Mehanokemijska sinteza kalcijeva oksalata iz kalcijeva sulfata

Bolić, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:304215

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Filip Bolić

Mehanokemijska sinteza kalcijeva oksalata iz kalcijeva sulfata

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Đerđ
Neposredna voditeljica: dr. sc. Anamarija Stanković

Osijek, 2018

SAŽETAK

Kalcijevi oksalati su sastavni dio bubrežnih kamenaca i oni su kalcijeve soli oksalne kiseline. Sve više ljudi u današnje vrijeme ima problema sa bubrežnim kamencima stoga su istraživanja na tu temu sve intenzivnija, najviše se istražuju procesi taloženja kalcijevih oksalata te načini njihova mogućeg uklanjanja ili prevencije njihova nastanka. U medicinskom smislu ovaj problem se naziva urolitijaza ili nefrolitijaza. Ovisno o uvjetima, kalcijev oksalat može kristalizirati u tri hidratna oblika, kalcijev oksalat monohidrat (COM) koji je termodinamički najstabilniji, te metastabilni dihidrat (COD) i trihidrat (COT) koji se vrlo rijetko može naći u sastavu bubrežnih kamenaca.

U ovom radu je cilj bio provjeriti koji hidratni oblik kalcijeva oksalata nastaje mehanokemijskom sintezom i to na dva načina, bez dodatka otapala (samo praškasti reaktanti) i s dodatkom minimalne količine otapala, u ovom slučaju vode. Dobiveni rezultati su obrađeni i interpretirani FT-IR spektroskopijom, termogravimetrijskom analizom te optičkom mikroskopijom.

Ključne riječi: kalcijev oksalat monohidrat (COM), bubrežni kamenci, mehanokemijska sinteza

ABSTRACT

Calcium oxalates are components of kidney stones and they are calcium salts of oxalic acid. Nowadays more and more people have problems with kidney stones therefore research on this subject are more intensive, mainly precipitation processes of calcium oxalate and the ways of their possible removal or prevention of crystal growth. In medical way this problem is known as urolithiasis of nefrolithiasis. Depending on conditions, calcium oxalate cristallizes in three hidrate forms, calcium oxalate monohydrate (COM) which is thermodynamically most stable, and metastable dihydrate (COD) and trihydrate (COT) which is the rarest to be found in kidney stone composition.

The goal of this work was to see which hydrate form of calcium oxalate will form by mechanochemical synthesis and it was done in two ways, without adding minimum quantity of solvent (only pulverised reactants) and with adding a minimum quantity of water, in this case water. Results were processed and interpreted with FT-IR spectroscopy, thermogravimetric analysis and optical microscopy.

Keywords: calcium oxalate monohydrate (COM), kidney stones, mechanochemical synthesis

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI DIO 2

2.1. Biomineralizacija 2

2.1.1. Bubrežni kamenci 2

2.1.2. Kalcijevi oksalati 4

2.2. Sinteza kalcijeva oksalata u laboratoriju 5

2.3. Mehanokemijska sinteza 6

2.3.1. Metode mehanokemijske sinteze 6

2.3.2. Planetarni kuglični mlin 7

2.4. Metode identifikacije uzoraka 9

2.4.1. Infracrvena spektroskopija 9

2.4.1.1. Literaturni podaci infracrvene spektroskopije za kalcijev oksalat monohidrat .. 10

2.4.2. Termogravimetrijska analiza 11

2.4.1.1. Literaturni podaci termogravimetrijske analize za kalcijev oksalat monohidrat 12

2.4.3. Optička mikroskopija 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. Pribor i aparatura 13

3.2. Popis kemikalija 13

3.3. Sinteza kalcijeva oksalata 14

3.4.1. Infracrvena spektroskopija (FT-IR) 15

3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA) 16

3.4.3. Optička mikroskopija 16

4. REZULTATI I RASPRAVA 18

4.1. Sinteza kalcijeva oksalata pri 250 ok/min 18

4.2. Sinteza kalcijeva oksalata pri 500 ok/min 23

4.3. Sinteza kalcijeva oksalata pri 750 ok/min 28

5. ZAKLJUČAK 34

6. LITERATURA 35

7. PRILOZI 37

1. UVOD

U današnje vrijeme je sve učestalija pojava bubrežnih kamenaca u ljudskoj populaciji. Proces patološke biomineralizacije nije još u potpunosti jasan te se zbog toga provodi sve više istraživanja da bi se objasnili mehanizmi, potrebni uvjeti i prevencija nastanka bubrežnih kamenaca.

Pojava stvaranja kristalne tvari na unutarnjim stijenkama bubrega koja uzrokuje oštru bol, oštećenja u urinarnom traktu te infekciju urinarnog sustava naziva se urolitijaza ili nefrolitijaza. Kemijskih sastav bubrežnih kamenaca je raznolik, ali u većini slučajeva su smjese različitih anorganskih soli sa najvećim udjelom kalcijevih oksalata.

Cilj ovog rada je bio mehanokemijski sintetizirati kalcijev oksalat i to na dva načina, bez dodatka otapala i uz dodatak minimalne količine otapala. Za karakterizaciju taloga kalcijeva oksalata korištene su sljedeće metode: termogravimetrijska analiza (TGA), infracrvena (FT-IR) spektroskopija, te optička mikroskopija (OM).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biomineralizacija

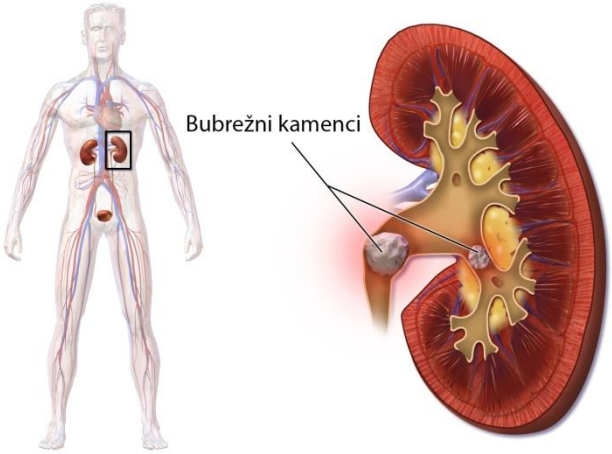
Biomineralizacija je proces kojim živi organizmi stvaraju strukture koje odgovaraju mineralima pa svojoj kristalnoj strukturi. Biominerali su spojevi koji su ne samo nastali u živim organizmima nego su složeni spojevi koji sadrže zajedno anorganske i organske komponente i zbog toga što su nastali u kontroliranim uvjetima imaju i određena svojstva poput veličine, oblika, funkcija,…. Stvaranje bioloških minerala pokazuje puno napredaka te je sigurno polje znanosti samo za sebe, u ranim počecima istraživanja bioloških minerala ovo polje je nosilo naziv „kalcifikacija“ zbog bioloških minerala koji su sadržavali kalcij, ali kako su kasnije otkrivani ostali biominerali koji su sadržavali i druge katione poput barijevih, stroncijevih, željeznih, tako je ovo znanstveno polje preimenovano u „biomineralizacija“[1].

Kalcij je u sastavu približno 50 % biominerala u organizmima jer je potreban za mnoge procese u staničnom metabolizmu. Od ostalih biominerala u manjoj mjeri se još u organizmima javljaju spojevi koji za kation sadrže željezo (Fe^{2+}, Fe^{3+}), mangan (Mn), kalij (K), cink (Zn), olovo (Pb), barij (Ba), stroncij (Sr) i u vrlo malim količinama čak i arsen (As)[1].

2.1.1. Bubrežni kamenci

Bubrežni kamenci su bolest koja priprada skupini bolesti bubrega i urinarnog trakta, te se jednim imenom nazivaju urolitijaza ili nefrolitijaza. Obuhvaćaju velik dio populacije s time da su muškarci češće pogođeni od žena. Stvaraju se taloženjem kristala iz mokraće koji se onda nakupljaju na unutrašnjim stijenkama bubrega, a kada se odvoje od stijenke putuju urinarnim traktom i sam taj put može uzrokovati veoma jaku bol oštećujući tkivo usput, a urolitijaza je medicinski izraz za opisivanje kamenaca u urinarnom traktu (**Slika 1.**). Kod nekih ljudi kamenci izađu iz tijela kroz urinarni trakt bez znanja te osobe ako kristali ostanu dovoljno sitni i djeluju inhibitori koji sprečavaju stvaranje i taloženje kristala. Bubrežni kamenci se sastoje od različitih tvari, ali većina sadrže spojeve s kalcijem i to najčešće fosfate u kombinaciji s oksalatom koji je tema ovog rada (**Tablica 1.**).Spojevi sa kalcijem se moraju konstantno unositi u organizam jer se nalaze u sastavu

kosti i zuba. Također su u bubrežnim kamencima još pronađeni i spojevi koji sadrže mokraćnu kiselinu te cisteinski kamenci[2].



Slika 1. Mjesto nastanka bubrežnih kamenaca[3].

Liječenje bubrežnih kamenaca ovisi o stanju pacijenta, tj. o veličini kamenca i njegovu položaju, pa se prvo pokušavaju razne metode s lijekovima dok je operacija odstranjivanja ostavljena kao zadnja opcija ukoliko ništa prije toga nije pomoglo. Većinom (90 %) bubrežni kamenci sami prođu kroz urinarni trakt uz uzimanje mnogo vode, dok su u ostalim slučajevima potrebne „agresivnije“ metode poput uretroskopije (uklanjanje kamenca endoskopskom pretragom), te novija metoda litotripsija koja razbija kamenac šok valovima[2]. Nakon odstranjivanja kamenca pacijentu se u dogovoru sa liječnikom određuje plan prehrane i određeni lijekovi kako bi se spriječio ponovni nastanak kalcijevih kamenaca i kamenaca mokraćne kiseline, a metoda prevencije ovisi o uzorku i tipu bubrežnih kamenaca koje je pacijent imao.

Tablica 1. Kemijski sastav bubrežnih kamenaca[4].

Naziv spoja	Kemijska formula	Udio (%)
Kalcijev oksalat monohidrat	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$	60 – 80
Kalcijev oksalat dihidrat	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$	
Kalcijev fosfat	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	
Kalcijev hidrogenfosfat	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	
Magnezijev amonijev fosfat heksahidrat	$(NH_4)Mg(PO_4) \cdot 6H_2O$	10 – 15
Mokraćna kiselina	$C_5H_4N_4O_3$	5 – 10
Cistein	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	1

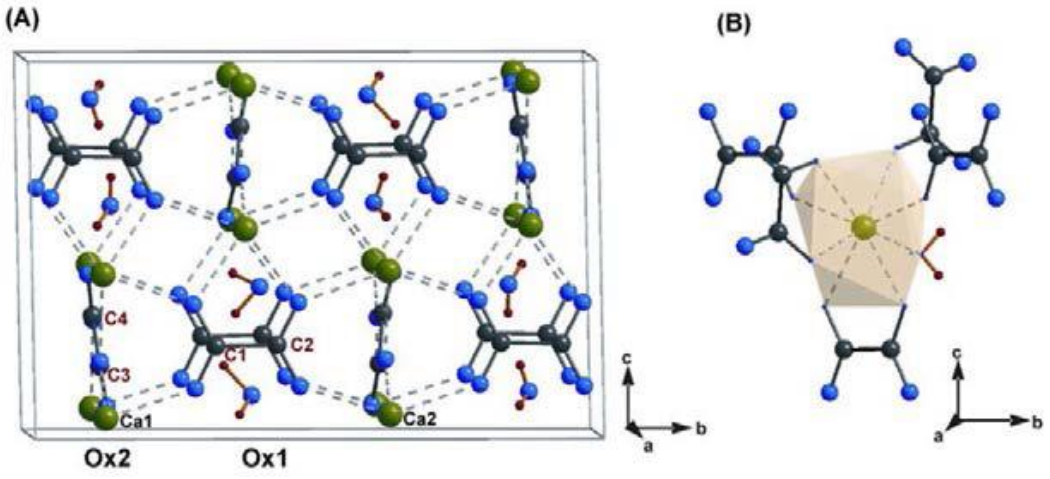
2.1.2. Kalcijevi oksalati

Soli oksalne kiseline su tvari široko rasprostranjene u prirodi, a nalaze se u biljkama, ljudima i životinjama, a s kemijskog gledišta oni su organske kiseline. Ljudsko tijelo ih sadrži u određenim količinama jer se dobivaju pretvorbom npr. vitamina C, a u organizam mogu doći i iz voća i povrća (špinat, blitva, kupine,…), ali i namirnice životinjskog porijekla sadrže zanemarive količine oksalata. Pretpostavlja se da se pomoću oksalata iz biljaka izlučuje višak kalcija te da ih biljke koriste za obranu od nametnika. Oksalna kiselina može stvoriti čvrstu vezu sa raznim mineralima poput natrija, kalija, magnezija i kalcija, a ti spojevi se onda nazivaju soli oksalata[5].

Kalcijev oksalat taloži u 3 hidratna oblika: dva metastbilna oblika trihidrat (COT) i dihidrat (COD) i termodinački najstabilniji monohidrat (COM). Monohidrat i dihidrat su pronađeni u kristaliničnom obliku u bubrežnim kamencima dok je trihidrat sastavni dio urina, ali nije nađen u kamencima[6].

Kalcijev oksalat monohidrat može kristalizirati u dvije monoklinske strukture. Prva strukutra je osnovna i stabilna iznad 45 °C (a = 9,978 Å, b = 7, 295 Å, c = 6,292 Å, β = 107,07°, Z = 8, V = 876,228 Å^3, prostorna grupa I2/m), a sastoji se od naslaganih planarnih slojeva kalcija i oksalata i oni se izmjenjuju sa slojevima oksalnog aniona i molekula vode u položaju koji je paralelan s ravninom[7-9]. Druga struktura je stabilna ispod 45 °C (a =

9,9763 Å, *b* = 14,5884 Å, *c* = 6,29134 Å, β = 107,05°, prostorna grupa P21/c) i u ovoj strukturi su oksalati pretrpjeli distorziju i zbog toga se duljina *b* osi udvostručila i simetrija smanjila[7-8]. Postoji još i treća struktura COM-a koja je ortorombska i nastaje isključivo dehidratacijom kalcijeva oksalata dihidrata na temperaturi između 118-130 °C.



