

Utjecaji matrice s visokim udjelom kalcija u emisijskoj plazma spektrometriji pri analizi elementnog profila školjki

Kobelja, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:792808>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

Kristina Kobelja

**Utjecaj matrice s visokim udjelom kalcija
u emisijskoj plazma spektrometriji pri analizi
elementnog profila školjki**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sande Rončević u sklopu diplomskog studija kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević na predanom znanju i iskustvu, te na danoj prilici da razvijam svoje vještine kroz kvalitetan laboratorijski rad. Hvala neposrednom voditelju dipl. ing. Ivanu Nemetu, na korisnim savjetima, strpljenju i profesionalnom vodstvu kroz istraživački rad. Posebno hvala doc. dr. sc. Jeleni Čulin i dr. sc. Ivanu Županu sa Sveučilišta u Zadru, koji su velikodušno ustupili uzorke prikupljenih kunjki za potrebe ovog istraživanja.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	I
ABSTRACT	II
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Metode atomske spektrometrije.....	2
2.1.1. Izvori pobudnog zračenja u atomskoj spektrometriji	3
2.2. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu.....	5
2.2.1. Značajke instrumenta ICP-AES.....	5
2.2.1.1. Plazma kao izvor zračenja	5
2.2.1.2. Radiofrekvencijski generator.....	7
2.2.1.3. Sustav za uvođenje uzorka	7
2.2.1.4. Spektrometar.....	8
2.2.1.5. Detektor	10
2.2.2. Analitička obrada uzorka i mjerenje	12
2.2.2.1. Mokra razgradnja uzoraka potpomognuta mikrovalnom energijom	12
2.2.2.2. Ugađanje instrumenta i mjerenje	13
2.2.2.3. Položaj plamenika.....	13
2.3. Spektralne značajke induktivno spregnute plazme.....	15
2.3.1. Ionizacijski procesi u induktivno spregnutoj plazmi.....	15
2.3.2. Vrste emisijskih linija.....	16
2.3.3. Robustni uvjeti u plazmi.....	17
2.3.4. Omjer intenziteta ionska linija/atomska linija	18
2.4. Interferencije u emisijskoj plazma spektrometriji	20
2.4.1. Spektralne interferencije u tehnici ICP-AES.....	20
2.4.2. Utjecaj matrice s visokim udjelom kalcija na jasnoću analitičkog signala	22
2.4.3. Metode uklanjanja utjecaja matrice uzorka	23
2.5. Određivanje metala u biološkim uzorcima	24
2.5.1. Metali u školjkašima.....	24
2.5.2. Kunjka	25

2.5.3. Kemijska karakterizacija kunjke	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. Kemikalije	27
3.2. Instrumenti.....	27
3.3. Uzorkovanje	28
3.4. Priprema uzoraka za analizu	29
3.5. Instrumentacija i mjerni postupak	30
3.5.1. Priprema kalibracijskih otopina.....	30
3.5.2. Značajke instrumenta.....	31
3.6. Statistička obrada podataka	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. Procjena utjecaja matrice s visokim sadržajem kalcija na emisijske signale	33
4.2. Prikaz mjerenih rezultata za analizu elementnog profila ljuštura kunjki	36
4.3. Kemometrijski alati u procjeni elementnog profila kunjki	42
5. ZAKLJUČAK	46
6. POPIS LITERATURE	47
ŽIVOTOPIS.....	III

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Kemijски odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ MATRICE S VISOKIM UDJELOM KALCIJA U EMISIJSKOJ PLAZMA SPEKTROMETRIJI PRI ANALIZI ELEMENTNOG PROFILA ŠKOLJKI

Kristina Kobelja

Zavod za analitičku kemiju
Prirodoslovno – matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Školjke su najčešće proučavani bio-indikatorski organizmi u istraživanjima antropogenih utjecaja na stanje okoliša. Sadržaj metala u ljušturama školjaka uvelike ovisi o uvjetima u okolišu, budući da se metali akumuliraju procesima biomineralizacije, precipitacije ili adsorpcije. Koncentracije metala inkorporiranih u mineralnoj strukturi ljuštura se vrlo sporo mijenjaju, za razliku od tkiva gdje su promjene koncentracije uzrokovane izmjenom fizioloških ili reproduktivnih uvjeta. Analitičke spektrometrijske metode temeljene na plazma izvoru omogućavaju precizno i istodobno određivanje koncentracije metala u realnim uzorcima. Međutim, interferencije uzrokovane matricom s visokim udjelom kalcijevih soli mogu značajno utjecati na kvantitativno određivanje sadržaja metala na način da povećavaju ili reduciraju ukupni intenzitet promatranih spektralnih linija.

