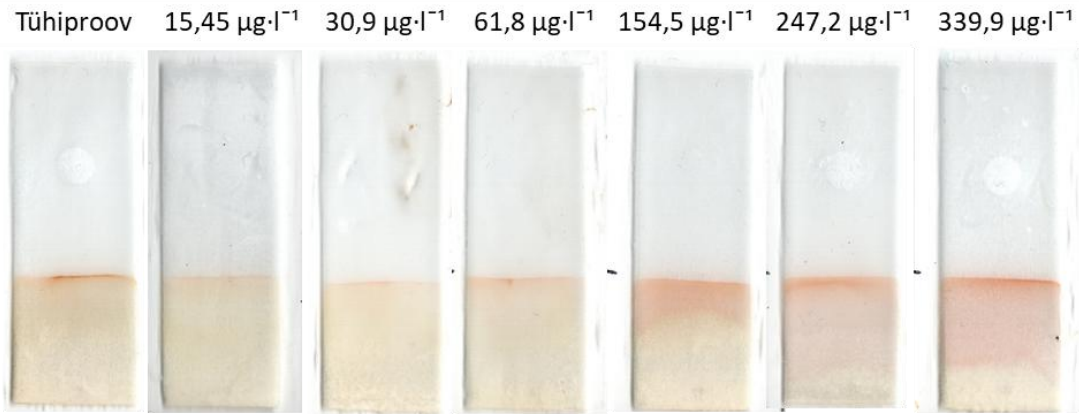
Joonis 5. Valideerimise teise seeria pilditöötlusel (lävend 21) saadud signaalid ja muudetud lävendiga saadud signaalid.



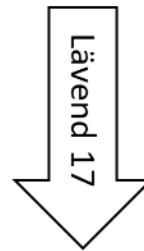
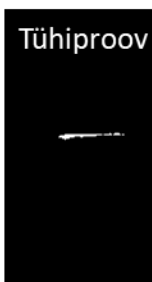
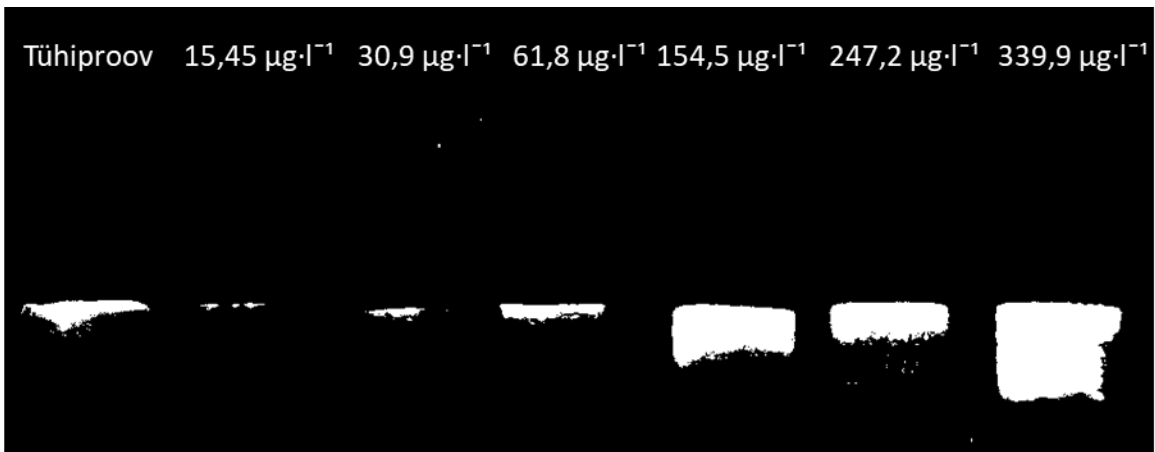
Joonis 6. Valideerimise kolmanda seeria skanneri pildid.



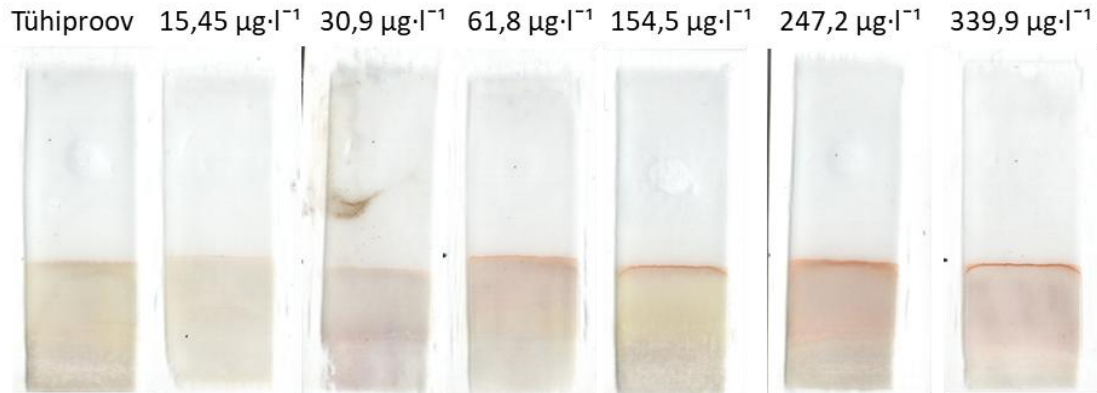
Joonis 7. Valideerimise kolmanda seeria pilditötlusel (lävend 21) saadud signaalid ja muudetud lävendiga saadud signaalid.



Joonis 8. Valideerimise neljanda seeria skanneri pildid.



Joonis 9. Valideerimise neljanda seeria pilditötlusel (lävend 21) saadud signaalid ja muudetud lävendiga saadud signaalid.



Joonis 10. Valideerimise viienda seeria skanneri pildid.



Joonis 11. Valideerimise viienda seeria pilditöötlusel (lävend 21) saadud signaalid ja muudetud lävendiga saadud signaalid. 30,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+} puhul ei arvestatud pikslite lugemisel määratud materjalilt tulnud signaali.

Lisa 3

Tabel 1. Intensiivsust arvesse võtvad valideerimise tulemused.

Hg ²⁺ kontsentratsioon, µg·l ⁻¹	Seeria 1	Seeria 2	Seeria 3	Seeria 4	Seeria 5	Keskmine	Standardhálve	Suhteline standardhálve, %
0	4520	177	626235	93071	8610	146523	270916	185
15,45	216546	902136	1206313	42820	324	473628	546843	115
30,9	952565	297252	426231	91664	11833	355909	371685	104
61,8	1773453	574176	1055109	381983	387089	834362	592245	71
154,5	2287277	1502546	2316073	2219052	1382469	1941483	458830	24
247,2	4033471	3357302	2510052	2625121	2901185	3085426	622412	20
339,9	3938164	1977311	3655992	3475370	2721316	3153631	797182	25

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lola Sõukand,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Analüütilise testi arendamine ja valideerimine elavhõbe(II) ioonide määramiseks**“, mille juhendaja on Hanno Evard, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lola Sõukand

23.05.2025