Slika 2. Kristalna struktura COM[10] (A) i poliedar Ca^{2+} (B).

Slika 2. prikazuje kako je oksalat koordiniran s kalcijem u poliedar (B) te kako je ekvivalentan jediničnoj ćeliji kalcijeva oksalata monohidrata (A). U takvoj strukturi je atom kalcija koordiniran s osam atoma kisika s time da sedam atoma kisika potječe od pet oksalatnih iona ($C_2O_4^{2-}$) i jedan od molekule vode (H_2O). Tri kraja poliedra oko kalcija su vezani za još tri atoma kalcija i sa time se stvaraju paralelni slojevi.

2.2. Sinteza kalcijeva oksalata u laboratoriju

U laboratoriju kalcijev oksalat se sintetizira najčešće otopinski pri čemu se kontroliraju razni parametri kao što su: temperatura, koncentracija reaktanata, ionska jakost, pH, način miješanja (magnetski ili mehanički),… Kod otopinskih sinteza promjena temperature ovisi o veličini dobivenih kristala te ovisi i o brzini miješanja cijele otopine. Kod većih brzina miješanja će općenito biti dobiveni manji kristali [11].

Kalcijev oksalat monohidrat laboratorijski može biti pripremljen na način da se pomiješaju otopine kalcijeve soli i kalijevog oksalata ($K_2C_2O_4$) u vodi ili otopini vode i etanola na temperaturi između 25 °C i 75 °C ovisno o željenoj veličini kristalita i miješaju se magnetskom miješalicom. Kristali se zatim istalože i filtriraju vakuumskom filtracijom te se suše u periodu od 24h[12]. Kalcijev oksalat dihidrat se može pripremiti na način da se pomiješaju otopine kalcijeva klorida ($CaCl_2$) i natrijeva citrata ($Na_3C_6H_5O_7$) te se mehanički miješaju. Nakon miješanja se dodaje otopina natrijeva oksalata ($Na_2C_2O_4$) te se sve zajedno promiješa i ostavi stajati do taloženja kristala koji se zatim filtriraju i suše[13].

2.3. Mehanokemijska sinteza

Mehanokemija je grana kemije koja se bavi proučavanjem fizikalno – kemijskih promjena tvari pod utjecajem mehaničke energije gdje tokom mljevenja dolazi do fizikalnih i kemijskih promjena tvari. U novije vrijeme, u želji da se eliminiraju toksična i/ili skupa otapala koja se koriste u sintezama, zelena kemija se sve više okreće mehanokemiji kao učinkovitom alternativom jer omogućava sinteze bez upotrebe za takvim otapalima. Postoji nekoliko vrsta mehanokemijskih metoda koje mogu biti ručno izvođene u tarioniku ili strojno. Mehanokemijskim reakcijama se reaktanti usitnjavaju što dovodi do povećanja dodirne površine i samim time i trenja i to dovodi do pokretanja reakcije čime nastaju produkti[14].

2.3.1. Metode mehanokemijske sinteze

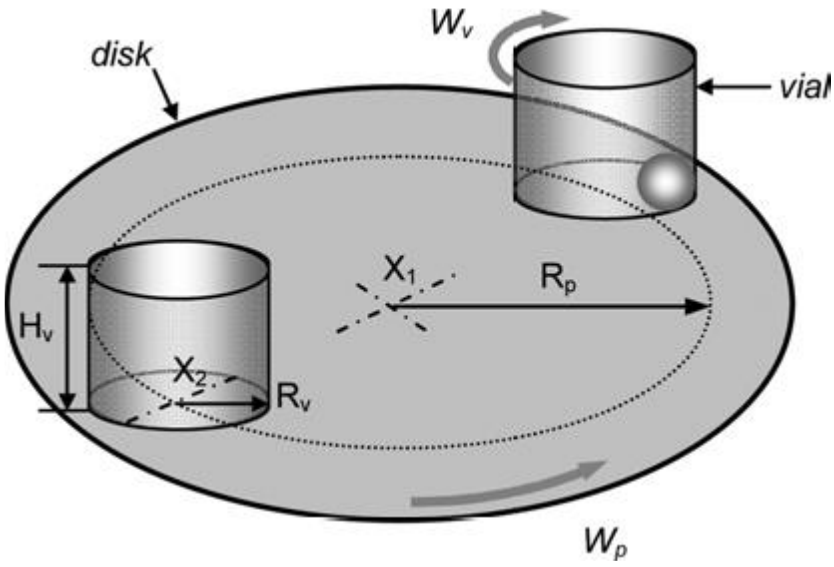
Mehanokemijska sinteza se može izvoditi na tri načina, bez prisutnosti otapala (NG, eng. *neat grinding*), sinteza potpomognuta tekućinom (LAG, eng. *liquid assisted grinding*) i mljevenje potpomognuto ionima i tekućinom (ILAG,eng. *ion and liquid assisted grinding*). Kod prvog tipa mljevenje može biti izvedeno ručno u tarioniku ili strojno u kugličnom ili vibracijskom mlinu i reaktanti se nalaze u suhim uvjetima. Kod drugog tipa reaktantima se dodaje katalitička količina otapala koja stvara sloj na površini čestica reaktanata što omogućava prijanjanje čestica i difuziju molekula reaktanata te dodatak otapala može imati i katalitički učinak koji ovisi o vrsti korištenog otapala[16].

Zadnjom metodom se u reakcijsku smjesu dodaje katalitička količina soli i ona može ubrzati cijeli proces i usmjerava sintezu u željenom smjeru[15].

U ovom radu su korištene prve dvije metode. U svaku reakcijsku posudu su stavljene jednake količine reaktanata i jednak broj kuglica za mljevenje samo što je jedna posuda bila u suhim uvjetima (NG), dok je u drugu dodana minimalna količina vode (LAG) da se provjeri utjecaj dodatka minimalne količine otapala.

2.3.2. Planetarni kuglični mlin

Procesi poput mehaničkog pravljenja legura, mehanokemije najčešće koriste visokoenergijsko mljevenje, a primjer je planetarni kuglični mlin (**Slika 3.**), ali se može koristiti i vibracijski mlin. Kontrola uvjeta mljevenja je veoma važna jer mogu utjecati na reaktante pa se treba obratiti pozornost na veličinu kuglica, posuda, brzine rotacije da bi se dobio željeni produkt[16].



Slika 3. Prikaz vrtnje planetarnog kugličnog mlina[16].

Naziv planetarni kuglični mlin je dobiven jer vrtnja cijelog diska i reakcijskih posuda (eng. *vial*) nalikuje gibanju planeta. Reakcijske posude se okreću oko svoje osi, na slici označene sa X_2 rotacijskom brzinom (W_v), i smještene su na disku koji se okreće oko svoje osi, na lici označena sa X_1 revolucijskom brzinom (W_p). Kod ovakvih mlinova, što se

tiče sila koje djeluju u cijelom sustavu osim gravitacijske djeluju i centrifugalna i Coriolisova sila (**Slika 4.**) i one povećavaju kinetičku energiju cijelog sustava čak i za 100 puta veću od gravitacijske. Definiranje uvjeta u kojima nastaje određeni produkt se radi konstruiranjem mape mljevenja (eng. *milling map*) pomoću koje se može izračunati prijenos energije na reaktante, a to se postiže opisivanjem brzine i kinetčke energije kuglica u reakcijskoj posudi[17].

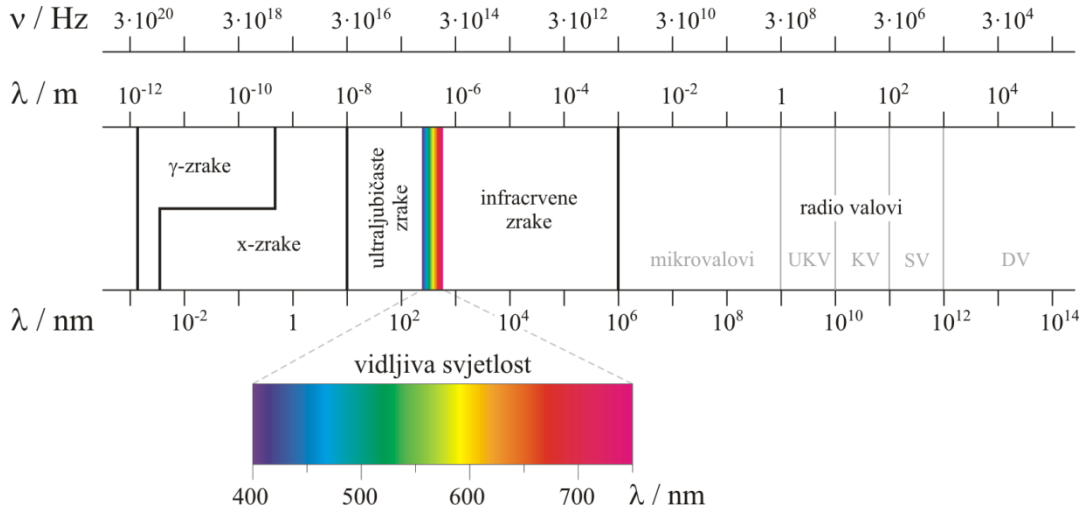


Slika 4. Prikaz sila koje djeluju u reakcijskoj posudi planetarnog kugličnog mlina.

2.4. Metode identifikacije uzoraka

2.4.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje koje se nalazi u rasponu valnih duljina od 0,7 μm do 500 μm (**Slika 5.**) i u tom rasponu djeluje infracrvena spektroskopija kod identifikacije spojeva[18].

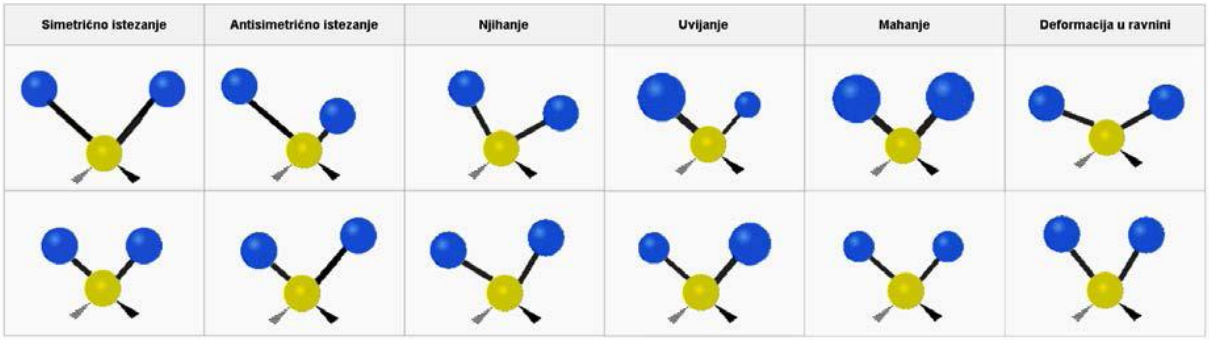


Slika 5. Spektar elektromagnetskog zračenja[19].

Infracrveno područje ima veću energiju od mikrovalova i manju od vidljive svjetlosti i zbog toga se nalazi između ta dva podučja. Također se može u svom rasponu podjeliti na tri područja, blisko (0,7 μm – 2,8 μm), srednje (2,8 μm – 50 μm) i daleko (50 μm – 500 μm). Infracrveno zračenje svojom apsorpcijom u spojeve stvara promjene u razinama vibracijske energije. Niža energija je potrebna u bliskom infracrvenom području za elektronske prijelaze, u srednjem području se događa promjena u razinama vibracija većine molekula dok u se dalekom mogu vidjeti promjene u rotacijskim razinama. Kod interpretacije se gleda apsorpcija zračenja u ovisnosti o valnoj duljini, tj. recipročnoj vrijednosti valne duljine koja odgovara valnom broju[18].

Za aktivnost molekula u infracrvenom području mora postojati promjena dipolonog momenta te time molekula može apsorbirati ovo zračenje. Atomi metala nemaju dipolne oscilacije te su neaktivni u infracrvenom području. Postoje dvije vrste vibracija u molekulama, vibracije istezanja i deformacije (**Slika 6.**). Vibracije istezanja mogu biti

simetrične i antisimetrične. Kod simetričnog istezanja se dvije jezgre istovremeno približavaju ili udaljavaju centru mase, a kod antisimetričnog se jedna jezgra udaljava dok se druga približava. Vibracije deformacije uzrokuju promjenu kuta između dvije veze, a može se podijeliti na njihanje, uvijanje, mahanje i deformaciju u ravnini[20].



Slika 6. Prikaz mogućih vibracija u molekulama.

2.4.1.1. Literaturni podaci infracrvene spektroskopije za kalcijev oksalat monohidrat

Kalcijev oksalat monohidrat u svojoj strukturi ima nekoliko vrsta vibracija koje se nalaze na valnim duljinama navedenim u **Tablici 2.** i karakteristične su samo za COM. Na 517 cm^{-1} se nalazi antisimetrično njihanje O-C-O veze, 947 cm^{-1} prikazuje uvijanje H-O-H, 782 cm^{-1} antisimetrično savijanje O-C-O veze, 1316 cm^{-1} prikazuje simetrično istezanje C-O veze dok 1622 cm^{-1} prikazuje antisimetrično istezanje C-O veze te 3490 cm^{-1} istezanje O-H veze[21].

Tablica 2. Literaturni podaci vibracijskih vrpci za kalcijev oksalat monohidrat[21].

