



Škola za zaštitu životne sredine  
Water Workshop  
Novi Sad, 6-9. septembar, 2011.



# ANALIZA PRIRODNIH ORGANSKIH MATERIJA

## IZOLACIJA, FRAKCIONISANJE I KARAKTERIZACIJA



dr Aleksandra Tubić  
Department za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine  
Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad

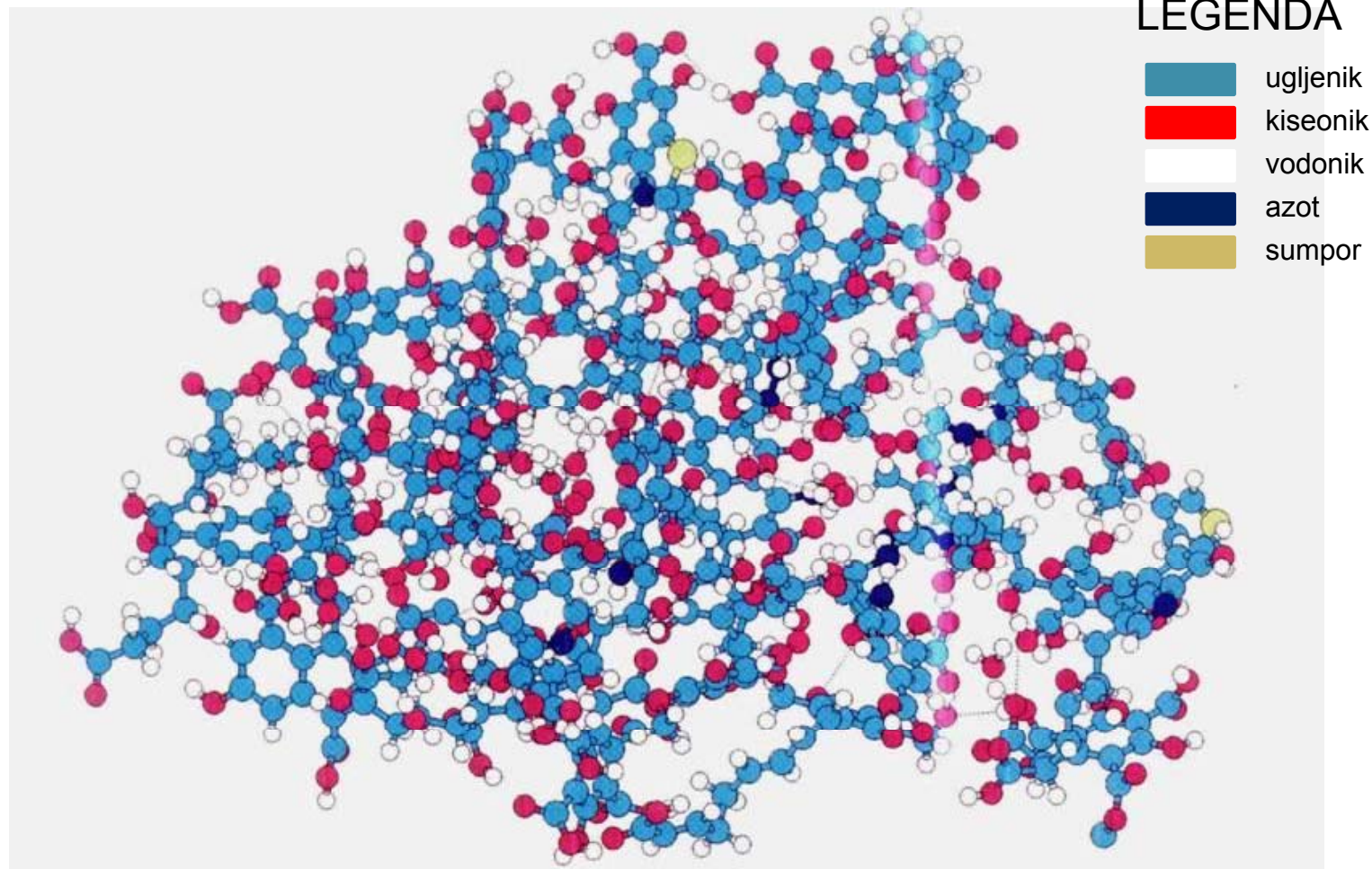
## Prirodne organske materije - POM

- Široko rasprostranjene u vodama
  - površinske – uglavnom
  - podzemne – u manjem broju slučajeva (Banat – Zrenjanin, Kikinda)
- Kompleksa smeša organskih jedinjenja