U ovom istraživanju, koncentracije osamnaest metala mjerene su metodom ICP-AES, u uzorcima s visokim sadržajem kalcijevog karbonata kao što su ljuštura kunjki (*lat. Arca noae*, Linnaeus, 1758.). Usporedbom mjerenih detekcijskih granica i područja linearnosti za standardne vodene otopine i otopine s prethodno ugođenom matricom, ispitana je prisutnost spektralnih i ne-spektralnih interferencija. Odabrani ugođeni uvjeti mjerenja primijenjeni su na reprezentativnim uzorcima kunjki prikupljenih tijekom nekoliko mjeseci 2014. godine u Parku prirode Telašćica i Pašmanskom kanalu. Zadovoljavajuća analitička točnost primijenjenih postupaka obrade i mjerenja uzoraka utvrđena je poredbenom analizom certificiranih referentnih materijala. Elementni profil uzoraka izveden je iz mjerenih podataka upotrebom kemometrijskih alata, tj. univarijatnim i multivarijatnim statističkim testovima. Utjecaj različitih uvjeta okoliša na sadržaj metala u ljušturi promatran je kroz analizu glavnih komponenata (PCA). Određivanjem elementnog profila ljuštura kunjke dobiven je uvid u stanje vrste i utjecaja okoliša na promatranim lokacijama.

(58 stranica, 17 slika, 5 tablica, 30 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: ICP-AES, kunjka, metali, PCA

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
Neposredni voditelj: Ivan Nemet, dipl. ing.

Ocjenjivači: 1. Izv.prof.dr.sc Sanda Rončević
2. Izv.prof.dr.sc. Ines Primožić
3. Izv.prof.dr.sc. Biserka Prugovečki

Rad prihvaćen: 23. rujna 2016.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

HIGH-CONTENT CALCIUM MATRIX EFFECTS ON ELEMENTAL PROFILING OF SHELL SAMPLES IN EMISSION PLASMA SPECTROMETRY

Kristina Kobelja

Laboratory of Analytical Chemistry
Faculty of Science
University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Mussels are commonly probed bio-marker species in studies of anthropogenic influences on environment. Metal content in shells mostly depends on environmental conditions, since metals tend to accumulate through biomineralization, precipitation and adsorption processes. Concentration of incorporated metals in mineral structure of the shell changes slowly, in contrast to variable concentration of metals in mussels' tissue caused by changes in physical and reproductive conditions. Analytical spectrometric methods based on plasma source provide precise and simultaneous determination of metal concentrations in real samples. However, interferences caused by high-content calcium matrix can have a significant influence on quantitative determination of the metal content in samples, in a manner of increasing or decreasing total intensity of the observed spectral lines.

In this study, concentrations of the eighteen elements were measured using ICP-AES method, in samples with high-content calcium matrix, such as the Noah Ark's shell crust (*lat. Arca noae*, Linnaeus, 1758.). Comparison of the measured detection limits and linearity ranges for standard aqueous solutions and matrix-matched calibration solutions was used to test the presence of spectral and no-spectral interferences. The chosen measuring conditions were applied on representative samples of Noah's Ark shells collected in Pašman channel and in Nature park Telašćica during several months in 2014. Satisfying analytical accuracy of applied analytical procedures and sample measurements was established in comparison with certified reference materials. The elemental profile of the shell samples was derived from measured set of data using chemometric tools, univariate and multivariate analysis. The impact of different environmental conditions on elements content in shell samples was observed by use of multivariate statistical method (PCA). Elemental profiling of mussel shell Noah's Ark provides an insight in species status as well as in environmental status on the observed locations.

(58 pages, 17 figures, 5 tables, 30 literature references, Croatian original)

Keywords: ICP-AES, metals, Noah's Ark shell, PCA

Supervisor: Dr. Sanda Rončević, Assoc. prof.

Assistant Supervisor: Ivan Nemet, Dipl. ing.

Reviewers: 1. Dr. Sanda Rončević, Assoc. prof.

