

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
KEMIJSKI ODSJEK

OZREN GROZDANIĆ

KEMIJSKI SEMINAR 1

**UPOTREBA DIFUZNIH GRADIJENATA U TANKOM FILMU ZA MJERENJA *IN-SITU*:  
PREGLED NAPRETKA U KEMIJSKOJ FRAKCIONACIJI, SPECIJACIJI I  
BIORASPOLOŽIVOSTI METALA U VODI**

(A. A. Menegário, L. N. M. Yabuki, K. S. Luko, P. N. Williams, D. M. Blackburn,  
*Anal. Chim. Acta* **983** (2017) 54-66)

mentor: dr. sc. Dario Omanović, znanstveni savjetnik

Pula, lipanj 2020.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	2
2. SPECIJACIJA, SPECIJACIJSKA ANALIZA I FRAKCIONACIJA .....	3
3. METODA DGT .....	4
3.1. PRINCIP METODE DGT .....	4
3.2. GRAĐA UZORKIVAČA DGT .....	4
3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ANALITA .....	5
3.3.1. UTJECAJ VREMENA IZLAGANJA .....	6
3.3.2. UTJECAJ IONSKE JAKOSTI.....	7
3.3.3. PRISUTNOST ORGANSKIH KOMPLEKSNIH SPOJEVA .....	7
3.4. VEŽUĆI GELOVI .....	8
3.5. DIFUZIJSKI GELOVI .....	8
3.6. MEMBRANE .....	8
3.7. VRSTE UZORKIVAČA DGT.....	9
4. SPECIJACIJA I FRAKCIONACIJA PRIMJENOM METODE DGT I MODELIRANJE.....	10
4.1. SPECIJACIJA I SPECIJACIJSKA ANALIZA.....	10
4.1.1 DGT-LABILNE VRSTE METALA I MODELIRANJE.....	10
4.1.2 REDOKS SPECIJACIJA KROMA METODOM DGT .....	11
4.1.3 REDOKS SPECIJACIJA ARSENA METODOM DGT.....	12
4.1.4 REDOKS SPECIJACIJA ŽIVE METODOM DGT.....	12
4.1.5 DGT-LABILNE VRSTE URANA I RADIONUKLIDA I MODELIRANJE SPECIJACIJE.....	12
4.2. FRAKCIONACIJA .....	12
4.2.1. LABILNI ANORGANSKI I ORGANSKI KOMPLEKSNI SPOJEVI METALA .....	12
4.2.2. FRAKCIONACIJA NANOČESTICA .....	13
4.3. MODELIRANJE SPECIJACIJE.....	13
4.4. OTOPLJENI SADRŽAJ METALA I FRAKCIJE DGT .....	14
4.5. USPOREDBA S DRUGIM INSTRUMENTNIM METODAMA.....	15
5. PRAKTIČNA PRIMJENA UZORKIVAČA DGT.....	16
5.1. MODELI ZA PROCESSE OGRANIČENE BRZINOM PROLASKA KROZ MEMBRANU.....	16
5.2. PROCESI OGRANIČENI BRZINOM DIFUZIJE.....	17
5.3. PREDVIĐANJE TOKSIČNOSTI .....	17
6. ZAKLJUČAK.....	18
BIBLIOGRAFIJA.....	19

## 1. UVOD

Metali se nalaze u svakom odjeljku okoliša gdje dospijevaju iz prirodnih ili antropogenih izvora. Metali prve i druge skupine periodnog sustava elemenata (Na, Mg, Ca, K), odnosno njihove soli, čine glavnu ottopljenih konstituenata u morskoj vodi, dok su prijelazni metali prisutni u tragovima (koncentracijama nižim od 1 µg/mL). Radi se, između ostaloga, i o određenom broju elemenata koji su neophodni za život organizama u vodi (Fe, Cu, Zn, Co) ukoliko su prisutni u okolišu do određene, kritične koncentracije. Iznad te razine, metali postaju toksični. S druge strane, sama prisutnost metala kao što su Hg, Cr, Cd i As, opasna je za okoliš u kojem se nalaze.

U vodi se metali nalaze kao slobodni ioni, u kompleksnim spojevima i adsorbirani na česticama različitih veličina. Uz činjenicu da manje čestice lakše prolaze kroz staničnu membranu, slobodni ili labilni oblici su reaktivniji, brže difundiraju i stoga je njihova bioraspoloživost, tj. toksičnost izraženija. Iznimke predstavljaju metilživa (MeHg) i tributilkositreni spojevi (TBT) čija je toksičnost jača u odnosu na slobodnu živu, odnosno kositar. Do toga dolazi radi specifičnog slučaja molekularne mimikrije koja omogućava neometan prijenos unutar živih organizama putevima namijenjenim biološki esencijalnim organskim spojevima.<sup>1</sup> Kod polumetala toksičnost ovisi o valenciji, pa su tako trovalentni arsen i antimon štetniji od peterovalentnih. Također, šesterovalentni krom je štetniji od trovalentnog, dok se toksičnost Cd, Pb, Cu i Al smanjuje kompleksiranjem s prirodnim, organskim ligandima. Pojam toksičnosti (ekotoksičnosti) se ovdje odnosi na svaku pojavu štetnih učinaka tvari iz okoliša u bilo kojem živom organizmu u kojeg je tvar unesena.<sup>2</sup>

Uz pojam toksičnosti, važno je i definiranje bioraspoloživosti, odnosno udjela tvari prisutne u okolišu koji može dospjeti u živi organizam u ukupnoj količini te tvari u okolišu u kojem se organizam nalazi. Za utvrđivanje bioraspoloživosti je stoga, kao i kod toksičnosti, veoma važna specijacija, odnosno frakcionacija metala.<sup>3</sup>

Obzirom na konstantne kemijske i biološke promjene koje se zbivaju u prirodnim medijima, javlja se problem konzerviranja i čuvanja uzorka. Čak i najrigoroznije tehnike konzerviranja tek usporavaju procese koji mogu dovesti do promjene sastava uzorka od trenutka uzorkovanja do analize. Dodatan problem predstavljaju metode uzorkovanja i ekstrakcije koje najčešće daju informaciju samo o ukupnim količinama metala u tragovima u uzorku, no ne i udjelu slobodnih i labilnih oblika.<sup>4</sup> Jedno od rješenja ovih problema jest uzorkovanje *in situ* pasivnim uzorkivačima – difuznim gradijentima u tankom filmu (DGT, engl. *diffusive gradients in thin film*). Oni omogućavaju uvid u specijaciju i bioraspoloživost metala i drugih tvari kao što su anorganski nutrijenti i organski spojevi. Uz to, ovakvo uzorkovanje pruža informacije o promjeni koncentracije s vremenom, stabilizira i prekoncentrira ciljane analite, ima nizak utjecaj na okoliš, ekonomski je prihvatljivo, a pritom nije vremenski zahtjevno.<sup>3,4</sup> Glavni dio praktične primjene metode DGT leži u razvoju modela koji predviđaju specijaciju i koji mogu imati značajnu ulogu u predviđanju toksičnosti i bioraspoloživosti tvari u vodi, sedimentu i tlu.

U ovom seminarskom radu predstavljeni su osnovni pojmovi specijacije i frakcionacije kemijskih vrsta i navedene su neke od analitičkih metoda koje se u tu svrhu mogu koristiti. Predstavljen je princip rada te prednosti i nedostaci upotrebe metode DGT pri specijaciji i frakcionaciji metala kao i građa te parametri uzorkivača DGT. Na nekoliko primjera prikazan je napredak u redoks specijaciji metala i modeliranju te mogućnosti praktične primjene metode DGT.

## 2. SPECIJACIJA, SPECIJACIJSKA ANALIZA I FRAKCIONACIJA

Kao što je već rečeno, u vodenom okolišu metali postoje u različitim kemijskim oblicima. Nalazimo ih u obliku slobodnih iona, u kompleksnim spojevima ili adsorbirane na koloidnim česticama. Pri proučavanju toksičnosti i bioraspoloživosti, u fokusu su manje čestice, dakle slobodni ioni i manje molekule. Jednako su važni i kompleksni spojevi koji mogu biti izvor metalnih iona ili mogu sami postati dio bioraspoložive frakcije izmjenom liganada. Hoće li se to dogoditi ovisi o labilnosti kompleksa, odnosno sklonosti kompleksa zamjeni liganada.

