

# Karakterizacija interakcije metala u tragovima s organskim ligandima UV/Vis spektrometrijom

---

Marcinek, Saša

Master's thesis / Diplomski rad

2017

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:899776>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Saša Marcinek

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Saša Marcinek

KARAKTERIZACIJA INTERAKCIJE METALA U TRAGOVIMA  
S ORGANSKIM LIGANDIMA UV/VIS SPEKTROMETRIJOM

**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Neposredni voditelj: dr. sc. Dario Omanović

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

doc. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Ema Horak

Zagreb, srpanj 2017.

*Ovaj rad je izrađen na Institutu "Ruđer Bošković" na Zavodu za istraživanje  
mora i okoliša u Laboratoriju za fizičku kemiju tragova.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Dariju Omanoviću na predloženoj temi, savjetima tijekom izrade rada i vremenu uloženom u oblikovanje teksta te na pruženoj podršci i razumijevanju u svakom trenutku.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči na pruženoj prilici i povjerenju i dr. sc. Šimi Ukiću na pomoći pri konačnom oblikovanju teksta.*

*Zahvaljujem se Zdeslavu Zovku na mjerenjima DOC-a kao i svim ostalim članovima Instituta „Ruđer Bošković“ koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se Jasminu Pađanu i svim ostalim članovima Laboratorija za fizičku kemiju tragova na ljubaznosti i prijateljskoj atmosferi te na pomoći i savjetima u svakoj prilici.*

*Zahvaljujem se dr. Jean-Pierre Gagnéu i dr. Cedric Garnieru na doniranim otopinama izolirane organske tvari.*

*Zahvaljujem se kolegici Moniki Šuman na velikoj potpori i ohrabrenju prilikom izrade ovog rada.*

*Najveće hvala mojim sestrama i svim prijateljima koji su mi uljepšali studiranje i učinili ga lakim i zabavnim.*

## SAŽETAK

Metali u tragovima su u prirodnim vodama raspodijeljeni u različite kemijske vrste (specije). Određivanje njihove raspodjele (specijacija) ključno je za bolje razumijevanje biogeokemijskog ciklusa i utjecaja u vodenom ekosustavu. Mnogi metali su većinom vezani u vrlo stabilne komplekse s organskim ligandima. U ovom radu interakcija metala u tragovima s organskim ligandima ispitana je UV/Vis spektrometrijom, na primjeru interakcije bakra s EDTA kao poznatim sintetskim organskim ligandom, s kromofornom otopljenom organskom tvari (CDOM) iz izoliranih frakcija riječne i morske vode, te s prirodnim organskim ligandima iz uzorka vode rijeke Save. Prilikom obrade spektara korištene su gotovo sve metodologije za određivanje specifičnih parametara koje su danas raspoložive u literaturi, a koje su implementirane u posebno za tu svrhu razvijeni program (ASFit). Pokazana je važnost izbora komponenata koje se dodaju u otopinu za mjerenje apsorbancije te utjecaj promjene pH vrijednosti na topljivost bakra, apsorpciju same organske tvari kao i interakciju bakra s ispitivanom organskom tvari. Povećanjem koncentracije bakra u otopini došlo je do promjena u apsorpcijskim spektrima svih ispitivanih organskih tvari s apsorpcijskim maksimumima (odnosno minimumima kod riječne huminske kiseline) na različitim valnim duljinama. Parametri određeni obradom apsorpcijskih spektara dobivenih titracijom dinatrijeve soli EDTA i diferencijalnih apsorpcijskih spektara modelnih otopina pokazali su statistički vrlo značajnu linearnu ovisnost o koncentraciji nastalog kompleksa procijenjenu pomoću Visual MINTEQ programa, dok uzorak rijeke Save nije bio u korelaciji s procijenjenim vrijednostima.

Istraživanja su pokazala da se derivativni i diferencijalni spektri, te karakteristični parametri obrade spektara (maksimum prve derivacije, diferencijalni apsorpcijski koeficijent na valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma, diferencijalni spektralni nagib, omjer diferencijalnih spektralnih nagiba i visina Gaussovih krivulja) mogu uspješno koristiti za istraživanje interakcije metala u tragovima s organskim ligandima. Međutim, moguću primjenu UV/Vis spektrometrije u tu svrhu, u realnim prirodnim uzorcima, potrebno je detaljnije istražiti.

**Ključne riječi:** UV/Vis spektrometrija, apsorpcija, metali u tragovima, organski ligandi, kompleksiranje, ASFit, Visual MINTEQ

## SUMMARY

Trace metals in natural waters are distributed in different chemical forms. Measurements of individual form are required to understand and predict their fate and effect on aquatic species. Major fraction of many trace metals are present as complexes with ligands from natural organic matter. In this work UV/Vis spectrometry was used to examine interactions of copper with known synthetic ligand (EDTA), with chromophoric dissolved organic matter (CDOM) isolated from river and marine water and with natural organic ligands from Sava River. For characterization of obtained absorbance spectra were used different methods and parameters that are implemented in all-in-one computer program (ASFit) designed for this purpose. It was shown that careful selection of components added to the solution for absorbance measurements is of great importance, same as maintaining constant pH value since copper solubility, its interactions with organic matter and absorption of organic matter itself is strongly pH dependent. All absorbance measurements of copper interactions with organic ligands have shown differences in the spectral signals between the original spectra and those changed upon the increase of copper concentrations, with peaks located at different wavelengths. Parameters derived from absorbance measurements of copper interactions with organic ligands were compared with bound copper estimated based on Visual MINTEQ calculations. This examination have shown that parameters derived from EDTA derivative spectra and model solutions differential spectra strongly correlate with concentration of bound copper, unlike the parameters derived from changes in absorbance spectra of Sava River sample.

This study have shown that derivative and differential spectra, along with the characteristic spectral parameters (maximum of first derivation, differential absorption coefficient at absorption peak wavelength, differential spectral slope, differential spectral slope ratio and Gaussian curve height) can be used to generate information concerning the nature of interaction of trace metals with organic ligands. However application of UV/Vis spectrometry for this purpose in real natural samples needs to be further explored.

**Key words:** UV/Vis spectrometry, absorbance, trace metals, organic ligands, complexation, ASFit, Visual MINTEQ

## Sadržaj:

1. Uvod .....	1
2. Opći dio.....	3
2.1 UV/Vis spektrometrija .....	3
2.1.1 UV/Vis spektrometar.....	6
2.2 Metali u tragovima u prirodnim vodama.....	9
2.2.1 Raspodjela metala u prirodnim vodama .....	9
2.2.2 Geokemijsko kruženje tragova metala u prirodnim vodama .....	11
2.2.3 Bioraspoloživost metala u prirodnim vodama .....	13
2.2.4 Geokemijsko modeliranje i analitičke tehnike.....	14
2.3 Organska tvar u prirodnim vodama.....	15
2.3.1 Kromoforna otopljena organska tvar u prirodnim vodama .....	16
2.4 Metode karakterizacije kromofornih otopljenih organskih tvari.....	20
2.4.1 Literaturni pregled metoda karakterizacije apsorpcijskog spektra kromofornih otopljenih organskih tvari.....	21
3. Eksperimentalni dio .....	29
3.1 Kemikalije i materijali .....	29
3.2 Instrumentacija.....	30
3.3 Računalni programi .....	30
3.3.1 ASFit .....	30
3.3.2 Visual MINTEQ.....	32
3.4 Uzorci otopljenih organskih tvari .....	35
3.4.1 Standardni uzorci .....	35
3.4.2 Prirodni uzorci.....	36
3.5 Opis mjerenja.....	39
3.5.1 Titracije s otopinom bakra .....	40



<b>4. Rezultati</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Ispitivanje interferencija</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.1 Utjecaj azida</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Apsorpcijski spektar bakra i utjecaj nitrata</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.3 Apsorpcijski spektar bakar hidroksida</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2 Apsorpcijski spektri otopljene organske tvari</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.1 Modelne otopine s izoliranom organskom tvari</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.2 Prirodni uzorci</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3 Titracije s otopinom bakra</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.1 Titracije otopine dinatrijeve soli EDTA</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.2 Titracije modelne otopine riječne fulvinske i huminske kiseline</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3.3 Titracije modelne otopine morske fulvinske i huminske kiseline</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3.4 Titracije prirodnog uzorka riječne vode</b> .....	<b>58</b>
<b>5. Rasprava</b> .....	<b>61</b>
<b>5.2 Obrada apsorpcijskih spektara modelnih otopina</b> .....	<b>61</b>
<b>5.3 Usporedba prirodnih uzoraka s modelnim otopinama</b> .....	<b>65</b>
<b>5.4 Titracije s otopinom bakra</b> .....	<b>66</b>
<b>5.4.1 Obrada spektara dobivenih titracijom dinatrijeve soli EDTA</b> .....	<b>66</b>
<b>5.4.2 Obrada spektara dobivenih titracijom riječne fulvinske kiseline</b> .....	<b>68</b>
<b>5.4.3 Obrada spektara dobivenih titracijom riječne huminske kiseline</b> .....	<b>80</b>
<b>5.4.4 Obrada spektara dobivenih titracijom morske fulvinske i huminske kiseline</b> .	<b>82</b>
<b>5.4.5 Obrada spektara dobivenih titracijom prirodnog uzorka riječne vode</b> .....	<b>84</b>
<b>6. Zaključci</b> .....	<b>87</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>91</b>

# 1. Uvod

---

Metali u tragovima imaju važnu ulogu u okolišu, a njihovo ponašanje i utjecaj na prisutne organizme ovisi o kemijskom obliku u kojem se nalaze. U prirodnim vodama se nalaze kao slobodni hidratizirani ioni, kao kompleksi vezani na organske ili anorganske ligande te adsorbirani ili ugrađeni u organske i anorganske čestice. Metali nisu (bio)razgradivi i ostaju prisutni u okolišu, zbog čega je važno kontinuirano praćenje i predviđanje njihovog kruženja i raspodjele kemijskih vrsta (specijacija) u kojima se nalaze te razvijanje pogodnih analitičkih tehnika u tu svrhu. Mnoge analitičke tehnike omogućuju mjerenje ukupne koncentracije metala neovisno o kemijskom obliku, dok su za mjerenje koncentracije određenog kemijskog oblika potrebne prilagodbe metodologije za te tehnike.

Topljivost metala i njihova rasprostranjenost u prirodnim vodama često je kontrolirana sklonošću stvaranja vrlo stabilnih kompleksa s organskim ligandima, te su mnogi metali većinom prisutni u ovom obliku. Međutim, dok je vezanje metala s anorganskim i nekim sintetskim organskim ligandima poznato, razumijevanje interakcija s heterogenim ligandima iz prirodne organske predstavlja velik izazov. Dio otopljene organske tvari, zahvaljujući kompleksnoj konjugiranoj strukturi, ima sposobnost apsorpcije zračenja u UV i vidljivom dijelu spektra te se stvaranjem kompleksa s ionima metala bilježi promjena u intenzitetu apsorbiranog zračenja, što omogućava primjenu UV/Vis spektrometrije u svrhu karakterizacije interakcije metala s organskim ligandima. Prednost ove metode je što uz koncentracije kompleksa, prema položajima apsorpcijskih maksimuma, daje strukturne informacije o specifičnim ligandima. Razvijanje ove metode u ovu svrhu je predloženo praktički tek 2013.<sup>1</sup> godine te je ovo područje još neistraženo i potrebna su detaljna ispitivanja pri različitim uvjetima kako bi se pronašli najpogodniji parametri i utvrdila njihova kemijska podloga.

U ovom radu interakcija metala u tragovima s organskim ligandima ispitana je UV/Vis spektrometrijskom tehnikom, na primjeru interakcije bakra s organskom tvari u modelnim otopinama i prirodnom uzorku riječne vode iz rijeke Save. Bakar je odabran zbog različitog utjecaja na žive vrste ovisno o koncentraciji odnosno obliku u kojem se nalazi te zbog jakih konstanti stabilnosti zbog kojih je očekivana vidljiva promjena. Za obradu dobivenih apsorpcijskih spektara korištene su različite metode, prilikom čega je određena većina parametara pronađenih u literaturi te je testirana njihova primjenjivost usporedbom s računalnim modelima, a dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima pronađenim u literaturi.



## 2. Opći dio

---

## 2.1 UV/Vis spektrometrija

Spektrometrija je znanstvena disciplina koja proučava međudjelovanje materije i svjetla, odnosno elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje (EMZ) ima dvojnu prirodu; valnu i čestičnu. Neka svojstva EMZ, kao što su refleksija i interferencija, potječu od njegove valne prirode, dok se apsorpcija i emisija svjetlosti od strane materije mogu objasniti isključivo pretpostavkom da je EMZ sastavljeno od čestica. Svjetlost se apsorbira ili emitira u jedinicama energije bez mase koje se gibaju brzinom svjetlosti, a nazivaju se kvanti ili fotoni. Fotoni su povezani s frekvencijom zračenja prema jednadžbi 1.<sup>2</sup>

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \quad (1)$$

gdje je  $E$  – energija fotona, J,

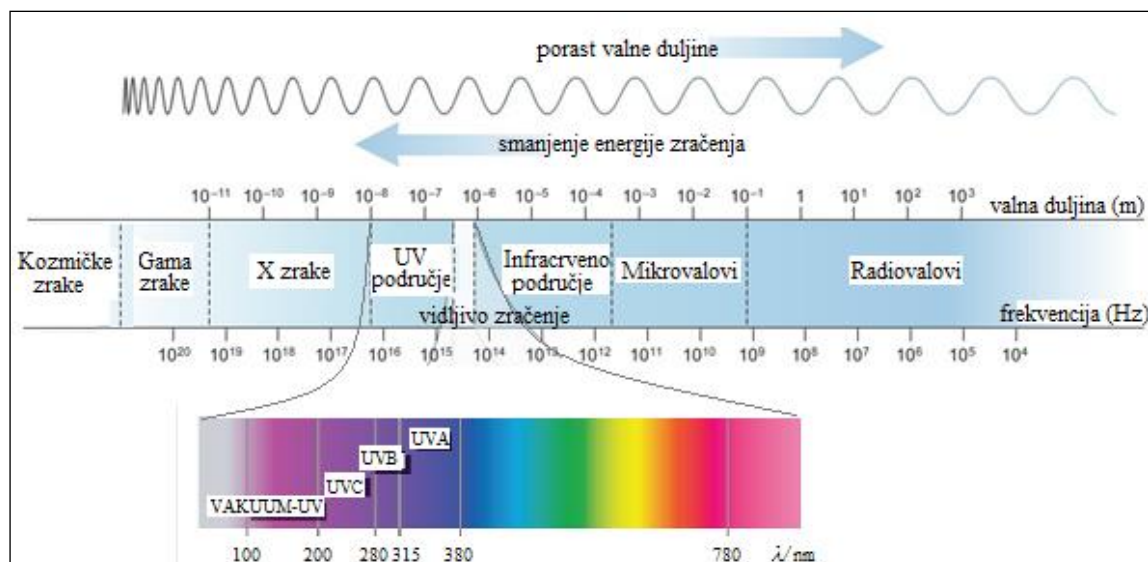
$\nu$  – frekvencija zračenja, Hz,

$\lambda$  – valna duljina, m,

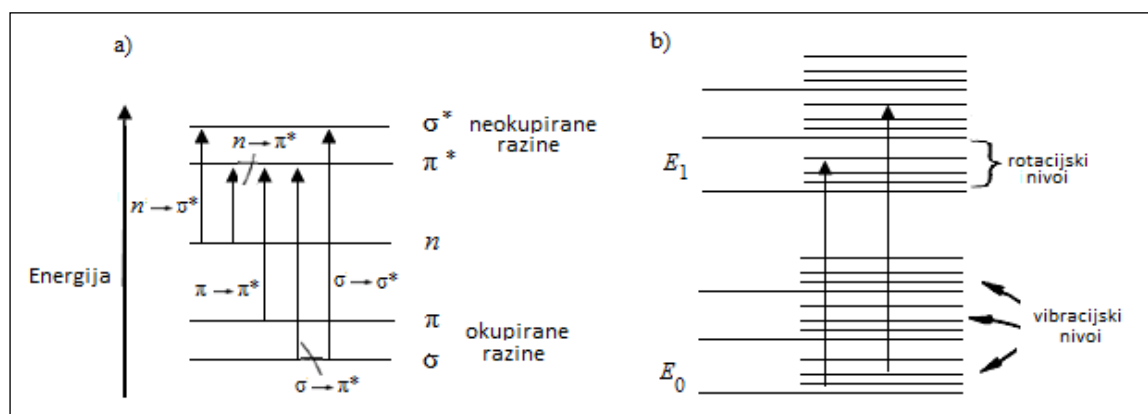
$h$  – Planckova konstanta,  $h = 6,266 \times 10^{-34}$  J s,

$c$  – brzina svjetlosti,  $c = 2,998 \times 10^8$  m s<sup>-1</sup>.

Elektromagnetsko zračenje je svrstano u elektromagnetski spektar koji obuhvaća veliko područje frekvencija (slika 2.1). Ultraljubičasta (engl. *ultraviolet* – UV) i vidljiva svjetlost (engl. *visible* – Vis) su samo dio elektromagnetskog spektra u području valnih duljina od 190 do 780 nm.<sup>3</sup> Iako za sve valove vrijede isti zakoni širenja, oni dolaze iz različitih izvora i različito djeluju na materiju.<sup>2</sup> Apsorbirana energija u UV i vidljivom području uzrokuje promjene u elektronskoj raspodjeli unutar molekule. Molekula prelazi u ekscitirano stanje skokom elektrona u slobodnu orbitalu veće potencijalne energije. Apsorbirana energija zračenja odgovara razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja. Što je ta razlika manja valna duljina apsorpcije je veća. Na slici 2.2a prikazane su molekulske orbitale prema rastućim vrijednostima i mogući prijelazi elektrona. Kod molekula koje posjeduju samo  $\sigma$  veze, kao što su alkani mogući su jedino prijelazi iz  $\sigma$  u  $\sigma^*$  orbitalu za koje je potrebna najveća energija. Kod molekula koje posjeduju  $\pi$ -veze ili heteroatome sa slobodnim elektronskim parom može doći do nekoliko elektronskih prijelaza različitih energija.<sup>2</sup>



Slika 2.1. Spektar elektromagnetskog zračenja.

Slika 2.2. Energijski nivoi i mogući prijelazi elektrona unutar molekule.<sup>4</sup>

Svaki energijski nivo sadrži vibracijske i rotacijske podnivoje (slika 2.2b). Zbog mogućnosti istovremenih elektronskih i rotacijsko-vibracijskih prijelaza apsorpcijska vrpca ima širok oblik s maksimumom na valnoj duljini najvećeg prijelaza.<sup>4</sup>

Količina apsorbiranog zračenja na danoj valnoj duljini ovisi o veličini apsorbirajućeg sustava i vjerojatnosti elektronskog prijelaza. Ovo svojstvo molekule se naziva molarni apsorpcijski koeficijent ili molarni koeficijent ekstinkcije ( $\epsilon$ ). Osim toga, apsorpcija raste s porastom broja molekula koje apsorbiraju svjetlost odgovarajuće energije. Iz ovoga slijedi Lambert-Beerov zakon (jednadžba 2).<sup>4</sup>

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

gdje je  $A$  – apsorbanca (količina apsorbiranog zračenja), bezdimenzijska veličina,

$T$  – transmisija (udio propuštenog zračenja), %,

- $I_0$  – intenzitet zračenja prije apsorpcije,  $W\ m^{-2}$ ,  
 $I$  – intenzitet zračenja nakon apsorpcije,  $W\ m^{-2}$ ,  
 $\varepsilon$  – molarni koeficijent apsorpcije,  $dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ ,  
 $c$  – koncentracija molekula koje apsorbiraju,  $mol\ dm^{-3}$ ,  
 $l$  – duljina puta zrake, cm.

Dio molekule u kojem razlika između dva energijska nivoa odgovara energiji UV i vidljivog dijela spektra naziva se kromofor (grč. *chroma* – boja, *phorein* – nositi). Većina jednostavnih nekonjugiranih kromofora apsorbira svjetlost manjih valnih duljina koje padaju izvan mjernog područja većine instrumenata ( $< 200\ nm$ ).<sup>4</sup> Iako je upotreba ove metode analize ograničena kod proučavanja izoliranih kromofora, daje korisne informacije kod proučavanja kompleksnijih konjugiranih sustava. Povećanje broja p orbitala koje grade konjugirani sustav smanjuje razliku između energijskih nivoa pa se valne duljine pomiču prema većim vrijednostima. Osim toga povećava se veličina apsorbirajućeg sustava kao i vjerojatnost elektronskog prijelaza zbog čega raste i intenzitet apsorpcije. Povećanje konjugacije može pomaknuti apsorpcijski maksimum sve do valnih duljina vidljivog dijela spektra. Kako ljudsko oko opaža propušteno zračenje, boja spoja koju tada opažamo je komplementarna apsorbiranoj boji (tablica 2.1).<sup>4</sup>

**Tablica 2.1.** Usporedba apsorbirane svjetlosti i opažene boje.<sup>4</sup>

Boja apsorbirane svjetlosti	$\lambda_{max} / nm$	Boja propuštene svjetlosti
Ljubičasta	400	Žuta
Plava	450	Narančasta
Plavo-zelena	500	Crvena
Žuto-zelena	530	Crveno-ljubičasta
Žuta	550	Ljubičasta
Narančasto-crvena	600	Plavo-zelena
Crvena	700	Zelena

Pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama naziva se batokromni ili crveni pomak, a porast intenziteta apsorpcije hiperkromni efekt. Suprotno tome pomak prema manjim valnim duljinama naziva se hipsokromni ili plavi pomak, a smanjenje intenziteta apsorpcije hipokromni efekt. Batokromni i hiperkromni pomak mogu uzrokovati i određeni supstituenti koji se nazivaju auksokromi. Vezanjem na dvostruku

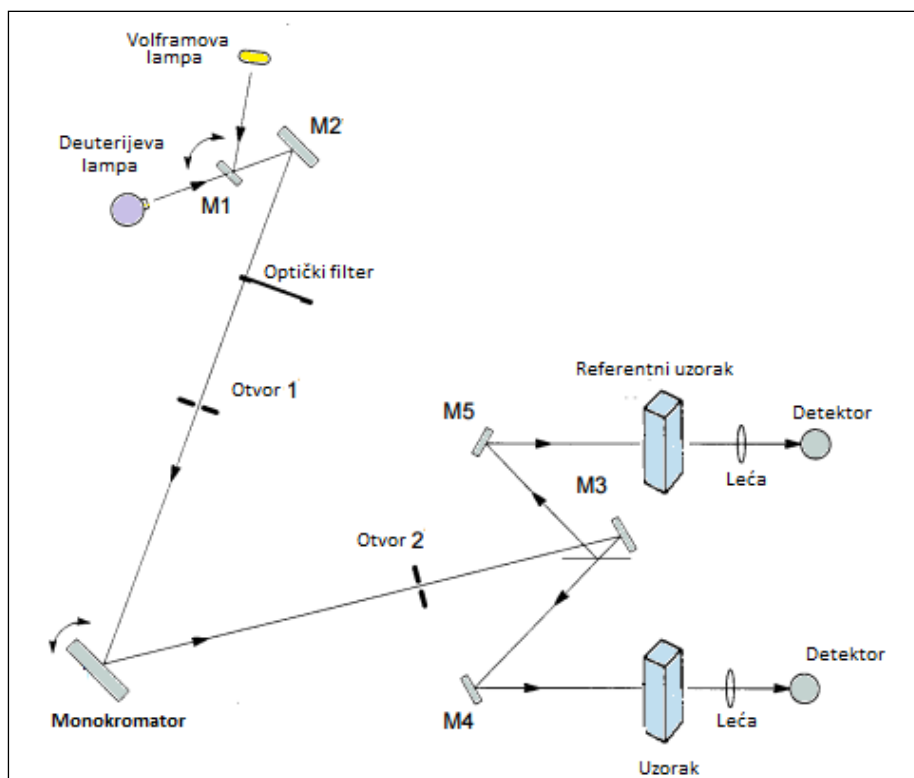


vezu, uslijed rezonancije, slobodni elektroni supstituenta postaju dio sustava i povećavaju ga za još jednu orbitalu. Najčešće su to hidroksilne, alkoksilne te amino skupine ili halogeni elementi.<sup>4</sup>

### 2.1.1 UV/Vis spektrometar

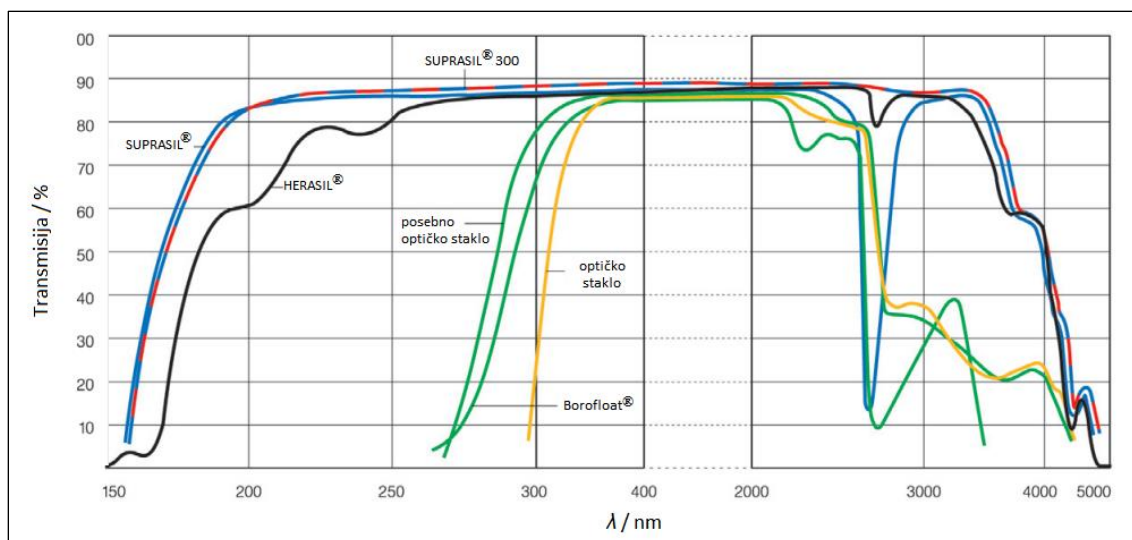
Instrument koji se koristi u UV/Vis spektrometriji naziva se UV/Vis spektrometar. Rad uređaja se temelji na usporedbi intenziteta ulaznog i izlaznog zračenja na određenoj valnoj duljini. Dobivena razlika jednaka je apsorbiranom zračenju od strane uzorka. Dijelovi uobičajenog spektrometra su deuterijeva lampa kao izvor UV zračenja i halogena lampa kao izvor vidljivog dijela spektra te monokromator i detektor. Monokromator rastavlja zračenje na pojedinačne valne duljine koje se zatim usmjeravaju na uzorak prolaskom kroz sustav uskih otvora i ogledala.<sup>4</sup>

Na [slici 2.3](#) je shematski prikazan UV/Vis spektrometar Perkin Elmer Lambda 45. Ogledalo M1 kontrolira izvor zračenja usmjeravajući zračenje odgovarajuće lampe na predmonokromator M2. Zrake dalje putuju do pomičnog optičkog filtra koji propušta odgovarajuće valne duljine. Filtrirano zračenje prolazi kroz podesivi otvor do monokromatora. Monokromator je rotirajuća konkavna rešetka s 1053 linija po mm. Kako se radi o dvozračnom spektrometru monokromatska svjetlost prolazi kroz podesivi izlazni otvor do ogledala M3 koje ga razdvaja na dvije zrake jednakog intenziteta. Nakon prolaska kroz uzorak propušteno zračenje se konveksnim lećama fokusira na detektor. Detektor su obično fotomultiplikatorske cijevi ili kao u ovom slučaju fotodiode. Kao rezultat se dobiva grafički prikaz transmisije ili apsorbancije pri određenoj valnoj duljini. Kod računanja transmisije odnosno apsorbancije ([jednadžba 2](#)) referentna zraka predstavlja intenzitet zračenja prije prolaska kroz uzorak.<sup>5</sup>



**Slika 2.3.** Shema UV/Vis spektrometra Perkin Elmer Lambda 45.<sup>5</sup>

Uzorak pripremljen u obliku otopine se nalazi u kivetama koje mogu biti izrađene od različitih materijala ovisno o intervalu u kojem se provodi mjerenje. Za mjerenja u vidljivom dijelu spektra se mogu koristiti plastične kivete (polistiren ili polimetil metakrilat) ili kivete od optičkog stakla koje su transparentne za valne duljine iznad 300 nm dok se za mjerenja pri nižim valnim duljinama koriste kivete od pročišćenog sintetičkog kvarca. Na [slici 2.4](#) su prikazane transmisije praznih kiveta načinjenih od različitih materijala. Za mjerenja u UV dijelu spektra se najčešće koriste kvarcne kivete trgovačkog naziva Suprasil koje propuštaju više od 80 % zračenja sve do valnih duljina od 190 nm.



**Slika 2.4.** Udio propuštenog zračenja praznih kiveta od različitih materijala.<sup>6</sup>

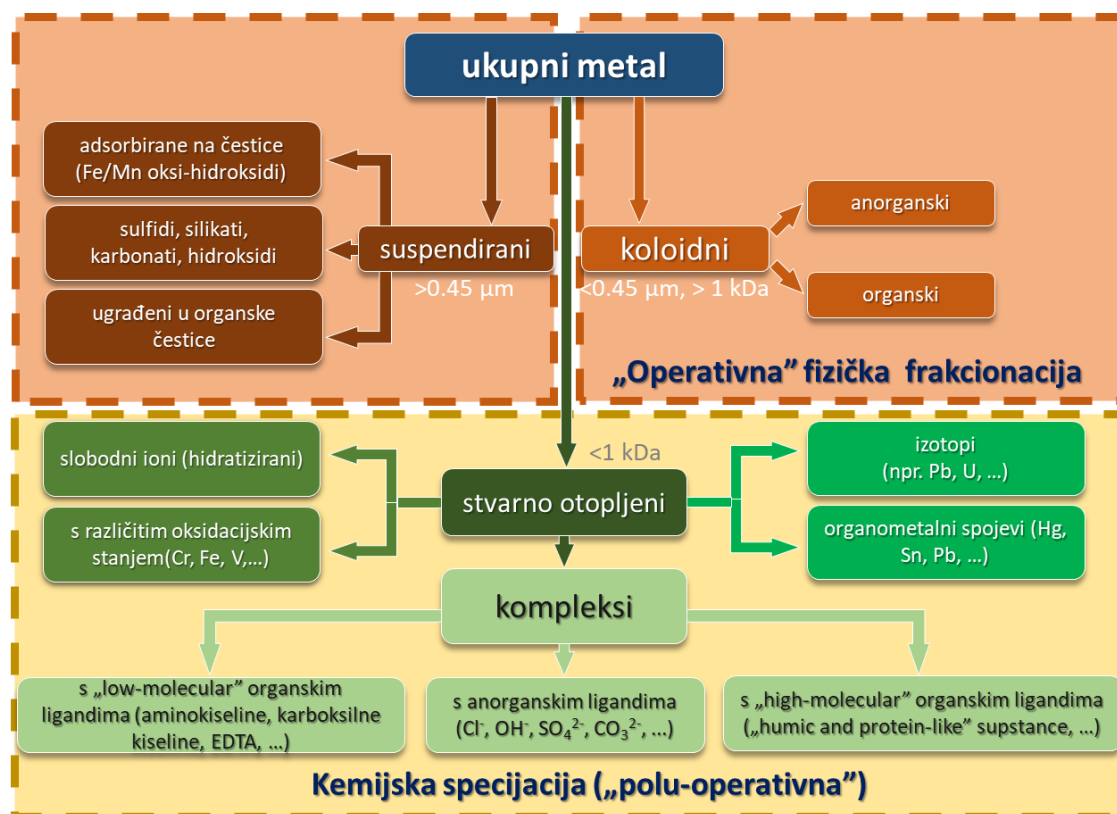
Najjednostavnija i najčešća primjena spektrometra je za mjerenja na fiksnoj valnoj duljini. Uzorak se snima na valnoj duljini za koju je prethodno utvrđeno da predstavlja maksimum apsorbancije za željenu komponentu, a ako otopina sadrži više apsorbirajućih komponenti valna duljina se bira u području u kojem ostale vrste ne apsorbiraju ili apsorbiraju minimalno. Mjerenja se također mogu provoditi na višestrukim valnim duljinama što često daje uvid u pojedinosti o sastavu ili čistoći uzorka. Međutim, kod kompleksnijih istraživanja snima se spektar svih valnih duljina u određenom rasponu poznat kao skeniranje spektra. Rotiranjem rešetke monokromatora mijenja se valna duljina koja putuje do uzorka. Iako je ovaj način mjerenja znatno sporiji kao rezultat se dobiva spektralna krivulja čiji oblik daje mnogo dodatnih informacija i omogućava tumačenje određenih kemijskih promjena u uzorku koji se snima.

## 2.2 Metali u tragovima u prirodnim vodama

Elementi u prirodnim vodama se uobičajeno dijele na glavne, „minor“, tragove i ultra-tragove. Glavnim elementima smatraju se oni koji se javljaju u koncentracijama većim od  $10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , a „minor“ između  $10^{-3}$  i  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Elementi u tragovima se nalaze u koncentracijama manjim od  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  što odgovara koncentraciji većine metala u prirodnim vodama. Elementi koji se javljaju u koncentracijama manjim od  $10^{-9}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  smatraju se ultra-tragovima. Za elemente u tragovima često se koriste i nazivi „teški metali“ ili „eko-toksični metali“ kao oznaka onečišćenja i otrovnosti. Problem kod naziva teški metali je u tome što se odnosi i na lake metale, kao što su nikal i aluminij, dok se naziv toksični metali odnosi i na mnoge esencijalne elemente, kao što su divalentno željezo i cink. Međutim, pojam teški metali se odnosi na metale gustoće veće od  $5 \text{ mg cm}^{-3}$ , a samo neki od njih kao što su živa, kadmij i olovo su toksični. Stoga je kao sveobuhvatni pojam najprikladniji naziv metali odnosno elementi u tragovima.<sup>7</sup>

### 2.2.1 Raspodjela metala u prirodnim vodama

Metali u tragovima se u prirodnim vodama nalaze u različitim kemijskim vrstama (specijama) i fizičko-kemijskim oblicima. Kemijske vrste elemenata definirane su prema izotopnom sastavu, oksidacijskom stanju ili strukturi molekule odnosno kompleksa. Specijacija elemenata predstavlja njihovu raspodjelu između različitih kemijskih vrsta i ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim osobinama te o osobinama sustava u kojem se nalaze.<sup>8</sup> Određivanje njihove raspodjele naziva se specijacijska analiza<sup>8</sup> i ključno je za bolje razumijevanje biogeokemijskog ciklusa i utjecaja u vodenom okolišu, a posredno i za razumijevanje njihovog utjecaja na čovjeka. Za razliku od specijacije, frakcionacija uključuje separaciju prema fizikalnim (npr. veličina, topljivost) i kemijskim (npr. vezanje, reaktivnost) svojstvima.<sup>8</sup> Metali se u prirodnim vodama razdvajaju prema veličini na suspendiranu, koloidnu i stvarno otopljenu frakciju ([slika 2.5](#)). Suspendirana i koloidna frakcija se operativno razdvajaju filtrom pora  $0,45 \mu\text{m}$  (u novije vrijeme  $0,2 \mu\text{m}$ ), dok se stvarno otopljenima smatraju oni koji su manji od  $1 \text{ kDa}$ .<sup>9</sup> Metali u suspendiranoj i koloidnoj frakciji se nalaze adsorbirani ili ugrađeni u organske i anorganske čestice dok se otopljeni pojavljuju kao slobodni hidratizirani ioni ili kao kompleksi vezani na organske ili anorganske ligande ([jednadžba 3](#)).



**Slika 2.5.** Raspodjela kemijskih i fizičkih oblika metala u prirodnim vodama.

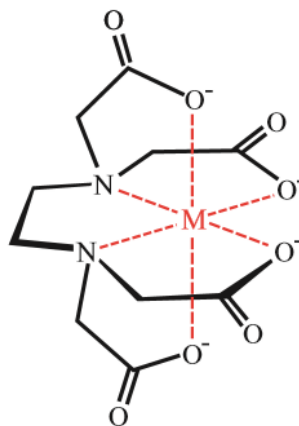
$$[M] = [M^{n+}] + \Sigma[MX] + \Sigma[ML] + \Sigma[M_{\text{čest.}}] \quad (3)$$

gdje je  $[M^{n+}]$  – koncentracija slobodnog hidratiziranog iona metala,  
 $\Sigma[MX]$  – zbroj koncentracija anorganskih kompleksa metala,  
 $\Sigma[ML]$  – zbroj koncentracija organskih kompleksa metala,  
 $\Sigma[M_{\text{čest.}}]$  – zbroj koncentracija metala vezanih na čestice.

Koncentracija slobodnih iona je regulirana kompeticijom između anorganskih liganada, otopljene organske tvari i reaktivnih koloidnih i suspendiranih čestica. U lužnatim otopinama (pH ~ 8) za mnoge metale dominantani su kompleksi s prirodnim organskim ligandima. Kod niskog pH funkcionalne skupine su protonirane i bez naboja dok se povećavanjem pH odnosno deprotonacijom povećava naboj organske molekule i broj slobodnih mjesta za vezanje metalnih kationa.<sup>10</sup>

Ligande možemo razlikovati s obzirom na broj veza koje mogu tvoriti s centralnim metalnim ionom. Tako imamo unidentantne, bidentantne ili polidentantne ligande. Potrebno je spomenuti i pojam kelatnog liganda koji je u biti polidentantni ligand sposoban da u potpunosti (poput rakovih škara; grč. *chelae* – kliješta raka) obuhvati metalni ion i

tvori s njim iznimno stabilan kompleks (slika 2.6). Metali s organskim ligandima u pravilu stvaraju stabilnije komplekse nego s anorganskim ligandima. Organski ligandi u prirodnim vodama su huminske i fulvinske kiseline te amino kiseline ali i kelatni ligandi umjetnog porijekla kao što su etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) i nitrilotrioctena kiselina (engl. *nitrilotriacetic acid* – NTA) koji potječu iz industrijskih otpadnih voda.