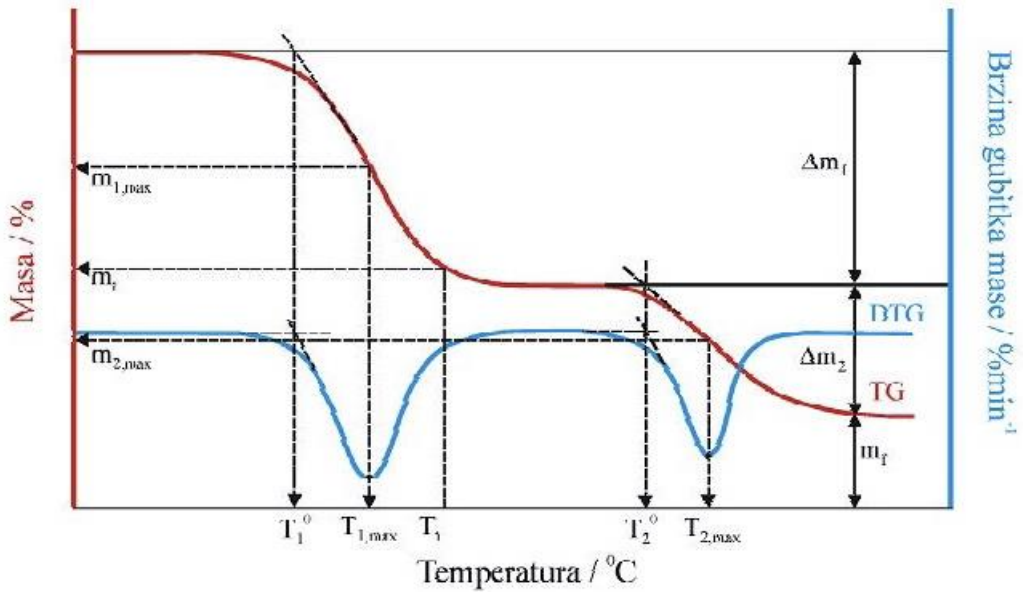
Valni broj [cm^{-1}]	**Vrsta vibracija**
517	O-C-O antisimetrično njihanje
782	O-C-O antisimetrično savijanje
947	H-O-H uvijanje
1316	C-O simetrično istezanje
1622	C-O antisimetrično istezanje
3490	O-H istezanje

2.4.2. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza je termička vrsta analize pomoći koje se prati promjena mase uzorka kao funkcije temperature ili vremena u kontroliranoj atmosferi, a karakterizacija uzorka se radi gubitkom i/ili dobivanjem mase. Ne izotermna termogravimetrijska analiza prati promjene svojstava uzoraka u ovisnosti o temperaturi dok izotermna termogravimetrijska analiza prati u ovisnosti o vremenu uz konstatnu temperaturu, a gubitak mase je moguć u jednom ili više koraka što ovisi o vrsti uzorka. Oblik krivulje termograma ovisi o brzini zagrijavanja, masi uzorka i o vrsti plina koji protječe kroz uređaj, a termogravimetrijskim metodama se mogu raditi procjene toplinske stabilnosti ili mehanizam raspada promatranih uzoraka[22].

Kod termogravimetrijske analize se koristi termovaga koja sadrži preciznu vagu koja je vrlo osjetljiva te može vagati uzorke od 10 mg i manje, peći koja je kontrolirana temperaturnim programerom, a cijela termovaga je spojena na računalo koje bilježi promjene ovisno o zadanim parametrima te radi termogram. Kučište termovage je zaštićeno toplinskim štitom da bi se održala preciznost vage te se također propuhuje inertni plin zbog kontroliranja atmosfere[22].

Termogram (**Slika 7.**) je grafički prikaz termogravimetrijske analize koji je jednistven za svaki spoj te on sadrži karakteristične točke iz kojih se očitaju potrebni podaci pomoću kojih se može okarakterizirati određeni uzorak. Važne točke na termogramu su: T^{o} (početna temperatura razgradnje uzorka), T_{max} (temperatura maksimalne brzine razgradnje), m_f (završna masa uzorka / g), R_{max} (brzina gubitka mase / %), Δm (gubitak mase uzorka / g).



Slika 7. Prikaz termograma sa svim potrebnim podacima.

2.4.1.1. Literaturni podaci termogravimetrijske analize za kalcijev oksalat monohidrat

Termogravimetrijskom analizom omogućena je kvantitativna analiza. Teoretski gubitak mase za kristalnu vodu u čistom COM je 12,33 %[12, 23], a gubitak mase odvija se tijekom samo jednog koraka.

$$COM - CaC_2O_4 \cdot 1\ H_2O \rightarrow CaC_2O_4 + H_2O \quad (1)$$

2.4.3. Optička mikroskopija

Optička mikroskopija je tehnika pomoću koje se vrlo mali predmeti mogu učiniti vidljivima te se njom u većini slučajeva provjeravaju podaci koji su dobiveni drugim metodama pomoću kojih je promatrani uzorak okarakteriziran. Pomoću svjetlosnog mikroskopa koji ne koristi polarizirano svjetlo može se odraditi veličina, boja i oblik kristala. U moderno vrijeme je mikroskopija došla do razine da se uzorci mogu snimati i povećati do vrlo velikih razina, dok optički mikroskopi imaju maksimalno povećanje do 1000 puta, a razlučivost ovisi o broju i kvaliteti leća kao i o valnoj duljini svjetlosti korištenoj kod osvjetljivanja uzoraka[24].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Pribor i aparatura

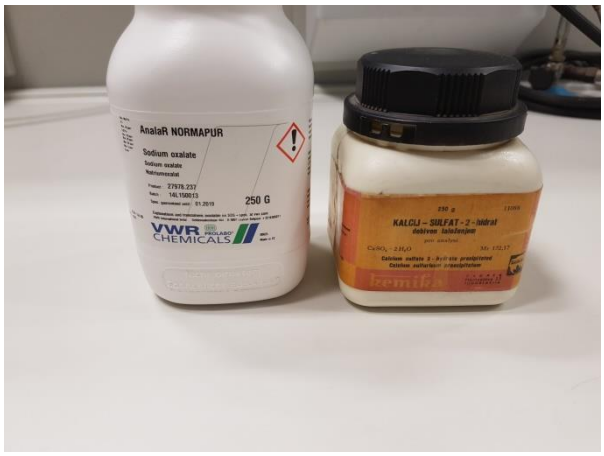
Za sintezu kalcijeva oksalata je korišten planetarni kuglični mlin (FRITSCH PULVERISETTE 7 premium line Planetary Ball Mill**, Slika 8.)** koji je sadržavao dvije posude za uzorke (volumen reakcijske posude, V = 20 cm3 , promjer posude, Dv = 4,5 cm, promjer rotirajućeg diska, Rp = 140 mm) s kuglicama od nehrđajućeg čelika (n = 80, promjer, d_b = 5 mm; gustoća, ρ = 7,7 g/cm3 i masa, m = 0,51 g) te su se koristile 3 različite brzine vrtnje mlina, 250, 500 i 750 ok/min. Sastav dobivenih produkata je određen FT-IR spektroskopijom i termogravimetrijskom analizom, a morfologija svjetlosnim mikroskopom.



Slika 8. Planetarni mlin korišten kod sinteze kalcijeva oksalata.

3.2. Popis kemikalija

Kod sinteze su od kemikalija korišteni natrijev oksalat, kalcijev sulfat dihidrat te deionizirana voda (provodnosti ≤ 0,055 μS/cm). Za analitičku analizu prisutnosti sulfata u uzorku nakon ispiranja je korišten reagens barijev nitrat nakon čega se otopina vrlo malo zamutila što dokazuje malu količinu sulfatnih iona koji su uklonjeni daljnjim ispiranjem iz uzorka. Navedene kemikalije su *p.a.* čistoće.



Slika 9. Kemikalije korištene u sintezi kalcijeva oksalata, natrijev oksalat i kalcijev sulfat dihidrat.

3.3. Sinteza kalcijeva oksalata

Za sintezu kalcijeva oksalata je izvagano 2,5 g natrijeva oksalata i 2,5 g kalcijeva sulfata dihidrata te su stavljeni u posudu za sintezu u mlin. U jednu posudu stavljeno 5 ml vode (LAG) dok su u drugoj bili samo reaktanti (NG). Zatim je na mlinu namještena brzina okretaja na 250 okretaja u minuti, a vrijeme je podešeno na 10 minuta gdje se uzeo prvi uzorak. Nakon uzimanja uzorka vrijeme je ponovno podešeno, ali ovog puta na 20 minuta kada se ponovno uzeo uzorak, te je vrijeme nakon toga podešavano da se uzorci uzimaju u intervalima od 15 minuta (**Tablica 3.**) sve do 120 min tako da je iz svake posude dobiveno po 8 uzoraka, tj. sveukupno 16 uzoraka za pojedinu brzinu (250, 500 i 750 ok/min što je ukupno 48 uzoraka.

Tablica 3. Vrijeme uzimanja uzoraka

Redni broj uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8
Vrijeme uzimanja / min	10	30	45	60	75	90	105	120

Sinteza kalcijevog oksalata na preostale dvije brzine vrtnje (500 i 750 ok/min) je bila izvedena na identičan način.

Za karakterizaciju kalcijeva oksalata korištene su sljedeće metode: termogravimetrijska analiza (TGA), infracrvena (FT-IR) spektroskopija, te optička mikroskopija (OM).

3.4. Karakterizacija sintetiziranih uzoraka

3.4.1. Infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Dobivenim produktima je snimljen IR spektar Shimadzu FTIR 8400S (**Slika 10.**) spektrometrom u valnom području od 400 do 4000 cm^{-1} (rezolucija: 4 cm^{-1}) DRS tehnikom. Uzorci kojima je sniman IR spektar su bili u krutom stanju te su se za snimanje uzorka trebali usitniti što je napravljeno u ahatnom tarioniku. Za snimanje spektra je korištena DRIFT tehnika (eng. *diffuse reflectance infrared Fourier transform*) kod koje se uzorak pomiješa sa tvari koja ne apsorbira u IR spektru tako da zajedno tvore homogenu smjesu, a u ovom slučaju je korišten KBr. Nakon što je uzorak fino usitnjen u tarioniku i pomiješan sa KBr, zajedno se prenesu u odgovarajući nosač koji se umeće u spektrometar te se računalnim programom IR Solution 1.30. prikupe i obrade dobiveni podaci.

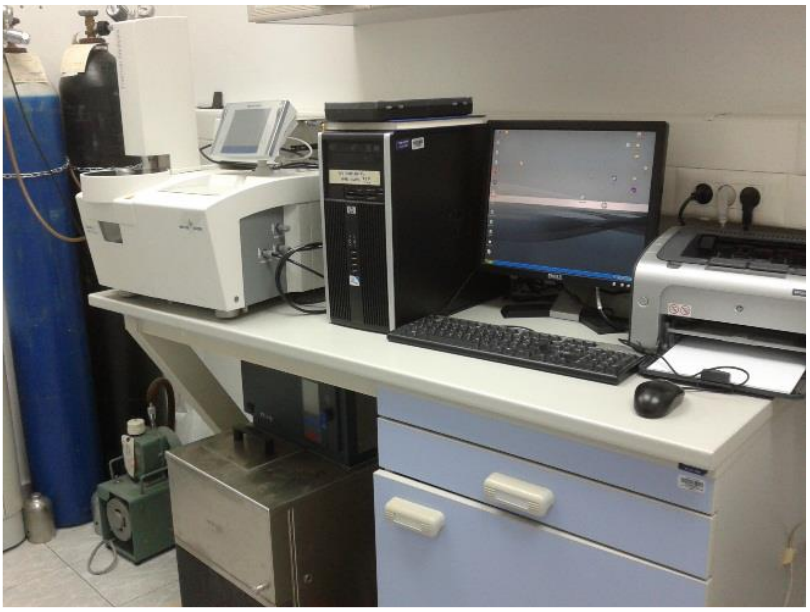


Slika 10. FT-IR spektrometar korišten za snimanje IR spektra dobivenih produkata.

3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

TG analiza je napravljena Mettler Toledo System 1 instrumentom (**Slika 11.**). Ispitivani uzorci su bili postavljeni u atmosferi kisika sa brzinom protoka od 200 mL/min, a razlika u snimanju je bila od 5 °C/min u temperaturnom intervalu od 30 do 300 °C.

Prvo su izvagane posudice u koje se stavlja uzorak te je u svaku stavljeno otprilike 10 mg uzorka. Točna masa stavljenog uzorka u posudicu je određena na način da se od mase posudice sa uzorkom oduzela masa posudice bez uzorka, a dobiveni rezultat je masa uzorka koji se koristio za TG analizu. Nakon toga je uzorak zajedno sa posudicom stavljen na uređaj te je na instrumentu podešeno da temperatura ravnomjerno raste do zadane vrijednosti i određenom brzinom. Promjena mase je zabilježena instrumentom te se na temelju te promjene u masi može odrediti postotni udio hidratnog oblika u uzorku.



Slika 11. Instrument za termogravimetrijsku analizu

3.4.3. Optička mikroskopija

Dobiveni kristali kalcijeva oksalata su promatrani trinokularnim svjetlosnim mikroskopom B1-223E-SP Elite Motic sa kamerom MOTICAM 2 (**Slika 12.**) koja je spojena na računalo te omogućuje da se dobivena slika spremi na računalo te da dalje bude korištena u tom obliku. Svaki uzorak je stavljen na predmetno stakalce te je na njega

stavljeno pokrovno stakalce i sve zajedno je postavljeno na postolje mikroskopa te je slika izoštrena i spremljena na računalu.