Pojam specijacije se najčešće u znanstvenim radovima poistovjećuje s frakcionacijom. Oba se pojma pri istraživanju bioraspoloživosti koriste za kvalitativno i kvantitativno određivanje kemijskih vrsta koje mogu proći kroz staničnu membranu. Međutim, Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) predlaže razlikovanje četiri izraza vezana uz kemijske vrste (specije)<sup>5</sup>:

1. **Kemijska specija** (engl. *chemical species*) – određen oblik elementa, definiran izotopnim sastavom, elektronskim i oksidacijskim stanjem i/ili kompleksnošću molekulske strukture,
2. **Specijacija** (engl. *speciation*) – distribucija određenog elementa između određenih kemijskih vrsta u određenom sustavu (npr. za Hg:  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$  i  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ ),
3. **Specijacijska analiza** (engl. *speciation analysis*) – analitički postupak čiji je cilj identifikacija i/ili kvantitativno mjerenje jedne ili više kemijskih vrsta u uzorku,
4. **Frakcionacija** (engl. *fractionation*) – klasifikacija određenog analita ili grupe analitâ u uzorku prema fizikalnim i kemijskim svojstvima.

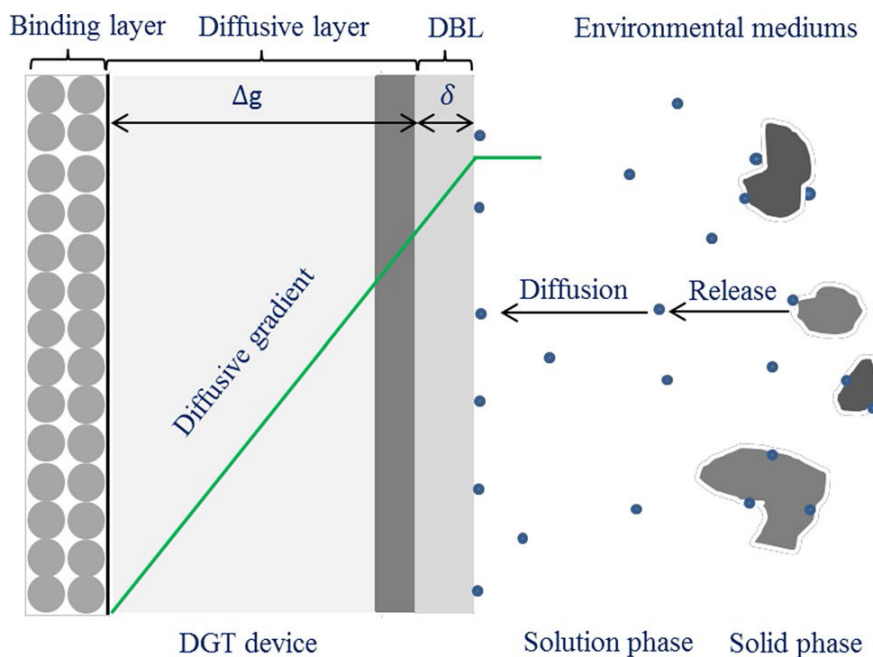
Među metodama koje mogu dati informaciju o specijaciji i frakcionaciji metala u morskom okolišu su ponajprije voltometrijske metode: adsorptivna katodna voltometrija otapanja s kompetitivnom izmjenom iona (engl. *competitive ligand exchange – adsorptive cathodic stripping voltammetry*, CLE-AdCSV) i anodna voltometrija otapanja (engl. *anodic stripping voltammetry*, ASV) te kemiluminiscencijska detekcija.<sup>3,6</sup>

U specijaciji značajnu ulogu imaju i vezani sustavi koji kombiniraju tehnike pripreme, separacije i detekcije kao što su: spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS), tekućinska kromatografija (LC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), kapilarna elektroforeza (CE), različite vrste ekstrakcije, plinska kromatografija (GC), laserska ablacija (LA), atomska fluorescencijska spektrometrija (AFS) i druge. Neki primjeri vezanih sustava su: HPLC-CVG-AFS, CE-ICP-MS, FI-ICP-MS, GC-ICP-MS, LA-ICP-MS, i LC-ICP-MS. Pri specijaciji se koristi i niz drugih metoda specifičnih za određeni metal (npr. Hg). Uz navedene analitičke metode, sve se više koristi i metoda difuznog gradijenta u tankom sloju (metode DGT).

### 3. METODA DGT

#### 3.1. PRINCIP METODE DGT

Metoda DGT uzorkovanja se često koristi u kemiji okoliša za detekciju elemenata i spojeva u prirodnom okolišu. Zasniva se na izlaganju posebnih, pasivnih uzorkivača okolišu kao što su voda, sediment i tlo. Kemijske vrste (specije) difundiraju iz okoline do membrane uzorkivača te kroz membranu i difuzijski gel s poznatim koeficijentima difuzije analita, do vežućeg gela u kojem se akumuliraju kroz cijelo vrijeme izlaganja u mediju (Slika 1).<sup>4,7</sup> Uzorkuju se samo određene kemijske vrste (diferencijacija *in-situ*) čije se koncentracije kasnije utvrđuju pogodnim tehnikama.



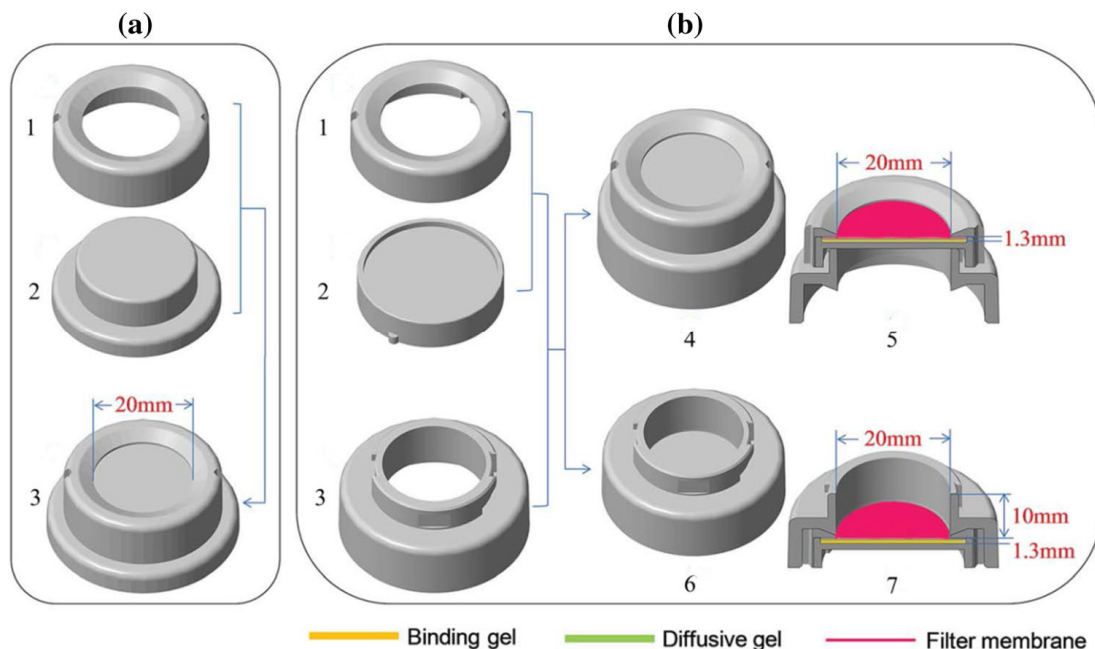
**Slika 1.** Difuzijski gradijent u tankom filmu (DGT) – shema uzorkivača i mehanizam uzorkovanja<sup>4</sup>

Masa metala koja se akumulira u uzorkivaču jednaka je sumi svih metalnih vrsta koje mogu difundirati kroz difuzijski sloj poznate debljine i veličine pora, i disocirati na slobodne ione tijekom vremena difuzije.<sup>8</sup> Metodom DGT mjeri se fluks koji predstavlja prosječnu koncentraciju tijekom vremena izlaganja uzorkivača. Uz to, metodom se omogućava istovremena analiza sadržaja više elemenata, prekoncentriraju se analiti, eliminiraju se problemi s kontaminacijom tijekom tradicionalnog uzorkovanja, uklanja se efekt matriksa i snižavaju se granice detekcije.<sup>7</sup>

#### 3.2. GRAĐA UZORKIVAČA DGT

Uzorkivači DGT izrađeni su od polipropilena i sastoje se iz dva dijela – klipa i poklopca (Slika 2). Na klip se nanosi vežući sloj s funkcionalnim skupinama, difuzijski gel i membrana. Difuzijski gel predstavlja matriks kroz koji će difundirati analiti. Labilne frakcije difundiraju kroz difuzijski sloj nakon čega se brzo i ireverzibilno vežu za vežući sloj na uzorkivaču. Poklopac osigurava da se difuzija iona iz okoline prema unutarnjim slojevima odvija samo kroz ostavljeni otvor u sredini poklopca, iako neki autori ostavljaju mogućnost difundiranja zakrivljenom putanjom. U potonjem slučaju analiti ulaze u gel ispod ruba poklopca, pa govorimo o geometrijskoj i efektivnoj površini izloženog dijela membrane.<sup>3,4,9</sup>

Nakon izlaganja uzorkivača okolišu, on se rastavlja, membrana se skida, a vežući sloj se uranja u odgovarajuću otopinu (uobičajeno 1M HNO<sub>3</sub> ili 1M NaOH) u kojoj će se ekstrahirati akumulirani elementi. Sastav dobivene otopine se ispituje određenom analitičkom metodom, ovisno o analitu, koja daje informaciju o akumuliranoj masi analita.