Struktura POM

H I D R O F I L N A	Kisele	Veći sadržaj alifatičnih struktura Ugljeni hidrati Proteini Šećeri Aminokiseline
Bazne		
Neutralne		
H I D R O F O B N A	Kisele	Aromatične strukture Fenolne strukture Strukture sa konjugovanim dvostrukim vezama
Bazne		
Neutralne		





3-D model molekula POM  
(H.R. Schulten, 1999, *J.Analytical Applied Pyrolysis* 49, 385-415)



## Funkcionalne grupe POM

- karboksilne,
- fenolne hidroksilne,
- alkoholne hidroksilne,
- karbonilne,
- hinonske i metoksi grupa,
- estarske,
- etarske i keto grupe

## Sadržaj i karakteristike POM u vodi zavise od:

- klimatskih uslova
- geologije
- topografskih karakteristika terena

## Specifičnosti POM

- značajan uticaj na ponašanje polutanata
- specifičnost za svaki matriks
- promenljivost zavisno od spoljašnjih uticaja



- Prisustvo prirodnih organskih materija u resursima vode za piće nepoželjno je iz više razloga:
  - Huminske materije menjaju organoleptičke osobine vode dajući joj žuto-mrko obojenje, kao i specifičan (neprijatan) miris i ukus;
  - Tokom hlorisanja vode (hlorom ili hlor-dioksidom) iz huminskih materija nastaju toksični nusproizvodi, pre svega, trihalometani i veći broj drugih organohlorinih jedinjenja;
  - Tokom procesa koagulacije stabilizuju dispergovane i koloidne čestice; povećavaju potrebu za koagulantom čime se povećava sadržaj proizvedenog otpadnog mulja
  - Tokom ozonizacije se transformišu u biodegradabilnija organska jedinjenja, kao što su karboksilne kiseline, aldehidi i ketoni, zbog čega se može povećati razvoj i rast mikroorganizama u distribucionom sistemu. Takođe, neka od ovih jedinjenja imaju kancerogena ili mutagena svojstva;
  - Mogu negativno da utiču na adsorpciju drugih polutanata na granulovanom aktivnom uglju, koji se koristi za njihovu eliminaciju iz vode;
  - Kada se nalaze u većim koncentracijama mogu se istaložiti u distribucionom sistemu

NEOPHODNO IH JE KVANTIFIKOVATI I OKARAKTERISATI



# IZOLACIJA I KONCENTRISANJE

- Reversna osmoza
- Uparavanje pod pritiskom (*vakuum destilacija*)
- Sušenje zamrzavanjem (*“freeze drying”*)
- Sorpcione metode

Nedostatak navedenih metoda:

- koncentrišu se i soli, koje su prisutne u prirodnim vodama

## **Reversna osmoza**

- najčešće primenjivana metoda za izolaciju POM
- u najmanjoj meri remeti fizičko-hemijske karakteristike POM
- *recovery* POM – 80-99%



# FRAKCIONISANJE

- na smolama
- gel hromatografija visokih performansi (*high-performance size-exclusion chromatography* - HPSEC)
- membranska filtracija
- druge metode
  - tečna hromatografija visokih performansi na reversnoj fazi (*reversed-phase high-performance liquid chromatography* - RPHPLC)
  - “*field-flow*” frakcionisanje (*field-flow fractionation* - FFF)
  - “*flow field-flow*” frakcionisanje (*flow field-flow fractionation* – FIFFF)