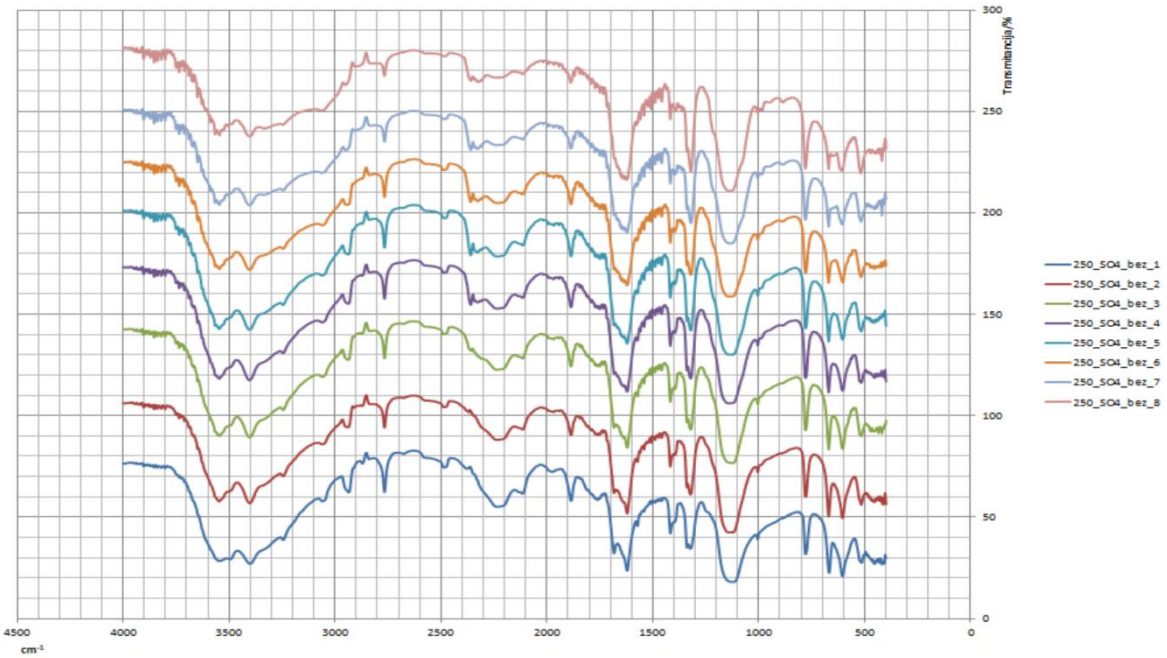
Slika 12. Aparatura za optičku mikroskopiju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

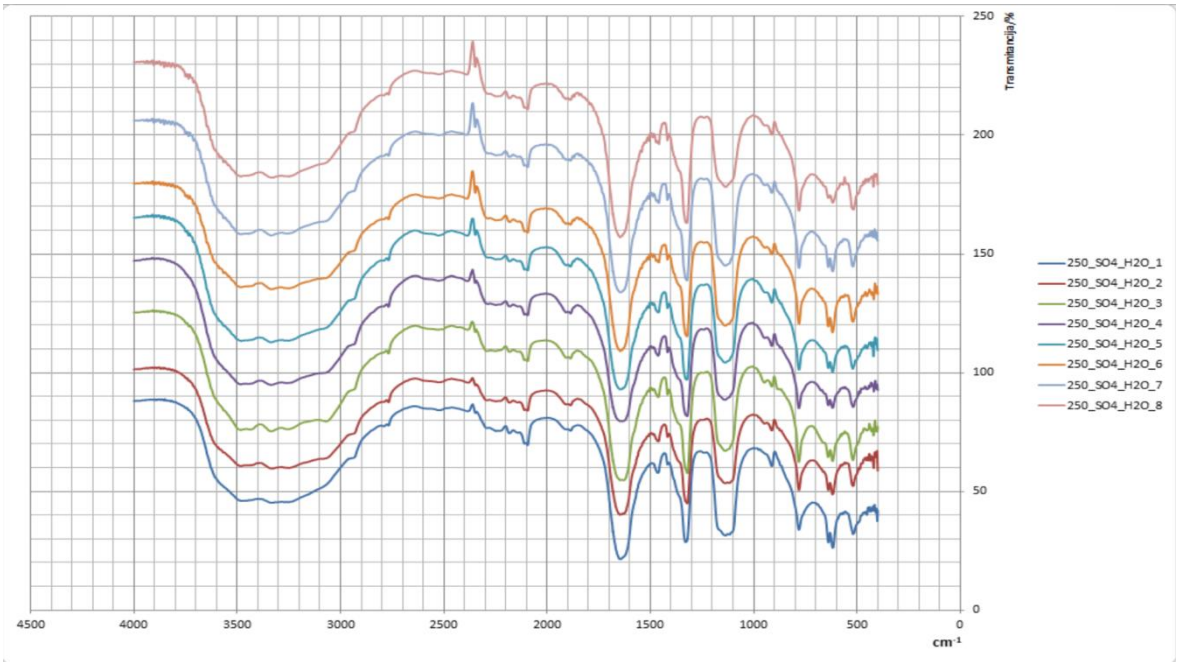
Rezultati su interpretirani po brzinama na kojima je kalcijev oksalat bio sintetiziran. Na svakoj brzini rezultati su uspoređivani tako što su uzorci bili podijeljeni na one koji su sintetizirani bez dodatka H_2O i oni kojima je bila dodana H_2O. Kod svake brzine je uzimano po 8 uzoraka iz posude u kojoj nije bilo H_2O i one u kojoj je bilo H_2O, što dovodi do ukupnog broja od 48 uzoraka. Nakon snimanja IR spektra u svim uzorcima je uočeno da je ostalo sulfatnih iona te su svi uzorci ispirani sa deioniziranom vodom i nakon čega je ponovno snimljen IR spektar gdje se došlo do zaključka da su na taj način uklonjeni sulfatni ioni iz konačnog produkta što će biti detaljnije prikazano.

4.1. Sinteza kalcijeva oksalata pri 250 ok/min

Prva brzina sinteze je bila na 250 ok/min i uzorci su uzimani kao što je navedeno u **Tablici 2.** Nakon sinteze uzorcima je snimljen FT-IR spektar (**Slika 13.** i **Slika 14.)**. Iz dobivenih podataka je očitano da je u oba slučaja već kod prvog uzimanja uzoraka nakon 10 min sinteze dobiven željeni produkt kalcijev oksalat monohidrat, to se može vidjeti po karakterističnim vrhovima na približno 1600 cm^{-1} koji prikazuje asimetrično istezanje C-O veze, te vrhovi na približno 1320 cm^{-1} koji obilježava simetrično istezanje C-O veza, s time da na grafu uzoraka kojima je dodana voda (**Slika 14.**) su ti vrhovi izoštreniji i puno više izraženi. Na grafu uzoraka kojima nije dodana voda se jasno može vidjeti da u uzorku još ima zaostalih iona početnih reaktanata više nego u uzorku kojem je dodana voda, to se može vidjeti i po vrhovima između 3500 cm^{-1} i 4000 cm^{-1} te također između 1400 cm^{-1} i 1600 cm^{-1} (**Slika 13.**) kojih kod uzoraka sa vodom nema (**Slika 14.**). Također se na oba grafa mogu vidjeti vrhovi između 1100 cm^{-1} i 1200 cm^{-1} koji prikazuju prisutnost sulfata u uzorku, a koji je uklonjen dodatnim ispiranjem vodom.



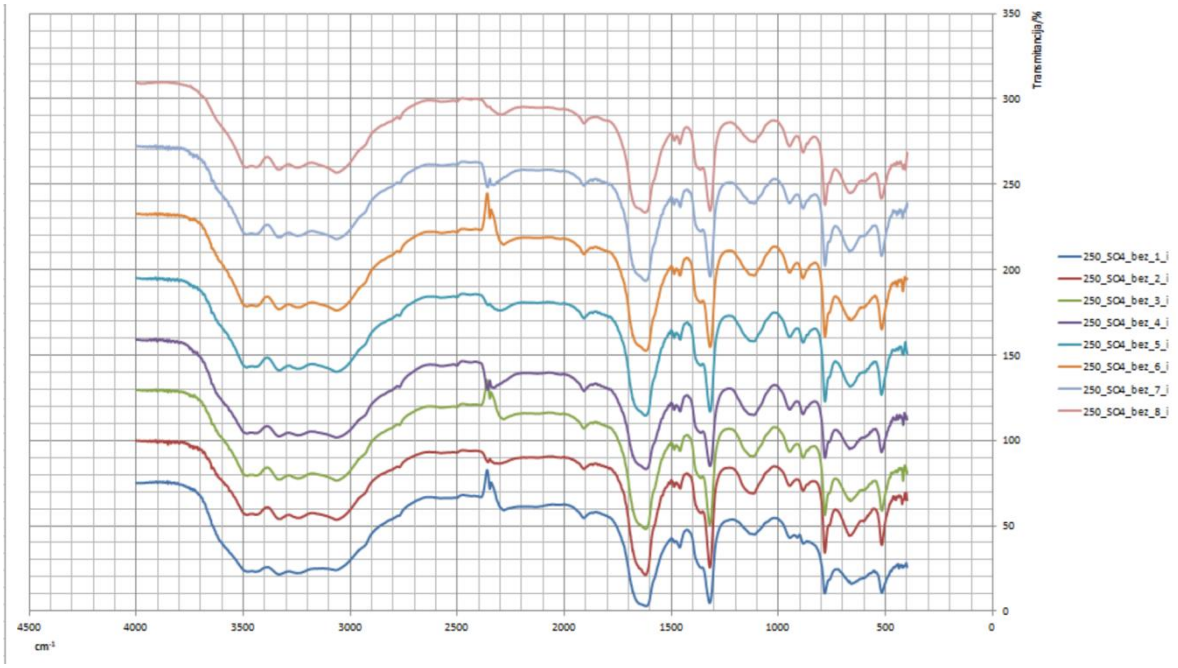
Slika 13. FT-IR spektar uzoraka bez dodavanja vode na 250 ok/min.



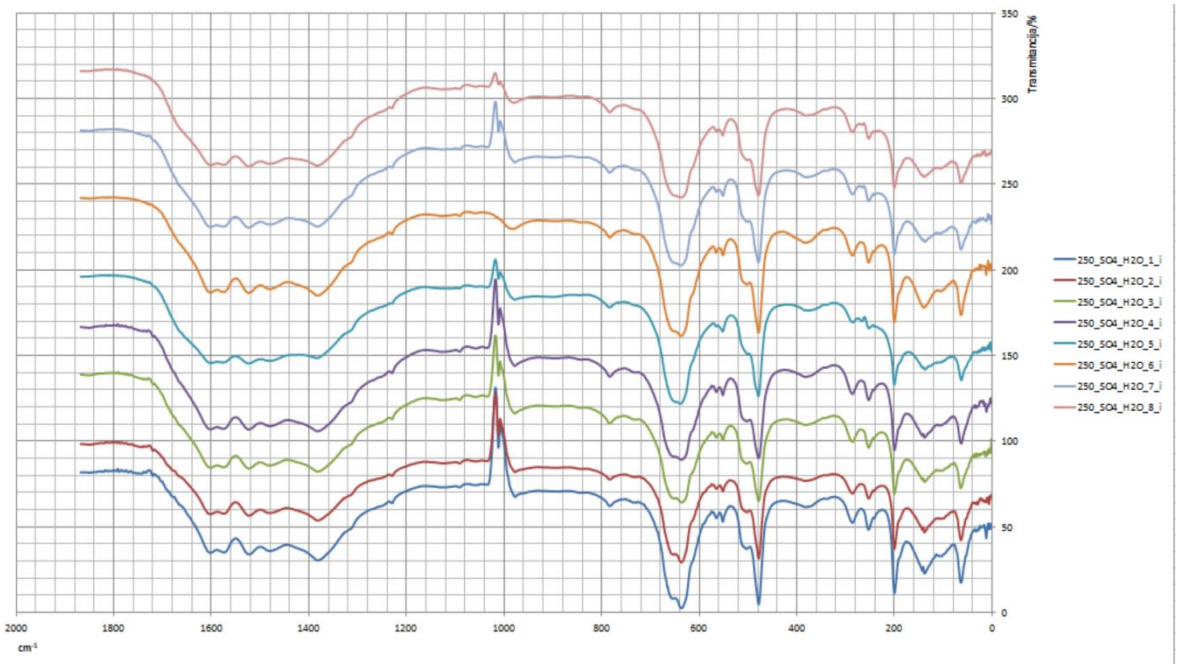
Slika 14. FT-IR spektar uzoraka sa dodatkom vode na 250 ok/min.

Uzorci su nakon snimljenih FT-IR spektara ispirani sa 250 – 300 ml deionizirane vode te su nakon toga ponovno snimljeni FT-IR-ovi da se provjeri jesu li reaktanti uklonjeni iz uzoraka. Na grafovima (**Slika 15.** i **Slika 16.**) se može vidjeti značajno

smanjenje vrha između 1100 cm^{-1} i 1200 cm^{-1} što ukazuje da se ispiranjem smanjila količina sulfata u svim uzorcima. Svi ostali vrhovi su kao i na predhodnim grafovima (**Slika 13.** i **Slika 14.**).



Slika 15. FT-IR spektar uzoraka bez vode nakon ispiranja na 250 ok/min.

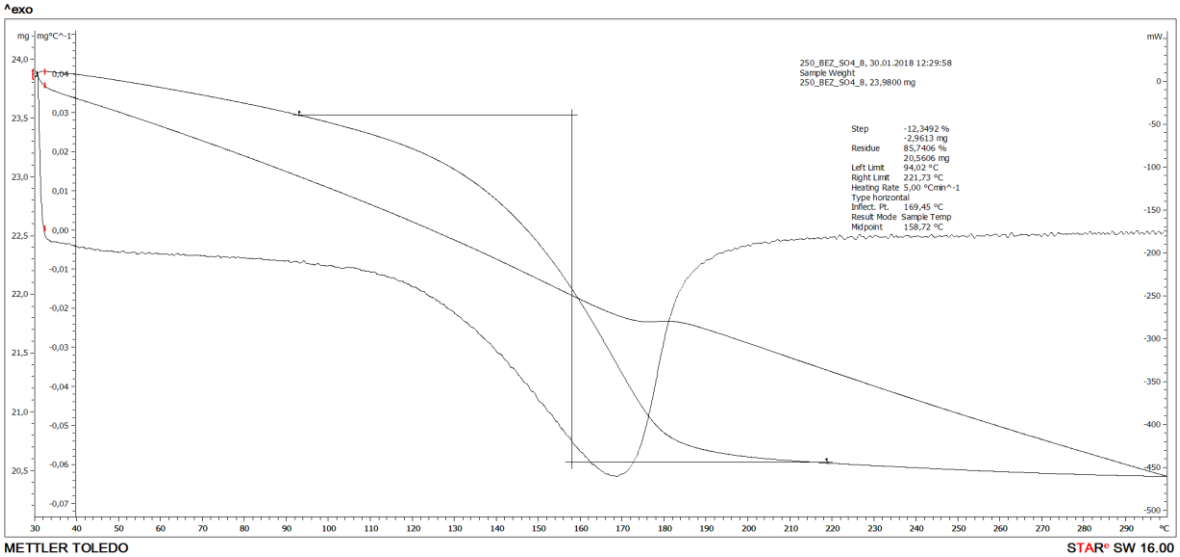


Slika 16. FT-IR spektar uzoraka sa dodatkom vode nakon ispiranja na 250 ok/min.