2. Dr. Ines Primožič, Assoc. prof.

3. Dr. Biserka Prugovečki, Assoc. prof.

Thesis accepted: 23rd September 2016.

1. UVOD

U brojnim istraživanjima u procjeni stanja okoliša, metali su prepoznati kao toksični i nerazgradljivi polutanti. Zbog mogućnosti da bioakumuliraju i koncentriraju različite otopljene tvari, školjke su uobičajeni bio-indikatori promjena u morskom okolišu. Za razliku od tkiva, čiji kemijski sastav nije stalan i ovisan je o vrsti, hidrografskim prilikama, uvjetima prehrane, te sezoni mriještenja, elementni sastav ljuštore koji je pretežito anorganski materijal, nepromjenjiv je obzirom na fiziološke i okolišne uvjete, i služi poput elementnog „otiska prsta“ te vrste.

Ljuštore školjaka su materijal pretežito mineralnog porijekla, te sadrže visok udio kalcijevih soli. Visok udio kalcija u uzorku stvara interferencije u elementnoj analizi metodom ICP-AES, budući da povećava ili reducira ukupni intenzitet promatranih spektralnih linija. Utjecaj kalcija na emisijske intenzitete može se smanjiti postizanjem robustnih uvjeta u plazmi, ugađanjem radnih uvjeta instrumenta, odnosno upotrebom prethodno ugođene matrice ili metode dodatka unutarnjeg standarda.

U ovom radu, određen je elementni sastav ljuštore kunjke (*lat. Arca noae*, Linnaeus, 1758), jestivog školjkaša koji nastanjuje područje istočnog Jadrana, metodom atomske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (*engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-AES). Reprezentativni uzorci kunjki, ulovljeni su na tri lokacije, tijekom siječnja, lipnja, rujna, studenog i prosinca 2014. godine. Prva lokacija je zaštićeno područje zaljeva Parka prirode Telašćica, a druge dvije lokacije nalaze se u blizini urbanih područja i frekventnih pomorskih puteva Pašmanskog kanala - područja za koje se očekuje izraženiji antropogeni utjecaj.

Metodom ICP-AES utvrđen je sadržaj glavnih elemenata, elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu i elemenata u tragovima u sastavu ljuštore kunjki, a usporedbom mjerenih detekcijskih granica i područja linearnosti za standardne vodene otopine i otopine s prethodno ugođenom matricom, ispitana je prisutnost spektralnih i ne-spektralnih interferencija. Dobiveni rezultati podvrgnuti su univarijantnoj i multivarijantnoj statističkoj analizi, kako bi se među jedinkama istovremeno definirale zajedničke karakteristike i/ili pronašle značajne razlike. Stoga je svrha istraživanja bila procjena odnosa elementnih profila jedinki prikupljenih s različitih geografskih lokacija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Metode atomske spektrometrije

Metode atomske spektrometrije su skupina tehnika koje se temelje na mjerenju procesa apsorpcije, emisije ili fluorescencije zračenja slobodnih atoma uzorka, te predstavljaju važan alat u elementnoj analizi uzoraka različitog porijekla.