## Frakcionisanje primenom smola

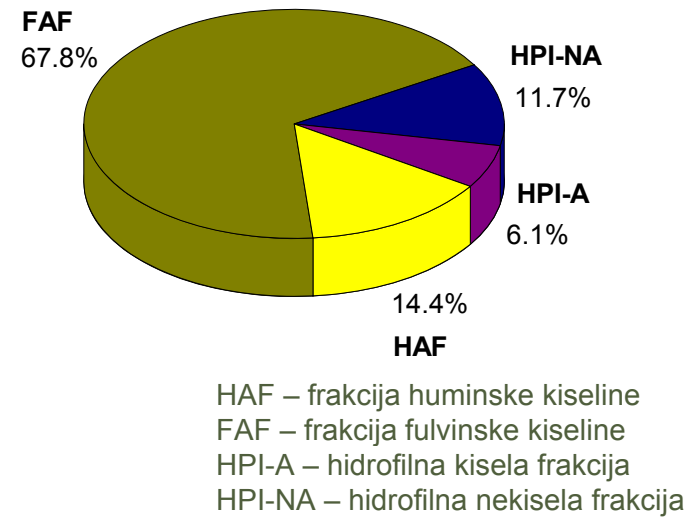
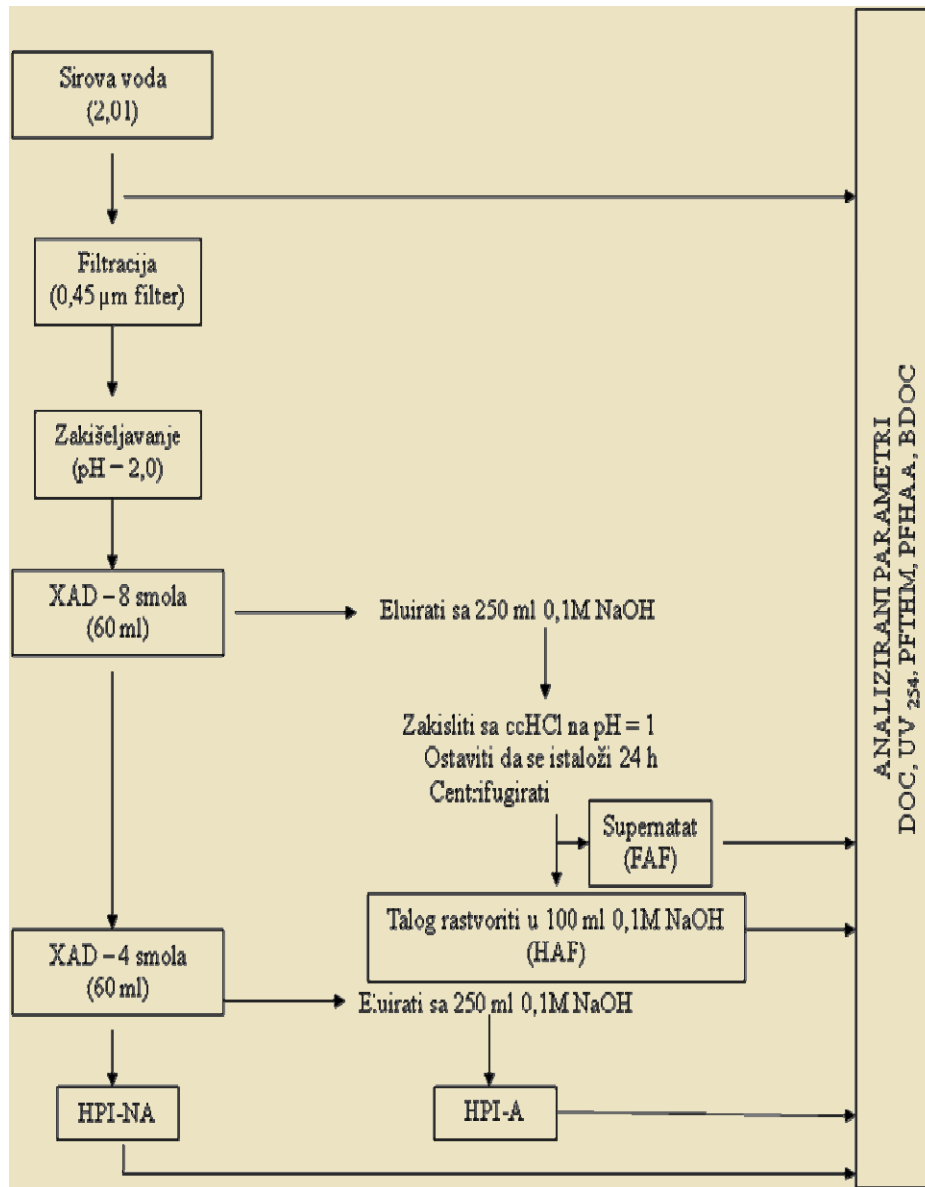
- jedna od najčešće primenjivanih tehnika frakcionisanja
- hidrofobne i hidrofilne frakcije POM definišu se kao organska materija koja se adsorbuje ili ne adsorbuje na XAD smolama – XAD-4 i XAD-8
- metod uveden 1981.god. (*Leenhee, 1981, Environmental Science and Technology, 15(5), 578-587*)
- standardni metod za izolovaje huminskih i fulvinskih kiselina – Međunarodno društvo za huminske supstance
  - XAD-8 – hidrofobna frakcija
    - fulvinske kiseline
    - huminske kiseline
  - XAD-4 – slabo hidrofilna kisela frakcija
  - ne adsorbuju – hidrofilna ne-kisela frakcija
- Hidrofilna frakcija se dodatno može frakcionisati pomoću (*Marhaba i sar., 2003, J.Hazard. Mater. B101,43-54*)
  - AG-MP-50, katjonska smola
  - WA-10, slaba anjonska smola