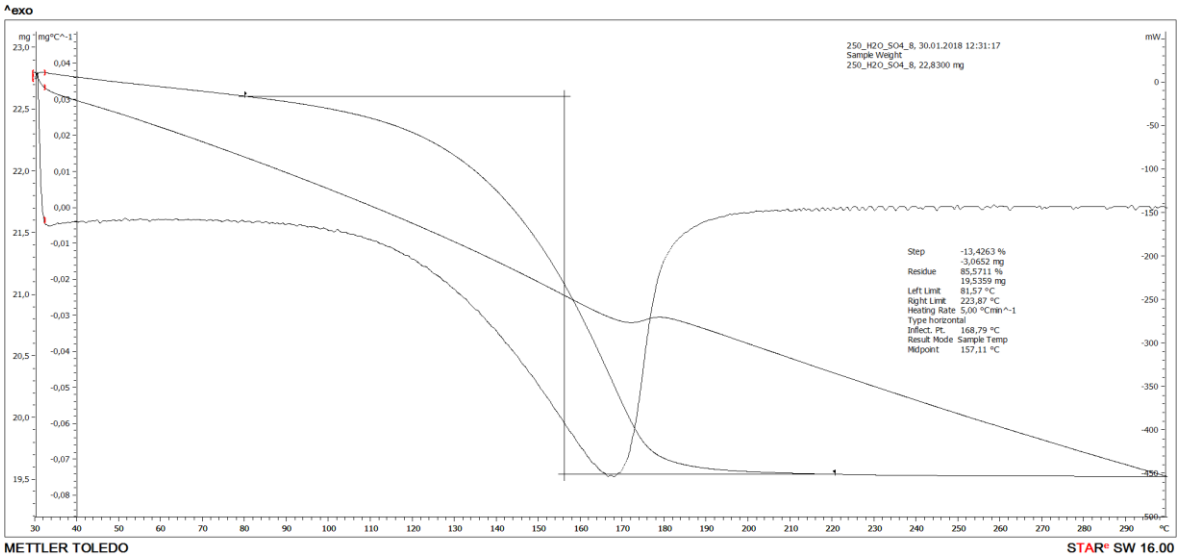
Nakon snimanja FT-IR spektra uzoraka, napravljena je termogravimetrijska analiza uzoraka uzetih nakon 2h sinteze jer je u uzorcima prije primijećen zaostatak poprilične količine sulfatnih iona. Dobiveni podaci prikazani su u **Tablici 4.**, a dobiveni termogrami su prikazani na **Slici 17.** i **Slici 18.** Termogrami prikazuju da je gubitak vode bio samo u jednom koraku, a prema postotku navedenom u **Tablici 4.** se može zaključiti da je navedeni uzorak kalcijev oksalat monohidrat. Iz tablice i oba grafa se može očitati početna temperatura razgradnje (T^{o}), temperatura maksimalne brzine razgradnje (T_{max}), temperatura završetka razgradnje (T_e), početna masa uzoraka (m_i), promjena mase u mg i % (Δm) te konačna masa nakon razgradnje (m_f). Iz grafova je izračunato da je u uzorcima najstabilniji oblik kalcijeva oksalata, a to je monohidrat. Izračun dobivenog rezultata je prikazan u **Tablici 5.** (u poglavlju Prilozi).

Tablica 4. Rezultati termogravimetrijske analize uzoraka na 250 ok/min.

250 ok/min	T_0/°C	T_{max}/°C	T_e/°C	m_i/mg	Δm/mg	Δm/%	m_f/mg
Sa H_2O	81,57	168,79	223,87	22,83	3,0652	13,4263	19,5359
Bez H_2O	94,02	169,45	221,73	23,98	2,9613	12,3492	20,5606

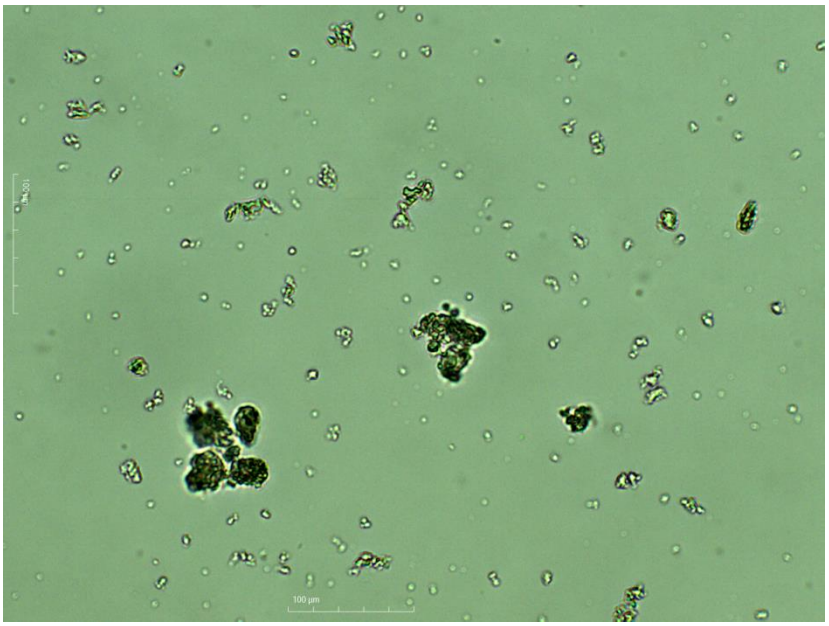


Slika 17. Termogram uzorka nakon 2h sinteze bez dodatka H_2O na brzini 250 ok/min.

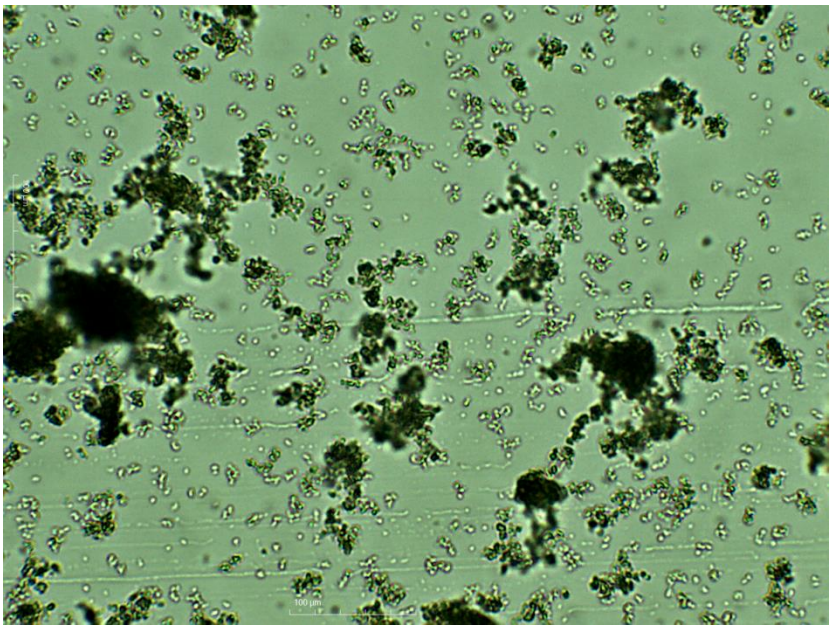


Slika 18. Termogram uzorka nakon 2h sinteze s dodatkom H_2O na brzini 250 ok/min.

Optičkim mikroskopom su snimljeni kristali kalcijeva oksalata uzetih nakon 30 min sinteze, ali kristali su bili premali, te je morfologija teško uočljiva zbog njihove veličine i velike količine agregiranih kristala. Iz slike se jasno može vidjeti da je veličina kristala manja od 50 μm (**Slika 19.** i **Slika 20.)** te se također uočavaju velike količine agregiranih kristala, vjerojatno uslijed dodatka vode prilikom sinteze.



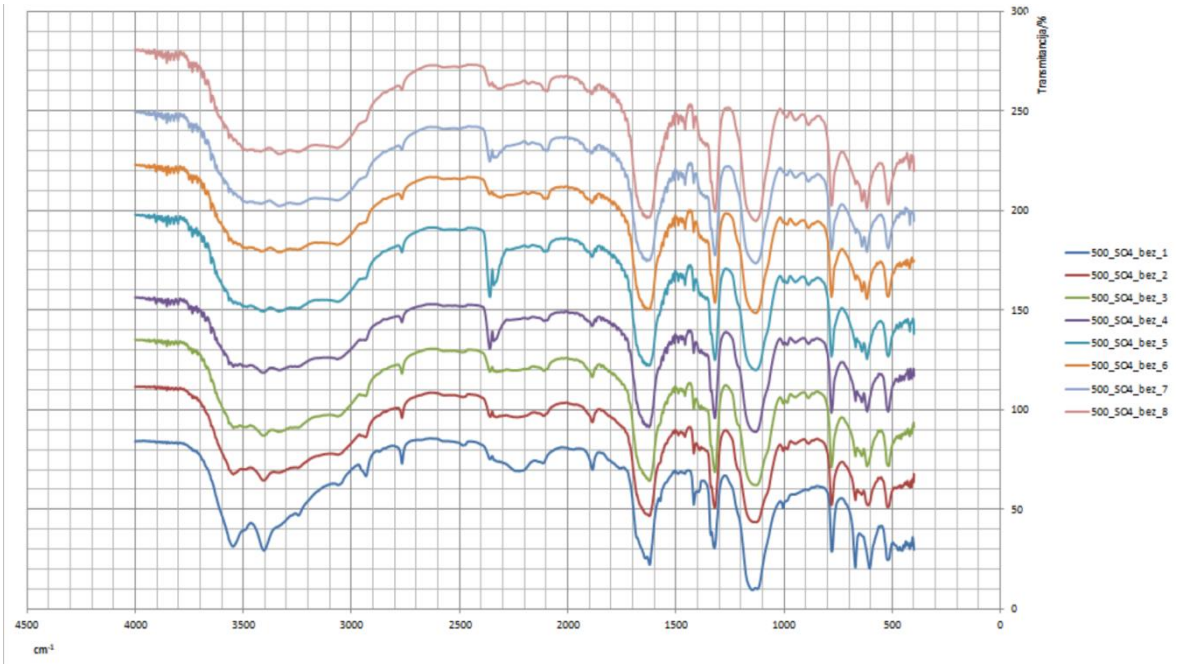
Slika 19. Morfologija uzorka bez dodane H_2O na brzini 250 ok/min.



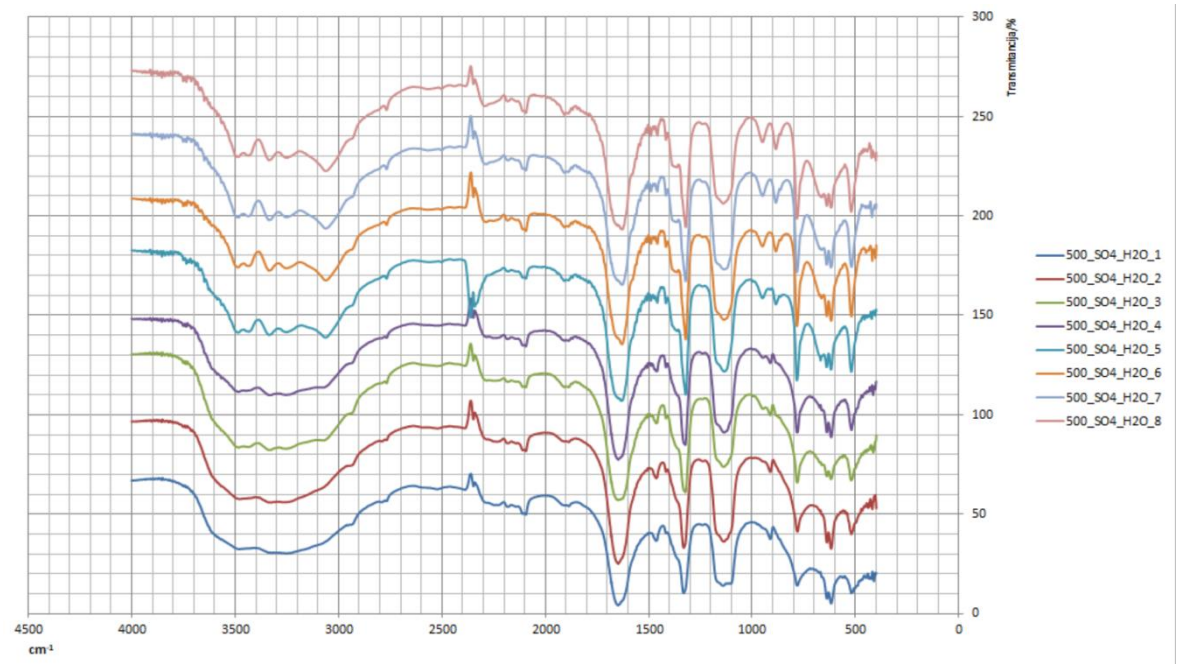
Slika 20. Morfologija uzorka sa dodanom H_2O na brzini 250 ok/min.

4.2. Sinteza kalcijeva oksalata pri 500 ok/min

Sinteza kalcijeva oksalata je provedena i na brzini 500 ok/min na isti način kao i na brzini od 250 ok/min, te je isto tako i postupak analize bio proveden na identičan način. Rezultati FT-IR spektara prikazani su na **Slici 21.** i **Slici 22.**. Iz dobivenih podatak se može vidjeti da je željeni produkt dobiven već nakon 10 minuta sinteze. Također se na oba grafa mogu vidjeti vrhovi između 1100 cm^{-1} i 1200 cm^{-1} koji prikazuju prisutnost sulfatnih iona u uzorku, koji su kasnije uklonjeni ispiranjem uzoraka. Ostali karakteristični literaturni podaci vibracijskih vrpci za kalcijev oksalat monohidrat, a koji su vidljivi na grafovima, su prikazani u **Tablici 2**.