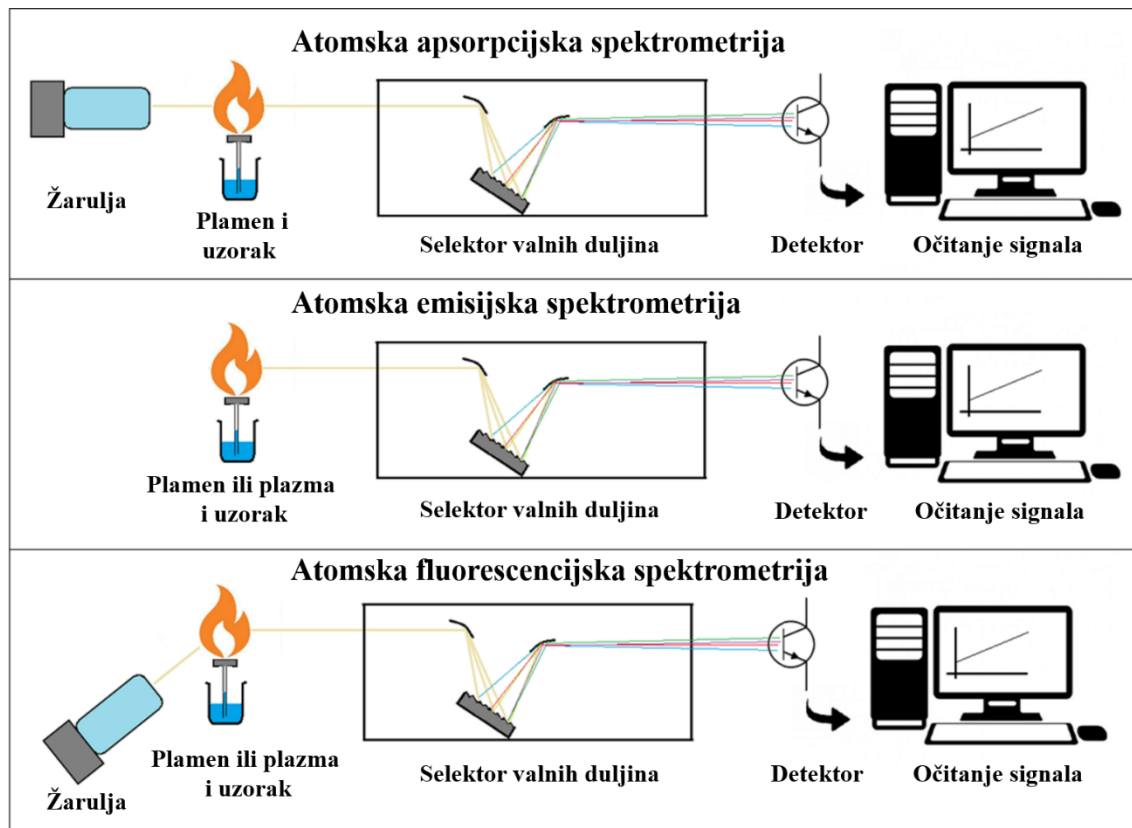
Uslijed procesa apsorpcije i/ili emisije slobodnih atoma u području ultraljubičastog i vidljivog dijela elektromagnetskog spektra (UV/VIS, 160-800 nm), dobivaju se kvalitativne i kvantitativne informacije o uzorku. Kvantitativna informacija je koncentracija specije u uzorku i povezana je s količinom apsorbiranog ili emitiranog elektromagnetskog zračenja. Kvalitativna informacija je vrsta specije u uzorku i povezana je s valnom duljinom apsorpcije ili emisije, karakterističnom za svaki element.

U atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji (*engl. atomic absorption spectrometry*, AAS), izvor emitira zračenje valne duljine karakteristične za element od interesa. Atomi elementa apsorbiraju zračenje izvora, pa je intenzitet apsorbiranog zračenja proporcionalan koncentraciji elementa koji se određuje u uzorku.

U atomskoj fluorescencijskoj spektrometriji (*engl. atomic fluorescence spectrometry*, AFS), koristi se isti izvor zračenja i princip selektivnog pobuđivanja atoma kao i u apsorpcijskoj atomskoj spektrometriji. Pobuđeni atomi gube dio energije sudarom ili vibracijskom deaktivacijom, pri čemu prelaze u pobuđeno stanje manje energije, u kojem se događa emisija zračenja. Intenzitet emisije zračenja u pravilu se mjeri pri linijama većeg intenziteta i proporcionalan je koncentraciji elementa u uzorku. Metoda nije pogodna za istodobno mjerenje velikog broja elemenata u uzorku, obzirom na značajne spektralne interferencije i ograničen broj selektivnih izvora zračenja i detektora u instrumentu.

U atomskoj emisijskoj spektrometriji (*engl. atomic emission spectrometry*, AES), uzorak je podvrgnut visokotemperaturnom izvoru zračenja, pri čemu se potpuno atomizira i uslijed sudara slobodnih atoma i elektrona ionizira. Nastali atomi i ioni pobude se u stanja više energije, a zatim dio energije gube u obliku topline ili radijativno (emisijom), pri čemu prelaze u stanja manje energije. Intenzitet emitiranog zračenja proporcionalan je koncentraciji elementa od interesa koji se određuje u uzorku. Prednost emisijskih tehnika nad ostalim tehnikama je potpuna razgradnja uzorka u izvoru zračenja. Time se istodobno pobuđuje velik broj elemenata, pa je moguća istodobna višeelementna analiza. Međutim,

veliki broj emisijskih linija istodobno pobuđenih atoma elemenata, može uzrokovati spektralne interferencije, koje utječu na kvalitetu analitičkog postupka, stoga posebnu pozornost treba obratiti na ugađanje mjernih parametara.¹



Slika 1. Shematski prikaz tipova instrumenata u atomskoj spektrometriji

2.1.1. Izvori pobudnog zračenja u atomskoj spektrometriji

Izvor pobudnog zračenja osnovni je dio svakog instrumenta u atomskoj spektrometriji. O temperaturi, stabilnosti i intenzitetu izvora zračenja ovisi učinkovitost spektrometrijske tehnike koja se koristi.