### *Nedostaci metode:*

- moguće narušavanje hemijske ili fizičke strukture POM - ekstremne pH
- moguća ireverzibilna adsorpcija POM na smolama
- kontaminacija curenjem sa smole
- eksluzioni efekat







## Distribucija DOC u sirovoj vodi sa teritorije opštine Zrenjanina

(Tubić i sar., 2010, *Journal of Environmental Science and Health: Part A*, 45, 363-369)



## Gel hromatografija visokih performansi (*high-performance size-exclusion chromatography* - HPSEC)

- Frakcionisanje zasnovano na veličini molekula – sa porastom molekulske mase, smanjuje se retenciono vreme
- Uvedeno **1960**-tih kao gel hromatografija (*Posner (1963), Nature 198, 1161-1163; Gjessing (1965), Nature 208, 1091-1092*)
  - meki gelovi imaju malu moć razdvajanja
- **1978** razvijena gel hromatografija visokih performansi (*Fukano i sar. (1978), J.Chromatogr. 166, 47-54*)
- Opis metode:
  - **kolone** – različite silikatne ili polimerne
  - **eluenti** – fosfatni pufer sa prilagođenom jonskom jačinom ili rastvor natrijum-acetata
  - **detektori** – FTIR, *on-line* DOC analizatori (*on-line organic carbon detektor*, OCD), fluorescentni detektori sa emisionom ekscitacijom, **UV/VIS**, DAD, MS, Masena spektrometrija sa jonskom ciklotron rezonancom i furijeovom transformacijom (ESI-FTICR-MS), kombinacije UV/VIS - spektrofluorometar i UV/VIS – OCD
  - **standard za identifikaciju** – na osnovu pretpostavljene strukture POM –
    - polistiren sulfonat (PPS) – najčešći
    - polietilenglikoli
- HPSEC **može** poslužiti za praćenje stepena uklanjanja POM u pojedinim fazama tretmana vode
- SEC profili **ne sadrže** dovoljno informacija za procenu potencijala formiranja dezinfekcionih nusproizvoda preostalih POM u vodi, nakon tretmana

## Membranska filtracija

- POM se mogu frakcionisati primenom membrana sa različitim *cut-off* opsegom
- razdvajanje na membranama zavisi od:
  - molekulske strukture
  - molekulske mase
  - uslova frakcionisanja