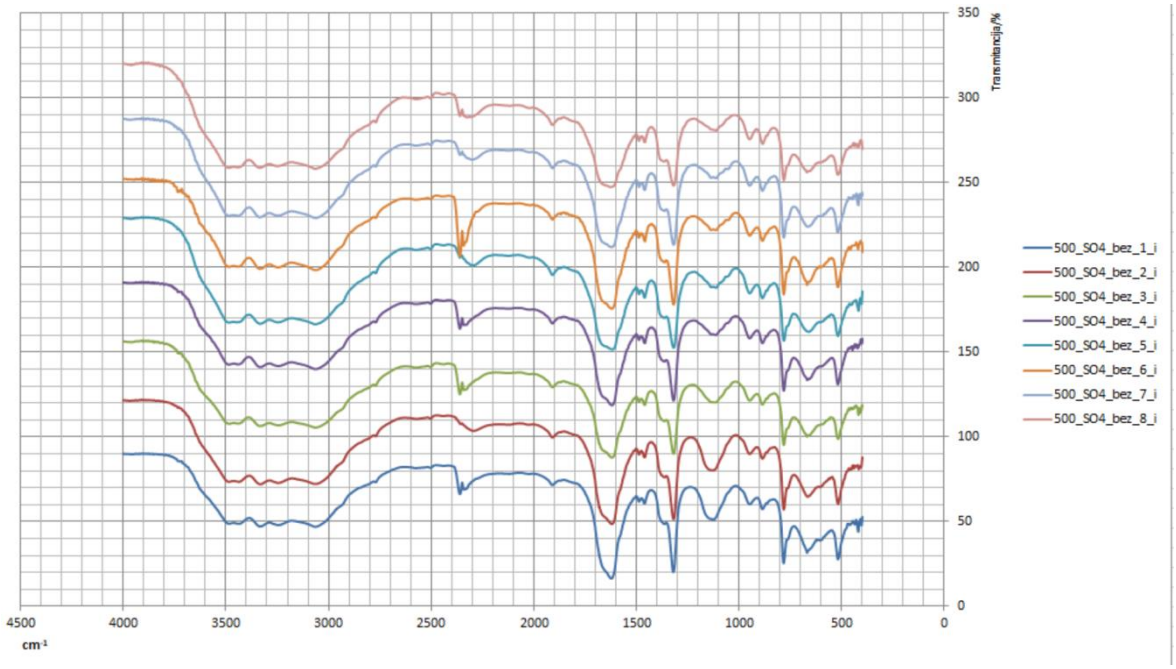
Slika 21. FT-IR spektar uzoraka bez dodavanja vode na 500 ok/min.



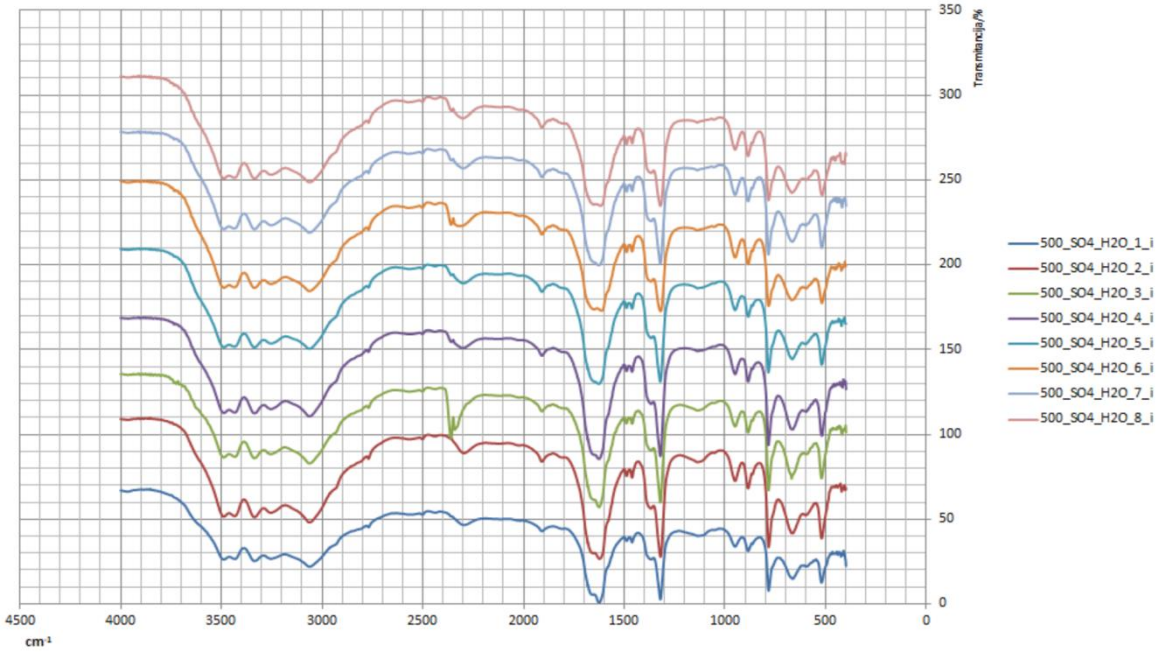
Slika 22. FT-IR spektar uzoraka sa dodatkom vode na 500 ok/min.

Uklanjanje zaostalih reaktanata provedeno je ispiranjem s 250 – 300 ml deionizirane vode te su ponovno snimljeni FT-IR spektri za svaki pojedini uzorak. Na **Slikama 23.** i **24.** se može vidjeti značajno smanjenje vrha između 1100 cm^{-1} i 1200 cm^{-1}

što pokazuje da se ispiranjem uklonila velika količina sulfatnih iona. Uzorcima kojima je početno dodana voda su se skoro u potpunosti isprali (**Slika 24.**).



Slika 23. FT-IR spektar uzoraka bez vode nakon ispiranja na 500 ok/min.

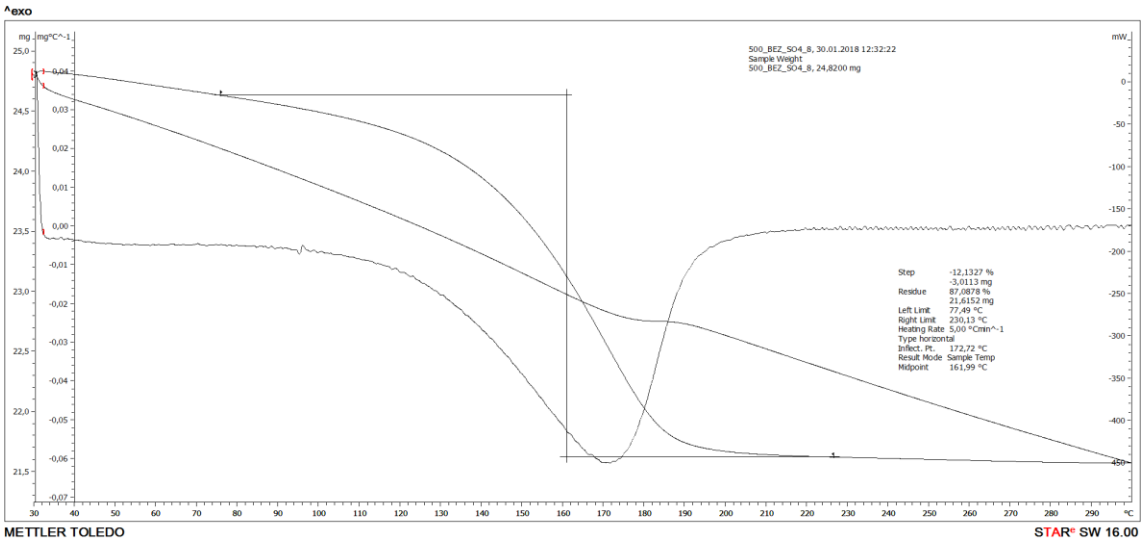


Slika 24. FT-IR spektar uzoraka sa dodatkom vode nakon ispiranja na 500 ok/min.

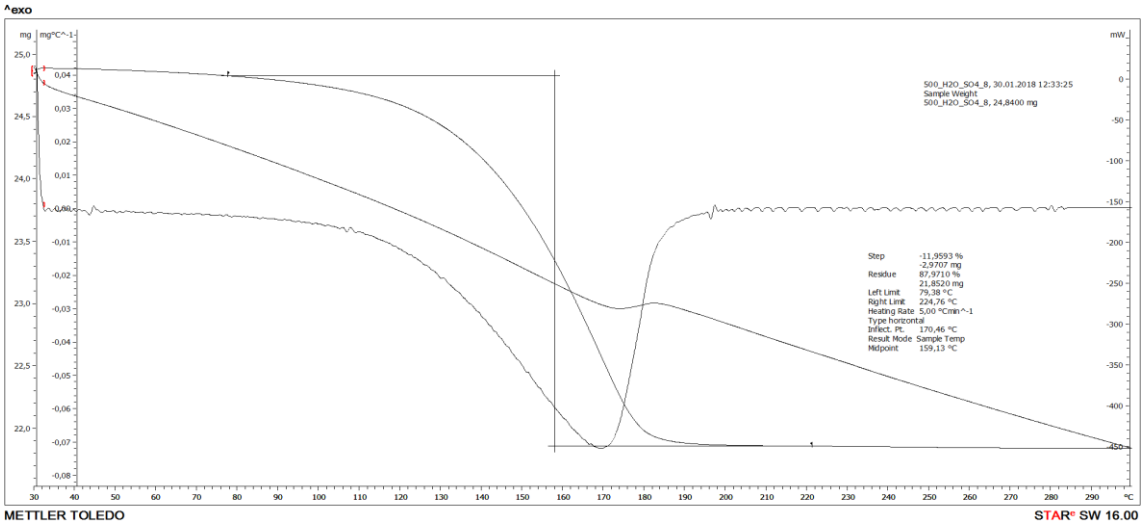
Rezultati termogravimetrijske analize uzorka uzetog nakon 2h sinteze prikazani su u **Tablici 6.**, a termogrami na **Slici 25.** i **Slici 26.** iz kojih se može očitati početna temperatura razgradnje (T^{o}), temperatura maksimalne brzine razgradnje (T_{max}), temperatura završetka razgradnje (T_e), početna masa uzoraka (m_i), promjena mase u mg i % (Δm) te konačna masa nakon razgradnje (m_f). Iz termograma je izračunato da je u oba uzorka dobiven najstabilniji oblik kalcijeva oksalata, a to je monohidrat. Izračun dobivenih rezultata je prikazan u **Tablici 7.** (u poglavlju Prilozi).

Tablica 6. Rezultati termogravimetrijske analize uzoraka na 500 ok/min

500 ok/min	T_0/°C	T_{max}/°C	T_e/°C	m_i/mg	Δm/mg	Δm/%	m_f/mg
Sa H_2O	79,38	170,46	224,76	24,84	2,9707	11,9593	21,8520
Bez H_2O	77,49	173,32	230,13	24,82	3,0113	13,1327	21,6152

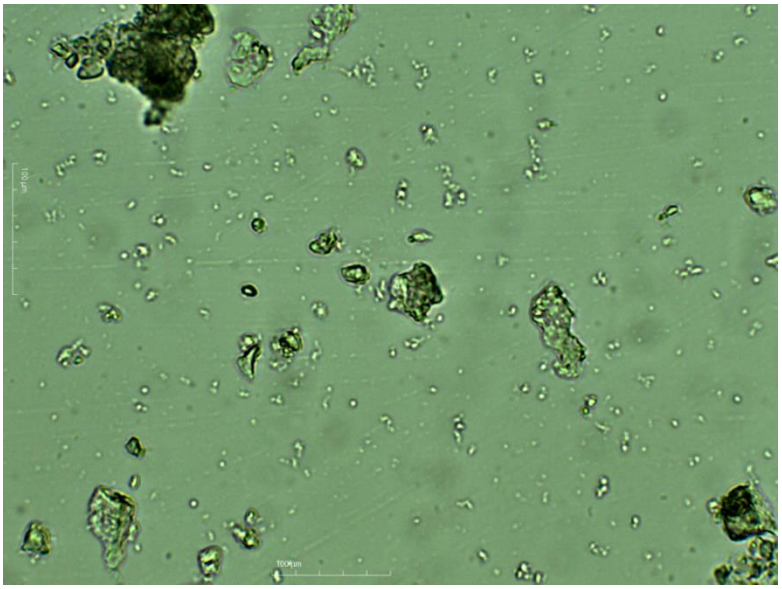


Slika 25. Termogram uzorka uzetog nakon 2h sinteze bez dodatka H_2O na brzini 500 ok/min.

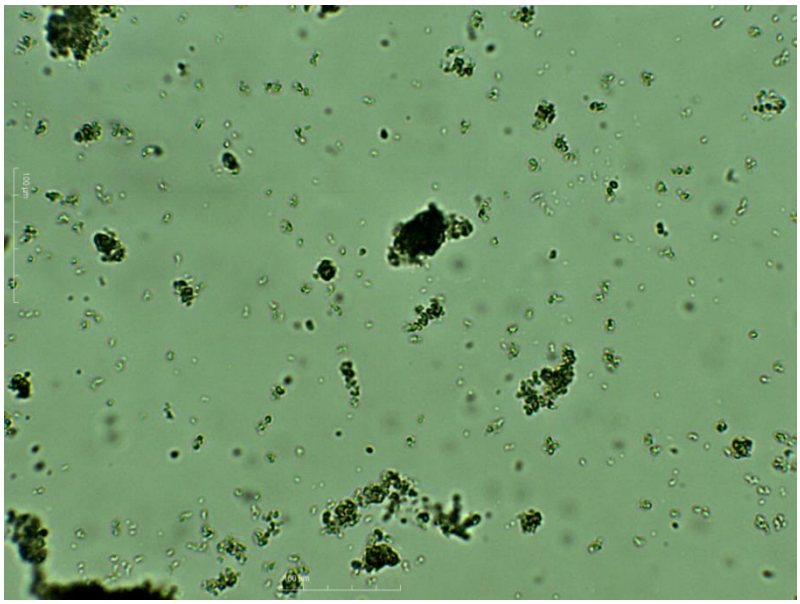


Slika 26. Termogram uzorka uzetog nakon 2h sinteze s dodatkom H_2O na brzini 500 ok/min.