Kod spektrometrijskih tehnika AAS i AFS, kao izvori pobudnog zračenja koriste se lampe sa šupljom katodom ili bezelektrodne lampe za određivanje lako hlapivih elemenata (poput As, Se i Te). Za precizna mjerenja emisijske linije izvora moraju biti uže od apsorpcijskih linija. Kod spektrometrijskih tehnika AES, izvor zračenja mora postići dovoljno visoku temperaturu, kako bi se pobudili atomi svih elemenata u uzorku, te kako bi nastale emisijske linije bile što intenzivnije, da se i elementi visokih energija pobude mogu detektirati sa dobrom osjetljivošću.

Plamen kao najstariji izvor zračenja zbog jednostavne primjene, najčešće se koristi pri određivanju alkalijskih i zemnoalkalijskih metala. Grafitna peć je isključivo apsorpcijska tehnika, koja se također koristi za određivanje elemenata s niskim energijama pobude. Električni luk i iskra mogu postići više temperature u odnosu na plamen i peć, te pobuditi gotovo sve stabilne elemente, osim onih sa izuzetno visokim energijama za pobudu, kao što su nemetali (kisik, dušik, halogeni elementi) i plemeniti plinovi. No, nedostatak takvih izvora pobude je mala stabilnost, niska reproducibilnost i znatan utjecaj matrice.

Za razliku od navedenih izvora zračenja, različite vrste plazme imaju značajnu prednost kao izvori u atomskoj emisijskoj spektrometriji. Plazma je ionizirani plin velike energije koji se sastoji od smjese elektrona, pozitivno nabijenih iona, neutralnih atoma, radikala i molekula. Nastaje ionizacijom inertnih, najčešće plemenitih plinova (argon, helij) ili dušika. Plazma izvori postižu visoke temperature 6000-10000 K, pri kojima dolazi do potpune razgradnje, atomizacije i pobude atoma uzoraka. Prema načinu nastanka, razlikuju se tri vrste plazma izvora: jednosmjerna strujna plazma (*engl. direct current plasma*, DCP-AES), koja nastaje električnim pražnjenjem argona između dvije elektrode u protoku jednosmjerne struje; mikrovalno inducirana plazma (*engl. microwave induced plasma*, MIP), koja nastaje pobudom argona pomoću visokofrekvencijskog magnetskog polja frekvencije 2000-3000 MHz i induktivno spregnuta plazma (*engl. inductively coupled plasma*, ICP-AES) koja nastaje pobudom argona pomoću visokofrekvencijskog magnetskog polja frekvencije od nekoliko desetina MHz.²

2.2. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

Najčešće korištena spektrometrijska tehnika s plazma izvorom je atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (*engl. inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES*). Tehnikom ICP-AES moguće je odrediti većinu elemenata periodnog sustava u uzorcima različitog porijekla: tlo, stijene, voda, zrak, biološki materijal. Zbog postizanja vrlo visokih temperatura, automatizacije mjerenja, te mogućnosti ugađanja radnih uvjeta, pomoću izvora plazme je moguće napraviti vrlo preciznu višeelementnu analizu u kratkom vremenu.