**Slika 2.6.** Kelatni kompleks EDTA i metalnog iona.<sup>11</sup>

Vežu između metala i liganda nazivamo koordinacijskom vezom. Slobodni elektronski par liganda popunjava prazne orbitale centralnog metalnog iona čime se postiže stabilnija elektronska konfiguracija. Promotrimo općenitu jednadžbu nastajanja kompleksa  $ML_i$  (jednadžba 4). Jakost koordinacijske veze liganda s ionom metala dana je omjerom konstanti brzine asocijacije (nastajanja,  $k_a$ ) i disocijacije (raspada,  $k_d$ ) pri ravnotežnim uvjetima što u biti predstavlja konstantu stabilnosti kompleksa ( $K_{ST}$ ) (jednadžba 5).



$$K_{ST} = \frac{[ML_i]}{[M] \cdot [L]^i} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5)$$

### 2.2.2 Geokemijsko kruženje tragova metala u prirodnim vodama

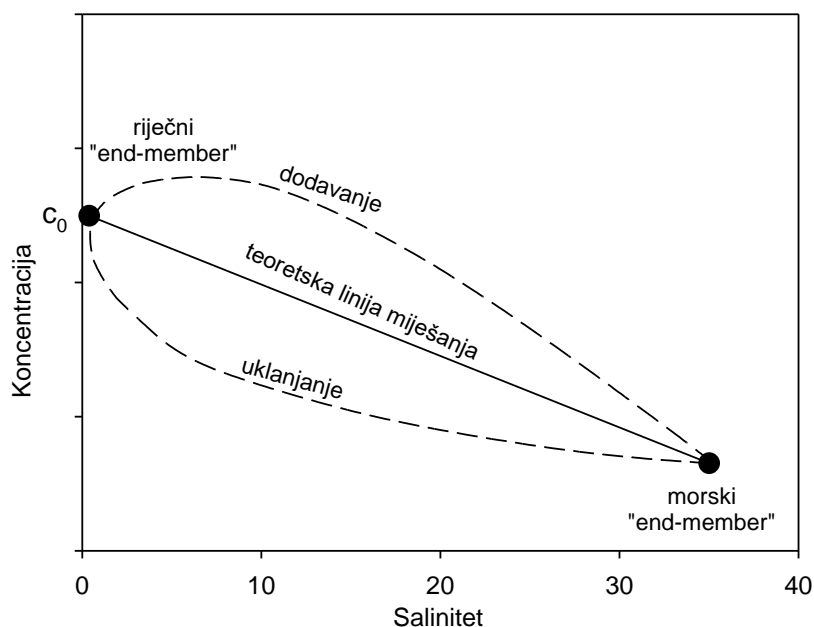
Metali neantropogenog porijekla u prirodnim vodama potječu pretežito iz litosfere; ispiranjem iz tla, erozijom stijena te vulkanskom aktivnošću. Razvojem industrije sve veći utjecaj na njihove koncentracije imaju i antropogeni izvori, kao što su poljoprivreda, promet, industrija, otpadne vode i odlagališta otpada, a putem vjetra i padalina mogu biti transportirani na velike udaljenosti.<sup>7, 11</sup>

U **tablici 2.2** prikazane su prosječne koncentracije značajnijih metala u tragovima u rijekama i oceanima. Neki od elemenata u tablici kao što su galij, germanij i telurij se smatraju ključnim elementima za razvoj novih tehnologija (engl. *Technology Critical Elements* – TCE). Ovi elementi se do nedavno nisu smatrali posebno važnima i njihovo poznavanje je vrlo oskudno, no povećana primjena ovih elemenata u novim tehnologijama otvara pitanja njihovog utjecaja i postavlja ih u fokus mnogih novih istraživanja.<sup>12</sup>

**Tablica 2.2.** Prosječna koncentracija metala u tragovima u oceanima i rijekama.<sup>11</sup>

<b>Element</b>	<b>Simbol i atomski broj</b>	<b>Prosječna koncentracija u oceanima / nmol dm<sup>-3</sup></b>	<b>Prosječna koncentracija u rijekama / nmol</b>
<b>Aluminij</b>	Al 13	20	1850
<b>Titan</b>	Ti 22	< 20	-
<b>Vanadij</b>	V 23	30	-
<b>Krom</b>	Cr 24	4	19
<b>Mangan</b>	Mn 25	0.3	145
<b>Željezo</b>	Fe 26	0.5	720
<b>Kobalt</b>	Co 27	0.02	3.4
<b>Nikal</b>	Ni 28	8	8.5
<b>Bakar</b>	Cu 29	4	24
<b>Cink</b>	Zn 30	5	460
<b>Galij</b>	Ga 31	0.3	1.3
<b>Germanij</b>	Ge 32	0.07	0.1
<b>Arsen</b>	As 33	23	23
<b>Selenij</b>	Se 34	1.7	-
<b>Molibden</b>	Mo 42	110	5.2
<b>Srebro</b>	Ag 47	0.025	2.8
<b>Kadmij</b>	Cd 48	0.6	0.2
<b>Kositar</b>	Sn 50	0.004	0.01
<b>Antimon</b>	Sb 51	1.6	8.2
<b>Telurij</b>	Te 52	< 0.001	-
<b>Lantan</b>	La 57	0.03	0.4
<b>Cerij</b>	Ce 58	0.02	-
<b>Olovo</b>	Pb 82	0.01	0.48
<b>Volfram</b>	W 74	0.06	-
<b>Platina</b>	Pt 78	0.003	-
<b>Zlato</b>	Au 79	<< 0.001	0.01
<b>Živa</b>	Hg 80	0.002	0.01
<b>Bizmut</b>	Bi 83	< 0.025	-
<b>Torij</b>	Th 90	< 0.001	0.4
<b>Uran</b>	U 92	14	1

Sastav metala u rijekama je zbog erozije tla i stijena povezan sa sastavom metala Zemljine kore.<sup>11</sup> Osim na ovaj način metali se u rijeke unose i putem padalina, otpadnih voda te akumulirani u biljnom materijalu. U oceanima je za neke metale kao što su olovo, živa i kadmij primarni mehanizam unosa putem padalina dok su za druge metale to riječni ispusti. Velik utjecaj na prijenos metala rijekama do oceana ima miješanje slatke i slane vode u estuarijskom okolišu. Na slici 2.7 su prikazani mogući načini ponašanja metala i organskih tvari s promjenom saliniteta. Zbog razlike u ionskoj jakosti i pH vrijednosti te smanjenjem protoka dolazi do koagulacije i taloženja organskih tvari a time i na njih vezanih metala. U gradijentu saliniteta, koncentracija otopljenih metala i organske tvari može se relativno povećati, smanjiti ili ostati nepromijenjena u odnosu na teoretsku liniju miješanja.<sup>11</sup>



**Slika 2.7.** Shematski prikaz (ne)konzervativnog ponašanja otopljenih metala ili organske tvari između dvije krajnje točke („end-member“).<sup>13</sup>

### 2.2.3 Bioraspoloživost metala u prirodnim vodama

Za određivanje utjecaja metala na prisutne organizme primarno je poznavanje njegove bioraspoloživosti na koju utječu biotski čimbenici kao što je metabolička aktivnost te abiotski čimbenici kao što su koncentracija, specijacija, pH i temperatura. Specijacija metala je vrlo važna jer pojedine kemijske vrste imaju različitu bioraspoloživost i određivanje ukupne koncentracije ne daje dovoljno informacija. Najveću



bioraspoloživost metali imaju u ionskom obliku, stoga vezanje s prisutnim organskim ligandima uglavnom smanjuje njihovu raspoloživost odnosno toksičnost.<sup>10</sup>

Glavni esencijalni metali nužni za rast i metabolizam organizama unutar vodenog ekosustava su željezo, cink, bakar, mangan, kobalt, molibden i nikal.<sup>11</sup> Željezo se smatra limitirajućim elementom zbog vrlo male topljivosti i bioraspoloživosti. Prema topljivosti željezo hidroksida u morskoj vodi predviđena koncentracija otopljenog željeza u oceanima iznosi 0,01 nmol dm<sup>-3</sup>. Međutim, zbog vezanja s organskim ligandima koji sprječavaju hidrolizu i precipitaciju ova je koncentracija znatno viša te se više od 99 % željeza u morskoj vodi nalazi u organskim kompleksima.<sup>9</sup> I drugi esencijalni elementi, a posebno bakar, se u morskoj vodi najvećim dijelom nalaze vezani za prirodne organske ligande, no zbog veće topljivosti se ne smatraju limitirajućim elementima. Naprotiv, ovi metali u povećanim koncentracijama mogu imati toksične efekte te vezanje u organske komplekse smanjuje njihov štetan utjecaj.<sup>11, 14</sup> Granica toksičnosti ovih metala određena je koncentracijom slobodnog metala koja je toksična za 5 % vrsta u ekosustavu (engl. *hazardous concentration* – HC5).<sup>15</sup> Uz navedene biološki važne elemente u vodama se nalaze i teški metali kao što su živa, kadmij i olovo koji su toksični već kod vrlo niskih koncentracija. Prema EU Water Framework Directive (Directive 2013/39/EU) neki od ovih metala se smatraju prioritetnim tvarima te je njihova bioraspoloživost navedena kao preporučena mjera kakvoće vode.<sup>16, 17</sup>

#### 2.2.4 Geokemijsko modeliranje i analitičke tehnike

Za mnoge metale u tragovima potpuna raspodjela kemijskih vrsta (specijacija) u prirodnim vodama nije poznata. U svrhu njihovog razumijevanja i predviđanja razvijeni su razni specijacijski (računalni) modeli. Najčešći programi koji se koriste za geokemijsko modeliranje su Visual MINTEQ<sup>18</sup> (*MINeral Thermal EQUilibrium model*), MINEQL+<sup>19</sup>, WHAM<sup>20</sup> (*Windermere Humic Aqueous Model*), CHEAQS<sup>21</sup> (*CHemical Equilibria in AQueous Systems*) i PHREEQC<sup>22</sup> (*pH-REdox-EQUilibrium Calculations*) koji se razlikuju po mogućnostima, bazi podataka i ponuđenim modelima interakcije elementa s prirodnom organskom tvari.

Za predviđanje bioraspoloživosti metala u vodenom okolišu razvijeni su modeli biotičkog liganda (engl. *Biotic ligand model* – BLM) i model aktivnosti slobodnog iona

(engl. *free ion activity model* – FIAM) koji obrađuju reakcije metala s organizmima i vodenim okolišem. Ovi modeli su razvijeni na temeljnoj pretpostavci da je bioraspoloživost ovisna o koncentraciji slobodnih metalnih iona.<sup>10</sup> Kao što je već navedeno ova koncentracija je kontrolirana prvenstveno vezanjem u stabilne komplekse s organskim ligandima. Dok je modeliranje specijacije metala s pojedinačnim anorganskim (npr. Cl<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, itd.) i nekim sintetskim organskim (EDTA, NTA, acetat i sl.) ligandima poznato (jer su poznate i njihove konstante stabilnosti), modeliranje s heterogenim ligandima iz prirodne organske tvari predmet je brojnih studija. Najčešće korišteni modeli za opisivanje interakcija između otopljenih organskih tvari i metalnih iona u različitim okolišnim uvjetima su WHAM, SHM (*Stockholm Humic Model*) i NICA-Donnan (*NonIdeal Competitive Adsorption*).<sup>10</sup>

Jedan od ciljeva mnogih istraživanja je poboljšati navedene modele uključivanjem eksperimentalnih rezultata.<sup>10</sup> Najčešće korištene analitičke metode u ovim istraživanjima su voltametrijske i potenciometrijske metode, koje omogućavaju direktno mjerenje u određenom uzorku vode. Potenciometrijskim metodama moguće je mjeriti koncentracije slobodnih iona, a voltametrijskim i labilno kompleksiranih metala. Ove metode omogućavaju mjerenje vrlo niskih koncentracija i do  $1 \times 10^{-12}$  M.<sup>23</sup>

Primjena UV/Vis spektrometrije u svrhu karakterizacije interakcije metala s organskim ligandima započela je radom u Korschin grupi.<sup>1</sup> Prednost ove metode je što uz koncentracije kompleksa daje strukturne informacije o specifičnim ligandima te na ovaj način omogućava detaljnije modeliranje.<sup>1</sup> Međutim, potrebna su daljnja ispitivanja u relevantnim okolišnim uvjetima zbog čega je ovo područje trenutno od velikog interesa.

### 2.3 Organska tvar u prirodnim vodama

Organska tvar u prirodnim vodama (engl. *natural organic matter* – NOM) složena je smjesa organskih spojeva koji se nalaze u obliku otopljenih molekula i suspendiranih čestica. Prirodna granica između ovih frakcija ne postoji. U operativnom smislu se razdvajaju na temelju filtracije, prema čemu su otopljene organske tvari (engl. *dissolved organic matter* – DOM) frakcija koja prolazi kroz membranu uobičajene veličine pora 0,7 μm. U novije vrijeme se koriste i filtri pora 0,45 i 0,2 μm.<sup>24, 25</sup> Partikulatna organska tvar (engl. *particulate organic matter* – POM) se sastoji od živog i neživog organskog

materijala. Njihov udio u ukupno prisutnoj organskoj tvari u prosjeku je manji od 10 %, osim u područjima visoke produktivnosti ili u područjima gdje su velike turbulencije.<sup>24</sup>

Otopljeni organska tvar je heterogeni sustav sastavljen od vrsta različitih molekularnih masa s različitim topljivostima, reaktivnošću i optičkim svojstvima ovisno o njihovoj strukturi.<sup>24</sup> Ova frakcija čini oko 90 % ukupne organske tvari u moru i predstavlja jedan od najvećih bio-aktivnih spremnika ugljika na Zemlji te ima važnu ulogu u globalnom ciklusu ugljika.<sup>26</sup> Većina se organske tvari u moru sporo razgrađuje dok je manji dio biološki razgradiv, a to je većinom organska tvar nastala autohtonom proizvodnjom u vodenom stupcu.<sup>24</sup> Prema životnom vijeku dvije glavne skupine DOM-a u oceanima su labilni DOM u površinskim slojevima koji se vrlo brzo mineralizira i refraktorni DOM na većim dubinama koji se s vremenom akumulira do eventualne mineralizacije ili uklanjanja drugim postupcima.<sup>26</sup>

Otopljeni organska tvar u vodenim ekosustavima ima vrlo bitnu ulogu u biogeokemijskim procesima. Osim što je izvor ugljika, kontrolira koncentraciju otopljenog kisika, dušika, fosfora, sumpora te sudjeluju u prijenosu metala i organskih onečišćivala i kontrolira njihovu bioraspodivnost. Također utječe na prodiranje svjetlosti i posreduje u fotokemijskim procesima.<sup>24</sup>

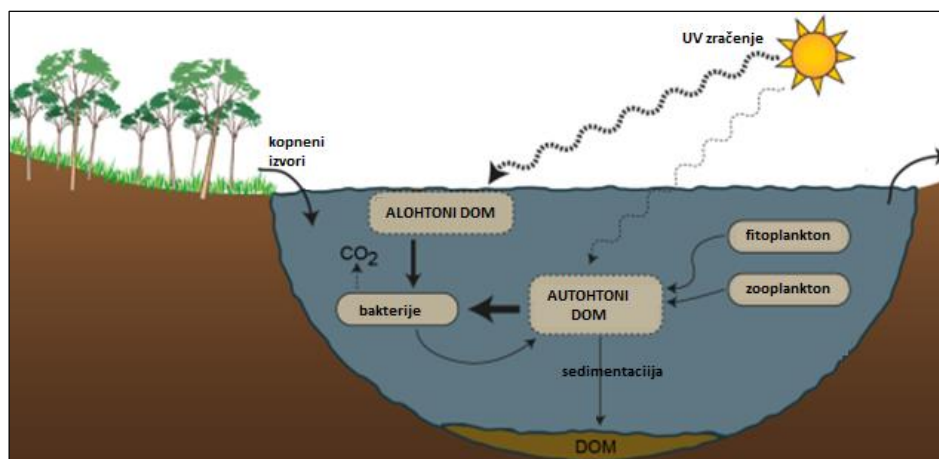
### 2.3.1 Kromoforna otopljeni organska tvar u prirodnim vodama

Dio otopljene organske tvari u prirodnim vodama je optički aktivan. Ova kromoforna odnosno obojena otopljeni organska tvar (engl. *chromophoric/colored dissolved organic matter* – CDOM) važna je komponenta DOM-a i od bitnog je interesa za pitanja vodenog ekosustava. CDOM je primarni faktor penetracije svjetlosti u oceane i uzrok je varijacije u boji oceana.<sup>27</sup> Zbog apsorpcije u plavom dijelu spektra, gdje klorofili i fotosintetski karotenoidi imaju apsorpcijske pikove ograničava prolaz svjetlosti potrebne za fotosintezu i ometa satelitsku procjenu koncentracije klorofila.<sup>26</sup> Zbog mogućnosti apsorpcije UV zračenja CDOM sprječava negativan utjecaj UV zračenja na prisutne organizme i posreduje u mnogim fotokemijskim procesima u površinskim vodama.<sup>26</sup> Fotokemijski produkti uključuju ugljikov monoksid, otopljeni anorganski ugljik ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{CO}_3^{2-}$ ), amonijak, fosfate te reaktivne vrste kao što su  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\cdot\text{OH}$  radikali.<sup>28</sup> Na ovaj način doprinosi direktnoj remineralizaciji organskog ugljika<sup>26</sup> kao i fotolizi biogenog dimetil sulfida u morskom okolišu, koji je važan izvor atmosferskog sumpora.<sup>29</sup> Također,

nepotpunom fotolizom CDOM-a nastaju organske molekule manje molekulske mase čime postaju biološki dostupne kao nutrijent i izvor energije mikroorganizmima.<sup>28</sup> Kao i sve otopljene organske tvari, CDOM ima važan utjecaj i na toksičnost, biološku dostupnost i rasprostranjenost organskih onečišćivala i metala. Osim toga važna je vrsta spojeva koja se nalazi u otpadnim vodama, a u procesima obrade voda djeluje kao prekursor štetnih dezinfekcijskih nusprodukata (engl. *disinfection by-product* – DBP).<sup>24</sup>

Prema mjestu nastanka razlikujemo alohtoni i autohtoni CDOM. Autohtoni CDOM je nastao u vodenom stupcu metabolitičkim aktivnostima raznih heterotrofnih i autotrofnih vodenih organizama te njihovim odumiranjem. Nasuprot tome, alohtoni CDOM je formiran izvan promatranog sustava od čega značajan dio dolazi riječnim ispustima iz kopnenih izvora kao što je raspad biljnog materijala. Zbog kopnenih izvora i ispiranja organske tvari iz tla posebno visoke koncentracije CDOM-a se nalaze u rijekama i estuarijskim te obalnim vodama dok je na otvorenom oceanu koncentracija znatno niža.<sup>26</sup> Postoje iznimke od ovog uobičajenog odnosa rijeka-ocean, pa je često koncentracija organske tvari, a time i CDOM-a, niža u rijekama nego u priobalnom moru. Takav je slučaj u našim krškim rijekama, odnosno estuarijima kao što je estuarij rijeke Krke.<sup>30</sup> Prema literaturi<sup>26</sup> vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 375 nm u rijekama najčešće iznosi između 5 i 25 m<sup>-1</sup>, u estuarijskim i obalnim vodama 0,5 i 5 m<sup>-1</sup>, a u oceanima varira između 0 i 0,5 m<sup>-1</sup>. Postoje i mnoge studije o odnosu između koncentracije CDOM-a i saliniteta koji je uglavnom obrnuto proporcionalan<sup>31</sup> kao što je prikazano na [slici 2.7](#).

Shematski prikaz kruženja otopljene organske tvari u prirodnim vodama prikazan je na [slici 2.8](#). Sastav i struktura CDOM-a ovisi o izvornom materijalu koji zatim prolazi kroz konstantne promjene izazvane fotokemijskom i mikrobiološkom aktivnošću, a na njega utječu i fizikalni procesi kao što je miješanje voda s različitih dubina i iz različitih izvora.<sup>32</sup> Sve ovo se odražava u njihovim optičkim svojstvima pa se brojne spektroskopske značajke koriste za određivanje njihovog sastava, a time i izvora i načina nastanka.

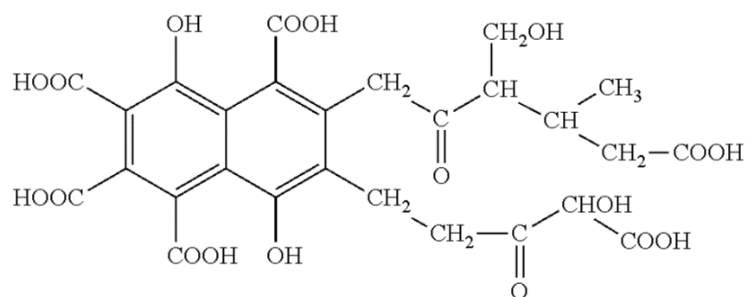


**Slika. 2.8.** Kruženje otopljene organske tvari u prirodnim vodama.<sup>33</sup>

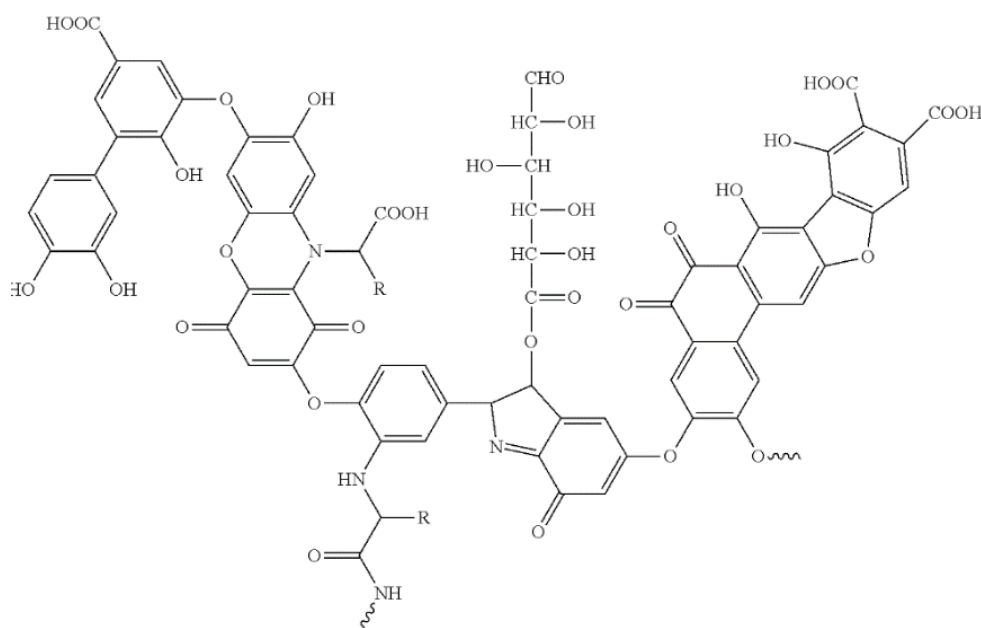
Boja CDOM-a je prvenstveno povezana s huminskom i fulvinskom kiselinom (lat. *fulvus* – žuto).<sup>28</sup> Ove kiseline su slične osnovne strukture, ali kako se radi o heterogenoj smjesi ne postoji jednoznačna strukturna formula kojom bi se mogle opisati. Provedena su brojna istraživanja i korištene su mnoge analitičke metode za određivanje njihovog sastava i funkcionalnih skupina<sup>34</sup> te su predlagane razne hipotetske strukture. Na [slici 2.9](#) prikazana je predložena modelna struktura fulvinske kiseline prema Buffleu, a na [slici 2.10](#) huminske kiseline prema Stevensonu.<sup>35</sup> Građene su od alifatskih lanaca i aromatskih prstenova na koje su vezane brojne funkcionalne skupine, a molekulska masa im varira od 100 do 1000 Da.<sup>24</sup> Ranije se smatralo da je riječ o makromolekulama molekulske mase i do 30000 Da,<sup>36</sup> ali su istraživanja pokazala da se zapravo radi o molekulskim agregatima te da većinu humusnih tvari čine manje molekule.<sup>24</sup> Fulvinska kiselina je općenito manje molekulske mase i u strukturi sadrži više alifatskih lanaca i hidrofilnih funkcionalnih skupina, zbog čega je topiva u cijelom pH rasponu, dok je huminska kiselina zbog veće aromatičnosti topiva samo u lužnatom mediju.<sup>36</sup> Također je pronađeno da postoje značajne razlike u strukturi između kopnene i morske fulvinske kiseline. Tako veća aromatičnost i veća molekulska masa upućuju na alohtone izvore dok su morske fulvinske kiseline manje aromatskog, a više alifatskog karaktera.<sup>36</sup> Zbog navedene strukture huminska i fulvinska kiselina imaju mogućnost vezanja hidrofilnih i hidrofobnih tvari, a time i važan ekološki utjecaj na anorganska i organska onečišćivala u vodenom ekosustavu.

Najvažniji dio strukture ovih kiselina su funkcionalne skupine koje određuju njihovu reaktivnost s metalima ili drugim organskim spojevima. Većinom se kompleksiranje s metalima odvija vezanjem na prisutne karboksilne i fenolhidroksilne skupine koje lako reagiraju s kationima i stvaraju stabilan bidentatni kompleks ([slika 2.11](#)).

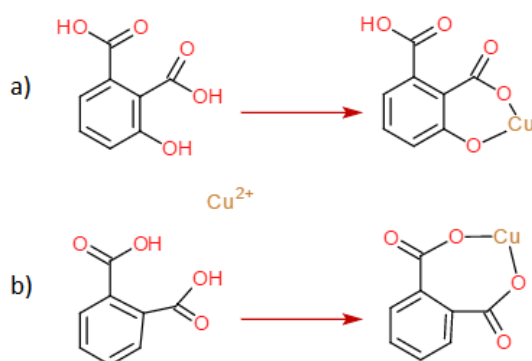
Kako fulvinske kiseline sadrže više karboksilnih i hidroksilnih skupina posjeduju veći kapacitet za interakciju s metalima.<sup>37</sup>



**Slika 2.9.** Modelna struktura fulvinske kiseline prema Buffleu.<sup>35</sup>



**Slika 2.10.** Modelna struktura huminske kiseline prema Stevensonu.<sup>35</sup>



**Slika 2.11.** Mehanizam kompleksiranja metala s funkcionalnim skupinama fulvinskih i huminskih kiselina.<sup>37</sup>

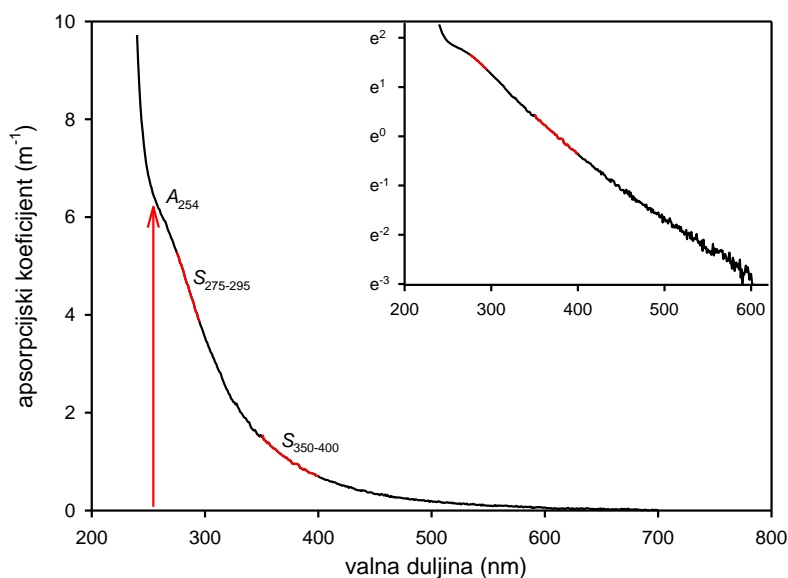
## 2.4 Metode karakterizacije kromofornih otopljenih organskih tvari

Proučavanje otopljenih organskih tvari u prirodnim vodama ometeno je njihovom kompleksnom strukturom i stvaranjem molekulskih agregata. U svrhu njihove karakterizacije se koriste razne analitičke metode kao što su masena spektrometrija,<sup>27, 34</sup> infracrvena spektrometrija<sup>34</sup>, nuklearna magnetska rezonancija<sup>34</sup> te različite kromatografske<sup>34, 38</sup> i mnoge druge metode. Spektroskopske metode su najčešće primjenjivane, jer se odlikuju jednostavnošću, brzim odzivom, niskom cijenom i visokom osjetljivošću.<sup>27</sup> Najčešće se koriste fluorescencijska spektroskopija i UV/Vis spektrometrija koje imaju dodatnu prednost što istovremeno daju kvalitativne i kvantitativne informacije.<sup>26-27</sup> Ove metode se u studijama CDOM-a koriste već 80 godina (prve radove nalazimo već 1910. godine<sup>39</sup>, no konkretniju primjenu ostvario je 1938. njemački znanstvenik Kurt Kalle proučavajući fluorescenciju morskih voda<sup>40</sup>). Zadnjih godina sve više raste interes za ovo područje, posebno za proučavanje interakcija CDOM-a s metalima.

Fluorescencija je pojava emisije svjetlosti koja se odvija samo pri povratku elektrona iz najnižeg vibracijskog stanja, pobuđenog elektronskog stanja, u osnovno elektronsko stanje. Fluorescencijskom spektroskopijom se dobiva trodimenzionalni spektar ekscitacije/emisije (engl. *excitation-emission matrices* – EEM)<sup>26</sup> koji daje više podataka o strukturi molekule,<sup>27</sup> ali je njezin nedostatak što se može primijeniti samo za mali dio otopljene organske tvari koji sadrži fluorofore<sup>27</sup> (engl. *fluorescence dissolved organic matter* – FDOM). Kako vezanjem metala na određeni fluorofor dolazi do odgovarajuće promjene u intenzitetu fluorescencije, ova metoda se često koristi u analizi interakcije funkcionalnih skupina FDOM-a s metalima.<sup>3</sup>

UV/Vis spektrometrija pokriva veći dio otopljene organske tvari koja zahvaljujući kompleksnoj konjugiranoj strukturi ima sposobnost apsorpcije zračenja u UV i vidljivom dijelu spektra. Apsorpcijski spektar CDOM-a ima karakterističan oblik s eksponencijalnim padom apsorpcije između 240 i 600 nm te često s blagom grbom između 260 i 270 nm (slika 2.12). Pojednostavljeno objašnjenje je da je ovakav oblik spektra rezultat preklapanja apsorpcijskih spektara samostalnih kromofora koji su elektronski izolirani jedan od drugoga. Na ovaj način se lako može objasniti izgled spektra na valnim duljinama ispod 350 nm, ali ne i postupni pad apsorpcije prema višim valnim duljinama karakterističan za CDOM.<sup>26</sup> Iz ovoga se izvodi zaključak da važan utjecaj na oblik spektra

CDOM-a imaju elektronske interakcije među kromoforima što je i podržano istraživanjima.<sup>41</sup>



**Slika 2.12.** Prikaz karakterističnog apsorpcijskog spektra kromoforne otopljene organske tvari i lineariziranog oblika spektra prikazanog u umetku.

## 2.4.1 Literaturni pregled metoda karakterizacije apsorpcijskog spektra kromofornih otopljenih organskih tvari

Intenzitet apsorpcije CDOM-a mjera je njihove koncentracije dok oblik spektra daje uvid u sastav.<sup>26</sup> Također, proučavanje promjena u obliku spektra daje korisne informacije o načinu nastanka, stupnju degradacije te reakcijama s metalima i onečišćivačima, što olakšava razumijevanje i predviđanje njihove sudbine i procesa u koje su uključeni. U tu svrhu su razvijeni različiti pristupi karakterizaciji apsorpcijskog spektra opisani u slijedećim poglavljima.

### 2.4.1.1 Apsorpcijski koeficijent

Kako se za mjerenje apsorpcije koriste kivete različite duljine puta, radi lakše usporedbe rezultata iz različitih studija nužno je izražavanje apsorpcije preko apsorpcijskog koeficijenta. Apsorpcijski koeficijent ( $a_\lambda$ ) na određenoj valnoj duljini je najčešće korišten parametar u terenskim studijama i često se koristi za procjenu koncentracije DOC i saliniteta.<sup>27, 42</sup> Važno je napomenuti da se u literaturi apsorpcijski koeficijent izražava na dva različita načina te je radi lakše usporedbe rezultata potrebno



naglasiti na koji način je izračunat. U studijama slatkih voda i otpadnih tokova se najčešće koristi dekadski apsorpcijski koeficijent definiran kao dekadaska apsorbanacija na određenoj valnoj duljini ( $A_\lambda$ ) podijeljena s duljinom puta zrake ( $l$ ). Kod istraživanja apsorpcije CDOM-a u morskoj vodi apsorpcijski koeficijent se obično izražava prema Napierianu pomoću prirodnog logaritma.<sup>3</sup> Ova dva koeficijenta su povezana **jednadžbom 6**:

$$a_\lambda = 2,303 \cdot \frac{A_\lambda}{l} \quad (6)$$

Često se koriste i omjeri apsorpcijskih koeficijenata na različitim valnim duljinama koji predstavljaju različite frakcije CDOM-a. U literaturi<sup>27</sup> se spominje 10 omjera apsorpcijskih koeficijenata na različitim valnim duljinama. Pomoću ovih parametara se određuju svojstva CDOM-a kao što su molekulska masa, aromatičnost, hidrofobnost i stupanj humifikacije. Za određivanje aromatičnosti i molekulske mase najčešće se koristi omjer E2/E3 ( $a_{250}/a_{365}$ )<sup>43</sup>, za određivanje porijekla CDOM-a omjer E2/E4 ( $a_{254}/a_{436}$ )<sup>44</sup>, a za određivanje stupnja humifikacije omjer E3/E4 ( $a_{300}/a_{400}$ )<sup>45</sup>.

#### 2.4.1.2 Spektralni nagib

1981. godine su Bricaud i suradnici<sup>46</sup> razvili eksponencijalni model (**jednadžba 7**) i predložili spektralni nagib kao parametar za opisivanje spektra CDOM-a. Spektralni nagib je od tada široko upotrebljavan parametar u studijama CDOM-a te mu primjena u zadnjih 10 godina naglo raste.<sup>33</sup> Oko ovog parametra su vođene razne diskusije. Vrijednost nagiba ovisi o širini intervala za koji je izračunat, a posebno o donjoj granici intervala.<sup>26</sup> Stoga različite rezultate pokazuju nagibi izračunati za različite raspone valnih duljina što predstavlja veliki nedostatak kod usporedbe rezultata iz različitih studija.

$$a_\lambda = a_{\lambda_0} \cdot e^{-S(\lambda-\lambda_0)} + K \quad (7)$$

gdje je  $a_\lambda$  – apsorpcijski koeficijent na određenoj valnoj duljini,  $m^{-1}$ ,

$\lambda_0$  – referentna valna duljina, najčešće 275 nm i 350 nm,

$K$  – pozadinska konstanta,  $m^{-1}$ ,

$S$  – spektralni nagib,  $m^{-1}$ .

Pozadinska konstanta ( $K$ ) se koristi u slučajevima kada se apsorpcijskim spektrima ne oduzima „bazna“ apsorbanacija na valnim duljinama višim od 500-600 nm, a koja potječe od drugih komponenata u analiziranom uzorku (npr. lagano замуćenje, pomak

instrumenta ili raspršivanje u kivetu), a ne od CDOM-a. U tom području valnih duljina, pri uobičajenim koncentracijama CDOM-a u prirodnim vodama, apsorpcija CDOM-a je gotovo zanemariva.

Veća vrijednost spektralnog nagiba ukazuje na brži pad apsorpcije s porastom valnih duljina pa je veća vrijednost apsorpcije na višim valnim duljinama povezana s manjim  $S$ .<sup>26</sup> U korelaciji je s prosječnom molekulskom masom CDOM-a pa se može koristiti u njenu zamjenu te ukazuje na aromatičnost i porijeklo CDOM-a.<sup>26-27</sup> U studijama interakcije CDOM-a s metalima se pokazalo da  $S$  raste proporcionalno povećanju koncentracije metala vezanog na CDOM.<sup>47</sup> Također ukazuje na potencijal za stvaranje DBP-a, a istraživanja su pokazala da bi mogao biti koristan i kod procjene procesa u okolišu koji su povezani s otopljenim organskim tvarima, kao što su mikrobiološka razgradnja, fotodegradacija i kompostiranje.<sup>27</sup>  $S$  se smanjuje s porastom prosječne molekulske mase. Ovo je objašnjeno većom mogućnošću izmjene naboja u većim molekulama što uzrokuje jednoličniji spektar.<sup>41</sup> Kako je već rečeno da je veća molekulska masa povezana s kopnenim izvorima CDOM-a, tako je  $S$  CDOM-a iz kopnenih izvora manji.<sup>26</sup>  $S_{300-600}$  CDOM-a iz kopnenih izvora izračunat eksponencijalnim modelom najčešće iznosi 0,015-0,019 nm<sup>-1</sup> a  $S_{275-295}$  0,01-0,02 nm<sup>-1</sup> dok se u oceanima  $S_{300-600}$  kreće između 0,01 i 0,03 nm<sup>-1</sup> a  $S_{275-295}$  između 0,02 i 0,06 nm<sup>-1</sup>.<sup>26</sup> Spektralni nagib, kao i intenzitet apsorpcije CDOM-a u oceanima jako varira ovisno o sezonskom dotoku slatke vode i o dubini.<sup>26</sup> U površinskim vodama je manja apsorpcija na valnim duljinama iznad 300 nm te je  $S_{275-295}$  veći, što je povezano s fotokemijskom degradacijom.<sup>26</sup> Porast apsorpcije i smanjenje  $S$  s dubinom ukazuje na proizvodnju CDOM-a od strane fitoplanktona i drugih organizama. Unatoč tome spektar morskog CDOM-a je relativno bezizražajan što ukazuje na brzu mikrobiološku razgradnju.<sup>26</sup>

$S$  se može računati i nelinearnim fitanjem na **jednadžbu 7** ili logaritmiranjem cijelog spektra (**jednadžba 8**), kao što je prikazano na umetku **slike 2.12**.