**Slika 2.** Građa difuznog gradijenta u tankom filmu (a) i dualne izvedbe uzorkivača<sup>4</sup>

### 3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ANALITA

Difuzijski gradijent se uspostavlja unutar difuzijskog gela i membrane (*diffusive layer* na Slici 1) te izvan površine membrane (granični difuzijski sloj, *diffusive boundary layer* – DBL na Slici 1). Difuzijski sloj uvjetuje difuziju na molekularnoj razini prema prvom Fickovom zakonu. Koncentracija analita se može dobiti prema sljedećem izrazu<sup>4</sup>:

$$c_{DGT} = \frac{M(\Delta g + \delta)}{DtA} \quad (1)$$

gdje je:

- $c_{DGT}$  koncentracija analita
- $M$  akumulirana masa analita u vežućem gelu
- $\Delta g$  debljina difuzijskog sloja (debljina gela+debljina membrane)
- $\delta$  debljina graničnog difuzijskog sloja
- $D$  difuzijski koeficijent analita
- $t$  trajanje uzorkovanja
- $A$  površina izloženog dijela membrane uzorkivača DGT

(1 vrijedi za stacionarno stanje i većinu okolinâ i načina postavljanja uzorkivača izuzev za slučajeve kratkog vremena izlaganja (manje od četiri sata), sustave s visokom razinom otopljenog organskog ugljika (DOC) te vodenim medijima s niskom ionskom jakošću (<1 mM). Nadalje, debljina graničnog difuzijskog sloja,  $\delta$  se može zanemariti u dobro miješanim otopinama i prirodnim vodama. Parametar postaje značajan pri niskim brzinama miješanja te se može izračunati iz modelnog eksperimenta uz poznatu koncentraciju analita u otopini (bez prisustva organske tvari) iz sljedećeg izraza<sup>9</sup>:

$$\frac{1}{M} = \frac{1}{tC_{DGT}A_e} \left( \frac{g}{D^g} + \frac{f}{D^f} + \frac{\delta}{D^w} \right) \quad (2)$$

gdje je:

$M$	akumulirana masa analita u vežućem gelu
$t$	trajanje uzorkovanja
$C_{DGT}$	koncentracija analita u otopini
$A_e$	efektivna površina izloženog dijela membrane uzorkivača DGT uzorkivača (ukoliko se uzima u obzir mogućnost difundiranja analita i ispod poklopca uzorkivača)
$g$	debljina difuzijskog gela
$D^g$	difuzijski koeficijent analita u difuzijskom gelu
$f$	debljina membrane
$D^f$	difuzijski koeficijent analita kroz membranu
$\delta$	debljina graničnog difuzijskog sloja
$D^w$	difuzijski koeficijent analita u mediju kojem je uzorkivač izložen

Dobivena koncentracija je usrednjena obzirom na vrijeme izlaganja (engl. *time-weighted average*, TWA), što može dati vrijedne informacije u sustavima gdje su izražene fluktuacije koncentracijâ određenih metala. Također, radi se o operativno određenim koncentracijama, odnosno koncentracijama elementa koji je prisutan u uzorku kao slobodni ion, u anorganskim kemijskim vrstama i labilnim organskim vrstama. Kemijske vrste koje se mogu uzorkovati uzorkivačima DGT u literaturi se nazivaju frakcija DGT, specijama DGT ili DGT-labilnim vrstama.

### 3.3.1. UTJECAJ VREMENA IZLAGANJA

Jednadžba 1 vrijedi za stacionarno stanje (stanje konstantnog fluksa) do kojeg ne dolazi u trenutku postavljanja uzorkivača. Stoga vrijeme izlaganja mora biti dovoljno dugo da period postizanja stacionarnog stanja ne bude značajan u odnosu na ukupno vrijeme uzorkovanja. Koliko će period postizanja stacionarnog stanja trajati, može ovisiti o nizu čimbenika kao što su: prisutnost organskih liganada, stupanj labilnosti kompleksnih spojeva u otopini koja se uzorkuje, postoji li vezanje analita za membranu ili difuzijski gel te debljina difuzijskog gela.<sup>9</sup>

Vrijeme potrebno za prolaz kroz difuzijski sloj može se izračunati iz Einstein-Smoluchowskijeve jednadžbe<sup>6</sup>:

$$t = \frac{0,5(\delta)^2}{D} \quad (2)$$

gdje je:

$t$	vrijeme difundiranja
$\delta$	ukupna debljina difuzijskog sloja
$D$	difuzijski koeficijent tvari

Za standardne parametre uzorkivača DGT,  $t$  iz jednadžbe 3 za metale je reda veličine 10 minuta, dok se za druge slučajeve može modelirati.<sup>10</sup>

U prirodnim se vodama preporuča vrijeme izlaganja od minimalno tri dana do nekoliko tjedana. Ukupno trajanje izlaganja, tj. procjena kraja uzorkovanja može biti uvjetovana pojavom obraštaja<sup>11</sup> ili kompetitivnošću iona Ca i Mg u morskom okolišu visokog saliniteta.<sup>12</sup>

### 3.3.2. UTJECAJ IONSKE JAKOSTI

Kod niske ionske jakosti otopine izražen je Donnanov potencijal između gela s jedne strane membrane i otopine s druge. Do toga dolazi ako postoji pozitivan ili negativan naboj unutar gela, a posljedica su različite koncentracije analita u gelu i u otopini. Donnanov potencijal se izražava sljedećim izrazom<sup>9</sup>:

$$\psi = \left(\frac{RT}{zF}\right) \operatorname{asinh}\left(\frac{\rho}{2zFc}\right) \quad (3)$$

gdje je:

$\psi$	Donnanov potencijal
$R$	opća plinska konstanta: 8,314 J/(molK)
$T$	temperatura
$\rho$	gustoća naboja u gelu
$z$	naboj metalnog iona (analita)
$F$	Faradayjeva konstanta: 96485 C/mol
$c$	koncentracija analita u otopini

Donnanov potencijal dobiven jednadžbom 4 može se upotrijebiti za izračunavanje odnosa koncentracije analita u gelu ( $c_{gel}$ ) i koncentracije analita u otopini ( $c_{otop}$ ) prema sljedećem izrazu<sup>9</sup>:

$$\frac{c_{gel}}{c_{otop}} = e^{-\frac{zF\psi}{RT}} \quad (4)$$

Ako je gel pozitivno nabijen, kationi će biti od njega odbijeni, pa će odnos  $c_{gel}/c_{otop}$  u otopinama ionske jakosti niže od 1 nM za metale biti manji od 1 i obrnuto. Uz uspostavu Donnanovog potencijala, značajan utjecaj na odnos  $c_{gel}/c_{otop}$  također mogu imati i specifična vezanja određenih metala za pojedine vrste gelova.<sup>9</sup>

### 3.3.3. PRISUTNOST ORGANSKIH KOMPLEKSNIH SPOJEVA

U prisutnosti jednostavnih, anorganskih spojeva može se koristiti jednadžba 1, no, ako su u otopini prisutni prirodni organski ligandi koji su dovoljno veliki da bi njihovi kompleksi imali niži koeficijent difuzije, vrijedi jednadžba 6.<sup>9</sup> Visoka razina parametra DOC zapravo znači prisutnost organskih liganada u značajnoj mjeri, pa oni koji utječu na labilnost metala i uzrokuju steričke smetnje.<sup>3</sup>

$$M = \frac{(D_M c_M + D_{ML} c_{ML}) t A_e}{\Delta g} \quad (5)$$

gdje je:

$M$	akumulirana masa analita u vežućem gelu
$D_M$	difuzijski koeficijent metala
$c_M$	koncentracija metala
$D_{ML}$	difuzijski koeficijent metalnog kompleksa
$c_{ML}$	koncentracija metalnog kompleksa
$t$	vrijeme (trajanje) uzorkovanja
$A_e$	efektivna površina izloženog dijela membrane uzorkivača DGT
$\Delta g$	debljina difuzijskog sloja (debljina gela+debljina membrane)

Jednadžba 6 zanemaruje razlike u difuzijskim koeficijentima metala i kompleksa u vodi i gelu te difuzijski sloj na površini membrane. Ako se različiti difuzijski koeficijenti uzmu u obzir, jednadžba 6 poprima sljedeći oblik<sup>6</sup>:



$$\frac{1}{M} = \frac{\frac{\delta}{D_M^w c_M + D_{ML}^w c_{ML}} + \frac{\Delta g}{D_M^g c_M + D_{ML}^g c_{ML}}}{t A_e} \quad (6)$$

gdje je:

$M$	akumulirana masa analita u vežućem gelu
$\delta$	debljina graničnog difuzijskog sloja
$D_M^w$	difuzijski koeficijent metala u vodi (otopini)
$c_M$	koncentracija metala
$\Delta g$	debljina difuzijskog sloja (debljina gela+debljina membrane)
$D_{ML}^w$	difuzijski koeficijent metalnog kompleksa u vodi (otopini)
$c_{ML}$	koncentracija metalnog kompleksa
$D_M^g$	difuzijski koeficijent metala u gelu
$D_{ML}^g$	difuzijski koeficijent metalnog kompleksa u gelu
$t$	vrijeme (trajanje) uzorkovanja
$A_e$	efektivna površina izloženog dijela membrane uzorkivača DGT

### 3.4. VEŽUĆI GELOVI

Vežuci gelovi su najčešće hidrogelovi koji sadrže funkcionalne skupine selektivne za pojedine ione. Prvi i zasad najrasprostranjeniji vežuci gel koji se koristi kod metode DGT jest otopina polivalentnog kompleksirajućeg agensa *Chelex-100*<sup>®</sup> (Bio Rad) pomoću kojeg se mogu odrediti Zn, Cd, Co, Ni, Cu, Al, Pb, Cr, Mn, Fe, As, Hg i U, iako neki autori proširuju popis na 24 elementa. Značajna je upotreba i gela *Metsorb* (adsorbens na bazi titanijevog dioksida) za uzorkovanje As, V, Sb, Mo, W, Se, P, i U, zatim gelova s funkcionalnom 3-merkaptopropilnom skupinom, tiolnom skupinom i ion-izmjenjivačkih smolâ *Duolite GT73* i *Ambersep GT74* za specijaciju Hg te *N*-metil-D-glukamina (NMDG) za uzorkovanje Cr(VI).<sup>3,4,13</sup>

Više se vrsta gelova koristi za uzorkovanje anionskih analita (metalnih i nemetalnih) i anorganskih nutrijenata, a sve je više i sustava za uzorkovanje organskih tvari. Kod anionskih vrsta radi se o gelu *Metsorb*, adsorbensima na bazi željezovog oksihidroksida (ferihidrit) i cirkonijevog oksida.<sup>3,4,13</sup>

### 3.5. DIFUZIJSKI GELOVI

Kemijski sastav (materijal) pojedinog sloja na uzorkivaču ovisi o ciljanom analitu. U slučaju difuzijskog gela, najčešće se radi o hidrogelu od poliakrilamida ili agaroze. Gel mora imati poznatu, točno definiranu debljinu.<sup>4</sup>

Gelovi se razlikuju i veličinom pora. Općenito su poznate dvije vrste gelova (dva sustava) obzirom na veličinu pora: otvoreni i restriktivni. Veličina pora u otvorenim sustavima je približno 10 nm, što omogućava ulaz i većim, organometalnim vrstama. Kod restriktivnog sustava, pore su veličine približno 1 nm. Takve pore omogućavaju ulazak anorganskim vrstama i slobodnim metalnim ionima. Za koloidne vrste općenito vrijedi da ne mogu proći kroz nijednu vrstu pora te da ne disociraju.<sup>6</sup>

### 3.6. MEMBRANE

Membrane između difuznog gela i okoline služe kao primarno kao filteri. Tipična veličina pora je 0,45  $\mu\text{m}$ , a ima i zaštitnu ulogu utoliko što sprječava kontaminaciju i oštećenje vanjske površine difuzijskog gela. Najčešći materijali membranskih filera su poliviniliden fluorid (PVDF), celulozni nitrat, celulozni acetat i hidrofilni polietersulfon (PES).<sup>4</sup>

Obzirom na probleme koje može izazvati obraštanje uzorkivača, membrane se prije izlaganja sustava mogu tretirati kako bi se obraštanje inhibiralo. U tu svrhu je uspješno ispitano djelovanje antibiotika, srebra i bakra kao i upotreba polikarbonatne membrane.<sup>4</sup>

### 3.7. VRSTE UZORKIVAČA DGT

U idealnim uvjetima, slobodni ioni metala su adsorbirani na gelu odmah pri dodiru, potpuno labilni kompleksi disociraju, nakon čega ion metala ostaje na gelu, dok kod kompleksnih spojeva koji nisu potpuno labilni, taj proces ovisi o konstanti disocijacije i trajanju difuzije. Vrijeme difuzije između ostaloga ovisi o putu kojeg čestica treba proći, a na temelju tog parametra razlikujemo dvije vrste uzorkivača DGT:

1. **klasičan** (engl. *classic DGT*) s ukupnom debljinom difuzijskog sloja od 1,125 mm (tipična debljina difuznog sloja na površini membrane je 0,2 mm, tipična debljina difuzijskog gela od 0,8 mm i debljina membrane 0,125 mm),
2. **brzovežujući** (engl. *fast DGT*) s ukupnom debljinom difuzijskog sloja od 0,325 mm (tipična debljina difuznog sloja na površini membrane je 0,2 mm, debljina membrane 0,125 mm) koji ne sadrži difuzijski gel.

## 4. SPECIJACIJA I FRAKCIONACIJA PRIMJENOM METODE DGT I MODELIRANJE

Metali i njihovi spojevi se u vodi obzirom na mogućnost detekcije metodom DGT mogu razlikovati prema najmanje tri razine labilnosti<sup>3</sup>:

1. **Labilne vrste** koje se mogu mjeriti uzorkivačima DGT sa standardnom konfiguracijom difuzijskog gela koja podrazumijeva debljinu sloja od 0,8 mm. Navedeni uzorkivači uzorkuju samo labilne vrste. U ovu skupinu spadaju slobodni ioni i spojevi koji lako i potpuno disociraju.
2. **Relativno labilni, kompleksni spojevi** koji se mogu detektirati određenim modifikacijama konfiguracije gela. Variranjem debljine u mjerenjima može se povećati točnost mjerenja budući da se labilnosti kompleksiranih metala i otopljenih metala (metalnih iona) razlikuju, pa se obje vrste mogu mjeriti. Ako se mjeri samo koncentracija otopljenih metala, disocijacija kompleksnih spojeva se može promovirati upotrebom difuzijskog gela jače moći adsorpcije, a ovisi dakako, o kinetici izmjene liganada.<sup>7</sup>
3. **Inertne vrste** nisu podložne disocijaciji, pa radi veličine molekule ne difundiraju u difuzijski gel.

Jedna od najvažnijih odlika metode DGT jest mogućnost frakcioniranja *in situ*, tj. specijacije s kojom se frakcionacija najčešće poistovjećuje u znanstvenim radovima. Frakcionacija se metodom DGT vrši putem određivanja labilnih vrsta na temelju njihove difuzije unutar difuzijskog gela i njihovim interakcijama s krutom fazom. Na ovaj se način sprječava raspad analita tijekom transporta i čuvanja.<sup>3</sup>

### 4.1. SPECIJACIJA I SPECIJACIJSKA ANALIZA

Saznanje o karakteristikama specijacije određenog elementa u prirodnim vodama može nam pomoći pri odabiru konfiguracije uzorkivača DGT koja je selektivna za određeni element ili vrstu spoja. Ipak, za dobivanje potpunije slike kemijskog sastava određenog uzorka, metoda DGT bi se trebala kombinirati s metodama modeliranja ili analitičkim metodama kao što je HPLC-ICP-MS, čija bi svrha bila dodatna separacija kemijskih vrsta.<sup>3</sup>

U nastavku je prikazano nekoliko različitih vrsta specijacije upotrebom metode DGT: specijacija kombiniranjem metode DGT i softvera za modeliranje specijacije kojom su se određivale pojedine specije istog metala (primjer Mn i Pb) ili ukupan sadržaj frakcije DGT pojedinog metala (primjer Zn, Cd, Pb, Cu, Ni i Co), zatim redoks specijacija, tj. specijacija kemijskih vrsta različitog oksidacijskog stanja (primjer Cr, As i Hg), specijacija kombiniranjem metode DGT metode i drugih, vezanih tehnika analize (primjer Hg) te specijacija radioaktivnih elemenata (primjer U, Eu i Np).