### Nedostaci:

- zadržavanje makromolekula na porama membrane – smanjenje propustljivosti



## Druge metode frakcionisanja

tečna hromatografija visokih performansi na reversnoj fazi (RPHPLC)

- razdvajanje je zasnovano na polarnosti - raspodela između nepolarne stacionarne faze i polarne mobilne faze
- ima ograničenu primenu u odnosu na HPSEC

*“field-flow”* frakcionisanje (FFF)

- metoda slična hromatografiji za razdvajanje makromolekula, koloida i čestica

*“flow field-flow”* frakcionisanje (FIFFF)

- tehnika nastala iz FFF
- primenjuje se za određivanje molekulske mase molekula
- detektori – UV/VIS, ICP AES, ICP MS
- rezultato su uporedivi sa rezultatima HPSEC

- *Nedostatak objavljenih podataka o primeni ovih tehnika za frakcionisanje POM*



# KARAKTERIZACIJA

## Elementarni sastav i određivanje strukturnih karakteristika

- Piroliza kombinovana sa GC-MS analizom (Py-GC-MS)
- Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)
  - $^{13}\text{C}$  – NMR
  - $^1\text{H}$  – NMR
  - nove NMR tehnike – 2-D NMR i višedimenzionalna NMR
- Infracrvena spektrometrija sa furijeovom transformacijom (FTIR)
- Tečna hromatografija – masena spektrometrija (LC-MS)
- Masena spektrometrija sa jonskom ciklotron rezonancom i furijeovom transformacijom (FTICR-MS)



## Piroliza kombinovana sa GC-MS analizom (Py-GC-MS)

- princip metode
  - razlaganje POM na analitički dostupne fragmente primenom visokih temperatura u anoksičnim uslovima
  - GC razdvajanje fragmenata
  - MS detekcija
- primena – za dobijanje strukturnih podataka o molekulima koji čine POM

Najznačajniji fragmenti dobijeni pirolizom POM iz vode

(Leenher i Croue (2003), *Environ. Sci. Technol.* 37(1), 18A-26A)

Vrsta	Fragmenti
Polisaharidi	Metilfuran, furfural, acetilfuran, metilfurfural, levoglukozanon, hidroksipropanon, ciklopentanon, metilciklopentanon, sirćetna kiselina
Amino šećeri	Acetamid, N-metilacetamid, propionamid, sirćetna kiselina
Proteini	Acetonitril, benzonitril, fenilacetanitril, piridin, metilpiridin, pirol, metilpirol, indol, metilindol, toluen, stiren, fenol, p-krezol
Polifenolne komponente	Fenol, o-, m-, p-krezol. Metilfenol, dimetilfenol
Lignini	Metoksifenol
Tanini	Katehol
DNK	Furfuril alkohol
Polihidroksibutirati	Butanska kiselina

## Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)

- za određivanje funkcionalnih grupa POM
- praktični značaj samog NMR mali, zbog heterogenosti i kompleksnosti POM
- kombinuje se sa metodama frakcionisanja (SEC, smole) – jednostavniji spektri
- $^{13}\text{C}$  – NMR
  - za identifikaciju karboksilnih struktura POM, kao i alifatičnog ugljenika, o-alkih ugljenika, aromatičnih i karbonil ugljenika
  - za tečne i čvrste uzorke
  - moćna tehnika ako se kombinuje sa  $^1\text{H}$  – NMR
  - manje je osetljiva za ugljenik u odnosu na  $^1\text{H}$  – NMR na vodonik
  - POM moraju biti izolovane za NMR
- $^1\text{H}$  – NMR
  - veoma osetljiva tehnika
  - interpretacija spektara može biti komplikovana
- $^{15}\text{N}$  – NMR
  - za identifikaciju ugljenika vezanog za azot
  - širi pregled strukture POM
  - slaba osetljivost – mali udeo  $^{15}\text{N}$  u prirodnom azotu
- 2-D NMR, višedimenzionalna NMR
  - dvodimenzionalni spektar
  - omogućava posmatranje pikova koji se preklapaju
  - omogućava posmatranje okruženja određene strukture
  - otežana detekcija velikih molekula