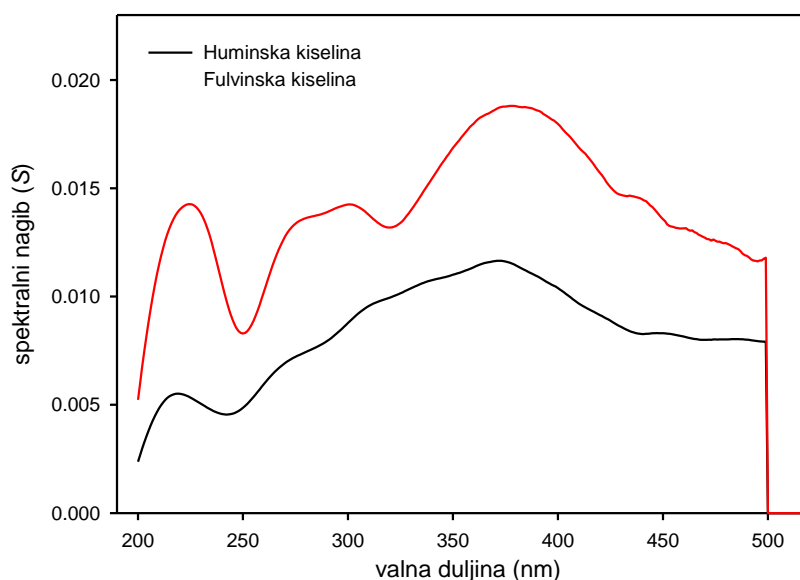
$$\ln(a_\lambda) = S \cdot \ln(\lambda) + K \quad (8)$$

Nakon linearizacije spektra na ovaj način  $S$  se može izračunati linearnom regresijom. Linearni model za računanje spektralnog nagiba su predložili Helms i suradnici 2008. godine.<sup>48</sup> Različiti načini računanja spektralnog nagiba donijeli su još veće komplikacije kod usporedbe rezultata. Zato je bitno kod korištenja ovog parametra uz raspon valnih duljina naglasiti na koji način je izračunat. Kako bi se umanjio ovaj

nedostatak predlagane su različite metode. Neke od njih su korištenje omjera spektralnih nagiba ( $S_R$ )<sup>48</sup> i krivulje spektralnih nagiba ( $S_\lambda$ )<sup>49</sup>.

### 2.4.1.3 Krivulja spektralnih nagiba

Krivulju spektralnih nagiba (slika 2.13) su predložili Loisele i suradnici 2009. godine.<sup>49</sup> Dobiva se računanjem spektralnih nagiba za svaku valnu duljinu prema odabranom rasponu valnih duljina. Odabirom većih intervala uklanjaju se šumovi, ali preveliki intervali previše utječu na oblik krivulje. Iz ovog razloga se najčešće računaju nagibi za raspon od 20 nm, s korakom od 1 nm ( $S_{200-219}$ ,  $S_{201-220}$ , ...  $S_{481-500}$ ). Zbog mogućih vrlo niskih apsorbancija na valnim duljinama iznad 450-500 nm, što uzrokuje veliki šum, krivulja spektralnih nagiba postaje nepouzdana te se kao relevantno područje promatraju valne duljine do oko 500 nm.



**Slika 2.13.** Prikaz krivulje spektralnih nagiba na primjeru fulvinske i huminske kiseline.

### 2.4.1.4 Omjer spektralnih nagiba

Omjer spektralnih nagiba ( $S_R$ ) su predložili Helms i suradnici 2008. godine.<sup>48</sup>  $S_R$  se računa iz omjera spektralnih nagiba u intervalima 275-295 nm i 350-400 nm.<sup>27</sup> Prvi je interval UVB dijela spektra koji sadrži značajne informacije o CDOM-u jer većina aromatskih spojeva pokazuje apsorpcijske maksimume u ovom dijelu spektra.<sup>26</sup>

Ovaj parametar je povezan s molekulskom masom i fotokemijskom degradacijom.  $S_R$  CDOM-a visokog stupnja fotodegradacije i CDOM-a u oceanima iznosi više od 1,5, a CDOM-a iz kopnenih izvora manje od 1.<sup>26</sup>

#### 2.4.1.5 Derivativni spektar

Promjene u obliku spektra se mogu proučavati i deriviranjem apsorpcijske krivulje. Derivativni spektar je kontinuirani prikaz prve ili viših derivacija apsorpcije s porastom valnih duljina ( $dA/d\lambda$ ,  $d^2A/d\lambda^2$ ...).<sup>50</sup> Na ovaj način je moguće uočiti slabo vidljive apsorpcijske maksimume, a u istraživanjima CDOM-a se većinom koristi kod određivanja njenog porijekla.<sup>27</sup>

#### 2.4.1.6 Specifična apsorpcija

U literaturi se često spominje i specifična apsorpcija (SUVA) koja predstavlja prosječnu apsorpciju svih organskih molekula u uzorku na 254 nm. Definira se kao apsorpcija uzorka na 254 nm u  $\text{cm}^{-1}$ ,  $A_{254}/l$  podijeljena s koncentracijom DOC u  $\text{mg dm}^{-3}$ .<sup>26</sup>  $SUVA_{254}$  je povezana s molekulskom masom i aromatičnošću organske tvari.<sup>26</sup> Standardni je parametar u istraživanjima CDOM-a iz prirodnih voda, a često se koristi i u industriji za izražavanje kvalitete vode.<sup>24, 51</sup>

#### 2.4.1.7 Diferencijalni spektar

Za istraživanje reaktivnosti CDOM-a često se koristi diferencijalni spektar. Ovom metodom se mogu proučavati različiti procesi kao što je fotodegradacija<sup>52</sup>, deprotonacija<sup>53, 54</sup> i interakcija s mineralnim koloidima<sup>55</sup>, halogenim elementima<sup>56</sup> kao i metalima u tragovima<sup>27, 31, 53, 57, 58</sup>. Diferencijalni spektar je razlika u spektru prije i nakon određenih promjena (**jednadžba 9**).<sup>47</sup>

$$\Delta A_\lambda = A_\lambda - A_{\lambda,\text{ref}} \quad (9)$$

gdje je  $\Delta A_\lambda$  – diferencijalna apsorpcija,

$A_\lambda$  – apsorpcija nakon određene promjene,

$A_{\lambda,\text{ref}}$  – apsorpcija referentnog stanja.

Parametri koji se mogu izvesti iz ove metode su osim diferencijalne apsorbancije na određenoj valnoj duljini, diferencijalna logaritmirana apsorbancija,  $\Delta \ln A$ ,<sup>1, 59</sup> relativna diferencijalna apsorbancija,  $\Delta A/A$ , omjer diferencijalnih apsorbancija,  $\Delta R$ . Vrlo često se koristi i diferencijalni spektralni nagib<sup>27</sup> ( $\Delta S$ ) koji odgovara promjeni spektralnog nagiba u odnosu na referentni spektralni nagib (**jednadžba 10**).<sup>47</sup> Prema literaturi, navedeni parametri koreliraju s koncentracijom metala vezanim na DOM procijenjenom NICA-Donnan modelom.<sup>27, 47, 53, 57-58</sup>

$$\Delta S_{350-400} = S_{350-400,i} - S_{350-400,ref} \quad (10)$$

gdje je  $\Delta S_{350-400}$  – diferencijalni spektralni nagib,  $m^{-1}$ ,

$S_{350-400,i}$  – spektralni nagib nakon određene promjene,  $m^{-1}$

$S_{350-400,ref}$  – spektralni nagib kod referentnog stanja,  $m^{-1}$ .

#### 2.4.1.8 Gaussove krivulje u karakterizaciji apsorpcijskog spektra

Apsorpcijski spektri se mogu vrlo dobro rekonstruirati linearnom kombinacijom Gaussovih krivulja što se većinom primjenjuje za istraživanje interakcije CDOM-a s metalima.<sup>27</sup> Gaussov pristup karakterizaciji spektra su razvili Korshin i suradnici su 1997. godine.<sup>60</sup> U početku je korišten kod praćenja promjena u strukturi organskih tvari prilikom procesa kloriranja i koagulacije, a od 2013. godine<sup>1</sup> se većinom koristi u kombinaciji s diferencijalnim spektrom pri proučavanju interakcije CDOM-a s metalima.<sup>27</sup> Temelji se na identifikaciji apsorpcijskih maksimuma koji se javljaju kao odstupanja od eksponencijalne krivulje za koja se pokazalo da imaju Gaussov oblik kada se valne duljine pretvore u energiju fotona prema **jednadžbi 11**.<sup>60</sup>

$$E = \frac{1240}{\lambda} \quad (11)$$

Prema literaturi Gaussove krivulje mogu potjecati od deprotonacije CDOM-a ili interakcija halogena, oksidansa ili metala s izoliranim skupinama CDOM-a. Pokazalo se da pozicije i širine Gaussovih krivulja imaju sličnosti s deprotonacijom CDOM-a<sup>53-54</sup> i interakcijama s metalima te da promjenom pH i koncentracije metala dolazi do promjene visine krivulja.<sup>47, 53, 57-58</sup>

Svaka Gaussova krivulja određena je s tri parametra (**jednadžba 12**, vidi sliku 2.14):

$$\Delta a_E = \sum_{i=0}^n \varphi_i \cdot e^{-\left(\frac{E-\mu_i}{\sigma_i \cdot \sqrt{2}}\right)^2} \quad (12)$$

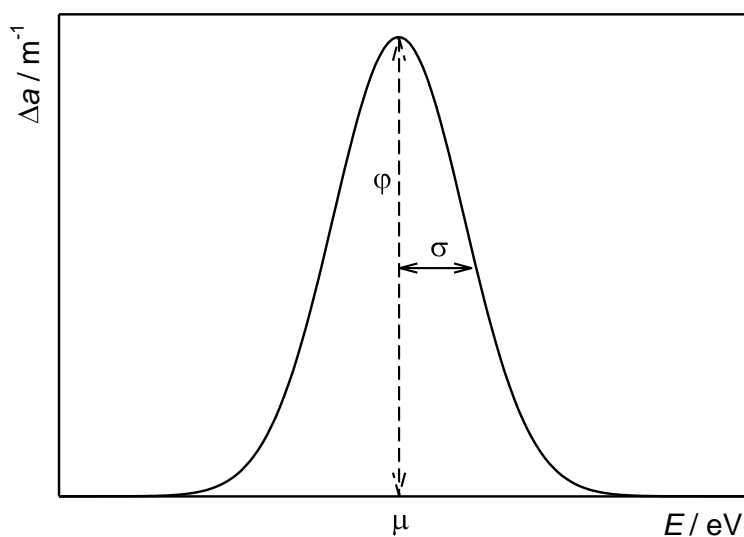
gdje je  $\Delta a_E$  – suma identificiranih Gaussovih komponenti,  $m^{-1}$ ,

$n$  – broj Gaussovih komponenti,

$\sigma$  – širina krivulje na polovici visine apsorpcijskog maksimuma, nm,

$\varphi$  – visina krivulje određena maksimumom apsorpcije,  $m^{-1}$ ,

$\mu$  – položaj sredine apsorpcijskog maksimuma, nm.



**Slika 2.14.** Prikaz Gaussove krivulje s osnovnim parametrima.

Dok se za rekonstrukciju diferencijalnih apsorpcijskih spektara koriste samo Gaussove krivulje, Massicotte i Markager su 2016. godine<sup>61</sup> predložili rekonstrukciju cijelog apsorpcijskog spektra CDOM-a pomoću linearne kombinacije eksponencijalne funkcije i nekoliko Gaussovih krivulja (**jednadžba 13**).

$$a_\lambda = a_{\lambda_0} \cdot e^{-S(\lambda-\lambda_0)} + K + \sum_{i=0}^n \varphi_i \cdot e^{-\left(\frac{E-\mu_i}{\sigma_i \cdot \sqrt{2}}\right)^2} \quad (13)$$

Modeliranjem spektra na ovaj način se uklanjaju greške vezane uz odabir raspona valnih duljina korištenog za procjenu  $S$  te se dobiva  $S$  s greškom dva reda manjom od onog dobivenog tradicionalnim metodama.<sup>61</sup> Primjer obrade spektara ovom metodom prikazan je u eksperimentalnom dijelu na **slici 3.2**.



### 3. Eksperimentalni dio

---



### 3.1 Kemikalije i materijali

Prilikom provođenja eksperimenata i pripreme otopina korištena je ultračista voda, ASTM Tip I, (MQ, 18.2 MΩcm, Merck-Millipore). Sve otopine su pripravljene pri sobnoj temperaturi pri čemu su korištene navedene kemikalije i materijali:

- AAS standardna otopina bakra,  $\gamma(\text{Cu}^{2+}) = 1,000 \text{ g dm}^{-3}$ , Fluka,
- Klorovodična kiselina, 37 %, HCl, TraceSelect, Fluka,
- Vodikov peroksid, 30 %,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TraceSelect, Fluka,
- Natrij perklorat,  $\text{NaClO}_4$ , suprapur, Merck,
- Perklorna kiselina, 70 %,  $\text{HClO}_4$ , suprapur, Merck,
- Natrij hidroksid, 30 %, NaOH, suprapur, Merck,
- Nitratna kiselina, 65 %,  $\text{HNO}_3$ , suprapur, Merck,
- Natrij nitrat, 0,1 M,  $\text{NaNO}_3$ , TraceSelect, Fluka/Sigma Aldrich,
- Dinatrijeva sol kiseline EDTA,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck,
- Bakrena žica,
- Otopina natrij azida, 1 M,  $\text{NaN}_3$ , Trace metal grade, Sigma Aldrich,
- Standardni uzorak riječne huminske kiseline,  $200 \text{ mg dm}^{-3}$ , 600-1000 Da, Fluka,
- Modelna otopine riječne fulvinske kiseline,  $100 \text{ mg dm}^{-3}$ , IHSS (*International Humic Substances Society*),
- Fulvinska kiselina izolirana iz morske vode,  $222 \text{ mg dm}^{-3}$ , (\*)
- Huminska kiselina izolirana iz morske vode,  $120 \text{ mg dm}^{-3}$ , (\*)
- Hidrofobna organska tvar izolirana iz morske vode DAX-8,  $77 \text{ mg dm}^{-3}$ , (\*)
- Hidrofobna organska tvar izolirana iz morske vode XAD-4,  $40 \text{ mg dm}^{-3}$ , (\*)
- Hidrofilna organska tvar izolirana iz morske vode XAD-4,  $216 \text{ mg dm}^{-3}$ , (\*)
- Prirodni uzorci riječne (Sava) i morske vode.

(\*) Otopine izolirane organske tvari dobivene su od dr. Jean-Pierre Gagnéa s „Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada“ posredstvom dr. Cedric Garniera sa Sveučilišta u Toulonu (Francuska).

## 3.2 Instrumentacija

Prilikom izrade ovog rada korišteni su navedeni instrumenti:

- Apsorpcijski spektri snimani su UV/Vis spektrometrom, Perkin Elmer Lambda 45.
- Za uparivanje uzorka vode iz rijeke Save korišten je uparivač, Caliper TurboVap LV.
- Za određivanje koncentracije otopljenog organskog ugljika korišten je TOC analizator, Shimadzu TOC-V<sub>CPH/CPN</sub> + SSSM-5000.

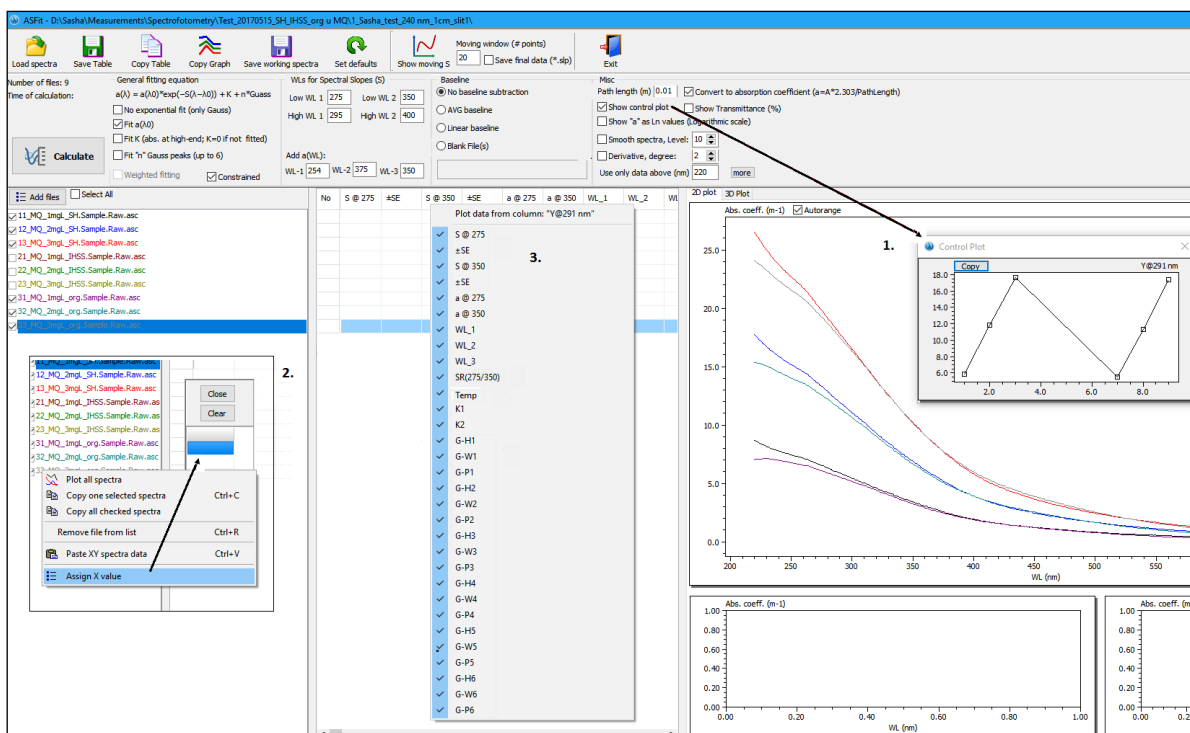
## 3.3 Računalni programi

### 3.3.1 ASFit

Glavni alat za obradu i analizu eksperimentalnih podataka bio je računalni program ASFit, izrađen na Institutu Ruđer Bošković. Autor programa je dr. sc. Dario Omanović. Radi se o novom softveru koji je nadograđivan i testiran za vrijeme izrade ovog rada. Program trenutno radi s ASCII i binarnim datotekama dobivenim pomoću softvera Perkin Elmer UV WinLab 6. Ulazne podatke prikazuje grafički (2D ili 3D prikaz) kao ovisnost apsorpcije ili transmisije o valnoj duljini. Program je *All-in-one* alat; omogućuje obradu i karakterizaciju apsorpcijskih spektara odnosno izračun karakterističnih parametara, jer ima implementirane sve do sada poznate metode obrade CDOM spektara opisane u poglavlju 2.4.1.

Na slici 3.1 prikazano je sučelje programa. Klikom na *Load spectra* moguć je istovremeni unos više apsorpcijskih spektara. Rezultate je moguće prikazati preračunavanjem apsorbancije u apsorpcijski koeficijent prema Napierianu (jednadžba 6) te u logaritmiranom ili deriviranom obliku (prva ili druga derivacija). Diferencijalni spektar se računa oduzimanjem željene datoteke klikom na *Blank File*, a krivulja spektralnih nagiba klikom na *Show moving S*. Ovako obrađene krivulje se mogu spremiti kao nove datoteke klikom na *Save working spectra*, a postoji i mogućnost kopiranja grafa u međuspremnik. Moguć je i prikaz kontrolnog grafa (broj 1 na slici 3.1) označavanjem u izborniku te desnim klikom miša na željenu valnu duljinu. Desnim klikom miša na neku od datoteka i klikom na *Assign x value* otvara se prozor u kojem je moguće podesiti vrijednosti x-osi kontrolnog grafa (broj 2 na slici 3.1).

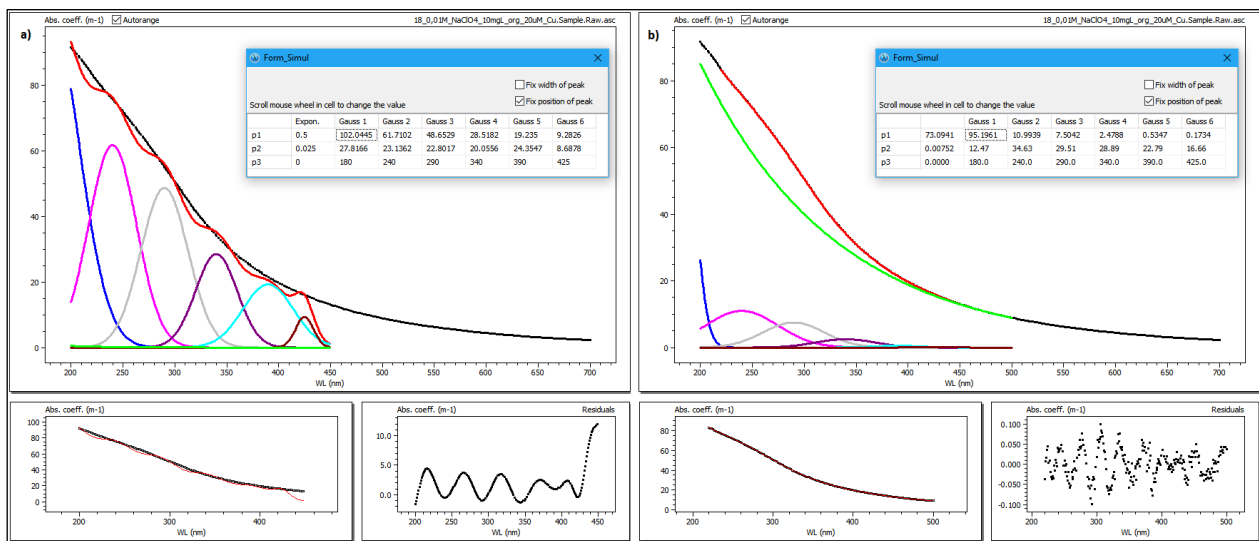
Označavanjem željene jednadžbe u odjeljku *General fitting equation* podatke je moguće fitirati eksponencijalnim modelom prema **jednadžbi 7** ili uz linearnu kombinaciju s Gausovim modelom (do 6 Gaussovih krivulja) prema **jednadžbi 13**. Klikom na *Calculate* program računa spektralne nagibe u željenim intervalima i omjer spektralnih nagiba, ukoliko je označen eksponencijalni model te parametre Gaussovih krivulja, ukoliko je označen Gaussov model. Desnim klikom miša na traku u kojoj su prikazani parametri otvara se prozor u kojem je moguće označiti parametre koji se žele ispisati tablično (**broj 3 na slici 3.1**). U tablici je moguće prikazati i vrijednosti apsorbancije odnosno apsorpcijskog koeficijenta na određenoj valnoj duljini desnim klikom miša na željenu valnu duljinu, pri čemu mora biti označen prikaz kontrolnog grafa. Tablicu je moguće kopirati u međuspremnik ili spremiti u obliku Excel datoteke.



**Slika 3.1.** Korisničko sučelje računalnog programa ASFit.

Klikom na *Fit "n" Gauss peaks* i odabirom broja Gaussovih komponenti otvara se prozor u kojem je moguće ručno podešavanje parametara Gaussovih krivulja. Navedeni prozor prikazan je na **slici 3.2** gdje *p1* označava visinu krivulje, *p2* širinu krivulje na polovici visine, a *p3* položaj apsorpcijskog maksimuma. Također je prikazano a) grubo ručno podešavanje početnih parametara za modeliranje spektra pomoću kombinacije eksponencijalnog i Gaussovog modela te b) konačni rezultat nakon fitanja. Zelena linija prikazuje eksponencijalnu krivulju, a crvena linija model dobiven zbrojem eksponencijalne

krivulje i Gaussovih komponenti. Donji lijevi graf prikazuje poklapanje modela s eksperimentalnim podacima, a desni „rezidualne“ točke, odnosno razlike između eksperimentalnih i modeliranih vrijednosti.



**Slika 3.2.** Modeliranje spektra kombinacijom eksponencijalnog i Gaussovog modela.

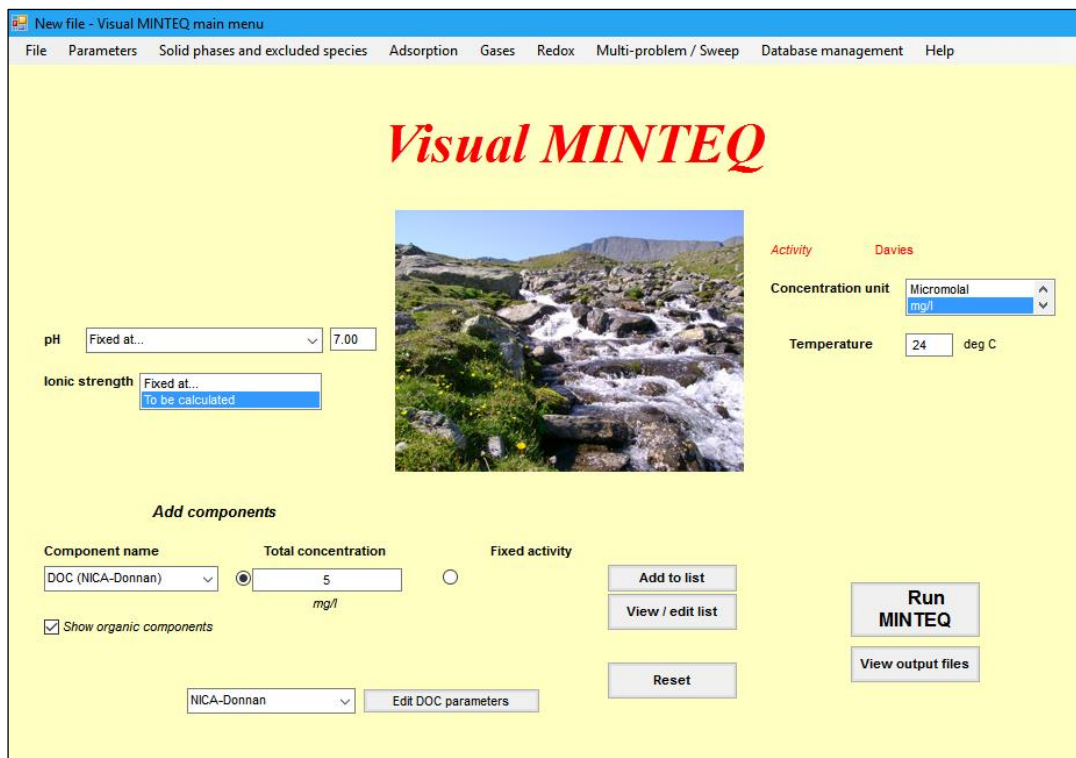
*All-in-one* značajka softvera čini njegovu veliku vrijednost. Pregledom literature nije utvrđeno postojanje softvera ovih mogućnosti te je u planu prezentacija programa široj znanstvenoj zajednici u obliku članka u međunarodnom časopisu.

### 3.3.2 Visual MINTEQ

Koncentracija nastalog kompleksa Cu-CDOM i Cu-EDTA procijenjena je pomoću programa za modeliranje Visual MINTEQ ver 3.1. Visual MINTEQ se može koristiti za izračun ravnotežnog kemijskog sastava razrijeđenih vodenih otopina u laboratoriju ili u prirodnim vodenim sustavima. Softver sadrži bazu podataka ravnotežnih konstanti koje uključuju ravnotežu između kiselina i baza, ravnoteže otapanja i taloženja te redoks i adsorpcijske ravnoteže.

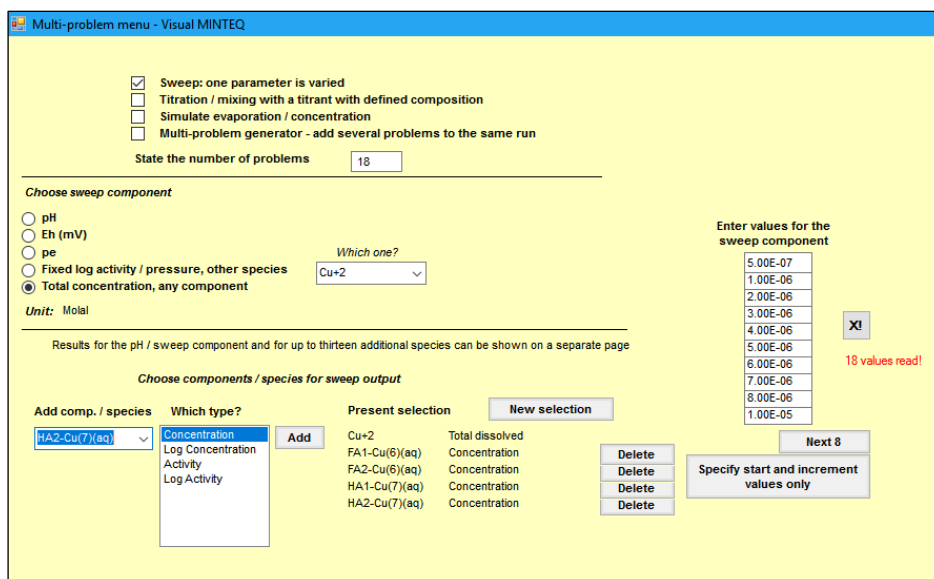
Modeliranje započinje definiranjem problema u glavnom izborniku (slika 3.3); podešavanjem pH, ionske jakosti i temperature te dodavanjem komponenti prisutnih u otopini i njihovih koncentracija u željenim jedinicama. U većini slučajeva se ionska jakost određuje programom. Za modeliranje interakcije s organskom tvari ponuđena su tri modela: Gauss DOM, SHM ili NICA-Donnan. Također je moguće podešavanje parametara

organske tvari kao što je postotak huminske i fulvinske kiseline ili omjer aktivnog DOM i DOC.

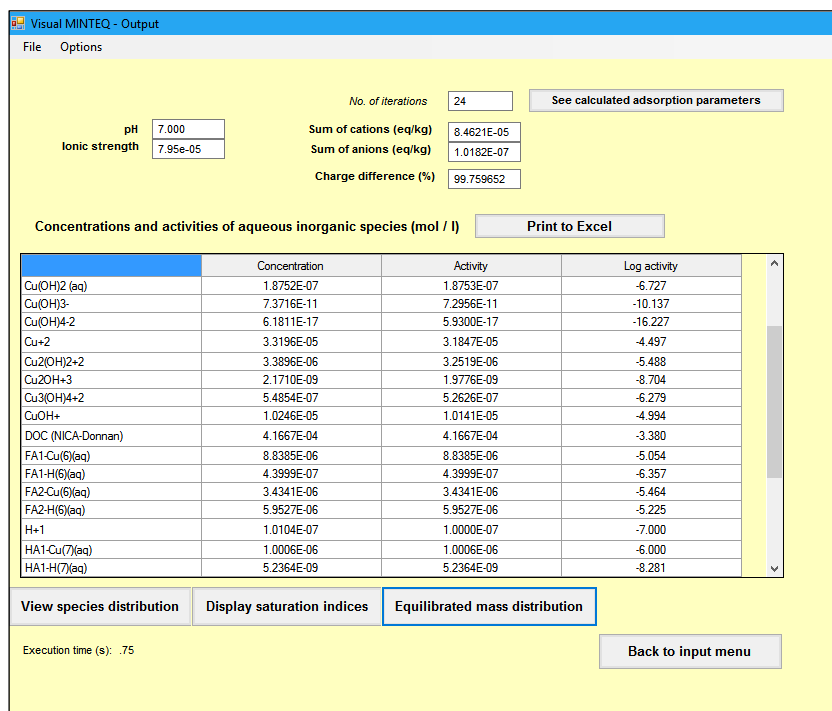


**Slika 3.3.** Visual MINTEQ – glavni izbornik.

Korištenjem izbornika na alatnoj traci moguće je modificiranje podataka na različite načine kao što je definiranje redoks potencijala, anorganskog ugljika, adsorpcijskih izoterma, čvrstih i plinovitih faza ili redoks parova kao i dodavanje modela biotičkog liganda (BLM). Odabirom izbornika *Multi-problem/Sweep* moguće je provesti više simulacija istovremeno. Tako je na primjer odabirom *Multi-problem generator* moguće definiranje niza problema s različitim vrijednostima komponenti u istoj datoteci. Moguća je i simulacija titracije odabirom opcije *Titration* gdje je potrebno definirati volumen otopine, volumen titranta u svakom koraku te sastav titranta. U ovom radu kod procjene nastalog kompleksa titracijom s otopinom bakra korištena je opcija *Sweep* (slika 3.4). Ova opcija omogućava promjenu vrijednost jedne komponente, kao što je u ovom slučaju ukupna koncentracija bakrovih iona u otopini, dok su ostale komponente konstantne.



**Slika 3.4.** Visual MINTEQ – *Multi-problem* izbornik, opcija *Sweep*.



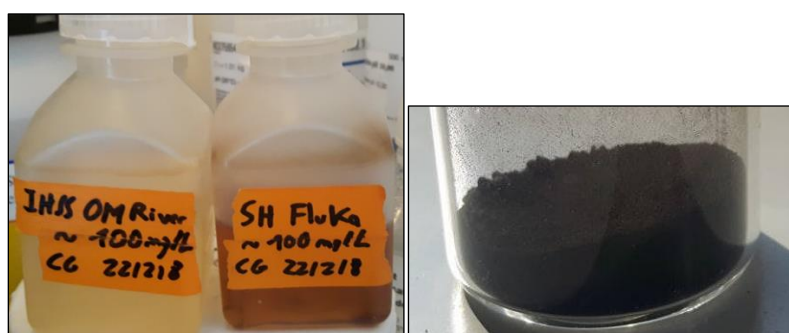
**Slika 3.5.** Visual MINTEQ – stranica s rezultatima.

Nakon definiranja problema i pokretanja programa prva stranica koja se otvara (slika 3.5) prikazuje ravnotežni pH, ionsku jakost, izračunate ukupne koncentracije kationa i aniona te koncentracije i aktivitet za sve prisutne kemijske vrste. Klikom na *View Species Distribution* otvara se stranica koja prikazuje molarni udio ukupne koncentracije svake kemijske vrste dok je na stranici *Equilibrated Mass Distribution* prikazana koncentracija svake komponente kao kompleksirane, otopljene, adsorbirane ili precipitirane faze. Sve rezultate je moguće izvesti u Excel datoteku.

### 3.4 Uzorci otopljenih organskih tvari

#### 3.4.1 Standardni uzorci

Na slici 3.6 prikazani su standardni uzorci otopljene organske tvari izolirane iz riječne vode korišteni u ovom radu. Proizvođač korištene fulvinske kiseline je međunarodna zajednica humusnih supstanci (engl. *International Humic Substances Society* – IHSS), a huminske kiseline Fluka (Sigma Aldrich). Huminska kiselina nabavljena je u obliku modelne otopine i izoliranog krutog uzorka. Uzorak je otopljen u deioniziranoj vodi podešavanjem pH otopine u lužnato područje otopinom natrijeva hidroksida.



**Slika 3.6.** Standardni uzorci organskih tvari izoliranih iz riječne vode.

Na slici 3.7 prikazani su standardni uzorci otopljene organske tvari izolirane iz morske vode korišteni u ovom radu. Navedene izolirane/koncentrirane frakcije organske tvari dobivene su separacijom iz  $\sim 50 \text{ m}^3$  oceanske vode. Oznaka AHSLE označava huminsku a AFSLE fulvinsku kiselinu, a izdvojene su sukladno standardnom IHSS protokolu. Oznake XAD-4 i DAX-8 označavaju način frakcioniranja huminskih tvari u navedenim kolonama koje razdvajaju hidrofobne i hidrofilne frakcije prema sposobnosti adsorpcije. Obje kolone adsorbiraju hidrofobnu frakciju dok XAD-4 adsorbira i slabo hidrofilnu kiselu frakciju.<sup>62</sup>



**Slika 3.7.** Standardni uzorci organske tvari izoliranih iz morske vode.



### 3.4.2 Prirodni uzorci

#### 3.4.2.1 Uzorkovanje

U radu su korišteni prirodni uzorci riječne i morske vode. Uzorak riječne vode je iz rijeke Save (uzorkovanje 28. ožujka 2017. kod Mosta Slobode u Zagrebu). Uzorkovanje je provedeno s obale uranjanjem PET (polietilen tereftalat) boce od 5 dm<sup>3</sup> na dubinu od oko 5 cm ([slika 3.8](#)).