#### 4.1.1 DGT-LABILNE VRSTE METALA I MODELIRANJE

Za specijaciju većine metala najčešće se koristi vežući gel *Chelex-100*<sup>®</sup> u uzorkivaču DGT. U literaturi se mogu naći usporedbe tako dobivenih koncentracija s modelirajućim softverima koji predviđaju specijaciju tvari u okolišu (v. §4.3).

Za određivanje labilne Mn frakcije koristio se *Chelex-100*<sup>®</sup> gel i softver (model) CHEAQS. Rezultati su pokazali da je moguće predvidjeti koncentraciju slobodnog iona  $Mn^{2+}$  te donekle  $Mn(SO_4)_{(aq)}$ . Negativno nabijene manganove vrste detektirane su upotrebom *DE81*<sup>®</sup> membrane, dok je model CHEAQS pokazao dobro slaganje s uzorkom uzorkovanim kroz *P81*<sup>®</sup> membranu za ione  $Mn^{2+}$  i  $Mn(OH)^+$  u uzorcima s niskim koncentracijama iona  $Ca^{2+}$ .<sup>(3)</sup>

Cindrić i sur.<sup>(14)</sup> usporedili su rezultate koncentracija frakcija DGT za Cd, Ni, Zn, Pb, Cu i Co s modelom dobivenim Sustavom vMINTEQ na uzorcima morske vode uzetim na ušću rijeke Rječine u Rijeci. Kao vežučji gel upotrebljen je *Chelex-100*<sup>®</sup>. Ulazni parametri za modeliranje su bili: udio fulvične i huminske kiseline od 90%, odnosno 10% u ukupnoj organskoj tvari u uzorku, modeliranje interakcija s organskom tvari po modelu *NICA-Donnan*, tipični sastav morske vode stvarno izmjerene saliniteta te stvarno izmjerena vrijednost parametra DOC. Uočeno je dobro slaganje frakcija DGT za Cd, Ni i Zn. Kod Pb i Cu model je predvidio niže vrijednosti, a za Co previsoke. Kao razlog neslaganja navodi se mogućnost difuzije organskih kompleksa u uzorkivače DGT te upotreba difuzijskih koeficijenata kiselina umjesto spojeva tih kiselina i pojedinog metala. Uz to, dostupni modeli su razvijeni primarno za slatke vode te se baziraju na svojstvima organskih spojeva u slatkovodnom okolišu, dok se prilagodbe modela na morski okoliš tek trebaju učiniti.

Ista autorica je sa suradnicima usporedila ukupne koncentracije frakcija DGT s modelnim podacima u uzorcima iz estuarija rijeke Krke. Za izračun predviđenih, DGT-labilnih koncentracija pojedinog metala korištena je jednadžba 8<sup>12</sup>:

$$C_{dyn} = C_{inorg} + \frac{C_{FA}D_{FA}}{D_{eff}} + \frac{C_{HA}D_{HA}}{D_{eff}} \quad (8)$$

gdje je:

$C_{dyn}$	predviđena (dinamička) koncentracija metala
$C_{inorg}$	koncentracija anorganskih kompleksa metala
$C_{FA}$	koncentracija kompleksa metala i fulvične kiseline
$D_{FA}$	difuzijski koeficijent kompleksa metala i fulvične kiseline
$C_{HA}$	koncentracija kompleksa metala i huminske kiseline
$D_{HA}$	difuzijski koeficijent kompleksa metala i huminske kiseline
$D_{eff}$	efektivni difuzijski koeficijent anorganskog kompleksa metala

Predviđena koncentracija označena je dinamičkom jer metoda DGT ovisi o kinetici disocijacije metalnih kompleksa, za parametre  $D_{FA}$  i  $D_{HA}$  korišteni su difuzijski koeficijenti same fulvične, odnosno huminske kiseline u korištenom gelu, dok su  $D_{eff}$  utvrđene eksperimentalno. Za modeliranje specijacije korišten je softver vMINTEQ, koncentracije aniona i kationa izračunate su prema Dittmarovom zakonu, a DOC i koncentracije otopljenih metala su izmjerene. Za 90% organske tvari se smatralo da je čini fulvinska, a za 10% huminska kiselina. Najbolje slaganje stvarnih i predviđenih koncentracija su pokazali rezultati za Cd, za Pb i Cu predviđene su niže koncentracije, a za Ni i Co više. U slučaju Zn, došlo je do kontaminacije i rezultati nisu bili usporedivi.

Kao alternativa vežučjoj fazi za uzorkovanje Pb koristio se i *Saccharomyces cerevisae* imobiliziran u agaroznom gelu. Takva konfiguracija pokazala se selektivnom za kationske olovjeve vrste u slatkoj i morskoj vodi s granicom detekcije od 0,75 µg/L za izlaganje od 72 sata. Modelirajući softver CHEAQS ukazao je na prisutnost gotovo isključivo kationskih vrsta ( $Pb^{2+}$ ,  $Pb(NO_3)^+$  i  $Pb(OH)^+$ ) pri približno neutralnoj pH vrijednosti vode.<sup>3</sup>

#### 4.1.2 REDOKS SPECIJACIJA KROMA METODOM DGT

Trovalentne i četverovalentne kromove vrste se nalazi u kationskim i anionskim oblicima, pa se za specijaciju Cr koristi kombinacija vežučjih fazâ koja je selektivna i za anione i za katione. Drugi pristup podrazumijeva uključivanje dodatnih metoda detekcije ili selektivnih agensa za eluciju.<sup>3</sup>

Gel *Chelex-100*<sup>®</sup> zadržava kationske vrste kroma, dok se ferihidrit pokazao učinkovitim za zadržavanje anionskih. Neki su su gelovi selektivni za pojedina oksidacijska stanja kroma, bez obzira na naboj čestice (npr. NMDG koji zadržava primarno Cr(VI)). Separacija vrsta prilikom elucije moguća je upotrebom NaOH koji eluira samo Cr(VI).<sup>3, 13</sup>

#### 4.1.3 REDOKS SPECIJACIJA ARSENA METODOM DGT

Radi štetnog djelovanja koje As ima na okoliš i ljudsko zdravlje, uz Hg i Cr, istraživanje ovog elementa među najčešćim je fokusima istraživanja redoks specijacije. Kod specijacije arsena metodom DGT, kombiniraju se gelovi koji selektivno vežu vrste istog oksidacijskog stanja As s onima koji zadržavaju ukupan anorganski As. Koncentracije pojedine vrste se zatim dobivaju jednostavnim oduzimanjem. Gelovi i membrane uzorkivača se odabiru prema ciljanom oksidacijskom stanju As, dok se *Metsorb* koristi za uzorkovanje ukupnog As.<sup>3</sup>

#### 4.1.4 REDOKS SPECIJACIJA ŽIVE METODOM DGT

Za specijaciju Hg, odnosno metilžive (MeHg) koristi se vežući gel s funkcionalnom 3-merkaptopropilnom skupinom. Daljnjim istraživanjem utvrđeno je da difuzijski sloj, uobičajeno poliakrilamidni, utječe na specijaciju iona. Isti fenomen pokazuje i agarozni gel, što znači da je obje metode potrebno vezati s dodatnim metodama separacije, npr. plinskom kromatografijom.<sup>15</sup>

Sličan pristup se primijenio za određivanje četiri specije Hg:  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$  i  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ . Za njihovo određivanje koristile su se kombinacije metode DGT (ion-izmjenjivačka smola i funkcionalne tiolne skupine, *Duolite GT73*<sup>®</sup> i *Ambersep GT74*<sup>®</sup>) i kemijskog određivanja tekućinskom kromatografijom (LC), atomskom fluorescencijskom spektrometrijom s hladnim parama (CV-AFS) i vezanim sustavom ionski kromatograf – induktivno spregnuta plazma – masena spektroskopija (IC-ICP-MS).<sup>16, 17</sup>