## Infracrvena spektrometrija sa furijeovom transformacijom (FTIR)

- široko rasprostranjena primena
- princip otiska prsta
- identifikacija organskih i neorganskih funkcionalnih grupa
- interpretacija spektra može biti otežana zbog složene strukture POM
- priprema uzorka i koncentrisanje je neophodno pre analize - ATR kristal

### Najvažnije karakteristike FTIR spektra huminske materije

(Rodriguez i Núñez (2009), Water Environ. J. 23, 1-8)

Talasna dužina (cm <sup>-1</sup> )	Struktura
3400	Vezane O-H (alkoholi, fenoli, karboksilne grupe)
2850-2960	C—H (CH <sub>3</sub> i CH <sub>2</sub> )
2620	O—H (karboksilen grupe vezane vodoničnim vezama)
1720	C=O (karboksilne grupe)
1630	C=C (alkeni i aromatični prstenovi)
1540	N—H (N—H strukture)
1455	C—H (CH <sub>3</sub> i CH <sub>2</sub> )
1410	O—H (karboksilne grupe)
1375	C—H (CH <sub>3</sub> )
1260 i 1220	C—O (karboksilne grupe, fenolne, aromatični/nezasićeni etri)
1095 i 1030	C—O (alkoholi, alifatični etri)
805	C—H (tri- i tetra-supstituisani aromatični prstenovi)



## Tečna hromatografija – masena spektrometrija (LC-MS)

- Jedna od najnovijih tehnika koje se primenjuju u istraživanjima strukture POM
- Primenjuje se LC-MS i HPLC-MS
- Kombinuje se sa:
  - elektrosprej jonizacijom (ESI) – nije potrebna derivatizacija POM
  - SEC – za opisivanje fulvinskih kiselina niže molekulske mase
- LC-MS/MS
- Slaba osetljivost prema molekulima visoke molekulske mase
- Izražen je uticaj matriksa

### **Masena spektrometrija sa jonskom ciklotron rezonancom i furijeovom transformacijom (FTICR-MS)**

- najnoviji pristup u proučavanju POM
- veoma visoka rezolucija
- može se razdvojiti na hiljade jona i veoma tačno odrediti molekulska formula
- ESI–FTICR-MS
- RPHPLC-FTICR-MS
- za interpretaciju kompleksnih struktura POM razvijen je univerzalni algoritam za automatsku obradu masenih spektara, zasnovan na diferencijalnoj statistici ukupnih masa

# ZAKLJUČAK

- POM koje su prirodno prisutne u površinskim i podzemnim vodama imaju negativan uticaj na kvalitet vode za piće i moraju biti uklonjene u tretmanu
- Da bi se postigao efikasan tretman neophodno je okarakterisati POM prisutne u sirovoj vodi i pratiti promene količine i strukture tokom tretmana
- Tokom proteklih godina veći broj tehnika je uveden u cilju karakterizacije POM
- Pre primene analitičkih metoda često se primenjuju izolacija, koncentrisanje i frakcionisanje
- Izolacija na smolama i frakcionisanje se najčešće primenjuju pre dalje analize primenom HPSEC i FTIR
- HPSEC – veoma popularna metoda frakcionisanja – u kombinaciji sa većim brojem različitih detekcionih metoda
- NMR – široka primena u karakterizaciji POM
- Sve značajnija uloga MS nakon kombinovanja sa HPLC-om – omogućava direktnu analizu POM bez prethodne destrukcije
- FTICR-MS – najnovija tehnika
- Budući razvoj – povezivanje FTICR sa NMR tehnikom



A vibrant, multi-tiered waterfall cascading down a lush, green, moss-covered rock formation. The water is clear and bright, creating a misty spray at the base. The surrounding vegetation is dense and verdant, with various shades of green. The overall scene is serene and natural.

HVALA NA PAŽNJI!