**Slika 3.8.** Uzorkovanje rijeke Save.

Uzorak morske vode uzet je u području južne strane otoka Zlarina (salinitet = 38). Uzorkovanje je provedeno na isti način kao i uzorkovanje riječne vode.

#### 3.4.2.2 Filtracija

Uzorci riječne i morske vode su filtrirani pod tlakom dušika kroz celulozno-nitratni filter veličine pora 0,45 um (cellulose nitrate filter, Sartorius Stedium biotech) korištenjem polikarbonatnog sustava za filtriranje pod tlakom (Sartorius polycarbonate filter holder, model 16511; [slika 3.9](#)). Prije filtriranja uzorka svaki filter je ispran MQ vodom i uzorkom, nakon čega je uzorak filtriran u teflonske boce. Na [slici 3.10](#) prikazan je izgled filtera nakon propuštanja uzorka rijeke Save.





**Slika 3.9.** Sartorius polikarbonatni sustav za filtriranje pod tlakom dušika.



**Slika 3.10.** Izgled celulozno-nitratnih filtara nakon filtriranja uzorka rijeke Save.

### 3.4.2.3 Mjerenje otopljenog organskog ugljika

U filtriranom uzorku rijeke Save koncentracija otopljenog organskog ugljika (engl. *dissolved organic carbon* – DOC) određena je metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije pomoću analizatora ugljika, Shimadzu TOC-V<sub>CPH/CPN</sub> (slika 3.11) i iznosila je  $1,01 \text{ mg dm}^{-3}$ . Instrument samostalno uzima mikrolitarske količine uzorka korištenjem ASI-V autosamplera. Princip rada instrumenta se zasniva na katalitičkom sagorijevanju tekućeg uzorka na temperaturi od  $680 \text{ }^\circ\text{C}$  u struji ekstra čistog zraka te određivanjem nastalog ugljikovog dioksida nedisperzivnom infracrvenom spektroskopijom (engl. *non-dispersive infrared* – NDIR). Koncentracija DOC-a u  $\text{mg dm}^{-3}$  se određuje pomoću eksterne kalibracijske krivulje izmjerene s kalij hidrogen ftalatom kao organskim standardom.



**Slika 3.11.** TOC analizator, Shimadzu TOC-V<sub>CPH/CPN</sub> + ASI-V autosampler.

#### 3.4.2.4 Uparivanje u struji dušika

Kako bi se povećala koncentracija otopljenog organskog ugljika dio uzorka riječne vode je uparivan u struji dušika pomoću uparivača, Caliper TurboVap LV (slika 3.12) pri temperaturi od 40 °C. Uzorak je uparivan 6 sati a prema volumenu otopine uzorka prije i nakon uparivanja, faktor ugušćivanja bio je 3,46. Stoga je očekivano da nakon uparivanja koncentracija otopljenog organskog ugljika u uzorku iznosi 3,48 mg dm<sup>-3</sup>.



**Slika 3.12.** Uparivač, Caliper TurboVap LV.

### 3.4.2.5 UV zračenje – razaranje organske tvari

Dio uzoraka morske i riječne vode podvrgnut je UV zračenju pomoću visokotlačne (engl. *high pressure* – HP) lampe na 254 nm radi razaranja prisutne organske tvari. UV oksidacija je provedena u kvarcnim bocama tijekom 48 sati. Nakon UV razaranja riječne vode na stjenkama boca se stvorio bijeli talog zbog precipitacije karbonata, zbog čega je uzorak ponovno filtriran. Mjerenje koncentracije DOC-a nakon UV razaranja pokazalo je da je njegova koncentracija na razini slijepe probe (*blanka*) ( $< 0,05 \text{ mg dm}^{-3}$ ), a što je potvrđeno i UV/Vis spektrometrijom gdje je apsorbancija izmjerena na 254 nm bila na razini *blanka* MQ vode.

## 3.5 Opis mjerenja

Apsorpcijski spektri snimani su UV/Vis spektrometrom, Perkin Elmer Lambda 45 (slika 3.13) s MQ vodom kao referentnim uzorkom i slijepom probom. Princip rada instrumenta opisan je u poglavlju 2.1.1. Snimanje spektra provedeno je u rasponu valnih duljina od 200-700 nm s intervalom od 1 nm i brzinom snimanja  $245 \text{ nm min}^{-1}$ . Otvori na putu zrake podešeni su na 1 mm širine. Uzorci su stavljeni u kivete širine 1 cm načinjene od kvarca (Suprasil). Svakodnevno prije provođenja mjerenja snimana je bazna linija s MQ vodom, a potom je testirana točnost i ponovljivost snimanjem slijepe probe. Apsorpcijski spektri slijepih proba su bili unutar šuma instrumenta ( $\pm 0,0005$  jedinica apsorbancije).



**Slika 3.13.** UV/Vis spektrometar, Perkin Elmer Lambda 45.

### **3.5.1 Titracije s otopinom bakra**

Otopina bakra korištena u titracijama pripravljena je otapanjem bakrene žice u otopini klorovodične kiseline i vodikovog peroksida ( $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 1$ ). Nakon otapanja određena je koncentracija bakra u otopini 0,12 M. Iz ove otopine pripravljene su *stock* otopine koncentracije  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Titracije su provedene dodavanjem potrebnih volumena *stock* otopine bakra u otopine organske tvari (koncentracije do ekvivalenta  $\text{DOC} = 5$  mg  $\text{dm}^{-3}$ ) kako bi se provela mjerenja s porastom koncentracije bakra. Otopine organskih tvari korištene za titraciju pripravljene su u volumenima od 20  $\text{cm}^3$  s konstantnom ionskom jakošću podešenom pomoću osnovnog elektrolita (natrij perklorat,  $\text{NaClO}_4$ ) u koncentraciji 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Promjena pH vrijednost otopina je kontrolirana dodacima otopina perklorne kiseline ( $\text{HClO}_4$ ) i natrijeva hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) u koncentracijama 0,1 i 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Nakon svakog dodatka otopina je radi uravnotežavanja stajala 20 minuta nakon čega je uzet alikvot od 3  $\text{cm}^3$  za analizu. Nakon mjerenja i prije idućeg dodatka alikvot je ponovno vraćan u otopinu.

## 4. Rezultati

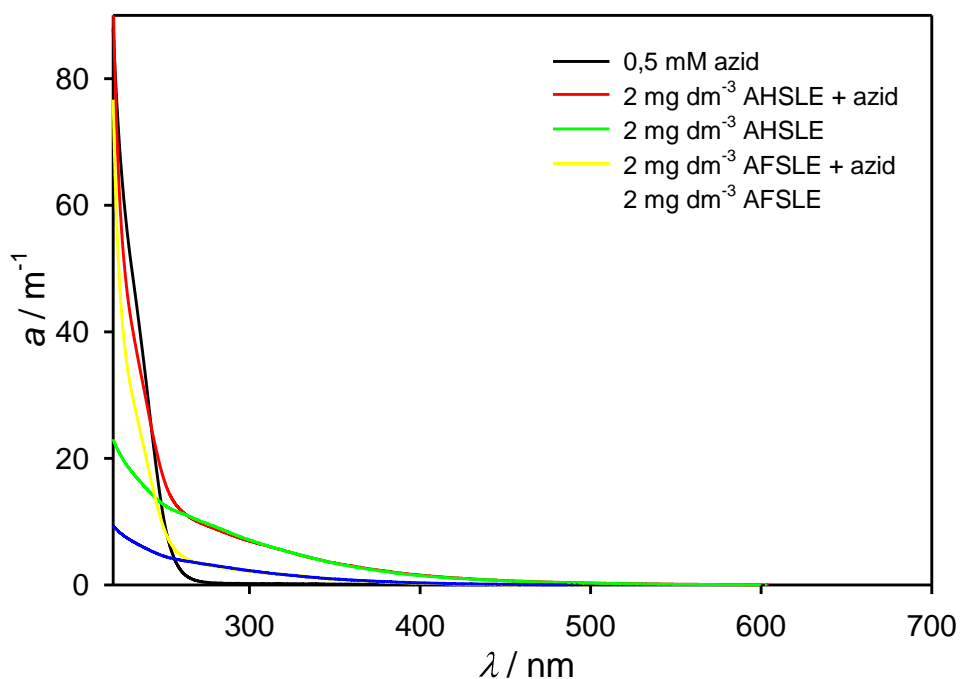
---

Proučavanje interakcije metala s organskom tvari spektrometrijskom tehnikom temelji se prvenstveno na karakterizaciji spektara same organske tvari. Tek na temelju dobro istraženih karakteristika/parametara spektara same organske tvari mogu se dalje istraživati interakcije s ionima metala. U području apsorpcije CDOM-a (220-500 nm) znatan utjecaj mogu imati interferencije drugih komponenata otopine koja se mjeri. Zbog toga je odabir pogodnih komponenata za sastav otopine, kemijske forme metala koji se dodaje, pufera i sl. od velike važnosti za uspješna i kvalitetna mjerenja. Stoga je u ovom radu znatan dio eksperimenata posvećen upravo karakterizaciji CDOM-a i nalaženju najpogodnijih uvjeta za provođenje eksperimenta sa što manje neželjenih interferencija, a potom je proučavana interakcija s ionima metala koja je znatno osjetljivija i kompliciranija nego CDOM sama po sebi.

## 4.1 Ispitivanje interferencija

### 4.1.1 Utjecaj azida

Prirodni uzorci su konzervirani dodatkom otopine natrij azida ( $\text{NaN}_3$ ) u svrhu mikrobiološke inhibicije, što je uobičajeni postupak kod mjerenja organske tvari.<sup>63</sup> Međutim, UV/Vis mjerenjima je utvrđeno da natrij azid ima značajan utjecaj na apsorpciju pri valnim duljinama nižim od 260 nm. Na [slici 4.1](#) prikazani su apsorpcijski spektri samog natrij azida te uzoraka pri istim koncentracijama sa i bez dodatka natrij azida iz kojih možemo vidjeti da natrij azid ne utječe na izgled spektra pri višim valnim duljinama. S obzirom da većina parametra obrade CDOM spektara promatra valno područje iznad 260 nm, konačni utjecaj azida nije značajan za karakterizaciju CDOM-a, ali, kako ćemo kasnije vidjeti, može imati utjecaj kod istraživanja interakcije CDOM-a i iona metala. Pažnja se mora posvetiti u slučajevima ako obrada podataka (npr. fitanje eksponencijalnom funkcijom) uključuje područje valnih duljina ispod 260 nm, jer je uobičajeno snimanje CDOM spektara do 220 ili 230 nm.



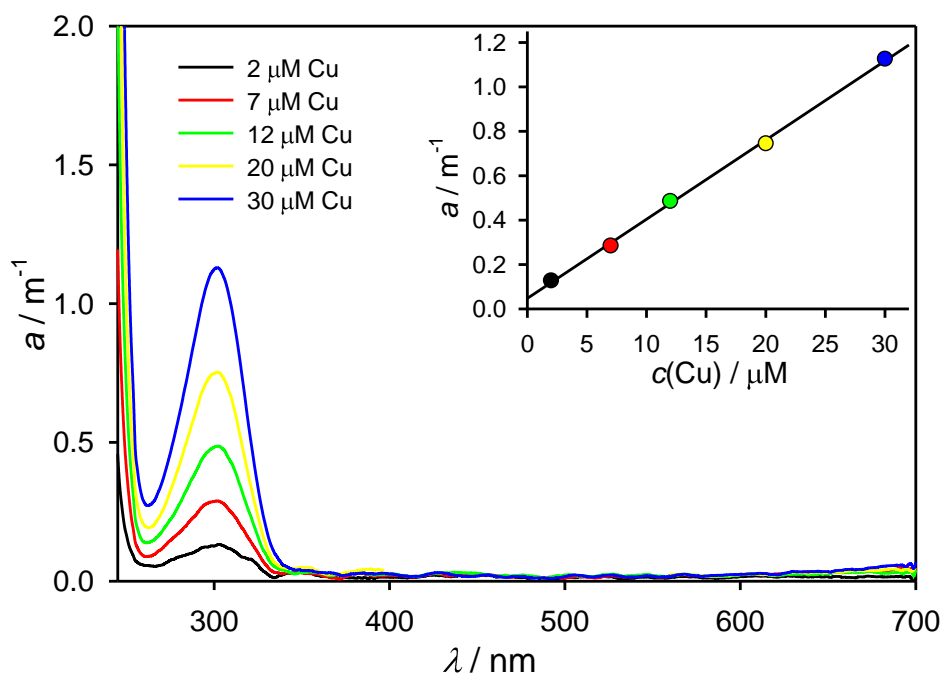
**Slika 4.1.** Spektar natrij azida u koncentraciji  $5 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  te izolirane morske huminske i fulvinske kiseline u koncentraciji  $2 \text{ mg dm}^{-3}$  sa i bez dodatka natrij azida.

#### 4.1.2 Apsorpcijski spektar bakra i utjecaj nitrata

Na [slici 4.2](#) prikazani su apsorpcijski spektri otopina bakra pripremljenih iz AAS standardne otopine bakra koja izvorno sadrži  $0,44 \text{ mol dm}^{-3}$  nitratne kiseline ( $\text{HNO}_3$ ). Na slici je vidljiv apsorpcijski maksimum na  $300 \text{ nm}$  za koji se pokazalo da pripada prisutnim nitratima u otopini, a ne bakru. Na umetku [slike 4.2](#) je prikazana „lažna“ linearna ovisnost maksimuma na  $300 \text{ nm}$  o koncentraciji bakra u otopini. U literaturi se nalaze slična spektrometrijska mjerenja u kojima su korišteni nitratne soli metala, međutim pojava maksimuma nije uvijek zabilježena.<sup>58</sup> Stoga su dodatno ispitane otopine nitrata ( $\text{NaNO}_3$ ) u ne kiseljoj otopini.

Na [slici 4.3](#) prikazani su apsorpcijski spektri otopine  $\text{NaNO}_3$  koji pokazuju vrlo visoku apsorpciju na valnim duljinama nižim od  $260 \text{ nm}$ . Već pri koncentraciji  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  apsorpcija nitrata na valnim duljinama ispod  $220 \text{ nm}$  dostiže vrijednost gornje granice mjernog područja instrumenta ( $a = 800 \text{ m}^{-1}$ ). Na umetku [slike 4.3](#) su prikazani isti spektri s prilagođenom skalom gdje se vidi porast apsorpcije s maksimumom na  $300 \text{ nm}$  koji odgovara apsorpcijskom maksimumu primijećenom u AAS standardnoj otopini bakra. Jednake rezultate daje snimanje spektara nitratne kiseline ( $\text{HNO}_3$ ) u istim koncentracijama. Slična mjerenja napravljena su i s drugim metalima ( $\text{Fe}$ ,  $\text{Cd}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Zn}$ ,  $\text{Co}$ )

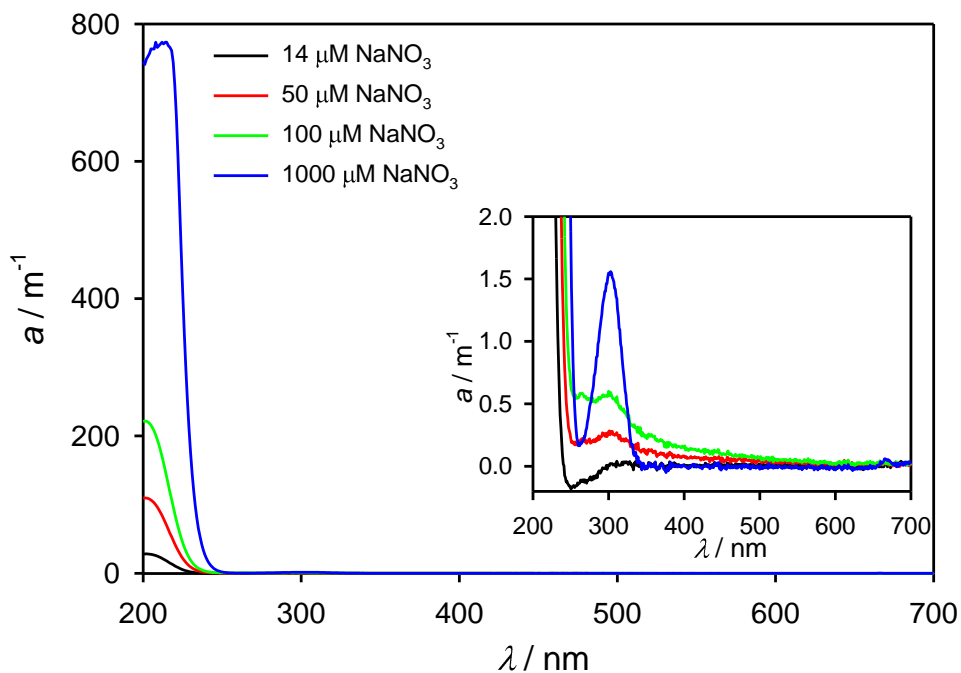
i svi su spektri imali maksimum na valnoj duljini oko 300 nm zbog prisutnosti nitrata u originalnim standardima metala (*stock* otopina).



**Slika 4.2.** Apsorpcijski spektri otopina bakra pripremljenih iz AAS standardne otopine u koncentracijama 2, 7, 12, 20 i 30  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  ( $c(\text{NO}_3^-) = 2 \times 10^{-4}$ ;  $3,4 \times 10^{-4}$ ;  $5,7 \times 10^{-4}$  i  $8,7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

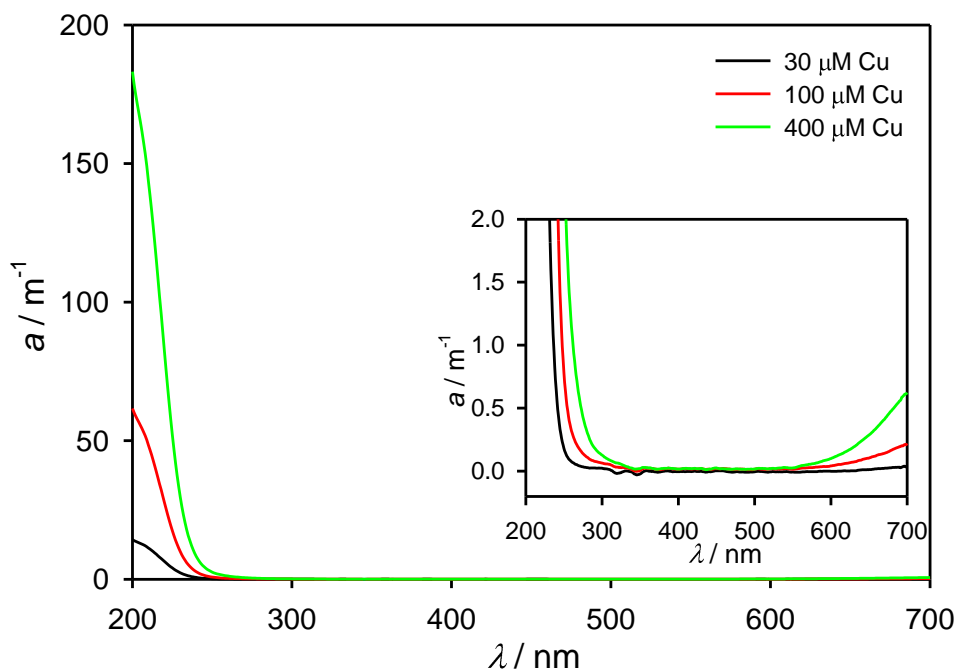
Kako bi se izbjegao utjecaj nitrata pripravljena je *stock* otopina otapanjem bakrene žice, koja je korištena u daljnjim ispitivanjima. Apsorpcijski spektri ove otopine u koncentracijama 30, 100 i 400  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  prikazani su na [slici 4.4](#). Iz slike možemo vidjeti apsorpciju bakra u „dubokom“ UV dijelu spektra već pri nižim koncentracijama te porast apsorpcije s porastom koncentracije bakra. Kod 400  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  bakra u otopini javlja se apsorpcija i u vidljivom dijelu spektra iznad 600 nm. Pri višim koncentracijama otopina bakra je plave boje što odgovara apsorpciji narančasto-crvene svjetlosti na ovim valnim duljinama ([tablica 2.1](#)).





**Slika 4.3.** ApSORPCIJSKI spektri natrijeva nitrata (NaNO<sub>3</sub>) u koncentracijama  $1,4 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  i  $10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Umetak: apSORPCIJSKI spektri s prilagođenom Y-skalom.



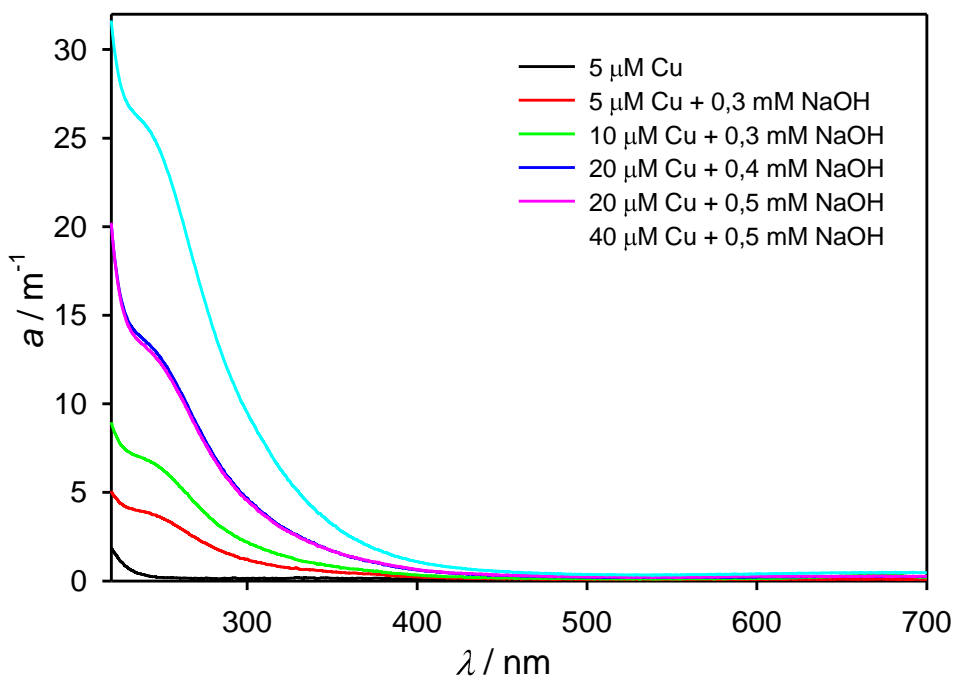
**Slika 4.4.** ApSORPCIJSKI spektri otopine bakra pripravljene otapanjem bakrene žice ( $c(\text{Cu}) = 30, 100$  i  $400$  μmol dm<sup>-3</sup>).

Umetak: apSORPCIJSKI spektri s prilagođenom Y-skalom.

Iako su se u ovom radu gornje razine koncentracije dodanog bakra nalazile na razini ovog eksperimenta, većina bitnih promjena u spektrima koje su se izravno koristile kod obrade bile su do koncentracije bakra oko  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , što prema prikazanim spektrima nije imalo znatnog utjecaja na valnim duljinama višim od 240 nm, što je područje karakterizacije CDOM spektara.

#### 4.1.3 Apsorpcijski spektar bakar hidroksida

Kako bi prepoznali precipitaciju bakra prilikom izvođenja eksperimenata testiran je oblik i područje promjene spektra bakar hidroksida u otopini natrij hidroksida i bakrovih iona prikazan na [slici 4.5](#). Na slici je vidljiv porast apsorpcije prilikom povećanja koncentracije bakra u širokom području apsorpcija, s izraženim maksimumom na 250 nm. pH ovih otopina bio je oko 10, što je značajno iznad pH vrijednosti kod koji su kasnije izvođena mjerenja, ali je na ovaj način dobiven uvid u utjecaj precipitacije na spektre koja nastaje i kod nižih koncentracija bakra. Usporedbom s apsorpcijama sa [slike 4.4](#) vidi se da je vrijednost apsorpcije pri koncentraciji bakra od oko  $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$  za oko 6 puta veća kod ovako visokog pH, nego kod nižeg pH ([slika 4.4](#)), što upućuje na značajne promjene u otopini.

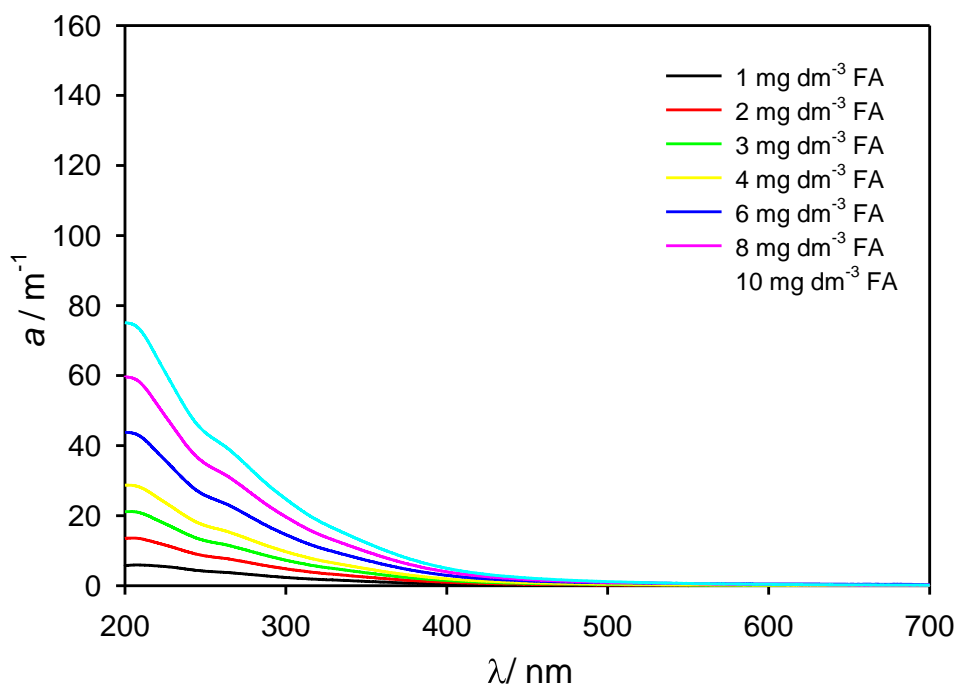


**Slika 4.5.** Apsorpcijski spektri bakrovih iona pri različitim koncentracijama uz variranje koncentracije natrij hidroksida (pH ~ 10).

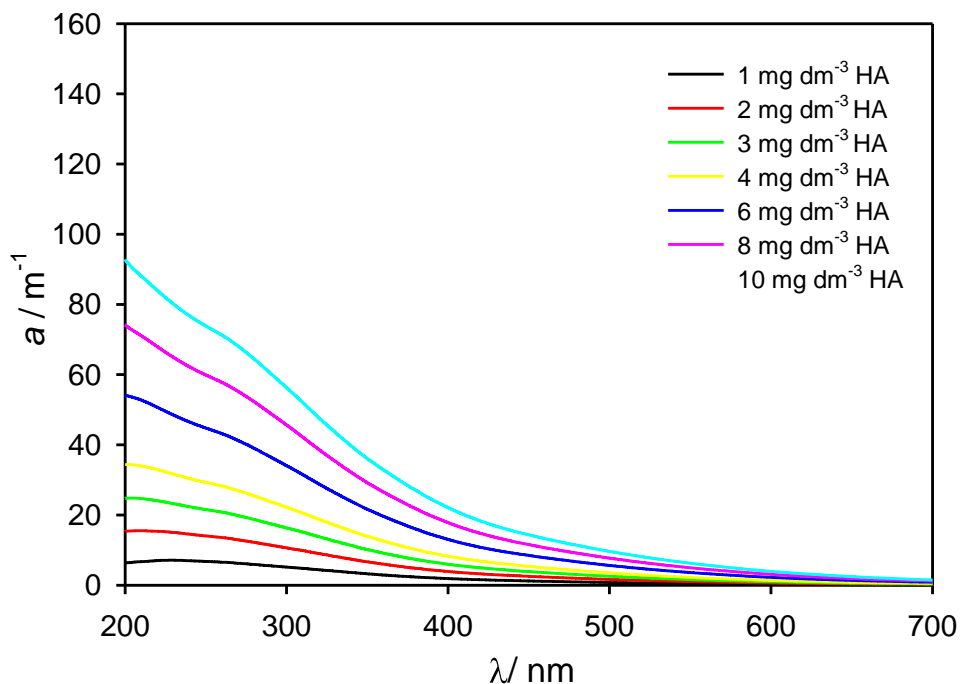
## 4.2 Apsorpcijski spektri otopljene organske tvari

### 4.2.1 Modelne otopine s izoliranom organskom tvari

Na slici 4.6 prikazani su apsorpcijski spektri fulvinske (FA), a na slici 4.7 huminske kiseline (HA) izoliranih iz riječne vode, u koncentracijama 1, 2, 3, 4, 6, 8 i 10 mg dm<sup>-3</sup>. Radi lakše usporedbe, skala apsorpcijskog koeficijenta (Y-os) je na slijedećim slikama koje prikazuju spektre izoliranih organskih tvari iz riječne i morske vode, fiksirana na istu maksimalnu vrijednost od 160 m<sup>-1</sup>. U prikazanim spektrima riječne FA i HA vidljiv je pad apsorpcijskog koeficijenta s porastom valne duljine i blagom grbom na 265 nm. Također je vidljiv proporcionalni porast apsorbancije s porastom koncentracije organske tvari. Uspoređujući oblik krivulja fulvinske i huminske kiseline primjećuje se strmiji pad apsorbancije u spektru fulvinske kiseline odnosno veća apsorpcija pri višim valnim duljinama kod huminske kiseline. Apsorpcija huminske kiseline na svim valnim duljinama objašnjava smeđu boju otopine dok veća apsorpcija ljubičaste, plave i plavo-zelene svjetlosti objašnjava žutu boju otopine fulvinske kiseline (slika 3.6).



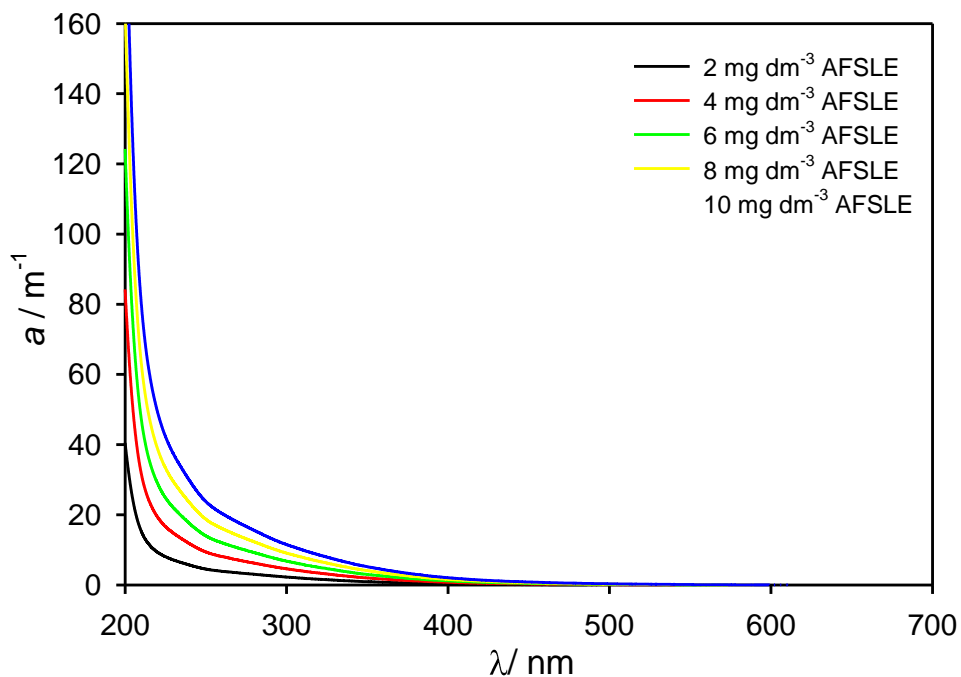
**Slika 4.6.** Apsorpcijski spektri fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{FA}) = 1, 2, 3, 4, 6, 8$  i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).



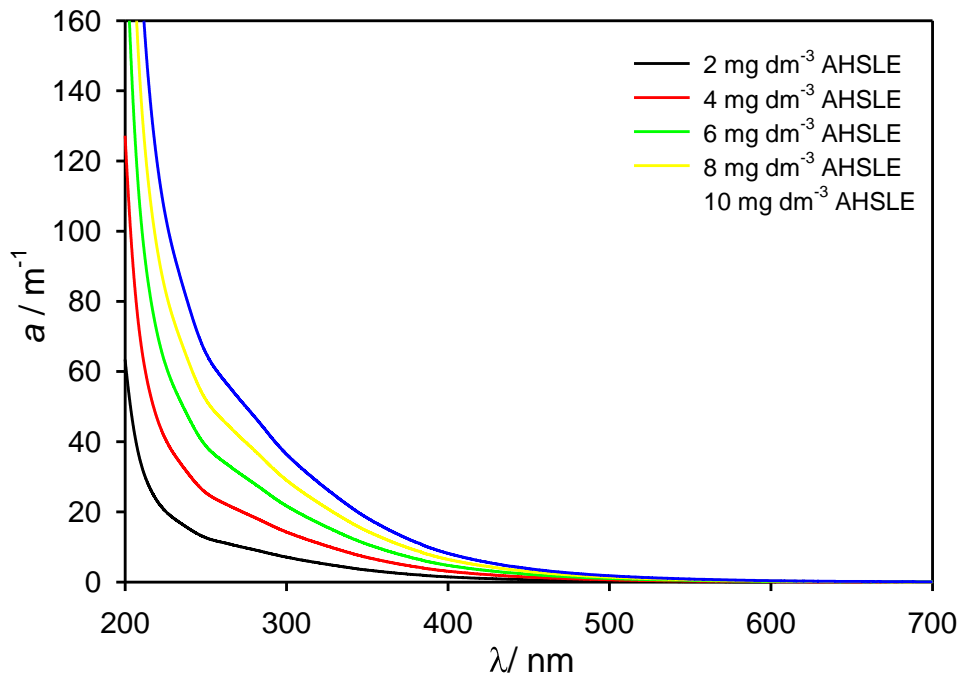
**Slika 4.7.** Apsorpcijski spektri huminske kiseline ( $\gamma(\text{HA}) = 1, 2, 3, 4, 6, 8$  i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).

Na slici 4.8 prikazani su apsorpcijski spektri fulvinske (AFSLE), a na slici 4.9 huminske kiseline (AHSLE) izoliranih iz morske vode, u koncentracijama 2, 4, 6, 8 i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ . Za razliku od spektara riječne huminske i fulvinske kiseline ovi su spektri gotovo glatki, bez posebno izraženih „grba“. Također pokazuju puno strmiji pad apsorbanacije odnosno veću vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na nižim, a puno manju na višim valnim duljinama nego što je slučaj kod riječnih kiselina. Apsorpcija na valnim duljinama nižim od  $500 \text{ nm}$  objašnjava žutu boju ovih otopina (slika 3.7).

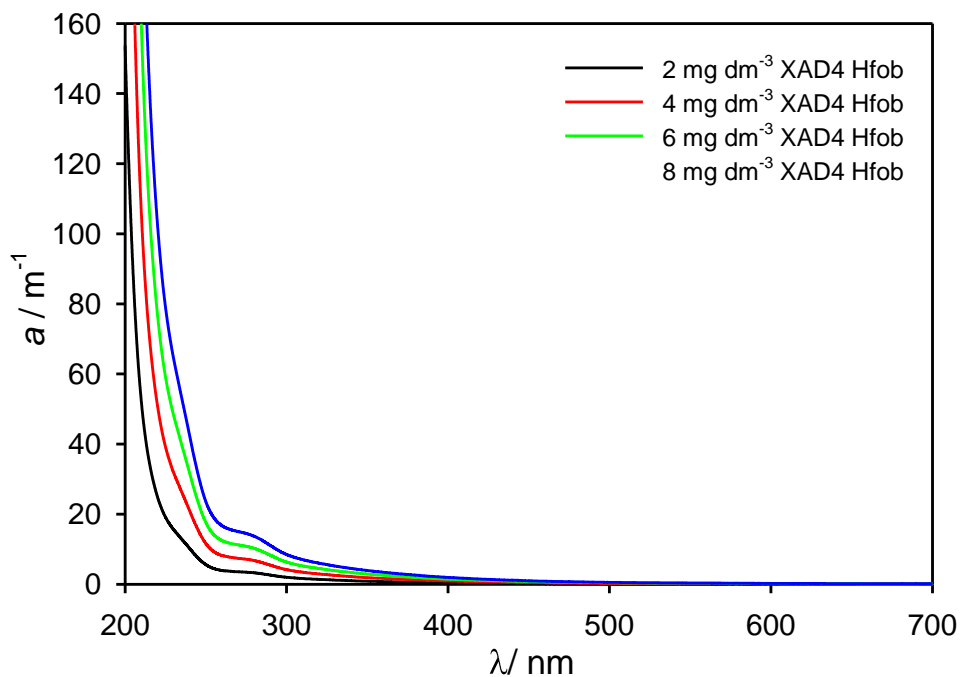
Na slikama 4.10 i 4.11 prikazani su apsorpcijski spektri organske tvari izolirane iz morske vode pomoću kolone XAD-4 na hidrofobnu (slika 4.10) i hidrofilnu frakciju (slika 4.11), a na slici 4.12 apsorpcijski spektri hidrofobne frakcije izdvojene pomoću kolone DAX-8. Usporedbom oblika prikazanih spektara kod hidrofobnih frakcija se može uočiti strmiji pad apsorbanacije s porastom valnih duljina te manja vrijednost apsorpcijskih koeficijenata pri svim valnim duljinama.