#### 4.1.5 DGT-LABILNE VRSTE URANA I RADIONUKLIDA I MODELIRANJE SPECIJACIJE

Specijacija urana se uglavnom bazira na uzorkovanju anionskih oblika korištenjem kationskih funkcionalnih grupa u difuzijskom gelu. Radi se o ionima urana koji kompleksiraju s ionima  $(\text{CO}_3)^{2-}$ , a spoznaja o tome koji vežući gel zadržava određene kemijske vrste dobivena je uz pomoć softvera za modeliranje. Ispitane su smole *DE81*<sup>®</sup> i *Chelex-100*<sup>®</sup>, pri čemu su dobiveni zadovoljavajući rezultati za alkalne, prirodne, slatke vode. Koncentracije dobivene upotrebom smole *Dowex resin*<sup>®</sup> pokazale su najbolje slaganje s koncentracijom ukupnog urana.<sup>3</sup>

Dostupna su i istraživanja drugih radionuklida, pa se *Chelex-100*<sup>®</sup> pokazao prikladnim za uzorkovanje iona  $\text{Eu}^{3+}$  pri pH vrijednosti oko 7, iona  $\text{UO}_2^{2+}$  u području pH vrijednosti do 10,7 i iona  $\text{NpO}_2^+$  u području pH vrijednosti do 11,7.<sup>3</sup>

## 4.2. FRAKCIONACIJA

### 4.2.1. LABILNI ANORGANSKI I ORGANSKI KOMPLEKSNI SPOJEVI METALA

Veliku važnost pri analizi metala u tragovima u uzorcima iz okoliša ima podatak o tome jesu li prisutni spojevi analita i huminske kiseline budući da ligandi iz huminske kiseline utječu na mobilnost metala. S druge strane, ukoliko su takvi spojevi podložni disocijaciji, sama prisutnost spojeva huminske kiseline ne mora nužno značiti da analiti neće difundirati u gel uzorkivača.<sup>3</sup>

Anorganske vrste su generalno manje veličine i brže i lakše difundiraju od organskih. Stoga se paralelnim uzorkovanjem iste otopine upotrebom više uzorkivača s različitim vrstama smola i različitim veličina pora (paralelnom upotrebom otvorenih i restriktivnih sustava) mogu na temelju razlike u

difuzijskim koeficijentima odvojiti frakcije organskih i anorganskih tvari. Koncentracije pojedinih frakcija mogu se izračunati sljedećim izrazima<sup>3</sup>:

$$c_{anorg} = \frac{\frac{{}^oM}{{}^oD_{org}} - \frac{rM}{rD_{org}}}{k\left(\frac{{}^oD_{anorg}}{{}^oD_{org}} - \frac{rD_{anorg}}{rD_{org}}\right)} \quad (9)$$

$$c_{org} = \frac{\frac{{}^oM}{{}^oD_{anorg}} - \frac{rM}{rD_{anorg}}}{k\left(\frac{{}^oD_{org}}{{}^oD_{anorg}} - \frac{rD_{org}}{rD_{anorg}}\right)} \quad (10)$$

gdje je:

- $c_{anorg}$  koncentracija anorganskih vrsta
- $c_{org}$  koncentracija organskih vrsta
- ${}^oM$  akumulirana masa u uzorkivaču otvorenih pora
- $rM$  akumulirana masa u uzorkivaču restriktivnih pora
- ${}^oD_{org}$  difuzijski koeficijent organskih vrsta u uzorkivaču otvorenih pora
- $rD_{org}$  difuzijski koeficijent organskih vrsta u uzorkivaču restriktivnih pora
- ${}^oD_{anorg}$  difuzijski koeficijent anorganskih vrsta u uzorkivaču otvorenih pora
- $rD_{anorg}$  difuzijski koeficijent anorganskih vrsta u uzorkivaču restriktivnih pora
- $k$  konstanta ovisna o parametrima samog uzorkivača: površini i debljini gela te vremenu izlaganja

S druge strane, neka su istraživanja pokazala da neki spojevi huminske kiseline (500-1750 Da) ipak difundiraju u restriktivni sustav DGT, što dovodi u pitanje upotrebu navedenih izraza pri frakcionaciji organskih i anorganskih spojeva metala.<sup>12, 18</sup>

Metoda DGT se može koristiti i za proučavanje labilnosti i pokretljivosti kompleksnih spojeva. Variranjem debljine difuzijskog sloja dokazano da su kompleksi Zn(II) i Cd(II) s huminskom kiselinom labilniji od spojeva te kiseline i Pb(II) ili Cu(II), kao i da određeni difuzijski gelovi selektivno zadržavaju metalne ione, no ne i njihove komplekse. Natrijev poliakrilat tako zadržava ione  $Cu^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ , no ne i njihove komplekse s EDTA te ion  $Ni^{2+}$ , ali ne i komplekse koje Ni stvara s huminskom kiselinom.<sup>19, 20, 21</sup>

#### 4.2.2. FRAKCIONACIJA NANOČESTICA

Teoretski, jako sitne nanočestice bi se mogle detektirati upotrebom metode DGT te diferencirati paralelnom upotrebom uzorkivača različite građe. Dobiveni rezultati se mogu usporediti s analizom filtrata nakon ultrafiltracije. Eventualno više vrijednosti koncentracija metala u filtratu u odnosu na frakciju DGT mogu ukazivati na prisutnost inertnih koloidnih čestica u uzorku.<sup>3</sup>

#### 4.3. MODELIRANJE SPECIJACIJE

Softveri za modeliranje specijacije mogu na temelju poznatih, ulaznih podataka o okolišu (npr. pH, ionska jakost, podaci o ukupnim koncentracijama metala i organske tvari) simulirati specijaciju pojedinog metala. Usporedba rezultata mjerenja metodom DGT s rezultatima softverskog modeliranja može pomoći pri interpretaciji mjerenja te validiranju podataka prikupljenih mjerenjem, ali i onih dobivenih modeliranjem. Metoda DGT se najčešće i koristi u kombinaciji s modeliranjem ili vezanim tehnikama analize. Najčešće korištene platforme za modeliranje su: *Windermere Humic Aqueous Model* (WHAM) temeljen na ionu huminske kiseline i *Visual MINTEQ* (vMINTEQ) temeljen na modelu *NICA – Donnan* i modelu *Stockholm Humic* (SHM, varijanta modela WHAM). U primjeni je čest i

*Chemical Equilibria in Aquatic Systems* (CHEAQS) baziran na također na modelu WHAM. Softveri vMINTEQ i CHEAQS su besplatni programi dostupni na internetu.

Meylan i sur.<sup>22</sup> usporedili su rezultate voltametrijske analize Cu i Zn s predviđanjima modela WHAM, vMINTEQ i SHM. Predviđanja koncentracije slobodnog, otopljenog Cu i anorganski vezanog Cu su bila viša od onih određenih voltametrijski, što se pripisalo jakom vezanju Cu i organske tvari. Otopljena frakcija se dobiva analizom filtrata uzorka filtriranog kroz pore veličine 0,45 µm. Rezultati koncentracija Zn su u ovom radu pokazali dobro slaganje.