Optičkim mikroskopom su snimljeni uzorci uzetih nakon 30 min sinteze (**Slika 27.** i **Slika 28.**). Morfologija je teško uočljiva zbog veličine i količine agregiranih kristala.



Slika 27. Morfologija uzorka bez dodane vode na brzini 500 ok/min.

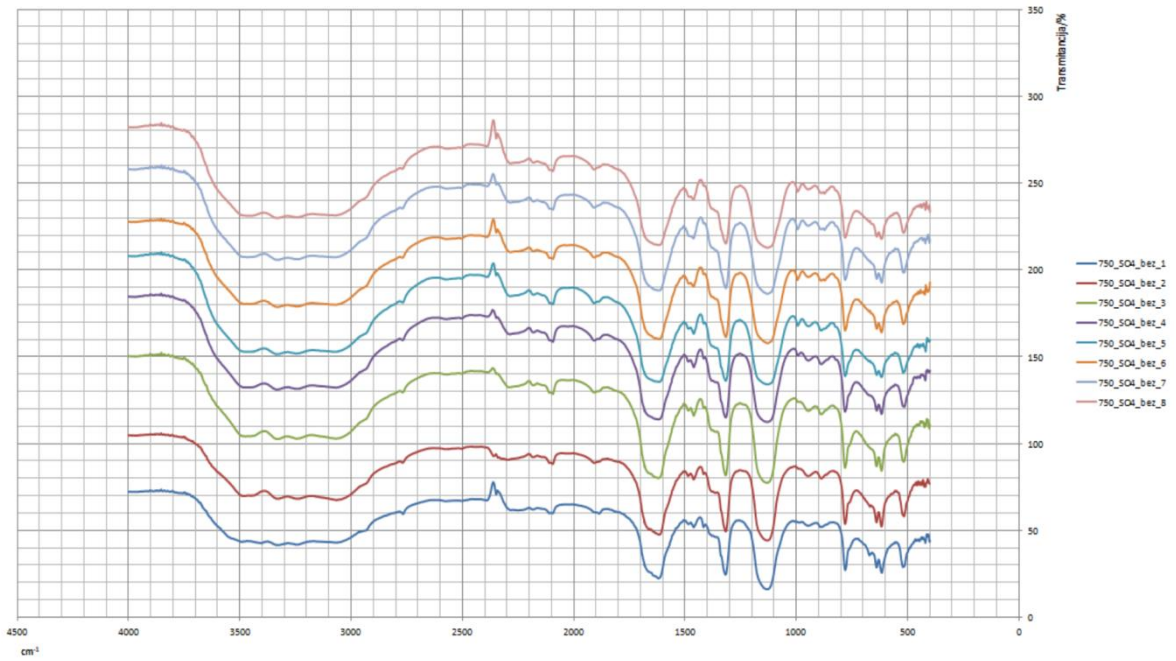


Slika 28. Morfologija uzorka s dodanom vodom na brzini 500 ok/min.

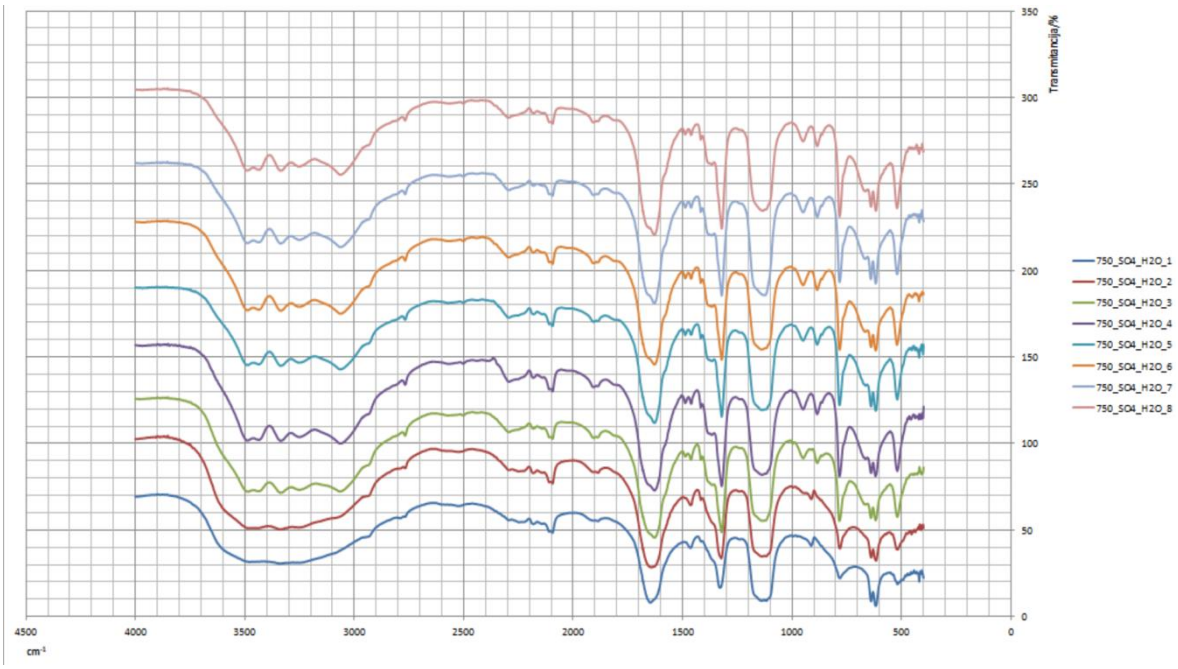
4.3. Sinteza kalcijeva oksalata pri 750 ok/min

Napravljena je i sinteza na brzini od 750 ok/min te je postupak analize bio identičan kao i na prethodne dvije brzine. Uzorcima je snimljen FT-IR spektar i nakon sinteze na brzini od 750 ok/min , a rezultati su prikazani na **Slici 29.** i **Slici 30.** Na slikama se može vidjeti da je željeni produkt dobiven već nakon 10 minuta sinteze što je vidljivo po karakterističnim vrhovima za kalcijev oksalat (**Slika 29. i Tablica 2**).

Iz obje slike se može također uočiti i prisutnost zaostalih sulfatnih iona, ali u odnosu na prethodne dvije brzine u puno manjem udjelu.



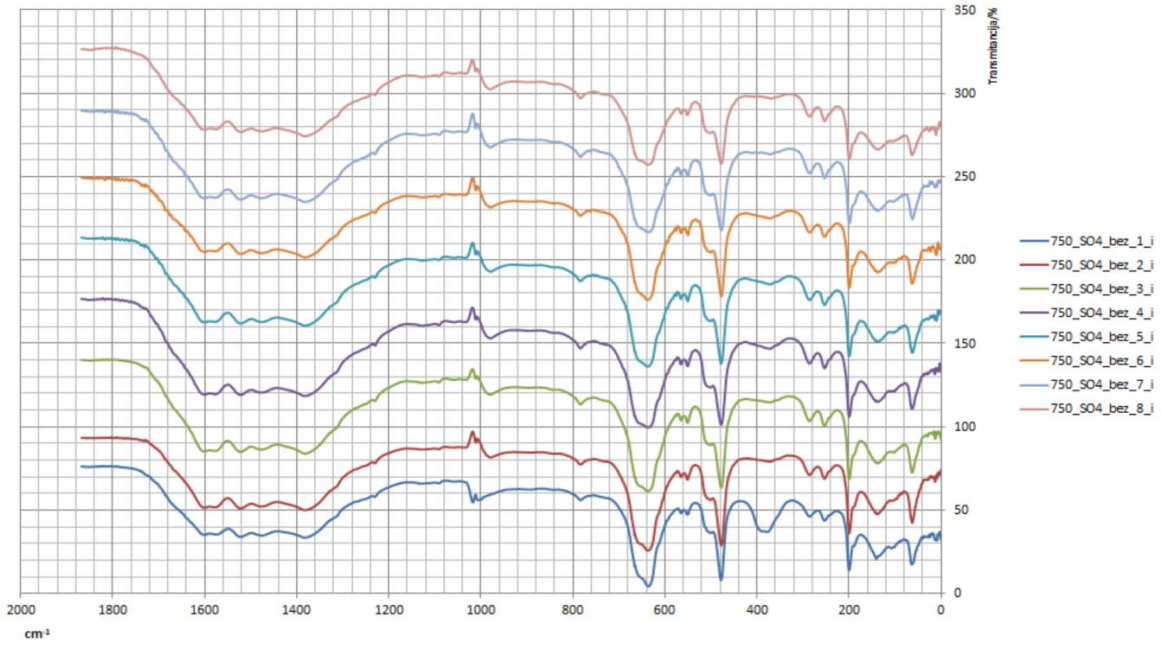
Slika 29. FT-IR spektar uzoraka bez dodane vode na 750 ok/min.



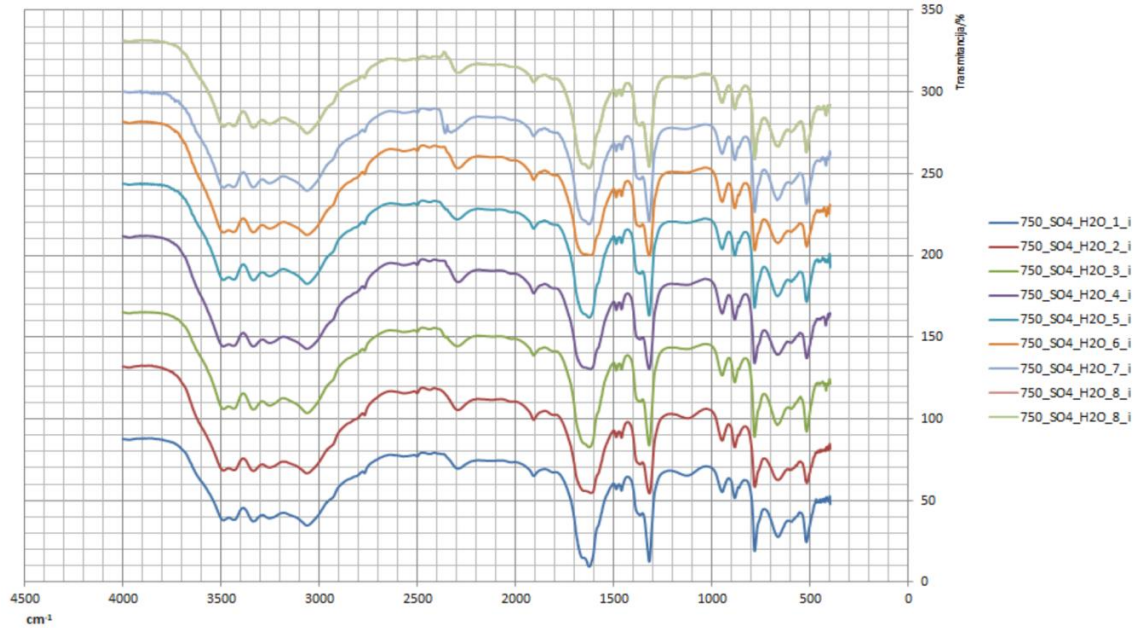
Slika 30. FT-IR spektar uzoraka sa dodatkom vode na 750 ok/min.

Nakon snimljenih FT-IR spektara, uzorci su ispirani s 250 – 300 ml deionizirane vode te su ponovno snimljeni FT-IR spektri za svaki pojedini uzorak da se utvrdi jesu li sulfatni ioni uklonjeni iz tih uzoraka. Na **Slikama 31.** i **32.** je vidljivo značajno smanjenje

vrhova između 1100 cm^{-1} i 1200 cm^{-1} čime se zaključuje da su sulfatni ioni uklonjeni iz uzoraka ispiranjem. Uzorci kojima je prilikom sinteze bila dodana voda su imali puno manji udio sulfatnih iona (**Slika 32.**).



Slika 31. FT-IR spektar uzoraka bez dodatka vode nakon ispiranja na 750 ok/min.

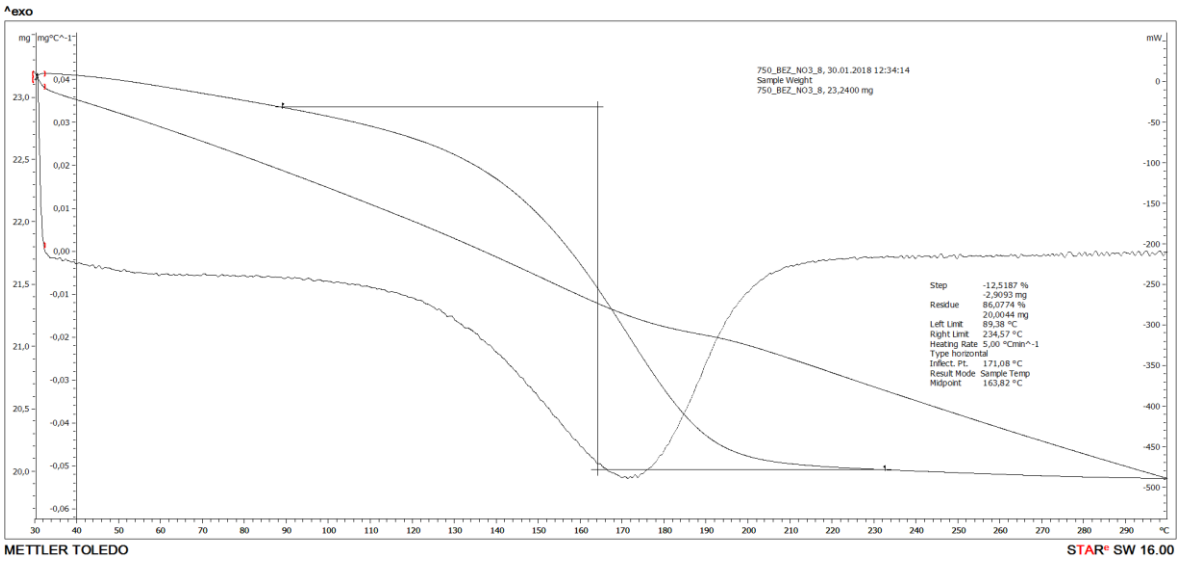


Slika 32. FT-IR spektar uzoraka nakon ispiranja sa dodatkom vode na 750 ok/min.