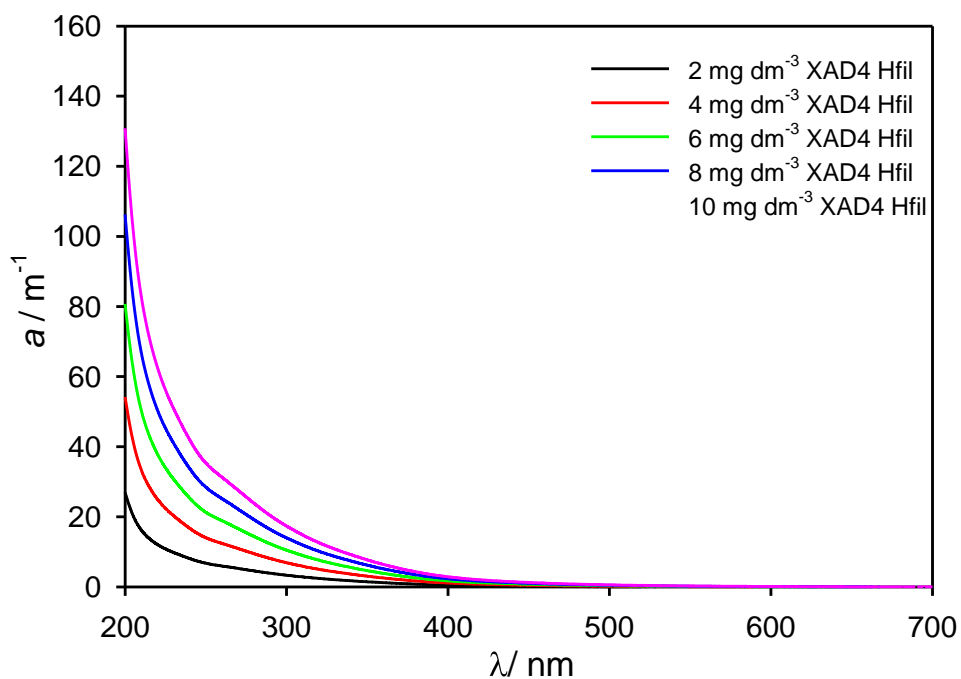
**Slika 4.8.** Apsorpcijski spektri morske fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{AFSLE}) = 2, 4, 6, 8$  i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).



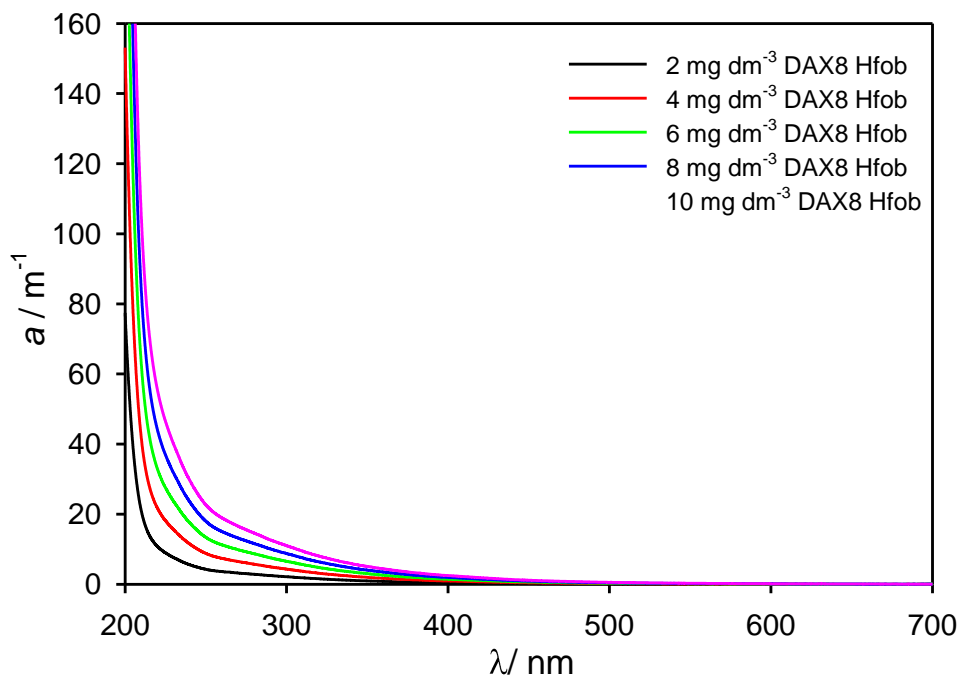
**Slika 4.9.** Apsorpcijski spektri morske huminske kiseline ( $\gamma(\text{AHSLE}) = 2, 4, 6, 8$  i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).



**Slika 4.10.** Apsorpcijski spektri hidrofobne frakcije zaostale na koloni XAD4 ( $\gamma(\text{XAD4 Hfob}) = 2, 4, 6$  i  $8 \text{ mg dm}^{-3}$ ).



**Slika 4.11.** Apsorpcijski spektri hidrofilne frakcije propuštene kroz kolonu XAD4 ( $\gamma(\text{XAD4 Hfil}) = 2, 4, 6, 8$  i  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).



**Slika 4.12.** Apsorpcijski spektri hidrofobne frakcije zaostale na koloni DAX8 ( $\gamma(\text{DAX8 Hfob}) = 2, 4, 6, 8 \text{ i } 10 \text{ mg dm}^{-3}$ ).

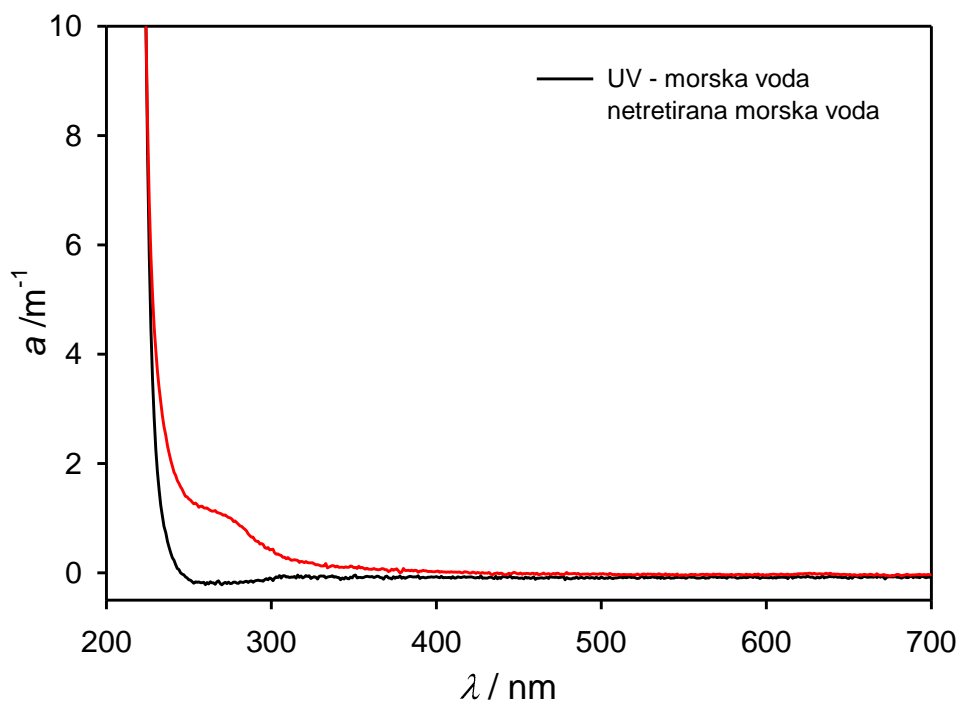
#### 4.2.2 Prirodni uzorci

Na [slici 4.13](#) prikazani su apsorpcijski spektri nefiltriranog uzorka morske vode i istog uzorka nakon UV zračenja, a na [slici 4.14](#) apsorpcijski spektri filtriranog uzorka vode iz rijeke Save i istog uzorka nakon UV zračenja te nakon uparivanja u svrhu povećanja koncentracije otopljenog organskog ugljika (potrebno za naknadna mjerenja).

Uzorak morske i riječne vode pokazuje spektar karakterističan za kromofornu otopljenu organsku tvar s eksponencijalnim padom apsorpcije prema višim valnim duljinama i blagom grbom u oba slučaja na 270 nm. Također je vidljivo povećanje koncentracije CDOM-a nakon uparivanja uzorka rijeke Save. Međutim, struktura CDOM-a se nije promijenila jer oba uzorka (upareni i originalni) pokazuju praktički istu krivulju spektralnih nagiba (umetak na [slici 4.14](#)).

Kako nakon razgradnje organskih tvari u uzorku morske vode UV razaranjem dolazi do potpunog smanjenja apsorpcije na valnim duljinama višim od 254 nm na kojima se provodilo zračenje, možemo pretpostaviti kako anorganske tvari prisutne u morskoj vodi, koje se ne razgrađuju ovim putem, ne pokazuju apsorpciju u ovom dijelu spektra te da je za apsorpciju na višim valnim duljinama odgovorna organska tvar.

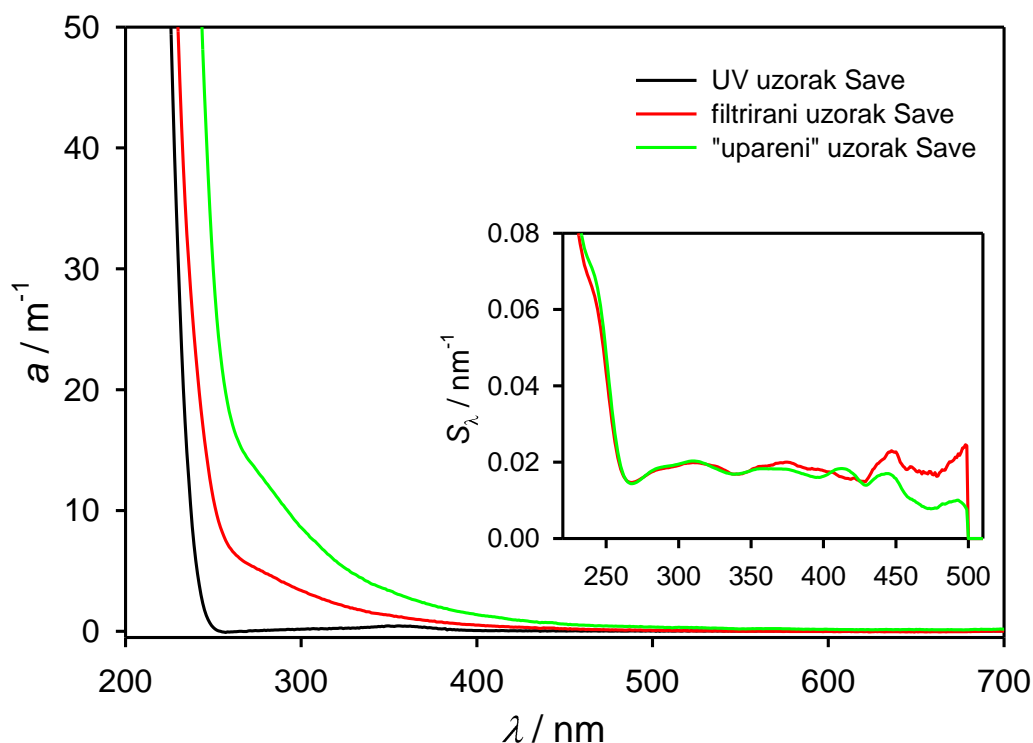
Povećanje apsorpcije na nižim valnim duljinama nakon UV zračenja može biti posljedica apsorpcije produkata nastalih razgradnjom organske tvari ili nastajanja karbonatnih iona reakcijom hidrogenkarbonata s hidroksilnim radikalima. Kod uzorka rijeke Save se ovo povećanje ne primjećuje jer je uzorak prije zračenja sniman tek nakon dodatka natrij azida dok u uzorak izdvojen za UV oksidaciju nije dodavan natrij azid.



**Slika 4.13.** Apsorpcijski spektri nefiltriranog uzorka morske vode i istog uzorka nakon UV zračenja.

Nakon UV zračenja uzorka riječne vode u apsorpcijskom spektru se javlja manji pik na 350 nm. Kako bi provjerili potječe li ovaj pik od tvari prisutnih u uzorku prije UV zračenja ili od tvari nastalih prilikom ovog postupka na isti način je testiran uzorak pitke vode uzet iz slavine. I na ovom uzorku je uočeno nastajanje maksimuma na istoj valnoj duljini nakon UV zračenja. Apsorpcija u ovom dijelu spektra je najvjerojatnije posljedica precipitacije karbonata nakon UV zračenja. Taloženje karbonata je posljedica lokalnog povećanja koncentracije karbonatnih iona i povišenja temperature prilikom UV zračenja.





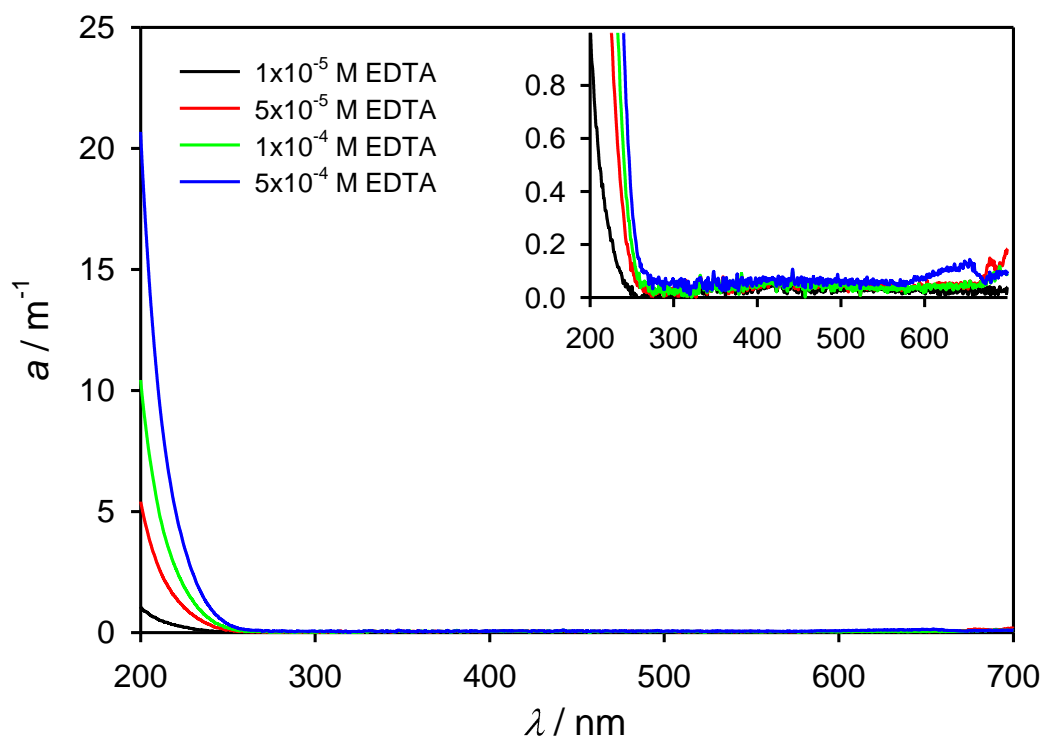
**Slika 4.14.** Apsorpcijski spektri filtriranog uzorka rijeke Save ( $\text{DOC} = 1,01 \text{ mg dm}^{-3}$ ) i istog uzorka nakon UV zračenja te nakon uparivanja ( $\text{DOC} \leq 3,48 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Umetak: krivulje spektralnog nagiba za originalni i upareni uzorak rijeke Save

### 4.3 Titracije s otopinom bakra

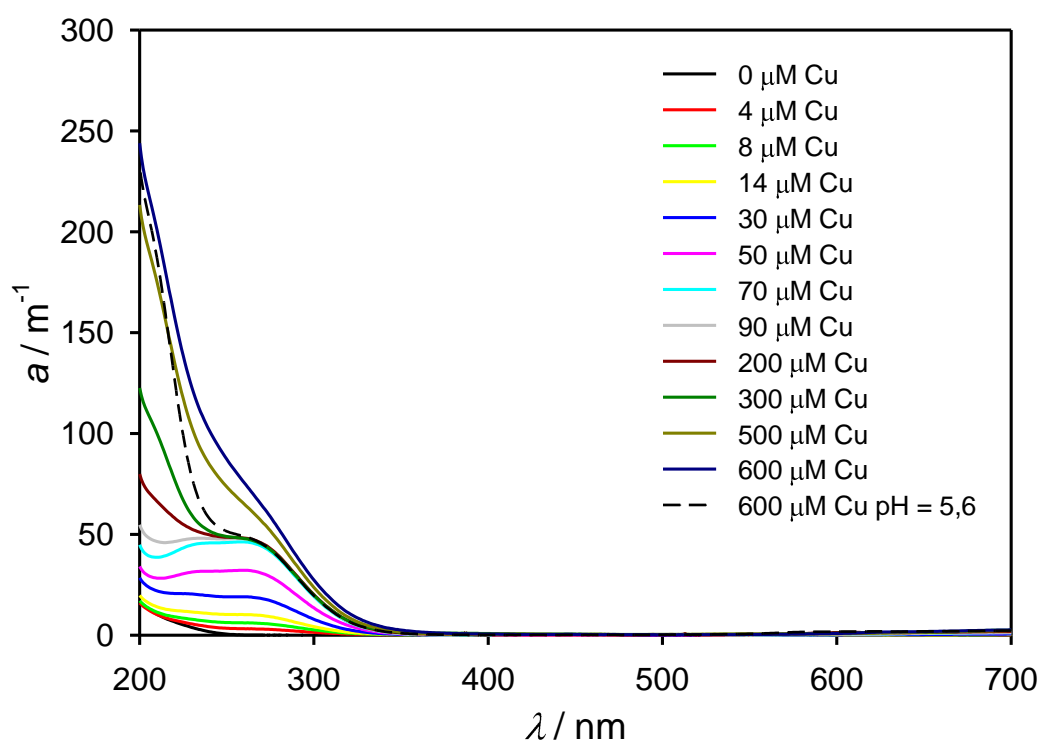
#### 4.3.1 Titracije otopine dinatrijeve soli EDTA

Na slici 4.15 su prikazani spektri otopine dinatrijeve soli EDTA, u koncentracijama  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  i  $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  iz čega se može vidjeti da EDTA ne apsorbira svjetlost na valnim duljinama višim od 260 nm.

Na slici 4.16 su prikazani apsorpcijski spektri snimani prilikom titracije otopine EDTA koncentracije  $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s otopinom bakra, pri  $\text{pH} = 6,0$ . Koncentracije dodataka bakra prikazane su na slici. Iz ovih krivulja se može vidjeti apsorpcija nastalog kompleksa Cu-EDTA koji pomiče apsorpciju obje komponente prema višim valnim duljinama s maksimumom na 265 nm. Ovaj maksimum (grba) pri koncentraciji višoj od  $\sim 70 \mu\text{mol dm}^{-3}$  bakra prestaje rasti, a nakon povećanja koncentracije bakra iznad  $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$  dolazi do skoka apsorbcije na valnim duljinama manjim od 260 nm.



**Slika 4.15.** Apsorpcijski spektri otopine dinatrijeve soli EDTA u koncentracijama  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  i  $2 \times 10^{-4}$   $\text{mol dm}^{-3}$  (pH = 6,0). Umetak prikazuje dio spektara do  $a = 1 \text{ m}^{-1}$ .

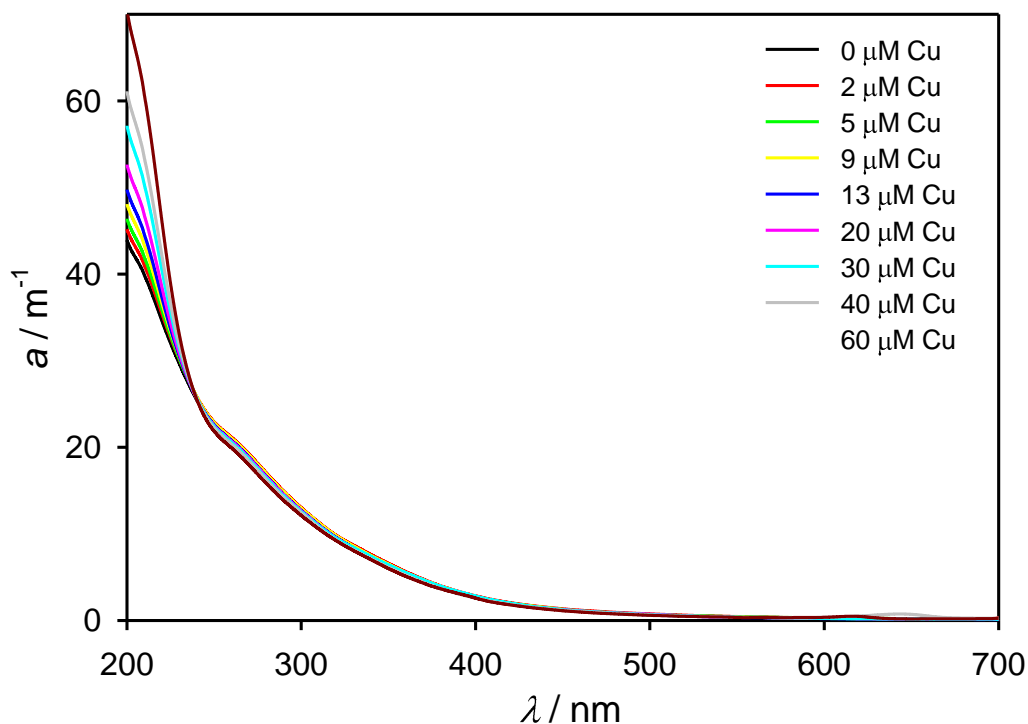


**Slika 4.16.** Apsorpcijski spektri otopine dinatrijeve soli EDTA koncentracije  $7,5 \times 10^{-5}$   $\text{mol dm}^{-3}$  tijekom titracije s otopinom bakra (pH = 6,0).

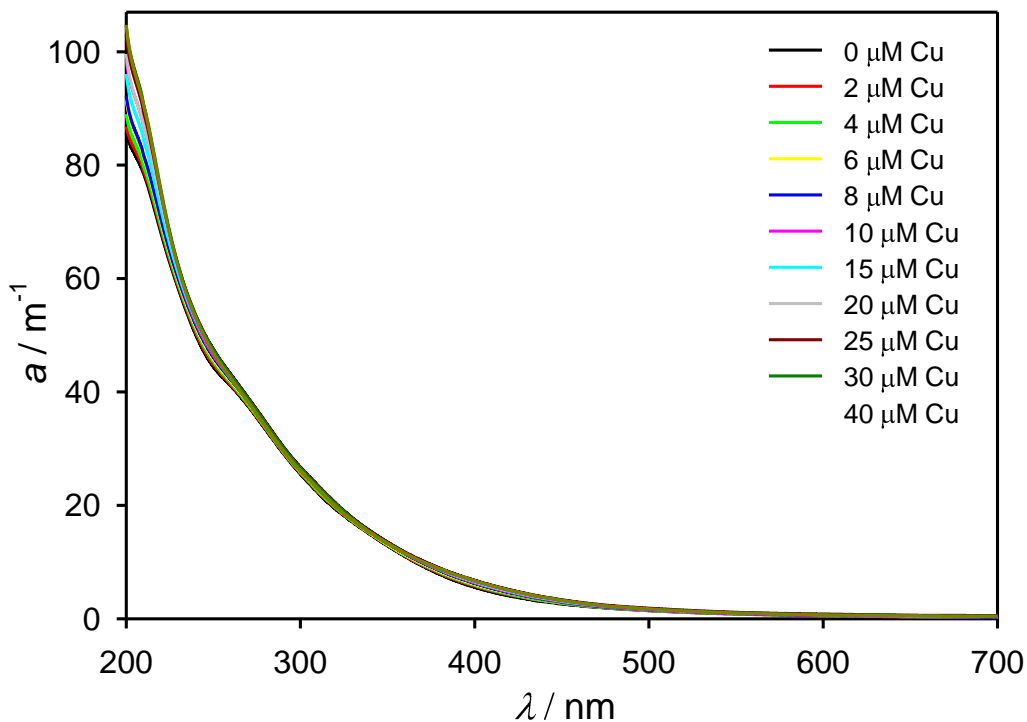
### 4.3.2 Titracije modelne otopine riječne fulvinske i huminske kiseline

Na slikama 4.17, 4.18 i 4.19 su prikazani apsorpcijski spektri riječne fulvinske kiseline, a na slici 4.20 huminske kiseline, snimani prilikom titracije modelne otopine s otopinom bakra na način opisan u poglavlju 3.5.1. Koncentracije dodataka bakra prikazane su na slikama.

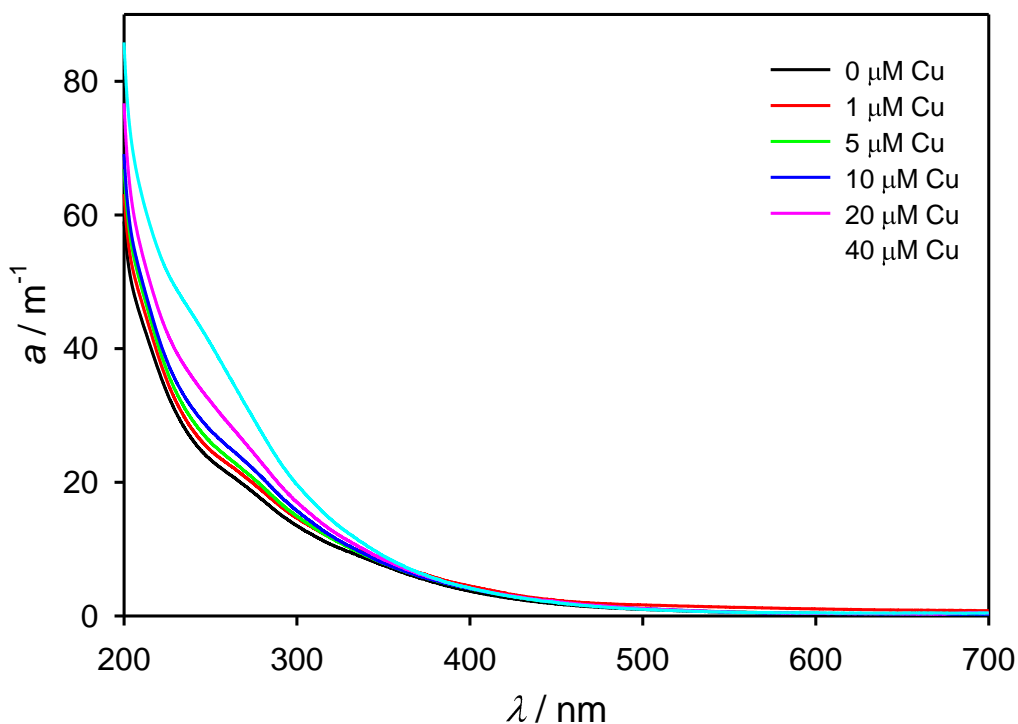
Titracije fulvinske kiseline su provedene pri različitim pH vrijednostima. Na slici 4.17 je prikazana titracija pri izmjerenom početnom pH = 4,5 koji se lagano snižavao dodatkom blago kisele otopine bakra, na slici 4.18 pri konstantnom pH = 6,3, a na slici 4.19 pri konstantnom pH = 9,0. Iz slika je vidljivo različito ponašanje apsorpcijskog spektra iste organske tvari u različitim uvjetima pH vrijednosti. Pri pH vrijednostima 4,5 i 6,3 promjene u spektru dodatkom bakra su vrlo male i jasno su vidljive samo promjene na valnim duljinama manjim od 230 nm, dok je kod pH = 9,0 razlika u cijelom spektru vidljiva već kod manjih koncentracija bakra i oblikom promjena odgovara ranije prikazanim spektrima bakra kod visokog pH (slika 4.5).



**Slika 4.17.** Apsorpcijski spektri riječne fulvinske kiseline (FA) koncentracije  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost =  $0,01 \text{ M}$ , početni pH = 4,5).



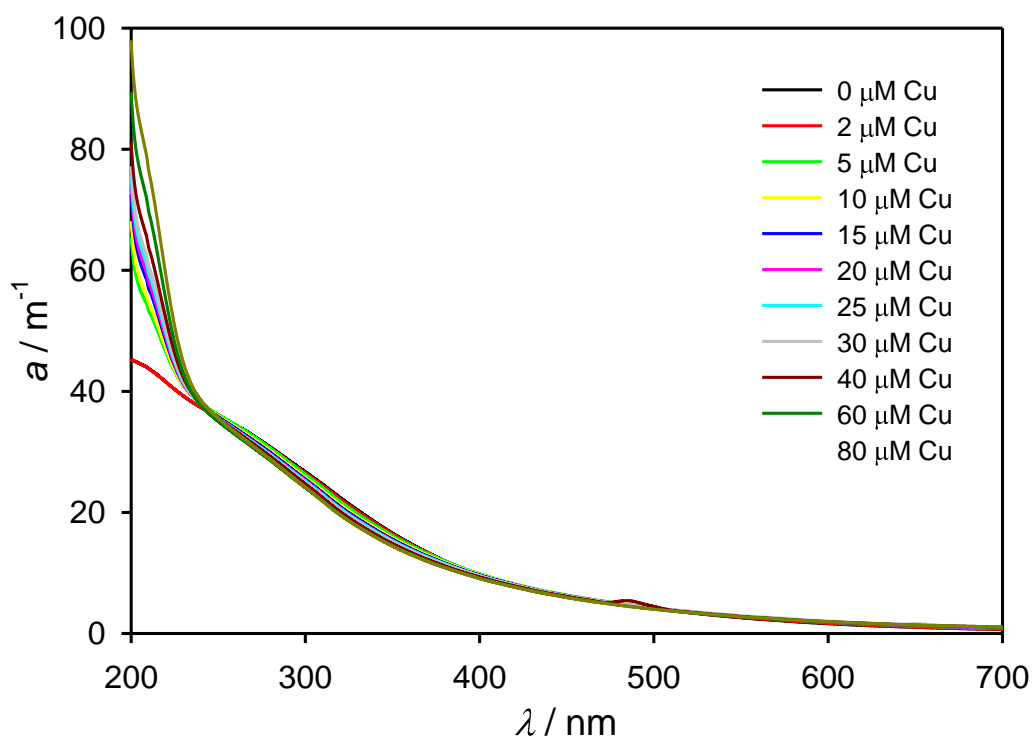
**Slika 4.18.** Apsorpcijski spektri riječne fulvinske kiseline (FA) koncentracije 10 mg dm<sup>-3</sup> tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3).



**Slika 4.19.** Apsorpcijski spektri riječne fulvinske kiseline (FA) koncentracije 5 mg dm<sup>-3</sup> tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost = 0,01 M, pH = 9,0).

Titracija huminske kiseline je provedena pri konstantnom pH = 6,3 koji se pokazao kao najprikladniji za kompleksiranje bakra s fulvinskom kiselinom. Titracije huminske i fulvinske kiseline u koncentracijama 5 i 10 mg dm<sup>-3</sup> pri ovoj pH vrijednosti su ispitivane više puta pri čemu se pokazala dobra ponovljivost rezultata te su u ovom radu prikazani rezultati samo jednog eksperimenta.

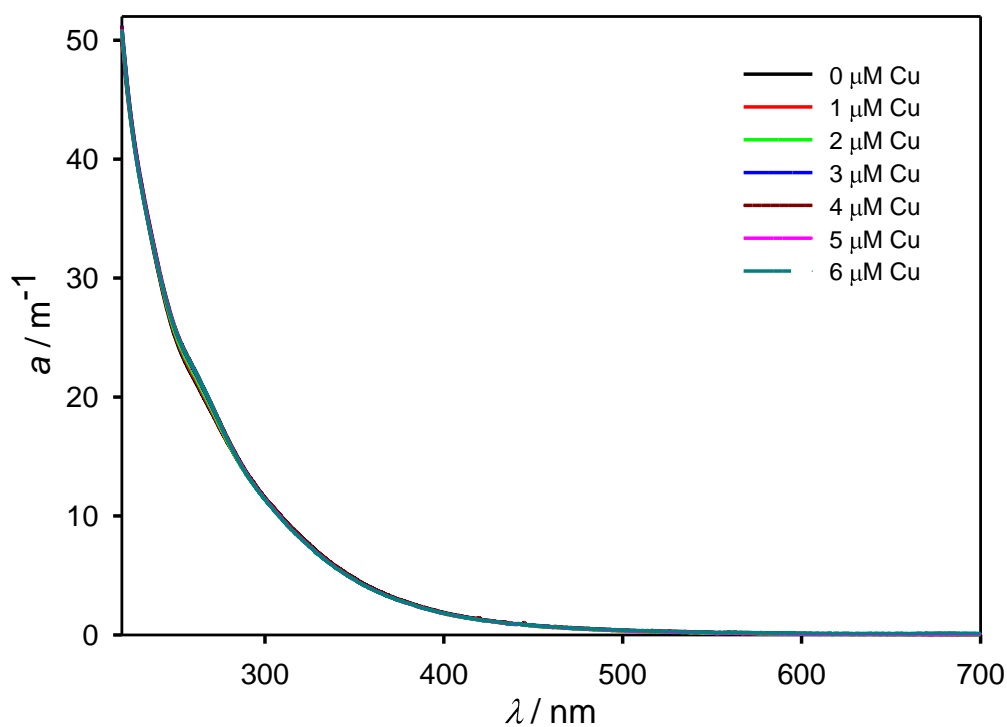
Kao i kod fulvinske kiseline promjene u spektru dodatkom bakra kod huminske kiseline su vrlo male te se i ovdje vidi porast apsorbancije na valnim duljinama manjim od 230 nm, no dok se povećanjem koncentracije bakra na višim valnim duljinama apsorpcija fulvinske kiseline povećava kod huminske se smanjuje (slika 4.20).



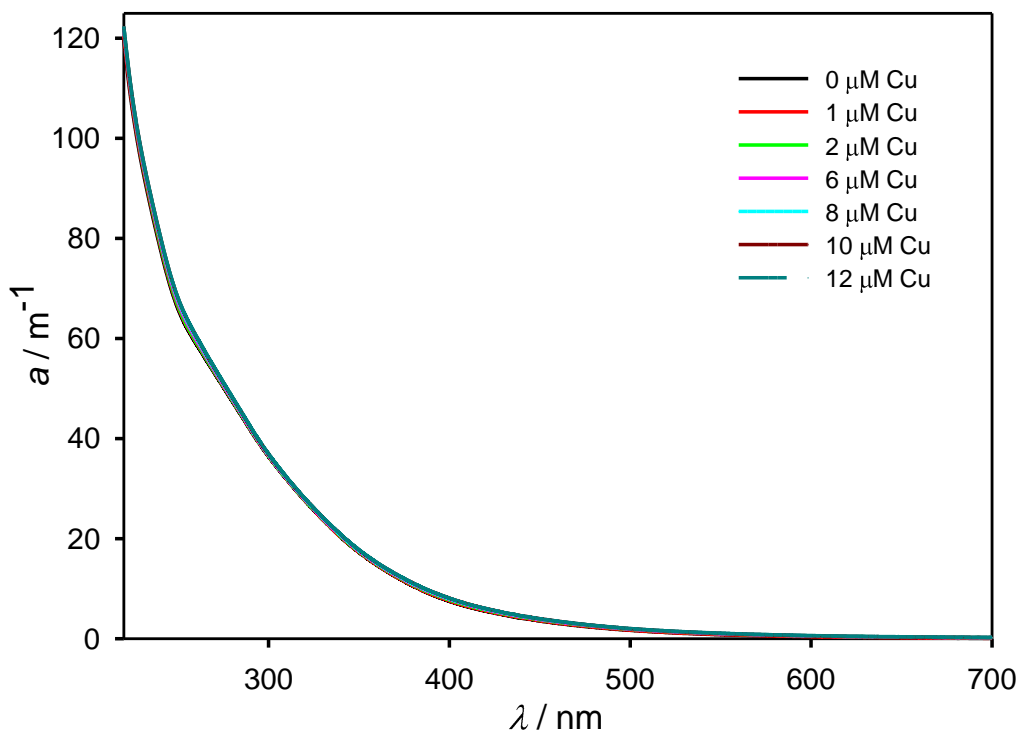
**Slika 4.20.** Apsorpcijski spektri riječne huminske kiseline (HA) koncentracije 5 mg dm<sup>-3</sup> tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3).

### 4.3.3 Titracije modelne otopine morske fulvinske i huminske kiseline

Na slikama 4.21 i 4.22 su prikazani apsorpcijski spektri morske fulvinske odnosno huminske kiseline u koncentraciji  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ , snimani prilikom titracije modelne otopine s otopinom bakra, pri  $\text{pH} = 6,3$  na način opisan u poglavlju 3.5.1. Koncentracije dodataka bakra prikazane su na slikama. Kod morske organske tvari je do zasićenja došlo pri vrlo niskim koncentracijama bakra te su snimani apsorpcijski spektri do koncentracije dodataka bakra od 6 odnosno  $12 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Kao i kod riječne organske tvari promjene u spektru dodatkom bakra, posebno kod ovako niskih koncentracija, su vrlo male te su na ovim slikama vrlo slabo vidljive.