Unsworth i sur.<sup>23</sup> usporedili su rezultate koncentracija Cd, Cu, Ni i Pb dobivene metodom DGT s ravnotežnim koncentracijama dobivenim modelima WHAM i vMINTEQ. Koncentracije Cu frakcije DGT činile su 13% ukupne koncentracije Cu nakon filtracije, što se poklapalo s predviđanjima modela koja su iznosila 20% udjela. U slučaju Pb, frakcija DGT iznosila je svega 3%, što ukazuje na dominaciju inertnih olovljevih vrsta u uzorku. Model WHAM je realno predvidio koncentraciju Cd uzimajući u obzir prisutnost koloidnog Fe, dok je model vMINTEQ predložio niže koncentracije. Što se tiče Ni, frakcija DGT je pokazala niže koncentracije u odnosu na oba modela vjerojatno zbog spore disocijacije Ni u odnosu na druge metale. Niz drugih istraživanja pokazao je slične fenomene za navedene metale. Također, primijećeni su manji udjeli frakcija DGT u filtriranim uzorcima za Fe, Pb, Cu i Al (5%, 12%, 42%, odnosno 50%) radi tendencije stvaranja organskih kompleksa ili pojave u koloidnom obliku.<sup>8</sup>

#### 4.4. OTOPLJENI SADRŽAJ METALA I FRAKCIJE DGT

Uobičajen je postupak filtracije uzoraka vode kroz filter veličine pora 0,45 µm pri čemu se razdvajaju otopljene i koloidne čestice od neotopljenih vrsta. Otopljene vrste su potencijalno bioraspoložive budući da lakše prolaze kroz stanične membrane. Stoga se filtrirane frakcije mogu koristiti za procjenu bioraspoloživosti kada je formiranje koloidnih čestica zanemarivo. Usporedbom koncentracija metala u filtriranim uzorcima s koncentracijama dobivenim pomoću uzorkivača DGT (frakcija DGT), može se kvantificirati udio koloidnih i inertnih vrsta.<sup>3</sup>

Iz rezultata u literaturi može se zaključiti da su frakcije DGT u većini realnih sustava nižih koncentracija u odnosu na ukupno dostupan metal u filtriranom uzorku na kojima se provode mjerenja *in situ*. To, naravno, u prvom redu ovisi o kemijskim vrstama u sustavu, budući da će metal u kompleksu s organskim (labilnim) ligandom dospjeti u frakciju DGT uz manji difuzijski koeficijent. Isto tako, treba uzeti u obzir da je metoda DGT u prvom redu ovisna o vremenu izloženosti uzorkivača te se tako veoma razlikuje od konvencionalne metode diskretnog uzorkovanja, pa različiti rezultati mogu biti posljedica vremenskih promjena, tj. unosa ili uklanjanja tvari iz okoliša koji se ispituje. Nadalje, što je čestica (molekula) veća, njen koeficijent difuzije je niži, pa su posljedično koncentracije takvih tvari određene metodom DGT niže. Druge moguće pogreške uključuju parametre samog uzorkivača kao što su njegova geometrija, difuzijski granični sloj ili obraštanje.<sup>3, 12</sup>

Odnos frakcija DGT i sadržaja otopljenih metala u uzorku je obrnuto proporcionalan sklonosti metala ka stvaranju organskih kompleksa. Redosljed metala prema jakosti njihove veze s ligandima, odnosno kapacitetu za vezanje liganada je: Cu>Co≈Ni≈Pb>Cd. Na početku niza je Cu koji se u velikom udjelu u okolišu nalazi u organskim kompleksnim spojevima, dok je kod Cd izražen afinitet prema stvaranju anorganskih vrsta. Neke studije pokazuju da se taj afinitet kod Cd smanjuje s povećanjem saliniteta u vodi, odnosno da je više organskih spojeva Cd u područjima višeg saliniteta, dok Co pokazuje obrnutu tendenciju.<sup>12</sup>

#### 4.5. USPOREDBA S DRUGIM INSTRUMENTNIM METODAMA

Cindrić i sur.<sup>12</sup> usporedili su rezultate dobivene metodom DGT metodom s rezultatima dobivenim voltametrijskom, metodom ASV za Cu. Ova je voltametrijska metoda pogodna za usporedbu s metodom DGT jer se njome mogu odrediti anorganske i slabo vezane organske bakrove vrste. Otopine iz uzorkivača DGT analizirane su na ICP-MS uređaju visoke rezolucije (HR ICP-MS).

Koncentracije dobivene voltametrijskom metodom su generalno niže od onih iz uzorkivača DGT. Radi se o prosječno 34% nižim vrijednostima. Niže koncentracije su bile očekivane radi razlike u efektivnom trajanju mjerenja (~0,1 s za ASV i ~13,5 s za DGT) i razlike u debljini difuzijskog sloja (~10 μm za ASV i ~0,9 mm za DGT). Također, iako su obje metode osjetljive za Cu, kod voltametrijske metode je izraženija uloga organskih kompleksa u akumulaciji nego što je to kod metode DGT.<sup>12</sup>



## 5. PRAKTIČNA PRIMJENA UZORKIVAČA DGT

Direktive Europske unije 2000/60/EZ, 2008/105/EZ i 2013/39/EU definiraju tzv. standarde kakvoće okoliša (SKO; engl. *environmental quality standards*, EQS) kao alate za procjenu kemijskog statusa vodâ te ukupno 45 kemijskih tvari koje su proglašene prioritarnima u području vodene politike. Za te se kemijske tvari drži da štetno utječu ili potencijalno mogu štetno djelovati na vodni okoliš. Zemlje članice Europske unije su dužne osigurati određeni nivo kvalitete vodnog okoliša te uspostaviti programe praćenja i klasifikacije voda obuhvaćenih navedenim direktivama. Standard kakvoće mora biti utvrđen za vodu, sediment i biotu te za krajnje receptore među kojima su i ljudi.

Za metale je propisano i određivanje bioraspoloživosti koja se može određivati i modelima, uzimajući u obzir parametre kakvoće vode koji mogu utjecati na specijaciju (pH, tvrdoća, DOC i dr.). Ključna je uloga metode DGT u razvoju modela koji će moći opisati i predviđati stanje morskog okoliša na određenom području. Ti se modeli sve češće i koriste za predviđanje bioraspoloživosti i toksičnosti, od kojih neki pokazuju dobro slaganje s mjerenjima, dok prikladnost drugih tek treba ispitati.

Metoda DGT ima važnu primjenu pri utvrđivanju sastava komponenti morskog okoliša, bioraspoloživosti i toksičnosti. Za labilne i male kompleksne spojeve metala postoji velika vjerojatnost prolaska kroz stanične membrane, pa su stoga organizmi podložniji njihovom utjecaju, odnosno njihove su toksičnosti i bioraspoloživosti veće. Budući da se upravo takve vrste određuju upotrebom uzorkivača DGT, jasan je potencijal ove metode za određivanje bioraspoloživih frakcija pojedinih metala. Istraživanja koja su provedena paralelno na bioti i uzorkivačima DGT, pokazala su dobro slaganje koncentracija frakcija DGT s koncentracijama tvari u živim organizmima pri kojima se manifestiraju jasni efekti (npr. inhibicija rasta).<sup>3</sup>

Pojednostavljen pristup bioraspoloživosti s kemijskog aspekta jest da se prvo odijele inertne od aktivnih (labilnih) specija. Postoje i neutralne kemijske vrste koje mogu proći kroz staničnu membranu pri čemu ne disociraju, pa njihova koncentracija u okolišu u kojem se organizam nalazi direktno utječe na bioraspoloživost. Budući da različite specije istog metala mogu imati veoma različito djelovanje na žive organizme (npr. kod Hg, Pb ili Sn), također se može izvesti zaključak da labilnost nije jedini uvjet da bi određena tvar, tj. kemijska specija bila bioraspoloživa.<sup>11</sup>

### 5.1. MODELI ZA PROCESE OGRANIČENE BRZINOM PROLASKA KROZ MEMBRANU

Kod spojeva koji su skloni disocijaciji, dio spoja koji stvarno prođe kroz staničnu membranu jest najčešće slobodni ion metala (npr.  $\text{Cu}^{2+}$ ). No, postoje mnoge iznimke kod kojih će bioraspoloživost ovisiti o sposobnosti konverzije u bioraspoložive oblike tijekom prolaska kroz membranu, tj. o brzini ulaska u stanicu. Ako je ta brzina mala u odnosu na brzinu difundiranja tvari do površine membrane, ulaskom čestice u stanicu neće se značajno mijenjati koncentracija tvari u okolišu (na površini membrane) i tada govorimo o biološkom unosu koji ovisi o brzini prolaska kroz membranu. Fenomen ovisi o aktivitetu iona, pa se naziva i modelom aktiviteta slobodnih iona – FIAM (engl. *free ion activity model*).<sup>11</sup>

Dogradnja modela FIAM temelji se činjenici da postoji interakcija između iona metala i površine biološke membrane te da su u zauzimanju vežućih mjesta na membrani određeni ioni kompetitivniji od drugih. Ovaj model, koji je također primjenjiv u slučajevima kad je brzina prolaska metala kroz membranu mala u odnosu na brzinu difuzije do površine membrane, naziva se biotički ligand model –

BLM (engl. *biotic ligand model*).<sup>11</sup> Model BLM je implementiran u Sjedinjenim Američkim Državama za određivanje Cu i u testnoj je fazi u mnogim zemljama članicama Europske unije.