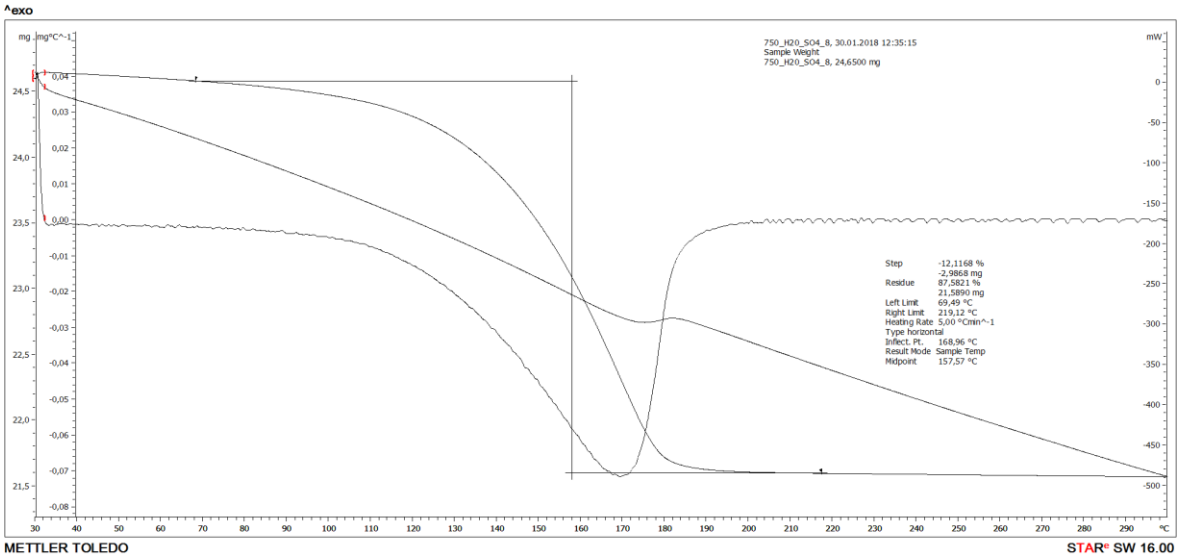
Rezultati termogravimetrijske analize prikazani su u **Tablici 8.**, a termogrami na **Slici 33.** i **Slici 34.** Iz dobivenih podataka je izračunato da je u oba uzorka dobiven najstabilniji oblik kalcijeva oksalata, a to je monhidrat što je i bilo očekivano s obzirom na način sinteze. Izračun dobivenih rezultata je prikazan u **Tablici 9.** (u poglavlju prilozi).

Tablica 8. Rezultati termogravimetrijske analize uzoraka na 750 ok/min

750 ok/min	T_0/°C	T_{max}/°C	T_e/°C	m_i/mg	Δm/mg	Δm/%	m_f/mg
Sa H_2O	69,49	168,96	219,12	24,65	2,9868	12,1168	21,5890
Bez H_2O	89,38	171,08	234,57	23,24	2,9093	12,5187	20,0044

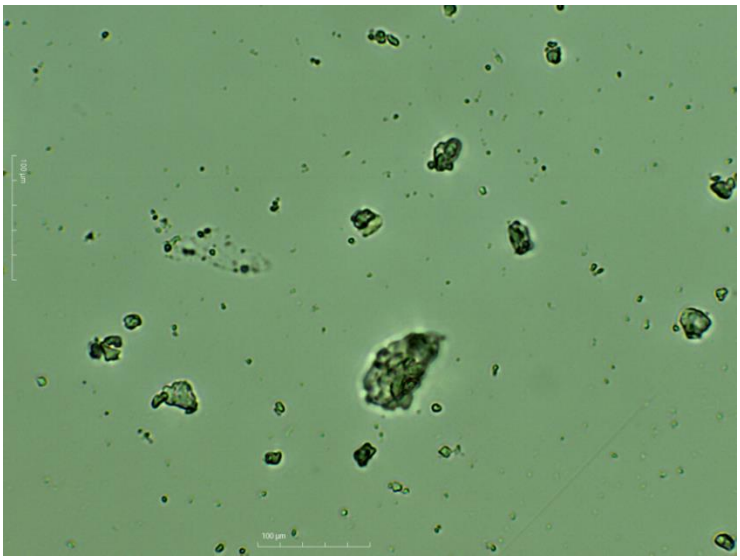


Slika 33. Termogram uzorka uzetog nakon 2h sinteze bez dodatka H_2O na brzini 750 ok/min.

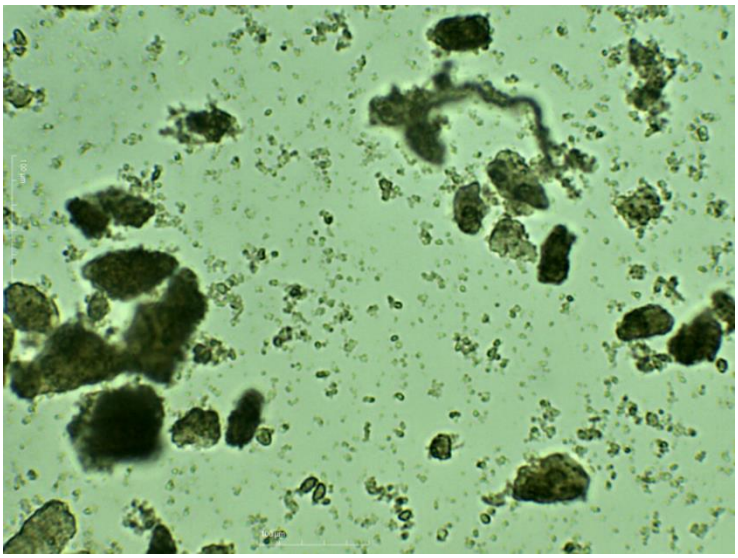


Slika 34. Termogram uzorka uzetog nakon 2h sinteze sa dodatkom H_2O na brzini 750 ok/min.

Optičkim mikroskopom su snimljeni kristali koji su bili premali da bi se mogla dobiti jasna slika morfologije. Na slikama je uočljivo kad se usporede sa slikama kristala na prethodne dvije brzine sinteze da su kristali puno manji od prethodnih. Na slikama se također može vidjeti da je i manja količina agregiranih kristala što je posljedica velike brzine na kojoj su kristali sintetizirani.



Slika 35. Morfologija uzorka bez dodane vode na brzini 750 ok/min.



Slika 36. Morfologija uzorka sa dodanom vodom na brzini 750 ok/min.

5. ZAKLJUČAK

U ovom završnom radu je mehanokemijski sintetiziran kalcijev oksalat iz kalcijeva sulfata i natrijeva oksalata. Kalcijevi oksalati su sastavni dio većine bubrežnih kamenaca i nastaju u organizmu procesom patološke biomineralizacije. Kalcijev oksalat može taložiti u tri hidratna oblika, kalcijev oksalat monohidrat koji je termodinamički najstabilniji, zatim metastabilni kalcijev oksalat dihidrat i trihidrat. U bubrežnim kamencima najčešće se mogu naći monohidrat i dihidrat, dok se trihidrat jako rijetko nalazi u sastavu. Istraživanja na temu bubrežnih kamenaca i mehanizama taloženja i mogućih prevencija njihova nastanka se sve više provode jer sve više ljudi oboljeva od ovog bolnog problema.

Ovim završnim radom po prvi puta je sintetiziran kalcijev oksalat monohidrat mehanokemijskom sintezom pomoću kalcijeva sulfata i natrijeva oksalata. Proučavanjem utjecaja brzine (250, 500 i 750 ok/min) uočeno je da pri svim brzinama nastaje kalcijev oksalat monohidrat. Pri brzini od 750 ok/min kalcijev oksalat monohidrat nastaje najbrže (već nakon 10 min sinteze), a udio zaostalih reaktanata je najniži. Također je uočeno da je pri brzini od 750 ok/min veličina čestica kristala najmanja, a što se brzina smanjivala čestice su bile veće. U uzorcima kojima je početno dodana voda uočeno je da zaostaje manje reaktanata (sulfatnih iona) pri svim promatranim brzinama.

Ovakva vrsta eksperimenata je vrlo korisna u svrhu budućih istraživanja patološke biomineralizacije.

6. LITERATURA

[1] S. Weiner, P.M. Dove, An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. Rev Mineral Geochem. 2003;54:1–29.

[2] https://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/246/Bubrezni-kamenci.html 27.8.2018.

[3] http://www.poliklinika-dr-zaky.hr/bubrezni-kamenac.html 27.8.2018. (Slika 1.)

[4] M. S. Parmar, Kidney stones, BMJ, volume 328, Canada, 2004, 1420-1424

[5] http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/oksalati 28.8.2018.

[6] Lj. Brečević, D. Kralj, Medicinski vjesnik, Factors Influencing the Formation of Calcium Oxalate Hydrates in vitro, 42(3-4), 2010, 127 – 136

[7] S. Deganello, Zeitschrift für Kristallographie, 152 (1980) 247-252

[8] F. Grases, O. Söhnel, A. Millán, A. Costa-Bauzá, A. Conte, Current Topics in Crystal Growth Res. 1 (1994) 367-389.

[9] G. Mandel, N. Mandel, In: Kidney Stones: Medical and Surgical Management, Ed.: F.L. Coe, M.J. Favus, C.Y.C. pak, J.H. Parks, G.M. Preminger, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996).

[10] A. Thomas, Biomimetic Growth and Morphology Control of Calcium Oxalates, Dissertation (PhD Thesis), TU Dresden, Njemačka, 2009.

[11] A. Šter, S. Šafranko, K. Bilić, B. Marković, D. Kralj, Urolithiasis, 48 (2018), 243-256

[12] . *T*. Echigo, *M*. Kimata, *A*. Kyono, *M*. Shmizu, *T*. Hatta, Re-investigation of the crystal structure of whewellite [$Ca(C_2O_4)\cdot H_2O$] and the dehydration mechanism of caoxite [$Ca(C_2O_4)\cdot 3H_2O$], Mineral. Mag. **69** (2005) 77-88 [13] A. Stanković, J. Kontrec, B. Njegić Džakula, D. Kovačević, B. Marković, D. Kralj, Journal of crystal growth, 500 (2018), 91-97

[14] G. Heinicke, Tribochemistry, Akademie – Verlag, Berlin (1984).

[15] S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, T. Friščić, F. Grepioni, K. D. M. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. G. Orpen, I. P. Parkin, W. C. Shearouse, J. W. Steed, D. C. Waddell, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 413−447.

[16] T. Friščić, D. G. Reid, I. Halasz, R. S. Stein, R. E. Dinnebier, M. J. Duer, Angew. Chem. Int. Ed., 49 (2010) 712−715.

[17] H.X. Khoa, S. Bae, S. Bae, B. Kim, J.S. Kim, Planetary ball mill process in aspect of milling energy, Journal of Korean powder metallurgy institute, 21 (2014), 155 - 164

[18] Schwedt, Georg. (1997). The Essential Guide to Analytical Chemistry. (Brooks Haderlie, trans.). Chichester, NY: Wiley. (Original Work Published 1943). pp. 16-17

[19] https://www.periodni.com/gallery/spektar_elektromagnetskog_zracenja.png 31.8.2018.

[20] Paula, Peter Atkins, Julio de (2009). *Elements of physical chemistry* (5th ed. izd.). Oxford: Oxford U.P. str. 459.

[21] http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html 20.8.2018

[22] http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=60947 4.9.2018.

[23] *J*. Kaloustian, *T*. *F*. El-Moselhy, *H*. Portugal, Determination of calcium oxalate (mono- and dihydrate) in mixtures with magnesium ammonium phosphate or uric acid: the use of simultaneous thermal analysis in urinary calculi, Clin. Chim. Acta **334** (2003) 117-129

[24] http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=40775 4.9.2018.

7. PRILOZI

Tablica 5. Prikaz računanja broja molekula vode u uzorcima na 250 ok/min.

250 ok/min	Δm (X_1)	M(H_2O)	M(CaOX)	X_1*M(CaOX) = X_3	X_1*M(H_2O) =X_2	M(H2O)-X_2 = X_4	Br. H_2O = X_3/X_4
Sa H_2O	0,1342	18,015	128,078	17,188	2,418	15,597	1,102
Bez H_2O	0,1234	18,015	128,078	18,805	2,223	15,792	1,19

Tablica 7. Prikaz računanja broja molekula vode u uzorcima na 500 ok/min

500 ok/min	Δm (X_1)	M(H_2O)	M(CaOX)	X_1*M(CaOX) = X_3	X_1*M(H_2O) =X_2	M(H2O)-X_2 = X_4	Br. H_2O = X_3/X_4
Sa H_2O	0,1195	18,015	128,078	15,305	2,152	15,863	0,964
Bez H_2O	0,1313	18,015	128,078	16,816	2,365	15,65	1,074

Tablica 9. Prikaz računanja broja molekula vode u uzorcima na 500 ok/min

500 ok/min	Δm (X_1)	M(H_2O)	M(CaOX)	X_1*M(CaOX) = X_3	X_1*M(H_2O) =X_2	M(H2O)-X_2 = X_4	Br. H_2O = X_3/X_4
Sa H_2O	0,1211	18,015	128,078	16,816	2,365	15,65	1,074
Bez H_2O	0,1251	18,015	128,078	16,022	2,253	15,762	1,016