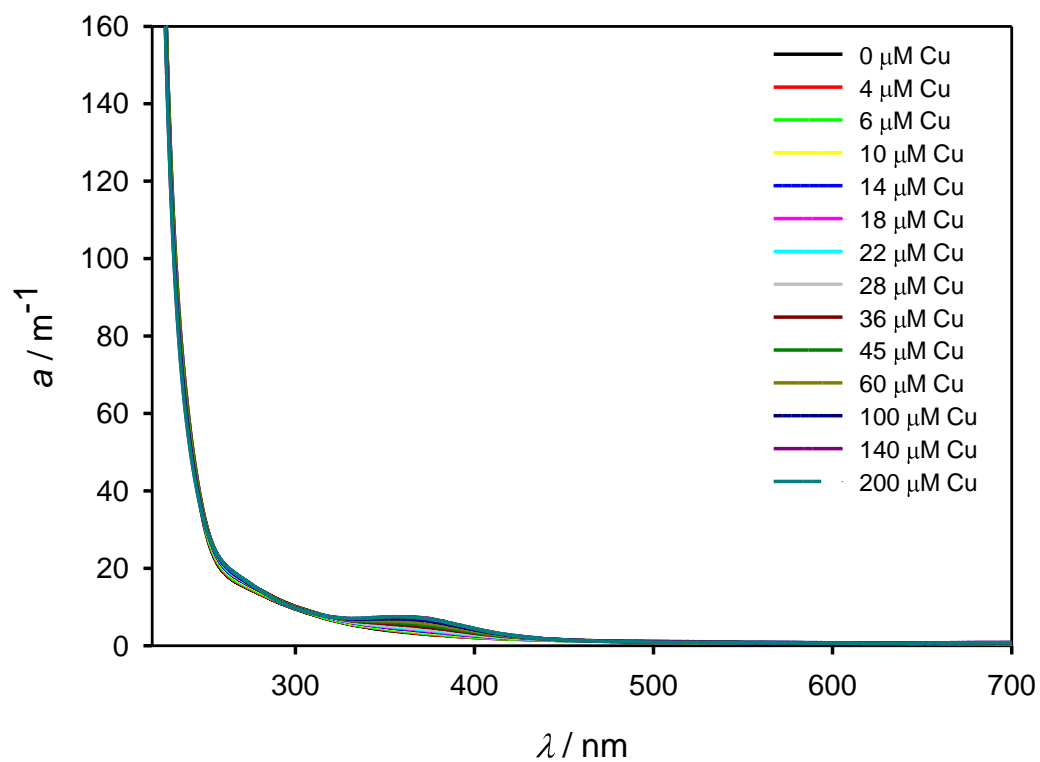
**Slika 4.21.** Apсорpcijski spektri morske fulvinske kiseline (AFSLE) koncentracije  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost =  $0,01 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6,3$ ).



**Slika 4.22.** Apsorpcijski spektri morske huminske kiseline (AHSLE) koncentracije  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  tijekom titracije s otopinom bakra (ionska jakost =  $0,01 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6,3$ ).

#### 4.3.4 Titracije prirodnog uzorka riječne vode

Na [slici 4.23](#) prikazani su apsorpcijski spektri snimani prilikom titracije uparenog prirodnog uzorka riječne vode iz rijeke Save s otopinom bakra na način opisan u [poglavlju 3.5.1](#). Koncentracije dodataka bakra prikazane su na slikama. Prirodni pH ovog uzorka je 8,1 pri kojem je topljivost bakra relativno mala. Kako bi se izbjegao utjecaj precipitacije bakra pri ovom pH titracija je provedena, slično kao i u drugim eksperimentima, pri  $\text{pH} = 6,0$ . Kao što je navedeno u [poglavlju 3.5.2.4](#) očekivana koncentracija otopljenog organskog ugljika, prema volumenu otopine uzorka prije i nakon uparivanja, je  $3,49 \text{ mg dm}^{-3}$ , no prosječni omjer apsorbancije uzorka nakon i prije uparivanja iznosi 2,70 prema kojem je izračunata koncentracija otopljenog organskog ugljika u uparenom uzorku  $2,73 \text{ mg dm}^{-3}$ .



**Slika 4.23.** Apsorpcijski spektri uparenog prirodnog uzorka riječne vode iz rijeke Save tijekom titracije s otopinom bakra ( $DOC \leq 3,48 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $pH = 6,0$ ).





## 5. Rasprava

---

## 5.1 Utjecaj nitrata

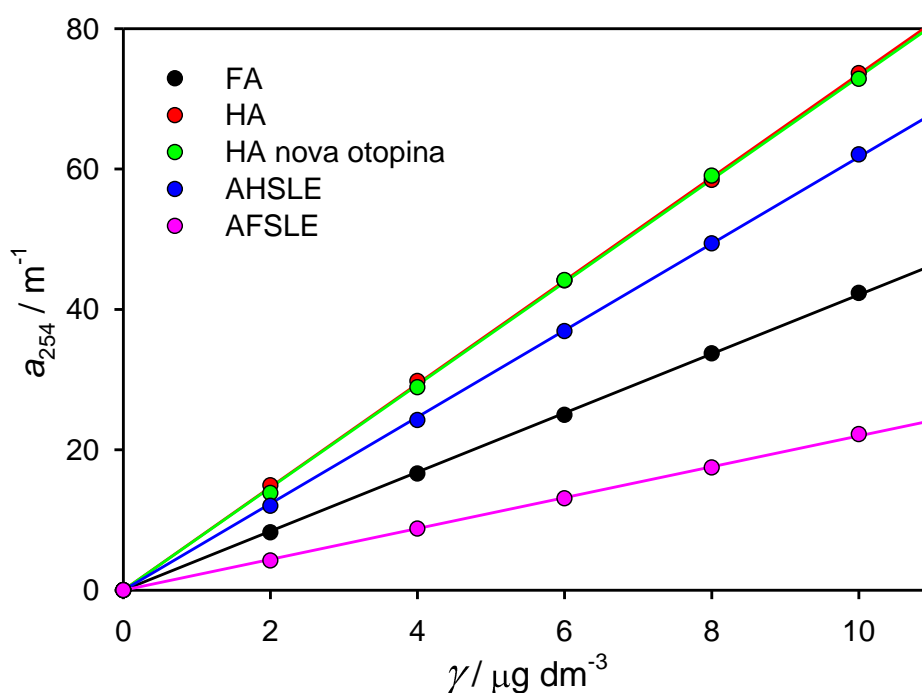
Kao što je prikazano na [slici 4.3](#) otopina nitrata pokazuje apsorpciju na valnim duljinama značajnim za kompleksiranje organskih liganada s metalima, što se odnosi posebno na apsorpcijski maksimum na 300 nm. Kako su promjene u CDOM spektrima nastale kompleksiranjem s metalom vrlo male, apsorpcijski maksimum nitrata onemogućava proučavanje ove interakcije zbog čega su daljnja ispitivanja provedena s otopinom bakra pripremljenom otapanjem bakrene žice.

Međutim, Yin i suradnici<sup>58</sup> su u svojoj studiji istraživanja interakcija organskih liganda (EPS – *extracellular polymeric substances*) s različitim metalima koristili otopine pripravljene iz soli nitrata. U navedenoj studiji prikazani su apsorpcijski spektri organske tvari prilikom titracije s otopinama željeza, bakra i olova te natrija i kalcija s prisutnim nitratima iz samih otopina metala. Dobiveni rezultati pokazuju porast apsorpcije na valnim duljinama manjim od 240 nm prilikom dodataka metala dok to nije slučaj kod dodataka otopine natrija i kalcija, iako je u ovom radu potvrđen značajan porast apsorpcije na ovim valnim duljinama dodatkom nitrata ([slika 4.3](#)). U ovom radu je također utvrđeno da povećanjem koncentracije nitrata iznad  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$  dolazi do porasta apsorpcijskog maksimuma na 300 nm ([vidljivo na umetku slike 4.3](#)), a u navedenoj studiji je diferencijalni apsorpcijski koeficijent na ovoj valnoj duljini predložen kao parametar za procjenu vezanih metala na organske ligande. Ne ulazeći u vjerodostojnost i ispravnost ove studije, ipak je bitno istaknuti problem odabira kemijskih formi metala koji može imati znatan utjecaj na rezultate mjerenja, a time i na konačne zaključke studije.

## 5.2 Obrada apsorpcijskih spektara modelnih otopina

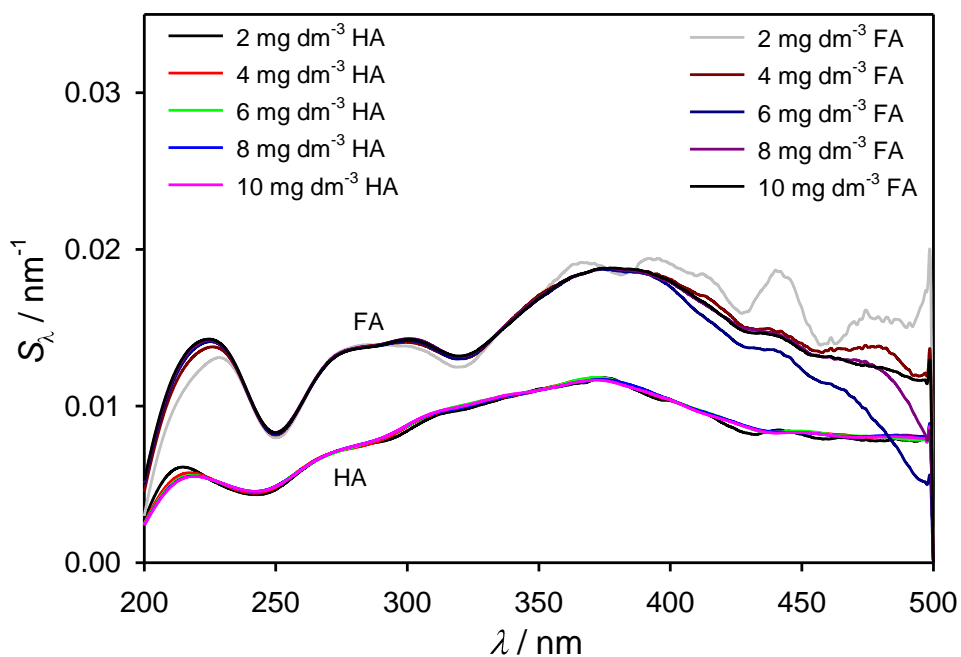
Uobičajeni parametar kvantitativne mjere koncentracije kromoforne organske tvari je mjerenje apsorpcije na 254 nm, koja uz određeni faktor odgovara i koncentraciji DOC-a. Za prirodne uzorke, ovisnost apsorpcije o koncentraciji DOC-a slijedi određenu generalnu linearnu ovisnost te se za područja gdje je utvrđena direktna korelacija apsorpcije i koncentracije DOC-a ona može uspješno koristiti za brzu procjenu DOC-a.<sup>64</sup> Međutim, s obzirom da je prirodna organska tvar heterogenog karaktera te svaki tip CDOM-a ima karakteristični molarni apsorpcijski koeficijent, ta ovisnost se uglavnom koristiti samo za grubu procjenu koncentracije DOC-a. Na [slici 5.1](#) je prikazana vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 254 nm ( $a_{254}$ ) dobivenog snimanjem spektara riječne i

morske fulvinske i huminske kiseline. Vrijednost apsorpcijskog koeficijenta proporcionalno raste s porastom koncentracije što je definirano porastom broja apsorbirajućih molekula Lambert-Beerovim zakonom (jednadžba 2). Prema literaturi apsorpcija na 254 nm korelira s molekulskom masom i aromatičnošću organske tvari.<sup>26</sup> Fulvinske kiseline su općenito manje molekulske mase i aromatičnosti od huminskih pa pokazuju manju apsorpciju na ovoj valnoj duljini. Prema literaturi također postoje razlike u strukturi između morskih i riječnih huminskih i fulvinskih kiselina pa morske kiseline pokazuju manju apsorpciju što je isto tako povezano s manjom molekulskom masom i aromatičnošću.

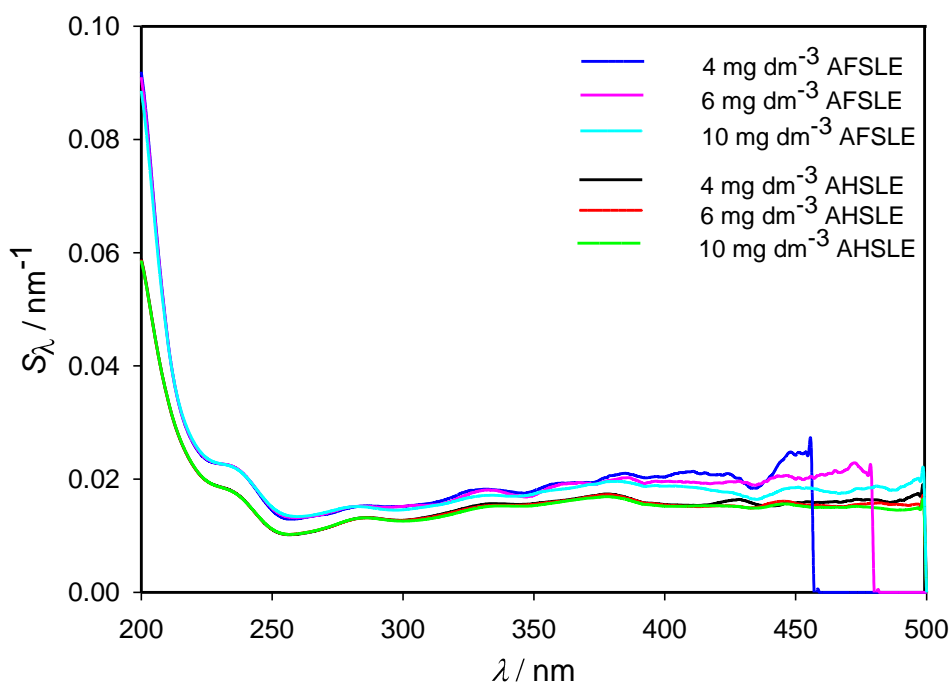


**Slika 5.1.** Vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 254 nm u ovisnosti o koncentraciji riječne i morske fulvinske i huminske kiseline.

Na slikama 5.2 i 5.3 prikazane su krivulje spektralnih nagiba<sup>49</sup> izračunatih s „prozorom“ od 20 nm i korakom 1 nm. Na slici 5.2 prikazane su krivulje spektralnih nagiba modelnih otopina riječne huminske i fulvinske kiseline u koncentracijama 2, 4, 6, 8 i 10  $\text{mg dm}^{-3}$ , a na slici 5.3 modelnih otopina morske huminske i fulvinske kiseline u koncentracijama 4, 6 i 10  $\text{mg dm}^{-3}$ .



**Slika 5.2.** Krivulje spektranih nagiba modelnih otopina riječne huminske i fulvinske kiseline u koncentracijama 2, 4, 6, 8 i 10 mg dm<sup>-3</sup>.



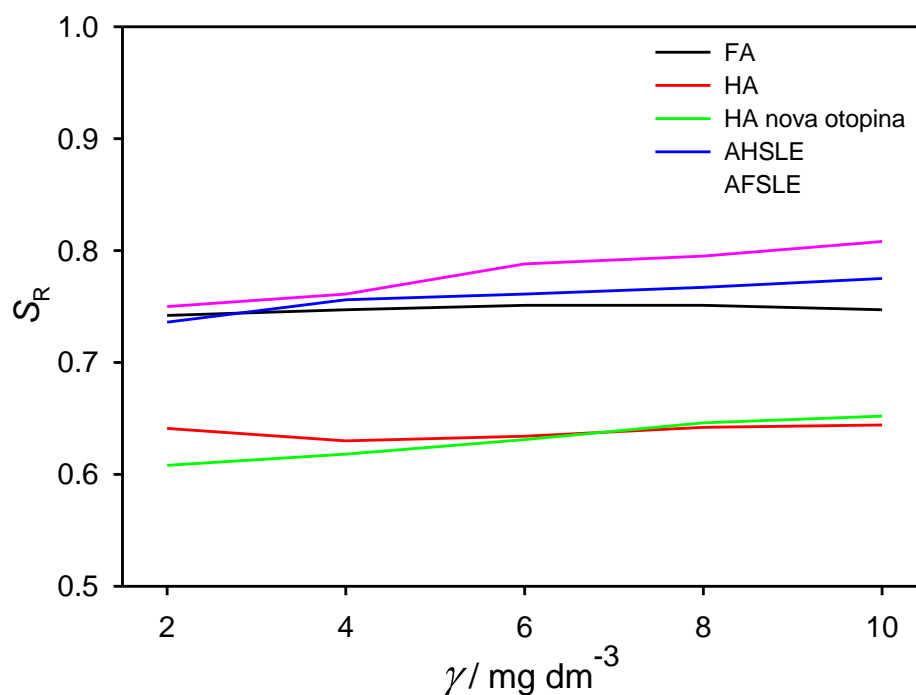
**Slika 5.3.** Krivulje spektranih nagiba modelnih otopina morske huminske i fulvinske kiseline u koncentracijama 4, 6 i 10 mg dm<sup>-3</sup>.

Za razliku od apsolutnih vrijednosti apsorbancija koje rastu s povišenjem koncentracije organske tvari, očekuje se da se spektralni nagibi za istu organsku tvar ne mijenjaju s promjenom koncentracije organske tvari. Krivulje na slikama 5.2 i 5.3 jasno pokazuju tu karakteristiku, koja je vrlo bitna jer omogućava usporedbu optičkih svojstava uzoraka pri različitim koncentracijama organske tvari u slučajevima kao što je npr. titracija s ionima metala. Male razlike između pojedinih krivulja pripisuju se spektralnom šumu (*noise*) koje dolazi više do izražaja kod većih valnih duljina, jer je u tim područjima apsorbancija vrlo mala.

Spektralni nagibi fulvinske kiseline su veće vrijednosti što je povezano s manjom molekulskom masom. Riječna huminska kiselina pokazuje porast spektralnih nagiba na valnim duljinama iznad 250 nm, s dva maksimuma na 330 i 380 nm. Fulvinska kiselina pokazuje veće promjene u spektru s porastom valnih duljina i izražajnije maksimume na 230, 275, 300 i 380 nm.

Izgled krivulja spektralnih nagiba morskih organskih tvari je različit u odnosu na riječne organske tvari zbog sastava elektrolita i načina izolacije koje je prilagođeno morskoj vodi. Ovdje se javlja nagli pad vrijednosti spektralnih nagiba do valne duljine 250 nm kao posljedica znatnog pada apsorbancije u tom području (slike 4.8 i 4.9). Na valnim duljinama iznad 250 nm, promjene su manje s karakterističnim maksimumima koji su manje izraženi nego u riječnim modelima.

Na slici 5.4 je prikazana vrijednost omjera karakterističnih spektralnih nagiba izračunatih u području valnih duljina 275-295 nm i 350-400 nm ( $S_R = S_{275-295}/S_{350-400}$ ) u ovisnosti o koncentraciji riječne i morske huminske i fulvinske kiseline. Kako je već gore spomenuto, vrijednost spektralnog nagiba neovisna je o koncentraciji te su stoga i vrijednosti njihovih omjera za određenu tvar konstantne, kao što je i prikazano na slici 5.4. Prema literaturi<sup>26</sup> spektralni nagibi su obrnuto proporcionalni molekulskoj masi i aromatičnosti te najmanji omjer spektralnih nagiba pokazuje riječna huminska kiselina, a najveći morska fulvinska kiselina.



**Slika 5.4.** Vrijednost omjera spektralnih nagiba u ovisnosti o koncentraciji riječne i morske fulvinske i huminske kiseline.

Na slikama 5.1 i 5.4 također možemo vidjeti poklapanje vrijednosti apsorpcijskog koeficijenta na 254 nm i omjera spektralnih nagiba za huminsku kiselinu iz modelne otopine (iz 2008 godine) i svježe otopine pripravljene otapanjem krutog uzorka. Prema tome zaključujemo da su uz dobro skladištenje (tamno i hladno mjesto) otopine huminske kiseline stabilne kroz duži vremenski period (čak nekoliko godina), odnosno UV/VIS spektri se ne mijenjaju niti po apsorpciji na 254 nm niti po obliku.

### 5.3 Usporedba prirodnih uzoraka s modelnim otopinama

U tablici 5.1 su prikazane usporedbe parametara prirodnih uzoraka i modelnih otopina organske tvari s vrijednostima pronađenim u literaturi.<sup>26</sup> Vidi se da su svi izmjereni parametri iz ovog rada u području koje se navodi u literaturi. Niže vrijednosti su zabilježene samo za apsorpcijski koeficijent ( $a_{375}$ ) izmjeren u rijeci Savi u odnosu na uobičajeni raspon „svjetskih“ rijeka. Kako je apsorpcija ovisna o koncentraciji DOC-a, vrlo je moguće da je niža vrijednost posljedica niske razine DOC izmjerene u rijeci Savi (DOC = 1,01 mg dm<sup>-3</sup>), a da je pripadajuća „svjetska“ koncentracija DOC-a znatno viša.

**Tablica 5.1.** Pregled usporedbe karakterističnih parametara mjerenih spektralnih krivulja s literaturnim podacima.

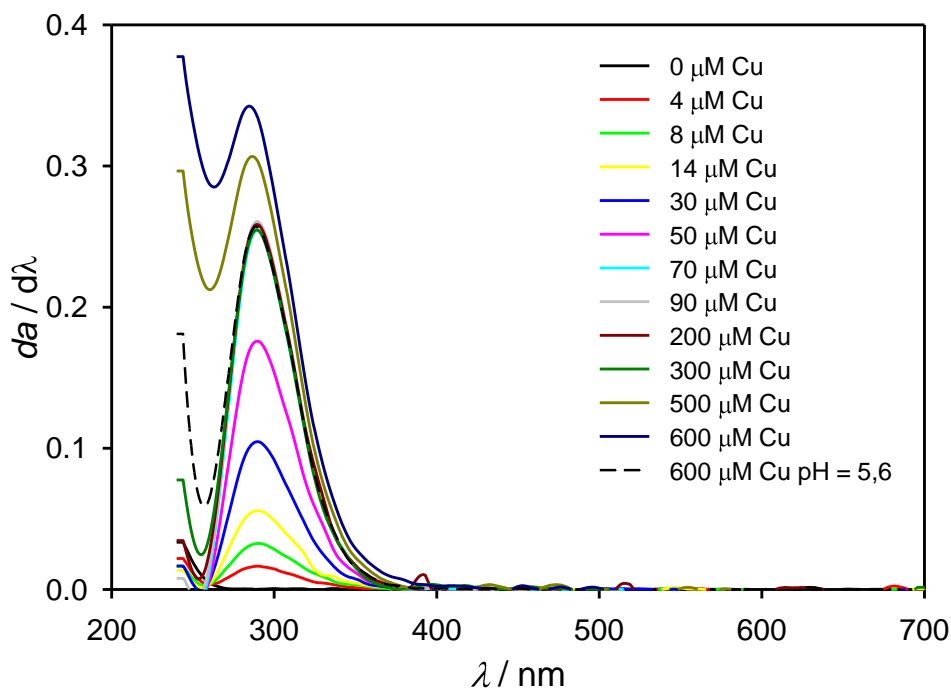
	Literatura		Uzorci		Modelne otopine (2 mg dm <sup>-3</sup> )			
	rijeke	more	Sava	more	HA	FA	AHSLE	AFSLE
$S_{300-600} / \text{nm}^{-1}$	0,015–0,019	0,01–0,03	0,020	0,031	0,010	0,016	0,016	0,020
$S_{275-295} / \text{nm}^{-1}$	0,01–0,02	0,02–0,06	0,017	0,035	0,007	0,014	0,012	0,014
$S_R / \text{nm}^{-1}$	< 1	> 1,50	0,893	1,121	0,673	0,865	0,784	0,728
$a_{375} / \text{m}^{-1}$	5,00–25,00	0,00–0,50	0,895	0,063	6,083	3,455	2,242	0,543

## 5.4 Titracije s otopinom bakra

### 5.4.1 Obrada spektara dobivenih titracijom dinatrijeve soli EDTA

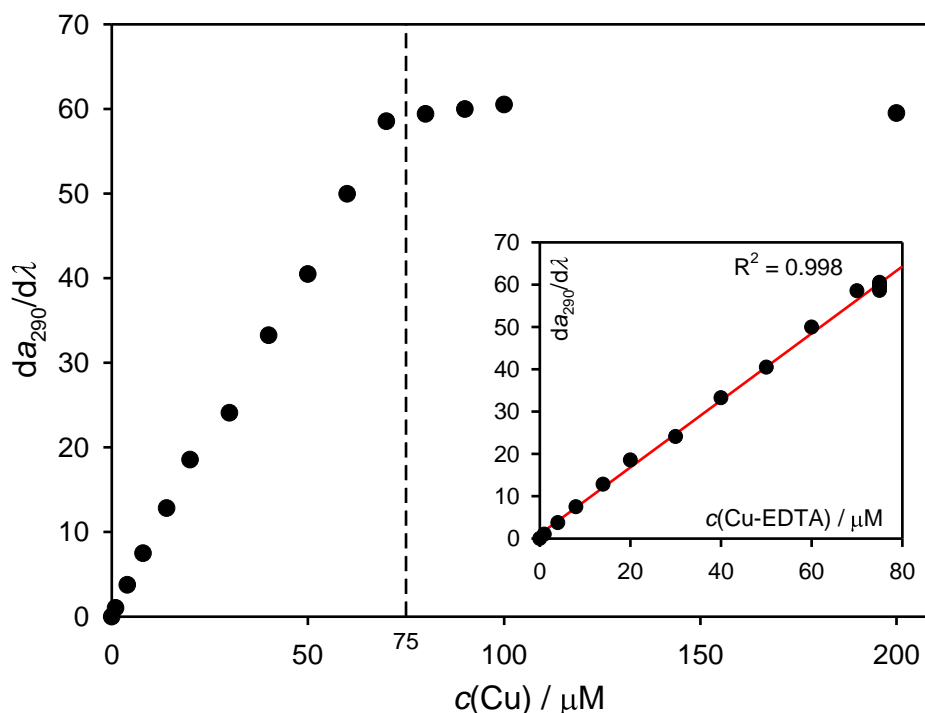
Na [slici 5.5](#) prikazani su derivirani apsorpcijski spektri (sa [slike 4.16](#)) snimani prilikom titracije otopine dinatrijeve soli EDTA koncentracije  $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s otopinom bakra. Derivativni oblik prikaza je odabran radi lakšeg uočavanja promjena u spektrima, koji u ovom slučaju daju maksimum na 290 nm. Na slici se jasno vidi porast maksimuma s koncentracijom dodanog bakra, odnosno formiranog Cu-EDTA kompleksa. Praćenjem porasta maksimuma deriviranih spektara na 290 nm možemo zaključiti da pri koncentraciji od  $70 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  dolazi do zasićenja aktivnih mjesta EDTA slobodnih za vezanje bakrovih iona. Nakon zasićenja raste koncentracija slobodnog bakra u otopini, a pri koncentracijama iznad  $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  dolazi do precipitacije bakra ([slika 5.5](#)). Ovo je vidljivo i na [slici 4.16](#) gdje nakon povećanja koncentracije bakra iznad  $\sim 200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  dolazi do većeg porasta apsorbanacije na valnim duljinama ispod 260 nm što odgovara izgledu apsorpcijske krivulje slobodnog bakra ([slika 4.4](#)). Prema skoku apsorpcije pri koncentracijama  $500 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  zaključujemo da dolazi do znatne precipitacije slobodnog bakra u otopini, što potvrđuje pad apsorbanacije smanjenjem pH vrijednosti na 5,6 zbog ponovnog otapanja bakra te ponovni porast dodatkom otopine NaOH.





**Slika 5.5.** Prva derivacija apsorpcijskih spektara snimanih prilikom titracije otopine dinatrijeve soli EDTA koncentracije  $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  s otopinom bakra (pH = 6,0).

Bakar s EDTA gradi vrlo jaki kelatni kompleks s konstantom stabilnosti  $\log K = 20.49$  te se, shodno modelu, očekivalo da u koncentraciji do  $75 \mu\text{M}$  bakar bude  $> 99 \%$  u Cu-EDTA kompleksu. Na [slici 5.6](#) prikazane su vrijednost prve derivacije apsorpcije na  $290 \text{ nm}$ , gdje ovi spektri pokazuju derivativni maksimum, u odnosu na koncentraciju bakra dodanog u otopinu. Jasno se vidi linearan porast maksimuma do koncentracije od  $75 \mu\text{M}$ , a nakon zasićenja EDTA, vrijednost ostaje konstantna. Umetak na [slici 5.6](#) pokazuje ovisnost maksimuma na  $290 \text{ nm}$  o modeliranoj koncentraciji Cu-EDTA kompleksa pomoću Visual MINTEQ programa. Dobivena je vrlo jasna i statistički značajna linearna ovisnost ( $R^2 = 0.998$ ), što dokazuje primjenjivost spektrometrijske metode za karakterizaciju bakra s EDTA i da se maksimum prve derivacije može uspješno koristiti kao značajka kod obrade UV/Vis spektara.



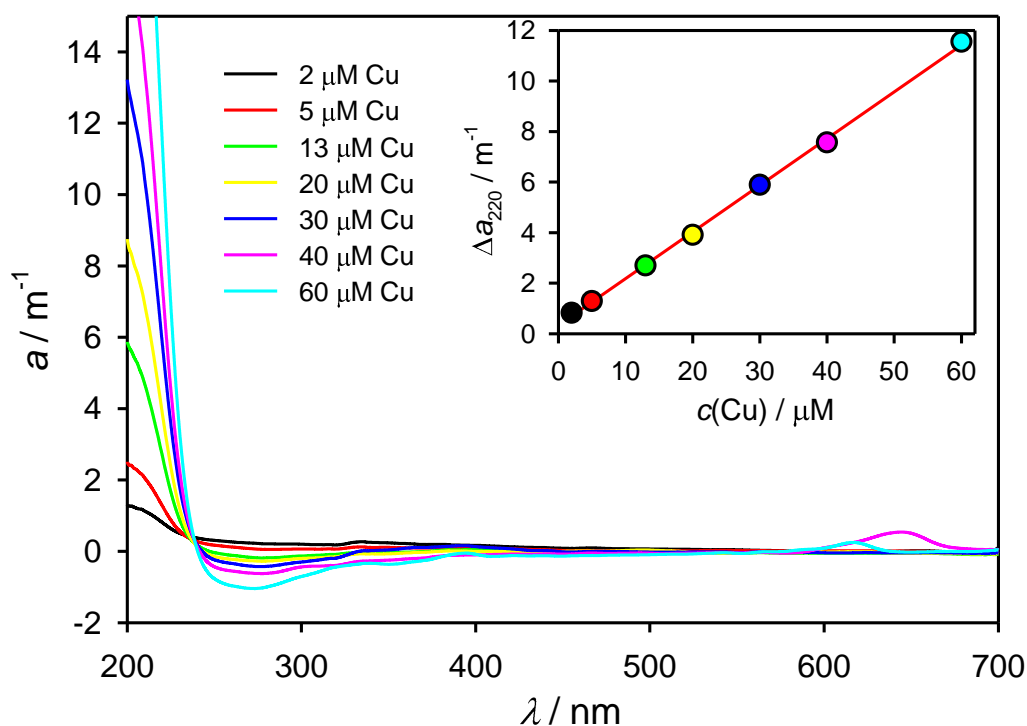
**Slika 5.6.** Vrijednost prve derivacije apsorbancije na 290 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog u otopinu ( $c(\text{EDTA}) = 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,0$ ). Umetak: ovisnost prve derivacije apsorbancije na 290 nm o koncentraciji Cu-EDTA kompleksa izračunatog pomoću Visual MINTEQ pri  $\text{pH} = 6,0$  i koncentraciji EDTA u otopini  $75 \mu\text{M}$ .

#### 5.4.2 Obrada spektara dobivenih titracijom riječne fulvinske kiseline

Kako su promjene u apsorpcijskim spektrima prilikom titracija otopina organske tvari s bakrom vrlo male, spektri su prikazani u diferencijalnom obliku (**jednadžba 9**), koji prikazuje razlike u spektru (u apsorbancijama) nakon svakog dodatka otopine bakra u odnosu na spektar bez prisutnog bakra u istim uvjetima. Bitno je ne miješati diferencijalni, i prethodno spomenuti, derivativni oblik (kod Cu-EDTA spektara).

##### 5.4.2.1 Interakcija bakra s fulvinskom kiselinom (FA) kod $\text{pH} = 4,5$

Na **slici 5.7** prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline koncentracije  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 4,5$  od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Kao i na **slici 4.17** možemo vidjeti porast apsorbancije na valnim duljinama manjim od 240 nm koji odgovara izgledu apsorpcijske krivulje slobodnog bakra.

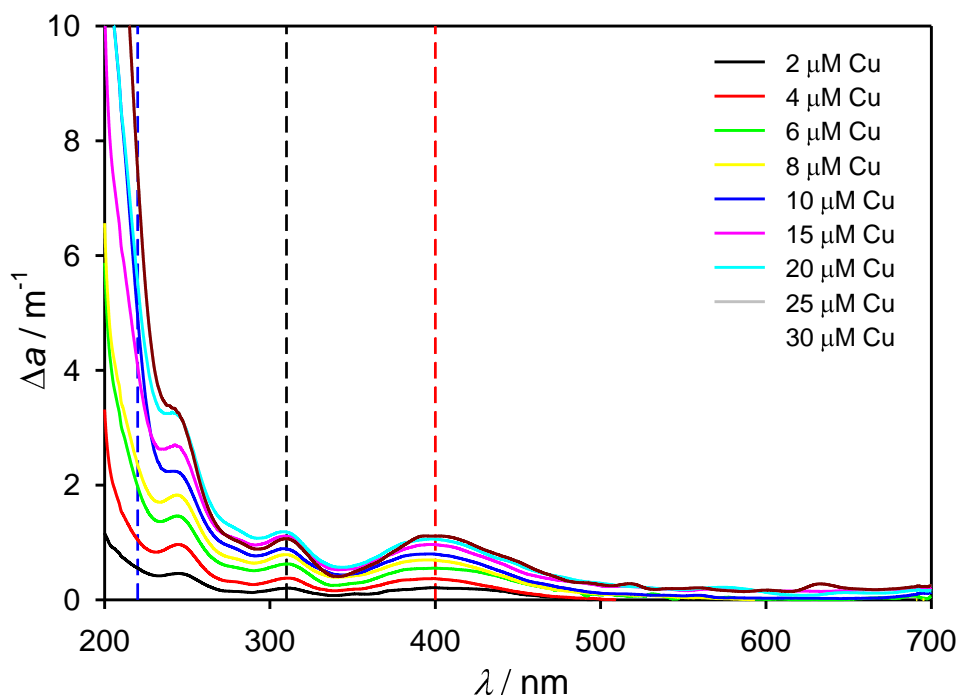


**Slika 5.7.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{FA}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 4,5) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Umetak: vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 220 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog u otopinu.

Na umetku [slike 5.7](#) je prikazan linearni porast apsorpcijskog koeficijenta na 220 nm s porastom koncentracije bakra dodanog u otopinu. Kako je već ranije bilo naglašeno, u ovom području valnih duljina predominantna je apsorpcija samog bakra te ova linearna ovisnost nije vezana za kompleks bakra s fulvinskom kiselinom. U diferencijalnom spektru je također vidljivo smanjenje apsorpcije pri valnim duljinama iznad 240 nm s dva pika na 275 i 360 nm što prema literaturi<sup>54</sup> odgovara protonaciji zbog pada pH vrijednosti dodatkom kisele otopine bakra. Prema ovome možemo zaključiti da pri pH vrijednosti manjoj od 4,5 ne dolazi do znatnijeg vezanja bakra na funkcionalne skupine fulvinske kiseline te da smanjenjem pH vrijednosti i protonacijom ovih funkcionalnih skupina dolazi do smanjenja apsorpcije pri čemu se javljaju dva pika na 275 i 360 nm.

### 5.4.2.2 Interakcija bakra s fulvinskom kiselinom (FA) kod pH = 6,3

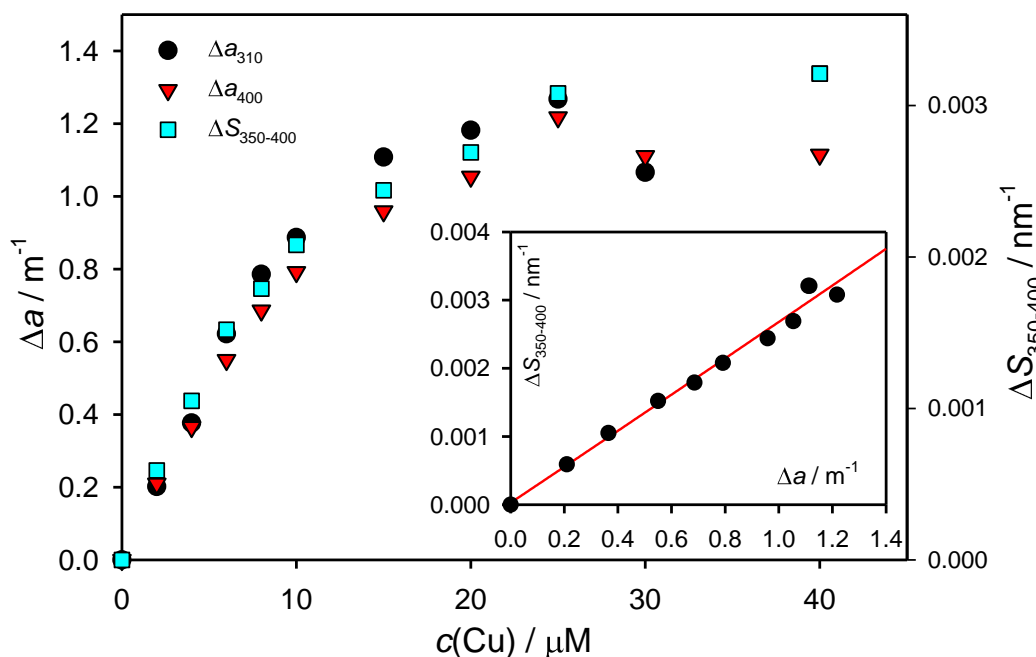
Na **slici 5.8** prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline koncentracije  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 6,3$  od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Ovdje su vidljiva tri pika na 250, 310 i 400 nm te je jasno vidljiv porast apsorbancije ovih pikova s porastom koncentracije bakra. Izgled spektra slaže se s rezultatima pronađenim u literaturi.<sup>53, 57</sup>



**Slika 5.8.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{FA}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M,  $\text{pH} = 6,3$ ) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra.