## 5.2. PROCESI OGRANIČENI BRZINOM DIFUZIJE

U slučaju kad je kritični dio procesa biološkog unosa brzina difuzije kojom slobodni ioni dolaze do vanjske površine biološke membrane, dolazi do pojave značajnog koncentracijskog gradijenta u otopini, a koncentracija slobodnih iona uz površinu membrane je veoma blizu nuli. U području gradijenta, kompleksni spojevi disociraju i doprinose biološkom unosu tvari. Svi kemijski oblici kojima je vrijeme potrebno za difuziju kroz gradijent dovoljno za disocijaciju, postaju bioraspoloživi. Mjerenja DGT se generalno dobro slažu s ovim modelom.<sup>11</sup>

## 5.3. PREDVIĐANJE TOKSIČNOSTI

Predviđanje toksičnosti je uglavnom vezano uz okoliše s visokom koncentracijom tvari. U takvim okolnostima dobro je slaganje s mjerenjima pokazao model BLM. Iako uzorkivači DGT ne mogu u potpunosti stvoriti stvarne uvjete biološkog unosa, tj. kompeticiju iona u slučaju primjene modela BLM, rezultati dobiveni metodom DGT pokazuju dobru korelaciju s rezultatima dobivenim modelom. Slaganje je opaženo kod koncentracija metala pri kojima su vidljive reakcije nekih organizama na toksičan okoliš.<sup>11</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom seminarskom radu prikazan je pregled podataka iz znanstvene literature o kemijskoj frakcionaciji, specijaciji i bioraspoloživosti metala u vodi s naglaskom na metodu difuznog gradijenta u tankom filmu (metoda DGT). Prikazana je i građa uzorkivača te princip primjene metode.

Od ukupnog udjela metala u vodenom okolišu, samo je dio bioraspoloživ. Radi se o udjelu u ukupnoj masi metala koji može, ali ne mora nužno biti i toksičan. U istraživanju bioraspoloživosti metala prvi problem predstavlja specijacija, odnosno utvrđivanje koje kemijske vrste (specije) mogu proći kroz staničnu stijenku živog organizma. U svrhu specijacije koriste se neke voltometrijske metode i kemiluminiscencijska detekcija, a sve su prisutniji i vezani instrumentni sustavi analize. Dodatan se problem javlja pri konzerviranju i transportu uzorka od mjesta uzorkovanja do mjesta analize budući da u tom vremenu može doći do znatnih promjena te u konačnici, krive slike stanja okoliša.

Jedno od rješenja oba problema je metoda DGT– upotreba posebnih, pasivnih uzorkivača kojima se uzorkuju samo određene kemijske vrste i pritom ostaju nepromijenjene do trenutka analize. Pasivni uzorkivači uzorkuju određenu kemijsku vrstu (ili više njih), čija se koncentracija kasnije određuje pogodnom tehnikom. Uzorkivači su jednostavne građe i ekonomični, a razvojem velikog broja različitih difuznih i vežućih gelova te membrana uzorkivača, postiže se visoka selektivnost za ciljane kemijske vrste. Značajan napredak učinjen je u istraživanju specijacije i frakcionacije tvari upotrebom uzorkivača DGT u vodi, sedimentu i tlu. Upotrebom različitih gelova može se utvrđivati potencijalno bioraspoloživa frakcija metala (frakcija DGT), zatim specijacija na osnovu naboja čestice (pozitivno i negativno nabijene vrste koje sadrže određeni element) ili oksidacijskog stanja. Frakcionacija na anorganske i organske spojeve može se dobiti paralelnom uporabom više uzorkivača različite veličine pora. Metodom DGT se primarno uzorkuju slobodni ioni metala, njihovi anorganski te labilni organski spojevi, no sve je više primjene i u detekciji anorganskih nutrijenata i organskih tvari.

Prednosti metode DGT su u prekoncentraciji analita, smanjenju mogućnosti kontaminacije uzorka, smanjenju efekta matriksa, niskim granicama detekcije i stabiliziranju kemijskih vrsta od trenutka uzorkovanja do analize. Ograničenja kod uzorkovanja metala postoje u vremenu izlaganja i sastavu otopine koja se uzorkuje (probleme predstavljaju niska ionska jakost otopine koja se uzorkuje i prisutnost organske tvari).

Velika je uloga rezultata dobivenih metodom DGT u razvoju i validaciji modela specijacije. Dosad je razvijeno nekoliko različitih modela, a na razvoju novih se i dalje radi u svrhu dobivanja informacija o bioraspoloživosti, tj. toksičnosti te definiranju standarda kakvoće okoliša u skladu s direktivama Europske unije 2000/60/EZ, 2008/105/EZ i 2013/39/EU. Razvijena su i dva modela koja opisuju fenomene, odnosno ograničenja ulaska kemijske tvari u stanicu, FIAM i BLM. Primijećeno je dobro slaganje podataka dobivenih metodom DGT s modelom BLM koji pokazuje dobre rezultate i u predviđanju toksičnosti.

## BIBLIOGRAFIJA

1. A. Kot, J. Namiesnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 69-79
2. F. Plavšić, Z. Lovrić, A. Wolf Čoporda, I. Z. Ježić Vidović, D. Čepelak Dodig, D. Gretić, S. Đurašević, *Siguran rad s kemikalijama*, Zagreb: O-tisak d.o.o. (2014) 1-22
3. A. A. Menegário, L. N. Marques Yabuki, K. S. Luko, P. N. Williams, D. M. Blackburn, *Anal. Chim. Acta* **983** (2017) 54-66
4. C. Li, S. Ding, L. Yang, M. Ren, M. Chen, X. Fan, E. Lichtfouse, *Environ. Chem. Lett.* **17** (2019) 801-831
5. D. M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G.G. Danielsson, H. Muntau, H. P. van Leeuwen, R. Lobinski, *Pure Appl. Chem.* **8** (2000) 1453-1470
6. Y. Gao, C. Zhou, C. Gaulier, A. Bratkic, J. Galceran, J. Puy, H. Zhang, M. Leermakers, W. Baeyens, *Trends Anal. Chem.* **116** (2019) 92-101
7. W. Davidson, H. Zhang, *Anal. Chem.* **67** (1995) 3391-3400
8. D. Omanović, I. Pižeta, P. Vukosav, E. Kovács, S. Frančišković-Bilinski, J. Tamás, *Sci. Total Environ.* **511** (2015) 423-434.
9. W. Davidson, H. Zhang, *Environ. Chem.* **9** (2012) 1-13
10. A. Altier, M. Jiménez-Piedrahita, R. Uribe, C. Rey-Castro, J. Galceran, J. Puy, *Anal. Chim. Acta* **1060** (2019) 114-124
11. H. Zhang, W. Davidson, *Environ. Chem.* **12** (2015) 85-101
12. A.-M. Cindrić, S. Marcinek, C. Garnier, P. Salaün, N. Cukrov, B. Oursel, V. Lenoble, D. Omanović, *Sci. Total Environ.* **721** (2020)
13. Y. Pan, D. X. Guan, D. Zhao, J. Luo, H. Zhang, W. Davison, L. Q. Ma, *Environ. Sci Technol.* **49** (2015) 14267-14273.
14. A.-M. Cindrić, N. Cukrov, G. Durrieu, I. Pižeta, D. Omanović, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017)
15. Y. Gao, S. De Craemer, W. Maeyens, *Talanta* **120** (2014) 470-474
16. P. Pelcova, H. Docekalova, A. Kleckerova, *Anal. Chim. Acta* **866** (2015) 21-26
17. Y. S. Hong, E. Rifkin, E. J. Bouwer, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 6429-6436
18. J. Balch, C. Guéguen, *Chemosphere* **119** (2015) 498-503
19. I. Gaabass, J. D. Murimboh, N. M. Hassan, *Water Air Soil Pollut.* **202** (2009) 131-140
20. H. Fan, Y. Bian, D. Su, G. Tong, T. Sun, *Talanta* **79** (2009) 1228-1232
21. C. Hong, D. Jia, N. Yong-xin, S. Ting, *Chem. Res. Chinese Univ.* **27** (2001) 703-707
22. S. Meylan, N. Odzak, R. Behra, L. Sigg, *Anal. Chim. Acta.* **510** (2004) 91-100

23. E.R. Unsworth, K.W. Warnken, H. Zhang, W. Davison, F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, J. Galceran, P. Gunkel, E. Kalis, D. Kistler, H.P. Van Leeuwen, M. Martin, S. Noël, Y. Nur, N. Odzak, J. Puy, W. Van Riemsdijk, L. Sigg, E. Temminghoff, M. Lou, Tercier-Waeber, S. Toepperwien, R.M. Town, L. Weng, H. Xue *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 1942-1949