Do zasićenja dolazi kod koncentracije bakra oko  $25 \mu\text{mol dm}^{-3}$  što je vidljivo na **slici 5.9** u kojoj su prikazane vrijednosti diferencijalnih apsorpcijskih koeficijenata na valnim duljinama apsorpcijskog maksimuma (310 i 400 nm), koje upućuju na mjesta funkcionalnih skupina, u ovisnosti o koncentraciji bakra.

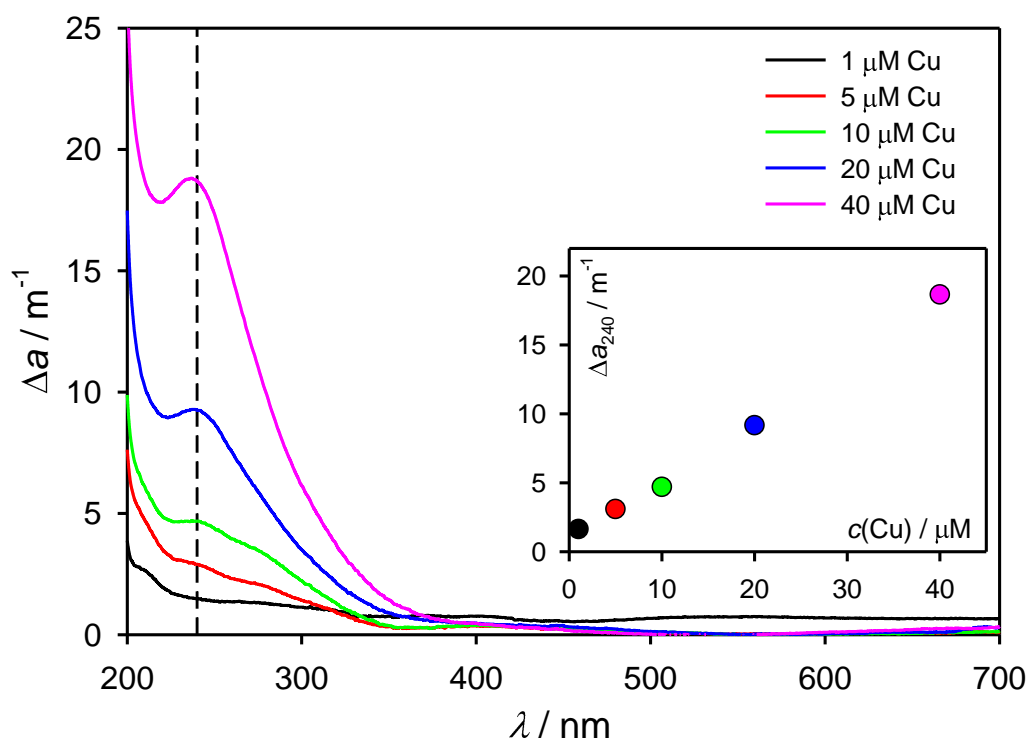
Na **slici 5.9** prikazana je i vrijednost diferencijalnog spektralnog nagiba (razlika spram spektralnog nagiba bez dodanog bakra) izračunatog pomoću eksponencijalnog modela u intervalu od 350-400 nm (**jednadžba 10**) u odnosu na koncentraciju bakra u otopini, gdje je također vidljivo zasićenje pri koncentraciji bakra od oko  $25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .



**Slika 5.9.** Vrijednost diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na 310 i 400 nm te diferencijalnog spektralnog nagiba u intervalu 350-400 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog u otopinu ( $\gamma(\text{FA}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3). Umetak: ovisnost diferencijalnog spektralnog nagiba ( $\Delta S_{350-400}$ ) o diferencijalnom apsorpcijskom koeficijentu ( $\Delta a_{400}$ ).

#### 5.4.2.3 Interakcija bakra s fulvinskom kiselinom (FA) kod pH = 9

Na slici 5.10 prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline koncentracije  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  pri pH = 9,0 od spektara dobivenih titracijom navedene otopine s bakrom. Razlike u spektru su puno veće nego kod pH = 6,3 pri čemu se javlja samo jedan maksimum na 240 nm, što odgovara izgledu apsorpcijskih spektara bakar hidroksida (slika 4.5). Da su razlike u spektru rezultat precipitacije a ne nastajanja kompleksa potvrđuje i linearni porast apsorpcijskog maksimuma i pri većim koncentracijama bakra nego što je utvrđeno kao zasićenost funkcionalnih skupina (umetak na slici slike 5.10). Ovaj eksperiment pokazuje da visoke pH vrijednosti nisu adekvatne za karakterizacija kompleksa bakra s fulvinskom kiselinom. Prema modelu kemijske specijacije programom Visual MINTEQ, pri ovom pH precipitacija nastaje već kod koncentracije bakra od  $1 \mu\text{M}$ .



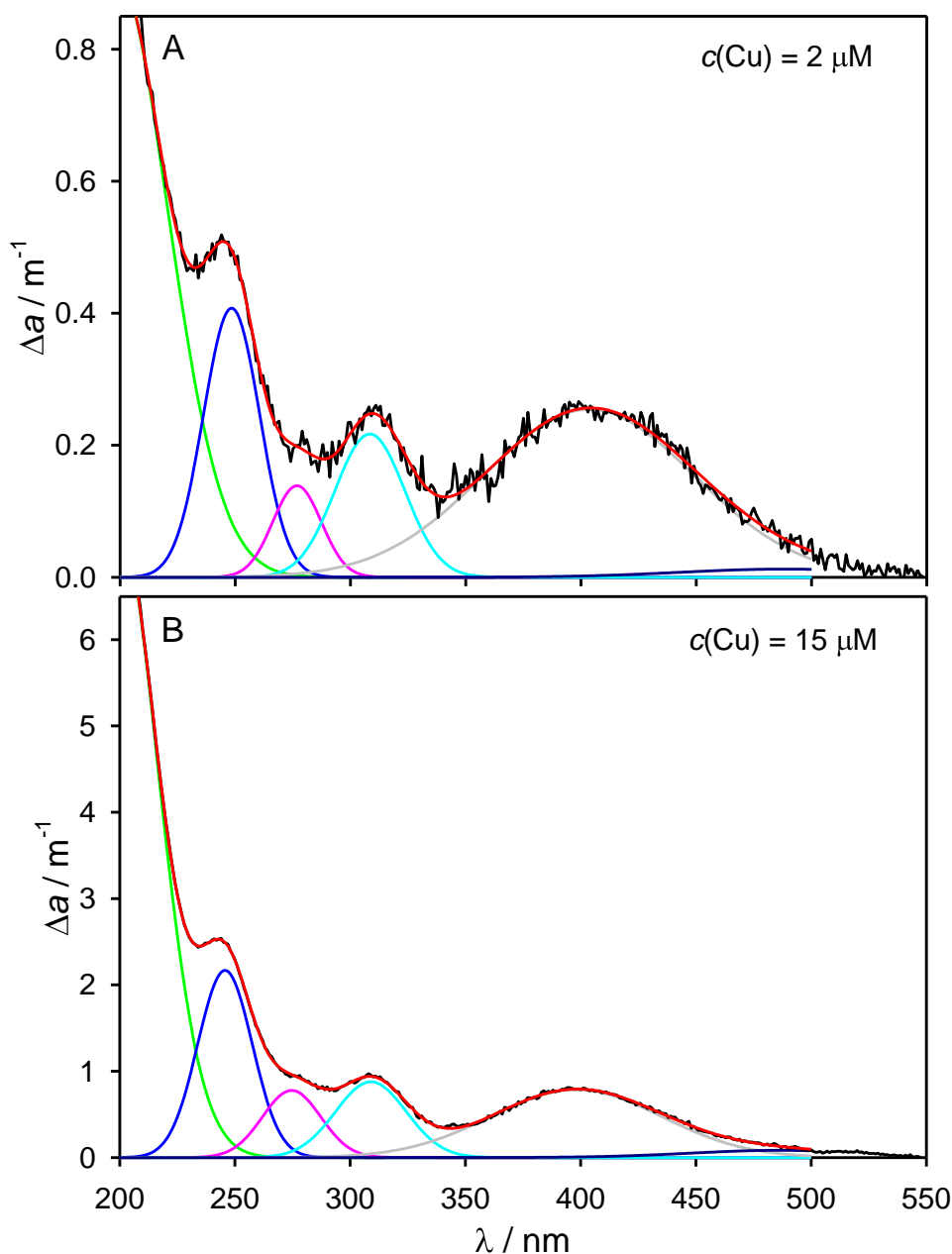
**Slika 5.10.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{FA}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 9) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra.

Umetak: vrijednost diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na 240 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog u otopinu.

#### 5.4.2.4 Primjena Gaussove „dekompozicije“ za obradu diferencijalnih spektara

U novije vrijeme je pokazano da se CDOM spektri mogu rekonstruirati pomoću linearne kombinacije eksponencijalne funkcije i nekoliko Gaussovih krivulja<sup>61</sup> (jednadžba 13) dok se za rekonstrukciju diferencijalnih apsorpcijskih spektara kod titracije s ionima metala koriste samo Gaussove krivulje<sup>57-58</sup>. Broj Gaussovih krivulja za fitanje CDOM spektara kreće se od 2 do 6, a za rekonstrukciju spektara kod titracije organske tvari s ionima metala bilo je optimalno 6 Gaussovih krivulja (uobičajeno označeni A1 do A6). U ovom radu fitanje je izvedeno tako da je u odnosu na početni, pomak položaja maksimuma Gaussove krivulje bio ograničen na  $\pm 10 \text{ nm}$ , dok je za parametar poluširine prozor prilagodbe bio  $\pm 5 \text{ nm}$ . Krivulje su fitane u području valnih duljina od 210 do 500 nm. Kao početni položaji (kod koncentracije bakra od  $2 \text{ } \mu\text{M}$ ) uzete su slijedeće vrijednosti: A1 = 200 nm, A2 = 245 nm, A3 = 275 nm, A4 = 310 nm, A5 = 400 nm i A6 = 490 nm. Za svaki slijedeći diferencijalni spektar, prethodno određene vrijednosti služile su kao početni parametri. Na slici 5.11 prikazana su dva primjera primjene ove metode za rekonstrukciju

diferencijalnih spektara kod titracije modelne riječne fulvinske kiseline s bakrom pri pH = 6,3 (diferencijalni spektri su prikazani na slici 5.8).



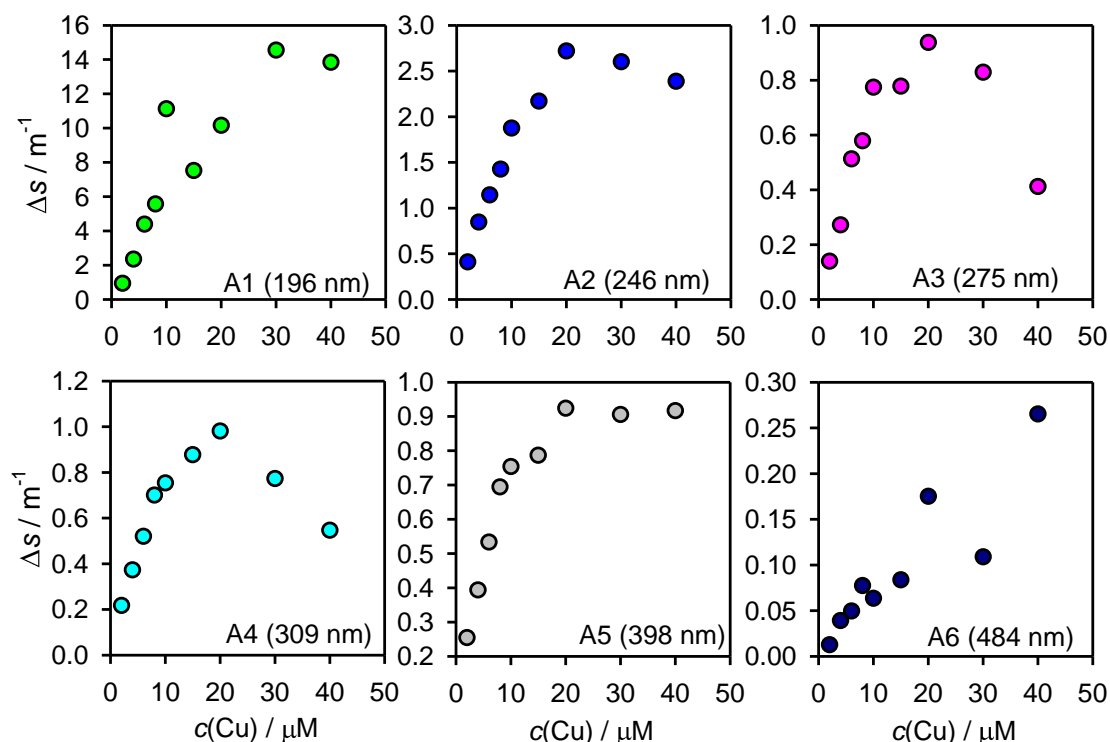
**Slika 5.11.** Rekonstrukcija diferencijalnih spektara sa 6 Gaussovih krivulja modelne otopine riječne fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{FA}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3) pri koncentracijama bakra  $2 \text{ } \mu\text{M}$  (A) i  $15 \text{ } \mu\text{M}$  (B).

Kako je već ranije naglašeno, dobiveni diferencijalni spektri karakterizirani su s nekoliko maksimuma kao što je ranije prikazano u radu od Yan i Korshina<sup>57</sup> koji su također koristili modelnu riječnu fulvinsku kiselinu (Suwannee River). U toj studiji, položaji maksimuma 6 Gaussovih krivulja bili su na oko 200 nm (A1), 240 nm (A2),

276 nm (A3), 316 nm (A4), 385 nm (A5) i 550 nm (A6), dok je analiza diferencijalnih spektara u ovom radu pokazala slijedeće srednje vrijednosti: 196 nm (A1), 246 nm (A2), 275 nm (A3), 309 nm (A4), 398 nm (A5) i 484 nm (A6) (tablica 5.2). Vidljivo je da se osim kod posljednje Gaussove krivulje (A6), vrijednosti ostalih maksimuma vrlo dobro slažu. U radu [Yin i suradnika](#)<sup>58</sup> korištena je različita organska tvar (EPS) te nije bilo za očekivati poklapanje svih maksimuma diferencijalnih spektara. Treba napomenuti da su u tom radu sve Gaussove krivulje imale isti parametar poluširine, dok su u ovom radu (slično kao i u radu [Yan i Korshina](#)<sup>57</sup>) za Gaussove krivulje A1, A2, A3, A4 dobivene vrijednosti parametra poluširine između 10 i 26 nm, a za A5 i A6 oko 40 nm. Na slikama 5.11A i 5.11B jasno se vidi da je 6 Gaussovih krivulja bilo sasvim dovoljno za jako dobru rekonstrukciju diferencijalnih spektara (spektralni šum koji je na slici 5.11A više izražen nego na slici 5.11B samo je posljedica skale Y-osi, i u apsolutnim iznosima jednak je kao na slici 5.11B. Maksimumi Gaussovih krivulja A1 do A6 prikazani su na slici 5.12. Svi maksimumi su rasli gotovo linearno s dodatkom bakra do koncentracije od oko 20  $\mu\text{M}$ . Iznad te koncentracije maksimumi A1 i A6 su i dalje rasli, međutim taj porast najvjerojatnije nije posljedica nastalog kompleksa, već nekompleksiranog bakra koji pokazuje apsorpciju na valnim duljinama nižim od 220 nm (A1) ili je porast nastao kao posljedica djelomične precipitacije bakra odnosno efekta raspršivanja u kivetu (engl. *scattering effect*).

U radu od [Yan i suradnika](#)<sup>53</sup> pokazano je da položaji maksimuma Gaussovih krivulja odgovaraju položajima maksimuma u diferencijalnim spektrima same fulvinske kiseline snimani kod različitih pH vrijednosti (pH = 3 je uzeta kao referentna vrijednost). Promjenom pH dolazi do deprotonacije određenih skupina u fulvinskoj kiselini te je na taj način protumačeno i kompleksiranje s bakrom. Nadalje, u svojim istraživanjima [Yan i Korshin](#)<sup>57</sup> su pokazali da omjer maksimuma određenih Gaussovih krivulja odgovara kovalentnom indeksu pojedinog metala. U tablici 5.3 uspoređene su srednje vrijednosti dobivene tijekom izrade ovog diplomskog rada s onima iz rada od [Yan i Korshina](#)<sup>57</sup>, gdje se vidi relativno dobro slaganje omjera.





**Slika 5.12.** Maksimumi Gaussovih krivulja (A1 do A6) dobiveni fitanjem diferencijalnih krivulja kod različitih koncentracija dodanog bakra.

**Tablica 5.2.** Srednje (SV), minimalne (Min) i maksimalne (Maks) vrijednosti parametra poluširine (W) i položaja (P) Gaussovih krivulja kod rekonstrukcije diferencijalnih spektara kompleksa bakra s modelnom fulvinskom kiselinom. Svi rezultati su izraženi u nm.

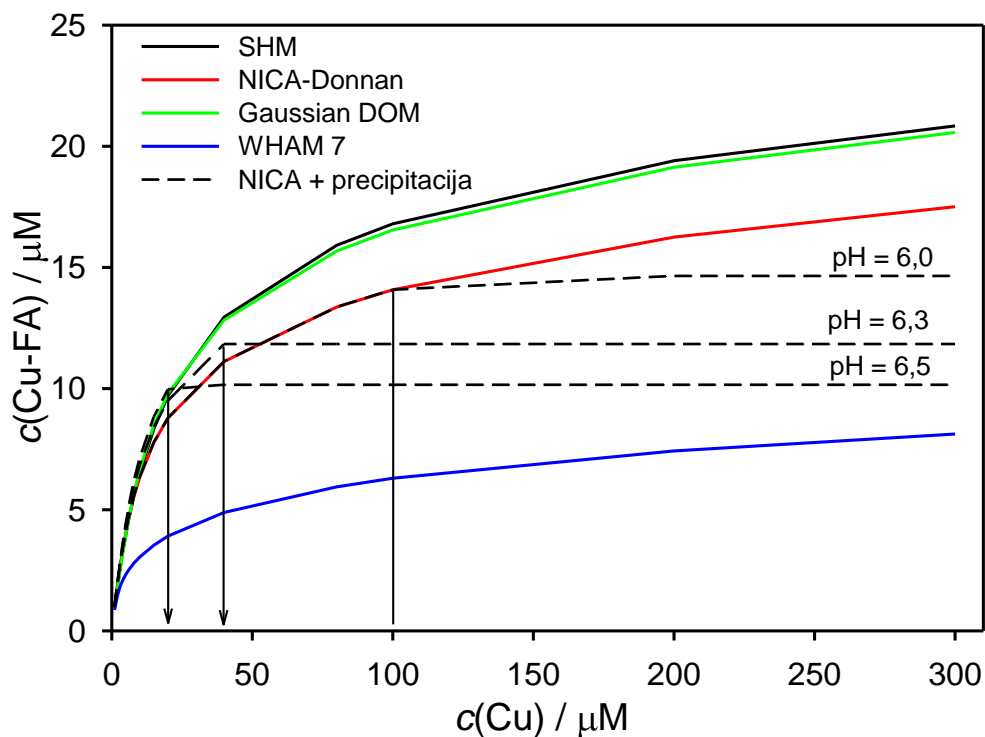
	A1		A2		A3		A4		A5		A6	
	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P
<b>SV</b>	20	196	12	246	13	275	14	309	39	398	42	484
<b>Min</b>	15	185	11	244	10	272	11	308	30	395	29	460
<b>Maks</b>	26	202	12	248	17	277	16	312	46	404	47	497

**Tablica 5.3** Omjeri maksimuma apsorbancije Gaussovih krivulja.

	A2/A5	A3/A5	A4/A5
<b>Ovaj rad</b>	2,40	0,82	0,93
<b>Yan i Korshin (2014)</b>	2,28	0,92	0,74

#### 5.4.2.5 Usporedba s računalnim modelima

Za opisivanje interakcija između otopljenih organskih tvari i metalnih iona u različitim okolišnim uvjetima koriste se mnogi računalni modeli. U ovom radu je koncentracija nastalog kompleksa bakra i riječne fulvinske kiseline pri  $\text{pH} = 6,0$  procijenjena pomoću 4 različita modela: SHM, NICA-Donnan, Gaussian DOM i WHAM-7 (slika 5.13). Rezultati dobiveni ovom procjenom uspoređeni su s eksperimentalnim vrijednostima diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na valnim duljinama apsorpcijskih maksimuma ( $\Delta a_{245}$ ,  $\Delta a_{310}$  i  $\Delta a_{400}$ ), diferencijalnog spektralnog nagiba ( $\Delta S_{350-400}$ ) te omjera diferencijalnih spektralnih nagiba ( $\Delta S_R$ ). Usporedba je pokazala da je procijenjena koncentracija nastalog kompleksa linearno povezana s navedenim parametrima samo do koncentracije bakra od oko  $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , koja je u ovom radu utvrđena kao granica zasićenja funkcionalnih skupina, iako prema navedenim modelima do zasićenja dolazi pri višim koncentracijama bakra. U studijama povezanim s istraživanjima interakcije bakra i fulvinske kiseline<sup>53, 57</sup> je prikazana korelacija eksperimentalnih rezultata s rezultatima procijenjenim pomoću računalnih modela do koncentracije bakra  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 7$  odnosno  $24 \mu\text{mol dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 5$ . U navedenim studijama su ove granice predložene zbog utjecaja precipitacije bakra na višim koncentracijama. Testirani modeli u ovom radu pokazuju da do precipitacije pri  $\text{pH} = 6,3$  dolazi kod ukupne koncentracije bakra u otopini od oko  $40 \mu\text{mol dm}^{-3}$  (slika 5.13). Međutim, treba napomenuti da vrlo mali pomak pH uzrokuje veliku razliku u koncentraciji bakra kod koje dolazi do precipitacije. Kod  $\text{pH} = 6,0$  precipitacija počinje kod oko  $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  a kod  $\text{pH} = 6,5$  kod oko  $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$  dodanog bakra. Strogo održavanje pH vrijednosti u ovom području, bez pufera, je vrlo složeno te se treba uzeti u obzir da je kod prikazanih eksperimenata moguća varijacija pH u odnosu na deklarirani unutar 0,1-0,2 jedinice. Određene devijacije i nesavršenosti dobivenih spektara i ovisnosti se stoga mogu pripisati i toj komponenti.



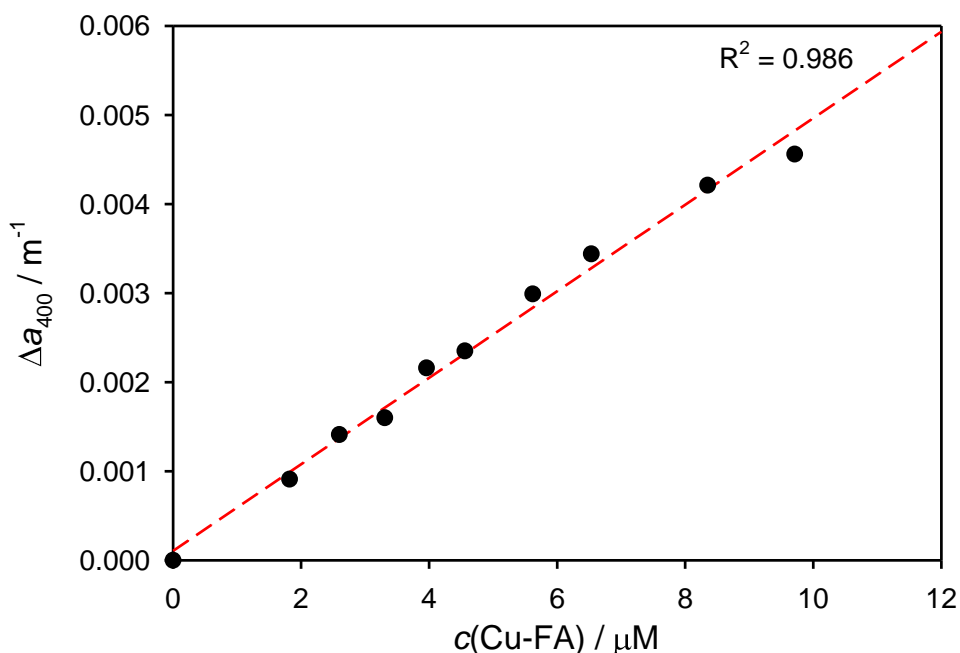
**Slika 5.13.** Procjena koncentracije nastalog Cu-FA kompleksa pomoću različitih modela ( $\gamma(\text{FA}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,0) uz uvjet da nema precipitacije bakra. Isprekidanom linijom su prikazane NICA-Donnan simulacije uz dozvoljenu precipitaciju kod 3 različite pH vrijednosti.

**Tablica 5.4.** Usporedba korelacije eksperimentalnih rezultata titracije modelne otopine fulvinske kiseline s bakrom s rezultatima dobivenim procjenom pomoću različitih računalnih modela.

	SHM	NICA-Donnan	Gaussian DOM	WHAM-7
$\Delta S_{350-400}$	0.969	0.986	0.971	0.996
$\Delta S_R$	0.989	0.995	0.990	0.988
$\Delta a_{245}$	0.995	0.997	0.995	0.984
$\Delta a_{310}$	0.965	0.982	0.968	0.987
$\Delta a_{400}$	0.972	0.986	0.973	0.994

Iako se vide značajne razlike u apsolutnim vrijednostima rezultata dobivenih različitim modelima (slika 5.13) trendovi su gotovo isti i usporedba s eksperimentalnim rezultatima je pokazala da sva 4 modela dobro opisuju kompleksiranje bakra s fulvinskom kiselinom pri koncentracijama bakra ispod  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  što se vidi iz regresijskih koeficijenata prikazanih u tablici 5.4. Prema vrijednostima regresijskih koeficijenata eksperimentalni rezultati su najbolje opisani NICA-Donnan i WHAM-7 modelom.

Na slici 5.14 predočena je korelacija navedenih parametara s procijenjenom koncentracijom nastalog kompleksa pri koncentracijama bakra do  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  na primjeru ovisnosti diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na 400 nm o koncentraciji bakra vezanog na fulvinsku kiselinu procijenjenoj NICA-Donnan modelom pri  $\text{pH} = 6,3$ . Uže područje za provjeru korelacije odabrano je radi izbjegavanja precipitacije koja počinje u ovom području koncentracija bakra. Kako je već ranije navedeno, slično područje odabrano je i u drugim radovima.<sup>53,57</sup>



**Slika 5.14.** Vrijednost diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na 400 nm u odnosu na koncentraciju bakra vezanog na fulvinsku kiselinu procijenjenu NICA-Donnan modelom ( $\gamma(\text{FA}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M,  $\text{pH} = 6,3$ ).

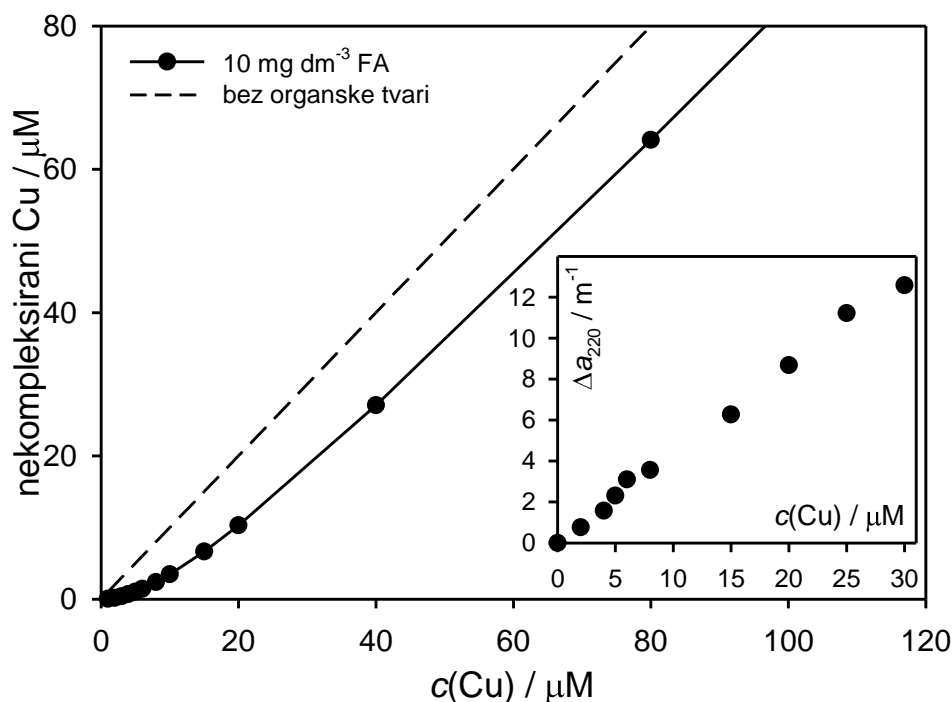
Usporedbom maksimuma A4 i A5 Gaussovih krivulja sa slike 5.12 s krivuljama maksimuma diferencijalne apsorpcije na  $a_{310}$  i  $a_{400}$  prikazanoj na slici 5.9, vide se slaganja u području koncentracija dodanog bakra do  $20 \mu\text{M}$  te se i za navedene

maksimume Gaussovih krivulja može očekivati potpuno slaganje s modeliranom koncentracijom nastalog Cu-FA kompleksa, kao što je prikazano na [slici 5.14](#).

Treba dalje napomenuti da je u radu od Yan i Korshina<sup>57</sup> utvrđena generalna linearna ovisnost između A<sub>2</sub>/A<sub>5</sub> maksimuma s parametrima vezanja iz NICA-Donnan modela ( $\log K_1$ ,  $\log K_2$ ,  $n_1$ , i  $n_2$ ), međutim u ovom radu nisu razmatrani detalji usporedbe s navedenim modelom.

Iz navedenih eksperimenata se može zaključiti da se diferencijalni spektri mogu upotrijebiti za istraživanje prirode interakcije između aktivnih mjesta iz prirodne organske tvari (CDOM-a) i iona metala. Međutim, svakako su potrebna daljnja istraživanja da bi se utvrdila bolja povezanost određenih spektralnih parametara s kemijskom prirodom veze između metala i organske tvari.

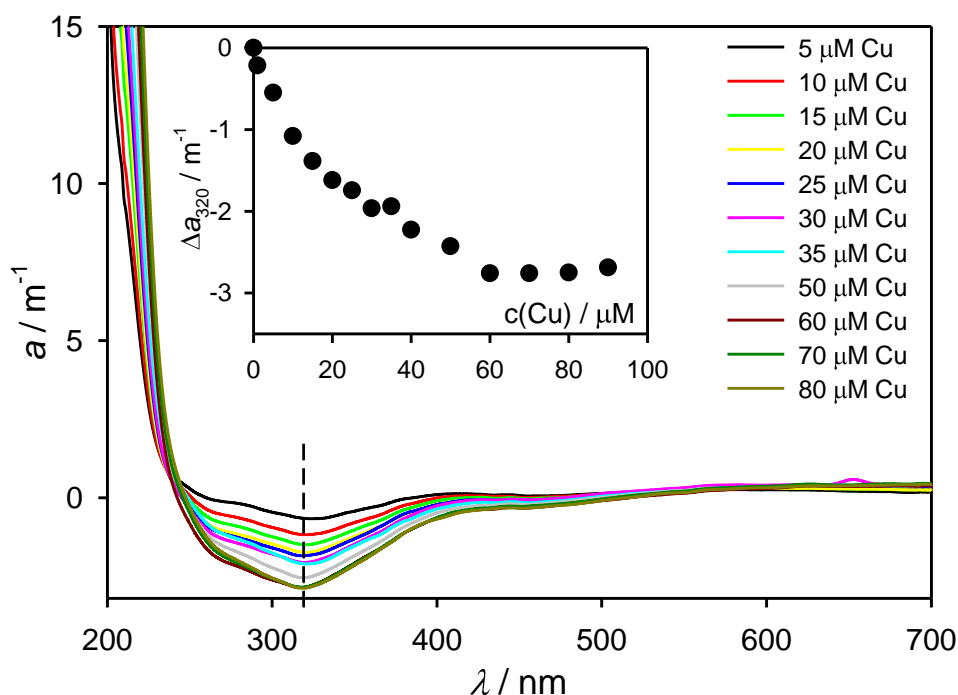
U istraživanjima interakcije metala u tragovima i organske tvari voltametrijskim metodama, uobičajeno se prati promjena odziva nekompleksiranog metala.<sup>65</sup> Takva titracijska krivulja ima specifičan oblik te se matematičkim transformacijama iz njih izračunavaju prividne konstante stabilnosti nastalih organskih kompleksa s metalom (npr. bakrom) i koncentracija organskih liganda koji mogu kompleksirati metal. Primjer takve modelne krivulje prikazan je na [slici 5.15](#) (puna linija) uz usporedbu s nekompleksiranim metalom (crtkana linija). Razlika između dvije krivulje predstavlja metal kompleksiran s organskim ligandima. Uzimajući u obzira da bakar pokazuje porast apsorbancije na valnim duljinama ispod 240 nm ([slika 4.4](#)) te uz pretpostavku da se apsorbancija odnosi samo na nekompleksirani bakar, za očekivati je da se na tim niskim valnim duljinama dobije slična titracijska krivulja kao što je prikazano na modelnoj titraciji na [slici 5.15](#). Na umetku [slike 5.15](#) prikazani su apsorpcijski koeficijenti očitani na 220 nm za odgovarajuće koncentracije bakra. Očekivana zakrivljenost titracijske krivulje nije dobivena. Područje niskih valnih duljina vrlo je nestabilno, tako da je ponovljivost apsorbancija na valnim duljinama nižim od 220 nm relativno slaba te je upitna primjenjivost ove metode. Svakako bi trebalo dalje ispitati ovu mogućnost, uz strogo održavanje eksperimentalnih uvjeta i uz duži put zrake svjetla (npr. 10 cm kiveta).



**Slika 5.15.** Titracijska krivulja bakra modelirana NICA-Donnan modelom pri pH = 6,3 uz koncentraciju fulvinske kiseline od 10 mg dm<sup>-3</sup>. Umetak: ovisnost apsorpcijskog koeficijenta na 220 nm o koncentraciji bakra u otopini (ostali podaci isti kao na slici 5.11)

### 5.4.3 Obrada spektara dobivenih titracijom riječne huminske kiseline

Na slici 5.16 prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne huminske kiseline koncentracije 5 mg dm<sup>-3</sup> pri pH = 6,3 od spektara dobivenih titracijom navedene otopine s bakrom. Na slici je vidljivo smanjenje apsorbancije s porastom koncentracije bakra s minimumima na 260, 310 i 450. Prateći smanjenje apsorbancije na valnoj duljini najvećeg apsorpcijskog minimuma kao što je prikazano na umetku slike 5.16 vidimo da do zasićenja dolazi kod koncentracije bakra 60  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , dok kod fulvinske kiseline do zasićenja dolazi već pri koncentracijama bakra 25  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  kod više koncentracije kiseline (10 mg dm<sup>-3</sup>) što je prikazano u poglavlju 5.4.2.2.



**Slika 5.16.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine riječne huminske kiseline ( $\gamma(\text{HA}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Umetak: vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 310 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog otopinu.

Ovi rezultati se ne slažu s literaturom prema kojoj fulvinske kiseline posjeduju veći kapacitet za interakciju s metalima.<sup>37</sup> Objašnjenje može biti što su ove organske tvari od različitih dobavljača te su izolirane na različite načine. Tako je fulvinska kiselina izolirana pomoću DAX8 kolone te se radi samo o hidrofobnoj frakciji. U radu od **Yan i Korshina** titracijski diferencijalni spektri huminske kiseline su bili slični spektrima kod titracije fulvinske kiseline (u oba slučaja radi se o izolaciji kiselina iz Suwannee River; SRFA i SRHA).<sup>57</sup> Ovaj eksperiment bi trebalo ponoviti i utvrditi radi li se o stvarnoj razlici u huminskoj kiselini ili je do razlike došlo uslijed promijenjenih eksperimentalnih uvjeta koji nisu registrirani. Nažalost, zbog ograničenog vremena i tijeka izvođenja drugih eksperimenta, ovaj eksperiment nije ponavljen u sklopu ovog rada.

#### 5.4.4 Obrada spektara dobivenih titracijom morske fulvinske i huminske kiseline

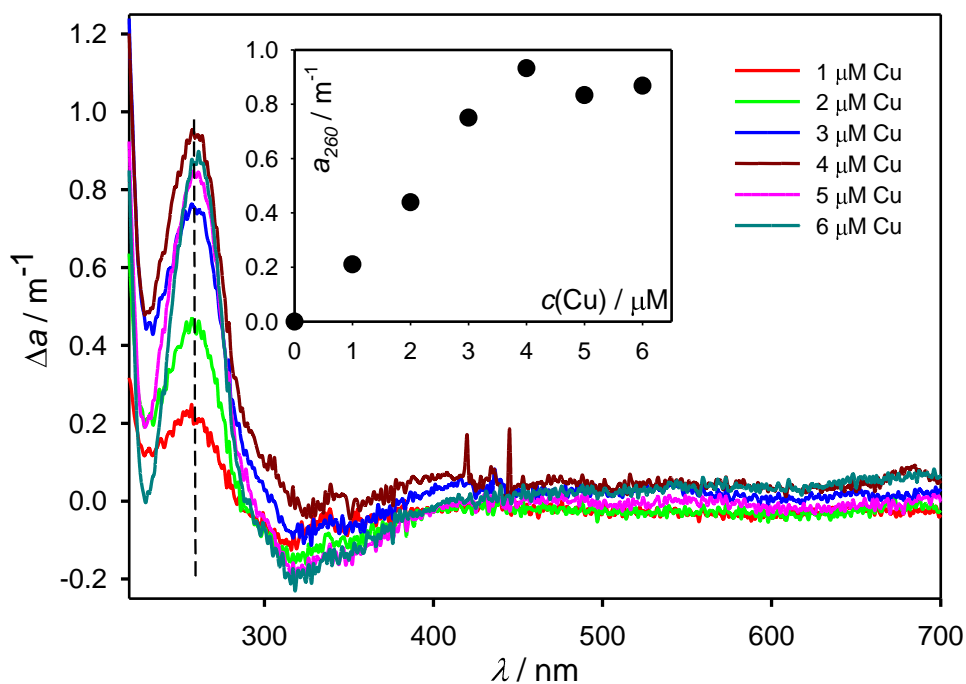
Kao i kod riječne organske tvari, zbog vrlo malih promjena u apsorpcijskim spektrima prilikom titracija otopina morske organske tvari s bakrom spektri su prikazani u diferencijalnom obliku, koji prikazuje razlike u spektru nakon svakog dodatka otopine bakra u odnosu na spektar bez prisutnog bakra u istim uvjetima. Na [slici 5.17](#) prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine morske fulvinske, a u [slici 5.18](#) huminske kiseline koncentracije  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 6,3$  od spektara dobivenih titracijom navedenih otopina otopinom bakra.

Na slikama je vidljivo da kod oba uzorka s dodacima bakra dolazi do povećanja apsorbanције. U spektrima fulvinske kiseline javlja se jedan apsorpcijski maksimum na 260 nm, a u spektrima huminske kiseline dva maksimuma na 340 i 395 nm. U umecima slika prikazan je porast apsorpcijskog koeficijenta na valnim duljinama ovih maksimuma, koje upućuju na mjesta funkcionalnih skupina, u ovisnosti o koncentraciji bakra. Iz navedenog je vidljivo da kod morske fulvinske kiseline do zasićenja dolazi već kod  $4 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ , a kod huminske kod  $10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  bakra u otopini. Kod ovako malih koncentracija bakra vrijednosti diferencijalnih apsorpcijskih koeficijenata su vrlo male te je zbog kraće Y-osi na slikama vidljiv i spektralni šum, koji je u apsolutnim vrijednostima jednak kao i u ostalim eksperimentima.

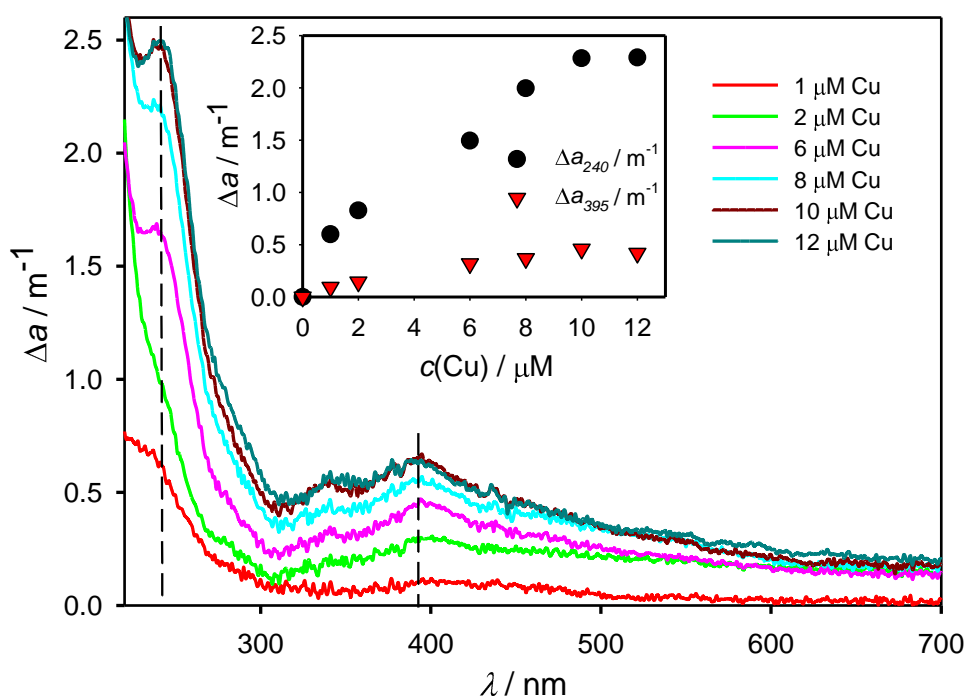
Kako se radi o vrlo malim promjenama u apsorbanциji procijenjena koncentracija nastalog Cu-FA odnosno Cu-HA kompleksa uspoređena je s porastom prve derivacije diferencijalne apsorbanције na 265 odnosno 245 nm, gdje su razlike u spektru izraženije. Ova usporedba je pokazala linearnu ovisnost s visokim regresijskim koeficijentima (0,988/0,984)

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako ispitivani uzorci morske organske tvari sadrže vrlo malo funkcionalnih skupina raspoloživih za vezanje metala, posebno u usporedbi s ispitivanim uzorcima riječne organske tvari. Objašnjenje može biti što su organske tvari u moru pod većim utjecajem fotokemijske degradacije i brze mikrobiološke razgradnje. Utjecaj fotokemijske degradacije je vidljiv i na [slikama 4.8 i 4.9](#) iz puno manje apsorbanције na valnim duljinama iznad 300 nm u odnosu na apsorbanције na nižim valnim duljinama, dok relativno bezizražajan spektar ukazuje na utjecaj mikrobiološke razgradnje. Ovaj utjecaj je vidljiv i na [slici 5.3](#) na kojoj su prikazane krivulje spektralnih nagiba morskih organskih tvari s vrlo slabo izraženim apsorpcijskim maksimumima na valnim duljinama iznad 250 nm.





**Slika 5.17.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine morske fulvinske kiseline ( $\gamma(\text{AFSLE}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Umetak: vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 260 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog otopinu.

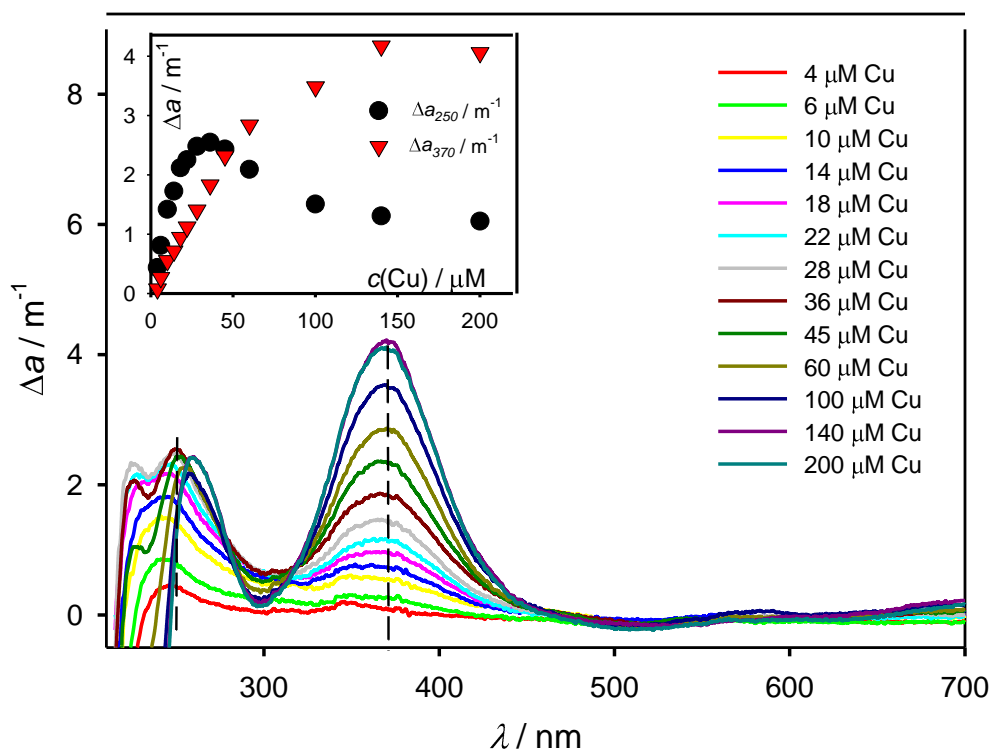


**Slika 5.18.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra modelne otopine morske huminske kiseline ( $\gamma(\text{AHSLE}) = 10 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M, pH = 6,3) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Umetak: vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 240 i 395 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog otopinu.

### 5.4.5 Obrada spektara dobivenih titracijom prirodnog uzorka riječne vode

Na slici 5.19 prikazani su diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra uparenog prirodnog uzorka riječne vode iz rijeke Save pri pH = 6,0 od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Kao u većini provedenih ispitivanja ovdje je također vidljivo povećanje apsorbancije s povećanjem koncentracije bakra u otopini pri čemu se javljaju dva izražena maksimuma na 250 i 370 nm, a kod koncentracije bakra od oko 20  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  javlja se i treći maksimum na 225 nm.

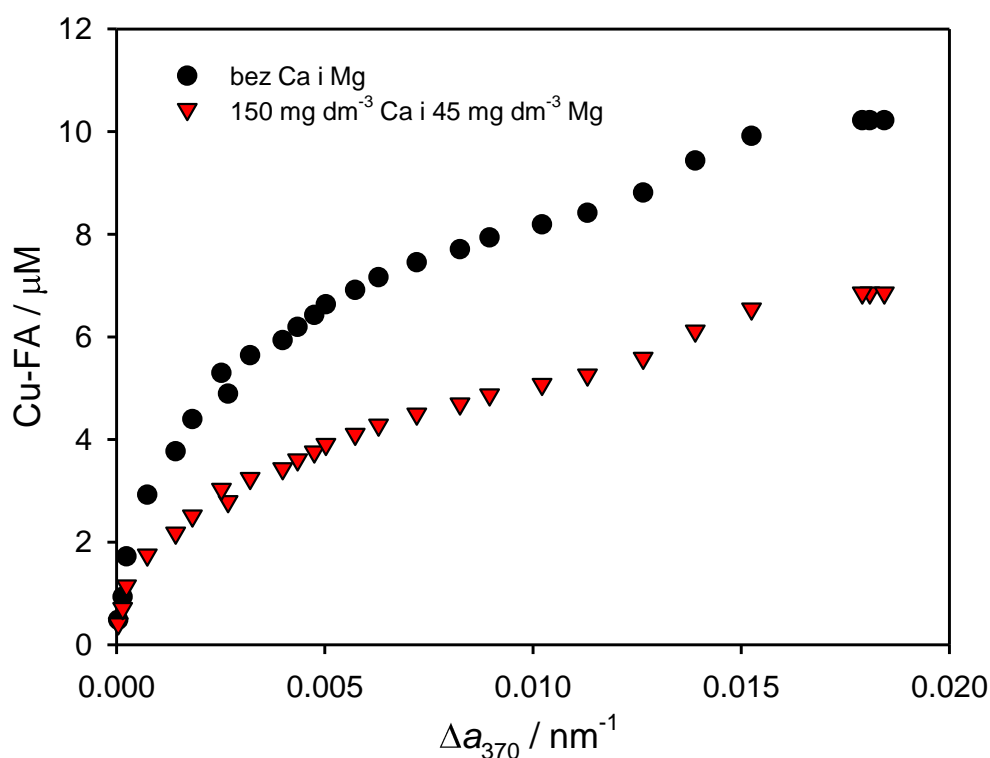
U umetku slike 5.19 prikazan je porast apsorpcijskog koeficijenta na valnim duljinama prva dva maksimuma u ovisnosti o koncentraciji bakra. Iz navedenog je vidljivo da do pada apsorbancije na 250 nm dolazi kod koncentracije bakra od oko 30  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , a na valnoj duljini 370 nm kod koncentracije bakra od oko 150  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ .



**Slika 5.19.** Diferencijalni spektri dobiveni oduzimanjem apsorpcijskog spektra uparenog prirodnog uzorka riječne vode iz rijeke Save (pH = 6,0) od spektara dobivenih titracijom navedene otopine otopinom bakra. Umetak: vrijednost apsorpcijskog koeficijenta na 250 i 370 nm u odnosu na koncentraciju bakra dodanog otopinu.

Vrijednosti apsorpcijskog koeficijenta na 370 nm uspoređene su s procjenjenom koncentracijom Cu-FA kompleksa pomoću NICA-Donnan modela pri koncentraciji otopljenog organskog ugljika  $3,5 \text{ mg dm}^{-3}$  i  $\text{pH} = 6,0$  te pri i istim uvjetima uz prisutne ione kalcija i magnezija u koncentracijama koje odgovaraju koncentracijama u rijeci Savi.<sup>66</sup> U oba slučaja koncentracije nastalog kompleksa predviđene modelom su veće od pripadajućeg porasta apsorpcijskog koeficijenta na valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma (slika 5.20). Uspredba je provedena i uz procjenjenu koncentraciju nastalog Cu-HA kompleksa te su dobiveni vrlo slični rezultati. Mogući razlog nepodudarnosti s modelom može biti razlika u organskoj tvari prisutnoj u rijeci Savi u odnosu na modeliranu fulvinsku i huminsku kiselinu.

Ovaj eksperiment predstavlja moguću primjenu UV/Vis spektrometrije za karakterizaciju interakcije metala s organskim ligandima u prirodnim sustavima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila slaganja s modelom ili potvrdila neslaganja.



**Slika 5.20.** Vrijednost diferencijalnog apsorpcijskog koeficijenta na 370 nm u odnosu na koncentraciju bakra vezanog na fulvinsku kiselinu procijenjenu NICA-Donnan modelom ( $\gamma(\text{FA}) = 3,5 \text{ mg dm}^{-3}$ , ionska jakost = 0,01 M,  $\text{pH} = 6,0$ ).



## 6. Zaključci

---

U ovom radu korištene su različite metode obrade apsorpcijskih spektara u svrhu karakterizacije kromoforne otopljene organske tvari (CDOM) u modelnim otopinama i prirodnim uzorcima riječne i morske vode te interakcije organske tvari iz ovih otopina s ionima bakra. Prilikom obrade spektara korištene su gotovo sve metodologije za određivanje specifičnih parametara koje su danas raspoložive u literaturi, a koje su implementirane u posebno za tu svrhu razvijeni program (ASFit). Kako bi se pronašli najpogodniji uvjeti za provođenje eksperimenata, prethodno je provedeno ispitivanje mogućih interferencija te je na valnim duljinama značajnim za kompleksiranje organskih liganada s metalima utvrđena apsorpcija natrij azida koji se uobičajeno koristi za mikrobiološku inhibiciju prirodnih uzoraka i značajna apsorpcija nitrata prisutnih u standardnoj otopini bakra. Apsorpciju u ovom dijelu spektra pokazali su i svi testirani puferi što predstavlja nedostatak jer je interakcija bakra s ispitivanom organskom tvari, ali i topljivost bakra te apsorpcija same organske tvari, vrlo osjetljiva na promjene pH vrijednosti. Stoga je izbor komponenata koji se dodaju u otopinu za mjerenje apsorpcije od vitalne važnosti za valjanu karakterizaciju CDOM-a, a posebice interakcije s ionima metala.

Ispitivani prirodni uzorci morske i riječne vode, kao i modelne otopine, pokazali su spektar karakterističan za CDOM s eksponencijalnim padom apsorpcije prema višim valnim duljinama i blagom grbom kod oba prirodna uzorka na 270 nm. Vrijednosti karakterističnih parametara ispitivanih uzoraka riječne i morske huminske i fulvinske kiseline i prirodnih uzoraka su u uobičajenom rasponu koji se navodi u literaturi za te tipove uzoraka. Nižu vrijednost pokazuje samo apsorpcijski koeficijent ( $a_{375}$ ) izmjeren u rijeci Savi što ukazuje na nižu koncentraciju CDOM-a u odnosu na svjetski prosjek uzet za određivanje raspona. Uspoređene su i vrijednosti apsorpcijskih koeficijenata na 254 nm ( $a_{254}$ ) kod određene koncentracije, krivulje spektralnih nagiba te omjeri spektralnih nagiba ( $S_R = S_{275-295}/S_{350-400}$ ) modelnih otopina morske i riječne huminske i fulvinske kiseline. Dobiveni rezultati ukazuju na manju molekulsku masu i aromatičnost fulvinske kiseline u odnosu na huminsku te morskih kiselina u odnosu na riječne, što se slaže s literaturom. Potvrđena je i neovisnost spektralnih nagiba o koncentraciji organske tvari što može biti olakšavajuća karakteristika kod usporedbe optičkih svojstava uzoraka pri različitim koncentracijama organske tvari u slučajevima titracije s ionima metala.

Interakcija metala s organskim ligandima testirana je titracijom dinatrijeve soli EDTA, (kao izoliranog liganada), modelnih otopina riječne i morske huminske i fulvinske

kiseline te uparenog prirodnog uzorka rijeke Save, s ionima bakra. U svim navedenim ispitivanjima povećanjem koncentracije bakra, a pri konstantnoj koncentraciji organske tvari, dolazi do promjene u apsorpciji na valnim duljinama na kojima sam bakar ne pokazuje apsorpciju (240-500 nm). Valne duljine dobivenih apsorpcijskih maksimuma odnosno minimuma upućuju na mjesta funkcionalnih skupina.

Praćenjem vrijednosti prve derivacije apsorpcije na 290 nm prilikom titracije EDTA i usporedbom s modeliranom koncentracijom Cu-EDTA kompleksa, pomoću Visual MINTEQ programa, dobivena statistički vrlo značajna linearna ovisnost ( $R^2 = 0.998$ ), što dokazuje primjenjivost spektrometrijske metode za karakterizaciju bakra s EDTA i mogućnost korištenja maksimuma prve derivacije kao značajke kod obrade UV/Vis spektara.

Promjene u apsorpcijskim spektrima prilikom titracija modelnih otopina riječne i morske fulvinske kiseline te uparenog prirodnog uzorka rijeke Save s bakrom su vrlo male (za razliku od titracije otopine dinatrijeve soli EDTA) te su ovi spektri prikazani u diferencijalnom obliku koji prikazuje razlike u spektru (u apsorpcijama) nakon svakog dodatka otopine bakra u odnosu na spektar bez prisutnog bakra u istim uvjetima.

Utjecaj pH vrijednosti na interakciju bakra s organskim ligandima ispitan je titracijom modelne otopine riječne fulvinske kiseline pri različitim pH vrijednostima (pH = 4,5; 6,3 i 9,0), pri čemu se najpogodniji pokazao pH = 6,3. Pri pH vrijednosti manjoj od 4,5 nisu uočene promjene u spektrima koje bi upućivale na znatnije vezanje bakra na funkcionalne skupine fulvinske kiseline. Smanjenjem pH vrijednosti i protonacijom ovih funkcionalnih skupina dolazi do smanjenja apsorpcije pri čemu se javljaju dva pika na 275 i 360 nm. S druge strane, pri pH = 9,0 javlja se samo jedan maksimum na 240 nm, što odgovara izgledu apsorpcijskih spektara bakar hidroksida nastalog zbog vrlo male topljivosti bakra pri ovom pH. Ovi eksperimenti pokazuju da visoke i preniske pH vrijednosti nisu adekvatne za karakterizaciju kompleksa bakra s fulvinskom kiselinom.

Titracijom fulvinske kiseline pri pH = 6,3 dolazi do porasta apsorpcije s povećanjem koncentracije bakra, s apsorpcijskim maksimumima na 250, 310 i 400 nm, što se slaže s rezultatima pronađenim u literaturi. Pri ovom pH provedene su i titracije riječne huminske kiseline te modelnih otopina morskih organskih tvari. Kod riječne huminske kiseline dolazi do smanjenja apsorpcije s porastom koncentracije bakra s minimumima na 260, 310 i 450 nm, što se ne slaže s rezultatima pronađenim u literaturi, a razlog može

biti razlika u korištenoj huminskoj kiselini. Titracijom modelnih otopina morske huminske i fulvinske kiseline, kao i kod riječne fulvinske kiseline, dolazi do povećanja apsorpcije s dodacima bakra. U spektrima morske fulvinske kiseline javlja se jedan apsorpcijski maksimum na 260 nm, a u spektrima morske huminske kiseline dva maksimuma na 240 i 395 nm. Kod obje otopine vrlo brzo dolazi do zasićenja iz čega možemo zaključiti kako ispitivani uzorci morske organske tvari sadrže vrlo malo funkcionalnih skupina raspoloživih za vezanje metala, posebno u usporedbi s ispitivanim uzorcima riječne organske tvari, a razlog može biti veća fotokemijska degradacija i mikrobiološka razgradnja organske tvari u moru.

Obradom apsorpcijskih spektara dobivenih titracijom riječne fulvinske kiseline pri pH = 6,0 određeni su različiti parametri ( $\Delta a_{245}$ ,  $\Delta a_{310}$ ,  $\Delta a_{400}$ ,  $\Delta S_{350-400}$  i  $\Delta S_R$ ). Navedeni apsorpcijski spektri su također rekonstruirani pomoću 6 Gaussovih krivulja s položajima maksimuma: A1 = 200 nm, A2 = 245 nm, A3 = 275 nm, A4 = 310 nm, A5 = 400 nm i A6 = 490 nm te vrijednostima parametra poluširine za krivulje A1, A2, A3, A4 između 10 i 26 nm, a za A5 i A6 oko 40 nm. Dobiveni položaji u skladu su s vrijednostima iz literature. Kao i vrijednosti ostalih određenih parametara, visina ovih krivulja je rasla gotovo linearno s dodatkom bakra do koncentracije od oko 20  $\mu\text{M}$ . Iznad te koncentracije maksimumi A1 i A6 su i dalje rasli što je najvjerojatnije posljedica nekompleksiranog bakra. Vrijednosti navedenih parametara kod određene koncentracije bakra u otopini uspoređene su s koncentracijom nastalog kompleksa procijenjenom pomoću različitih računalnih modela (SHM, NICA-Donnan, Gaussian DOM i WHAM-7), pri čemu je dobivena značajna linearna ovisnost u području koncentracija dodanog bakra do 20  $\mu\text{M}$ . Vrlo dobro poklapanje s modelom pokazuju i prve derivacije diferencijalne apsorpcije na 265 nm kod morske fulvinske kiseline odnosno na 245 nm kod morske huminske kiseline.

Iz svega navedenog se može zaključiti da se diferencijalni spektri i navedeni parametri mogu upotrijebiti za istraživanje interakcije prirodne organske tvari i iona metala, no ovo područje je potrebno detaljnije istražiti pri različitim uvjetima kako bi se određeni parametri povezali s kemijskom prirodom nastale interakcije.

Kao u većini provedenih ispitivanja i prilikom titracije uparenog uzorka rijeke Save vidljivo je povećanje apsorpcije s povećanjem koncentracije bakra, pri čemu se javljaju dva izražena maksimuma na 250 i 370 nm. Usporedba s NICA-Donnan modelom pokazala



je manje vrijednosti promjena u apsorbanciji na 370 nm u odnosu na procijenjenu koncentraciju Cu-FA i Cu-HA kompleksa. Razlog tome može biti djelomična razlika u tipu organske tvari prisutne u rijeci Savi u odnosu na modelirane. Ovaj eksperiment predstavlja moguću primjenu UV/Vis spektrometrije za karakterizaciju interakcije metala s organskim ligandima u prirodnim sustavima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila slaganja s modelom.

## 7. Literatura

---

1. Yan M., Wang D., Korshin G. V., Benedetti M. F., *Quantifying metal ions binding onto dissolved organic matter using log-transformed absorbance spectra*, *Water research*, 47 (2013) 2603-2611.
2. Banwell C. N., *Fundamentals of molecular spectroscopy*, McGraw-Hill: New York, 1972.
3. Coble P. G., Lead J., Baker A., Reynolds D. M., Spencer R. G., *Aquatic organic matter fluorescence*, Cambridge University Press: Cambridge, 2014.
4. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Vyvyan J. A., *Introduction to spectroscopy*, 3 izd.; Cengage Learning: Washington, 2008.
5. *Lambda 25, 35, 45 User's Guide*, PerkinElmer, Inc.: Beaconsfield, 2000. preuzeto s [http://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer\\_Lambda35\\_manual\\_EN.pdf](http://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.pdf) (pristup 15. svibnja 2017.).
6. <http://www.hellma-analytics.com/text/283/en/material-and-technical-information.html> (pristup 5. lipnja 2017.).
7. Richir J., Gobert S., *Trace Elements in Marine Environments: Occurrence, Threats and Monitoring with Special Focus on the Costal Mediterranean*, *Journal of environmental and analytical toxicology*, 6 (2016) 349-368 doi:10.4172/2161-0525.1000349.
8. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski R., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. definitions, structural aspects, and methodological approaches*, *Pure and applied chemistry*, 72 (2000) 1453-1470.
9. Gledhill M., Buck K. N., *The organic complexation of iron in the marine environment: a review*, *Frontiers in microbiology*, 3 (2012) 1-17 doi: 10.3389/fmicb.2012.00069.
10. Ahmed I. A., Hamilton-Taylor J., Bieroza M., Zhang H., Davison W., *Improving and testing geochemical speciation predictions of metal ions in natural waters*, *Water research*, 67 (2014) 276-291.
11. Mason R. P., *Trace metals in aquatic systems*, John Wiley & sons: New York, 2013.
12. COST projekt 1407 <https://www.costnotice.net> (pristup 8. lipnja 2017.).
13. Wen L., Shiller A., Santschi P. H., Gill G., *Trace element behavior in Gulf of Mexico estuaries*, u: Bianchi T. S., Pennock J. R., Twilley R. R., *Biogeochemistry of Gulf of Mexico estuaries*, John Wiley & sons: New York, 1999. str. 303-346.
14. Buck K. N., Moffett J., Barbeau K. A., Bundy R. M., Kondo Y., Wu J., *The organic complexation of iron and copper: an intercomparison of competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry (CLE-ACSV) techniques*, *Limnology and oceanography*, 10 (2012) 496-515.

15. Durán I., Beiras R., *Ecotoxicologically based marine acute water quality criteria for metals intended for protection of coastal areas*, Science of the total environment, 463 (2013) 446-453.
16. Cindrić A.-M., Cukrov N., Durrieu G., Garnier C., Pižeta I., Omanović D., *Evaluation of discrete and passive sampling (Diffusive Gradient in Thin films - DGT) approach for the assessment of trace metal dynamics in marine waters – a case study in a small harbor*, (2017) u tisku.
17. Vukosav P., Mlakar M., Cukrov N., Kwokal Ž., Pižeta I., Pavlus N., Špoljarić I., Vurnek M., Omanović D., *Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia)*, Environmental science and pollution research, 21 (2014) 3826-3839.
18. Gustafsson J. P., *Visual MINTEQ*, ver. 3.1; KTH, Sweden, 2000.  
<https://vminteq.lwr.kth.se>.
19. Westall J., Morel F., *MINEQL+*, ver. 5.0; MIT, Cambridge, 1975.  
<http://www.mineql.com>.
20. Tipping E., *WHAM7*, 1992. <https://www.ceh.ac.uk/services/windermere-humic-aqueous-model-wham>.
21. Verweij W., *CHEAQS Next*, 2014. <http://www.cheaqs.eu/author.html>.
22. Charlton S. R., Parkhurst D. L., Appelo C. A. J., *PHREEQC*, ver. 3.0; 2016.  
[https://wwwbr.cr.usgs.gov/projects/GWC\\_coupled/phreeqc](https://wwwbr.cr.usgs.gov/projects/GWC_coupled/phreeqc).
23. Omanović D., Garnier C., Gibbon-Walsh K., Pižeta I., *Electroanalysis in environmental monitoring: Tracking trace metals-A mini review*, Electrochemistry Communications, 61 (2015) 78-83.
24. Leenheer J. A., Croué J.-P., *Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter*, Environmental science & technology, 37 (2003) 18A-26A.
25. Richardot M., Debroas D., Thouvenot A., Sargos D., Berthon J. L., Dévaux J., *Influence of cladoceran grazing activity on dissolved organic matter, enzymatic hydrolysis and bacterial growth*, Journal of plankton research, 23 (2001) 1249-1261.
26. Stedmon C. A., Nelson N. B., *The optical properties of DOM in the ocean*, u: Hansell D. A., Carlson C. A., *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, Academic Press: San Diego, 2014. str. 481-502.
27. Li P., Hur J., *Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review*, Environmental science and technology, 47 (2017) 131-154.
28. Reddy R., Ramesh K., DeLaune R. D., *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*, CRC press: Boca Raton, 2008.

29. Toole D. A., Kieber D. J., Kiene R. P., Siegel D. A., Nelson N. B., *Photolysis and the dimethylsulfide (DMS) summer paradox in the Sargasso Sea*, *Limnology and oceanography*, 48 (2003) 1088-1100.
30. Cindrić A. M., Garnier C., Oursel B., Pižeta I., Omanović D., *Evidencing the natural and anthropogenic processes controlling trace metals dynamic in a highly stratified estuary: The Krka River estuary (Adriatic, Croatia)*, *Marine pollution bulletin*, 94 (2015) 199-216.
31. Arellano A. R., *Investigation of colored dissolved organic matter (CDOM) optical properties, nutrients and salinity in coastal Florida: Springshed to estuaries*, Doktorska disertacija, University of South Florida: Tampa, 2013.
32. D'Sa E. J., Goes, J. I., Gomes, H., & Mouw, C., *Absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter of the eastern Bering Sea in the summer with special reference to the influence of a cold pool*, *Biogeosciences*, 11 (2014) 3225-3244.
33. Massicotte P., Markager S., *Using a Gaussian decomposition approach to model absorption spectra of chromophoric dissolved organic matter*, International Workshop on Organic Matter Spectroscopy, Aarhus University, Danska, 22-25 rujna 2015.  
preuzeto s  
[https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiqwsTx2-LUAhXIthQKHfzBGIOFggvMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.iopan.pl%2Fwoms2015%2Flectures%2FPMassicotte.pdf&usg=AFQjCNHuzFOsBI1rDCdyBYx\\_ZrP2WHvDmA](https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiqwsTx2-LUAhXIthQKHfzBGIOFggvMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.iopan.pl%2Fwoms2015%2Flectures%2FPMassicotte.pdf&usg=AFQjCNHuzFOsBI1rDCdyBYx_ZrP2WHvDmA) (pristup 15. svibnja 2017.).
34. Gaffney J. S., Marley N. A., Clark S. B., *Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environment*, u: *Humic and fulvic acids*, ACS Publications: Washington, 1996.
35. Patent EP1797190 A1, *Method for extracting fulvic acid molecules*, 2011.  
<https://www.google.com/patents/EP1797190A1?cl=en> (pristup 5. svibnja 2017.).
36. Stumm W., Morgan J. J., *Aquatic chemistry; an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*, 2 izd.; John Wiley & sons: New York, 1970.
37. Jackson K. S., Jonasson I. R., Skippen G. B., *The nature of metals-sediment-water interactions in freshwater bodies, with emphasis on the role of organic matter*, *Earth-science reviews*, 14 (1978) 97-146.
38. Mills G. L., McFadden E., Quinn J. G., *Chromatographic studies of dissolved organic matter and copper-organic complexes isolated from estuarine waters*, *Marine chemistry*, 20 (1987) 313-325.
39. Dienert F., *De la recherche des substances fluorescentes dans le controle de la sterilisation des eaux*, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 150 (1910) 487-488.
40. Kalle K., *Zum Problem der Merreswasserfarbe*, *Annalen der hydrographie und maritimen meteorologie*, 66 (1938) 1-13.

41. Boyle E. S., Guerriero N., Thiallet A., Vecchio R. D., Blough N. V., *Optical properties of humic substances and CDOM: relation to structure*, Environmental science & technology, 43 (2009) 2262-2268.
42. Yu X., Shen F., Liu Y., *Light absorption properties of CDOM in the Changjiang (Yangtze) estuarine and coastal waters: An alternative approach for DOC estimation*, Estuarine, coastal and shelf science, 181 (2016) 302-311.
43. Heller M. I., Wuttig K., Croot P. L., *Identifying the sources and sinks of CDOM/FDOM across the Mauritanian Shelf and their potential role in the decomposition of superoxide ( $O_2^-$ )*, Frontiers in marine science, 3 (2016) doi: 10.3389/fmars.2016.00132.
44. Jaffé R., Boyer J. N., Lu X., Maie N., Yang C., Scully N. M., Mock S., *Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis*, Marine chemistry, 84 (2004) 195-210.
45. Claret F., Schäfer T., Bauer A., Buckau G., *Generation of humic and fulvic acid from Callovo-Oxfordian clay under high alkaline conditions*, Science of the total environment, 317 (2003) 189-200.
46. Bricaud A., Morel A., Prieur L., *Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains*, Limnology and oceanography, 26 (1981) 43-53.
47. Yan M., Ma J., Ji G., *Examination of effects of Cu(II) and Cr(II) on Al(III) binding by dissolved organic matter using absorbance spectroscopy*, Water research, 93 (2016) 84-90.
48. Helms J. R., Stubbins A., Ritchie J. D., Minor E. C., Kieber D. J., Mopper K., *Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter*, Limnology and oceanography, 53 (2008) 955-969.
49. Loiselle S. A., Bracchini L., Dattilo A. M., Ricci M., Tognazzi A., *Optical characterization of chromophoric dissolved organic matter using wavelength distribution of absorption spectral slopes*, Limnology and oceanography, 54 (2009) 590-597.
50. Owen T., *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy* Agilent Technologies: Waldbronn, 2000.
51. Roccaro P., Yan M., Korshin G. V., *Use of log-transformed absorbance spectra for online monitoring of the reactivity of natural organic matter*, Water research, 84 (2015) 136-143.
52. Del Vecchio R., Blough N. V., *Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling*, Marine chemistry, 78 (2002) 231-253.

53. Yan M., Dryer D., Korshin G. V., Benedetti M. F., *In situ study of binding of copper by fulvic acid: Comparison of differential absorbance data and model predictions*, Water research, 47 (2013) 588-596.
54. Yan M., Dryer D., Korshin G. V., *Spectroscopic characterization of changes of DOM deprotonation–protonation properties in water treatment processes*, Chemosphere, 148 (2016) 426-435.
55. Janot N., Benedetti M. F., Reiller P. E., *Colloidal  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, europium (III) and humic substances interactions: a macroscopic and spectroscopic study*, Environmental science & technology, 45 (2010) 3224-3230.
56. Li C., Benjamin M. M., Korshin G. V., *The relationship between TOX formation and spectral changes accompanying chlorination of pre-concentrated or fractionated NOM*, Water research, 36 (2002) 3265-3272.
57. Yan M., Korshin G. V., *Comparative Examination of effects of binding of different metals on chromophores of dissolved organic matter*, Environmental science and technology, 48 (2014) 3177-3185.
58. Yin C., Meng F., Meng Y., Chen G.-H., *Differential ultraviolet-visible absorbance spectra for characterizing metal ions binding onto extracellular polymeric substances in different mixed microbial cultures*, Chemosphere, 159 (2016) 267-274.
59. Gao Y., Yan M., Korshin G., *Effects of calcium on the chromophores of dissolved organic matter and their interactions with copper*, Water research, 81 (2015) 47-53.
60. Korshin G. V., Li C. W., Benjamin M. M., *Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory*, Water research, 31 (1997) 1787-1795.
61. Massicotte P., Markager S., *Using a Gaussian decomposition approach to model absorption spectra of chromophoric dissolved organic matter*, Marine chemistry, 180 (2016) 24-32.
62. Malcolm R. L., Croue J. P., Martin B., *Isolation of XAD-4 acids from natural waters and their importance as precursors to TOX and THM upon chlorination*, u: Grimvall A., De Leer E. W., *Naturally-produced organohalogenes*, Springer Science & Business Media: New York, 1995. vol. 1, str. 67-81.
63. Cindrić A.-M., *Distribution, speciation and fate of trace metals in the stratified Krka river estuary*, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu: Zagreb, 2015.
64. Fichot C. G., Benner R., *A novel method to estimate DOC concentrations from CDOM absorption coefficients in coastal waters*, Geophysical research letters, 38 (2011) L03610 doi: 10.1029/2010GL046152.
65. Omanović D., Garnier C., Pižeta I., *PromCC: an all-in-one tool for trace metal complexation studies*, Marine chemistry, 173 (2015) 25-39.
66. Kanduč T., Ogrinc N., *Hydrogeochemical characteristics of the River Sava watershed in Slovenia*, Geologija, 50 (2007) 157-177.





## ŽIVOTOPIS

Saša Marcinek [REDACTED]. Pohadala je prirodoslovnu gimnaziju „Prirodoslovna škola Vladimira Preloga“ u Zagrebu gdje je maturirala 2009. godine s odličnim uspjehom. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je kao prvostupnik 2015. godine, smjer Ekoinženjerstvo, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Stjepana Milardovića, s temom „Politiramin kao osnova senzorske površine“. Iste godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstva na istoimenom fakultetu. Tijekom studiranja na preddiplomskom studiju odradila je stručnu praksu u INA – Industrija nafte d.d u Sektoru razvoja rafinerija i marketinga u Laboratoriju za primjenjena laboratorijska istraživanja. Na prvoj godini diplomskog studija sudjeluje na XI. susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim izlaganjem „Uklanjanje fenola iz vodene otopine adsorpcijom na kominu maslina“.