2.2.1. Značajke instrumenta ICP-AES

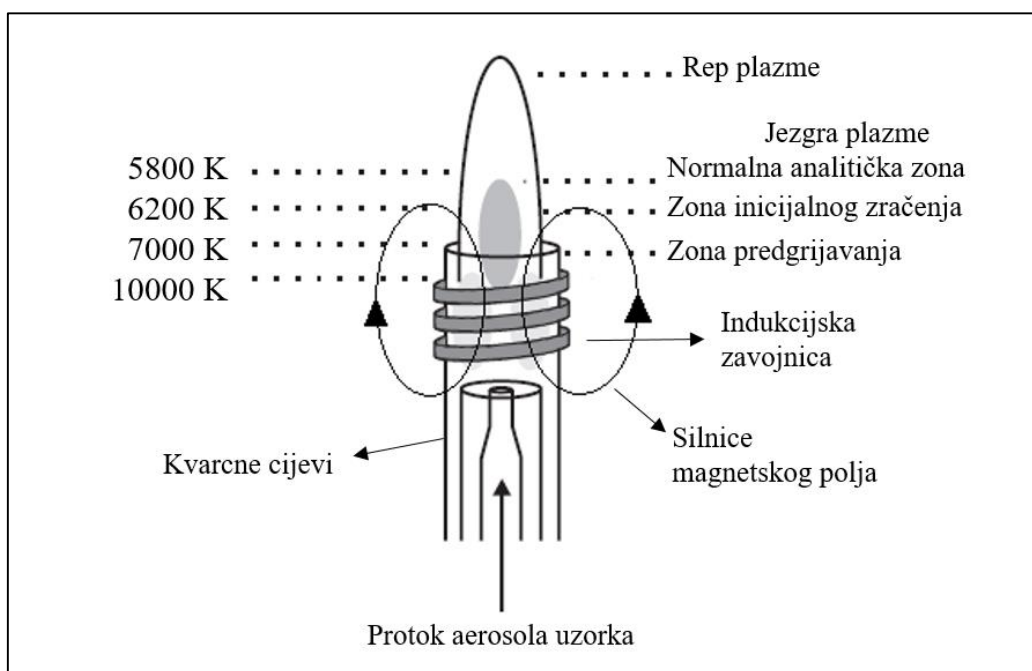
Optički emisijski spektrometar je uređaj koji se sastoji od slijedećih dijelova: plamenika, radiofrekvencijskog generatora i zavojnice za formiranje plazme, optičkog sustava koji sadrži disperzijski element (prizmu ili refleksijsku rešetku) za razdvajanje emitiranih valnih duljina, detektora, sustava kapilara za uvođenje otopine uzorka i komore za raspršivanje aerosola uzorka.

2.2.1.1. Plazma kao izvor zračenja

Induktivno spregnuta plazma nastaje prolaskom plina nosioca (najčešće argona) kroz visokofrekvencijsko elektromagnetsko polje. Kroz vanjsku cijev, tangencijalno prolazi argon koji hladi cijev za formiranje plazme ($v = 10\text{--}12 \text{ L min}^{-1}$), srednjom cijevi prolazi argon kao plin-nosioč koji sadrži elektrone i ione za formiranje plazme ($v = 1 \text{ L min}^{-1}$), a kroz unutarnju cijev sporim protokom u struji argona uvodi se aerosol uzorka u plazmu ($v = 1 \text{ L min}^{-1}$). Plamenik se sastoji od tri koncentrične kvarcne cijevi, a pri vrhu ga okružuje bakrena induksijska zavojnica s dva do šest navoja, spojena na radiofrekvencijski generator. Slobodni elektroni plina nosioca nastaju iskrenjem iz induksijske zavojnice, te sa ionima ulaze u promjenjivo magnetsko polje i kružno se ubrzavaju. Silnice induciranog magnetskog polja su paralelne s cijevi izvora, a kada se promijeni smjer magnetskog toka, ubrzani elektroni također mijenjaju svoj smjer i sudaraju se s atomima plina potičući dodatnu ionizaciju. Taj proces dodavanja energije zavojnice naziva se induktivno

sprezanje. Kao posljedica otpora gibanju elektrona, dolazi do intenzivnog zagrijavanja plina (Ohmovo zagrijavanje). U centralnoj cijevi aerosol uzorka prodire u plazmu i stvara kanal kroz središte izvora. Aerosol uzorka se u visokotemperaturnom području plazme zadržava oko 2 ms, puno dulje nego u plamenu.

Plazma ima vrlo intenzivnu, bijelu i neprozirnu jezgru prekrivenu repom sličnom plamenu. Postoji pet temperaturnih područja plazme: 1. Zona predgrijavanja u kojoj dolazi do konačnog uklanjanja otapala uzorka; 2. Visokotemperaturna jezgra u čijem središtu nastaje spektralni kontinuum i gdje uzorak podliježe učinkovitoj razgradnji, isparavanju i atomizaciji; 3. Zona inicijalnog zračenja gdje kontinuum blijedi i plazma postaje optički prozirna; 4. Normalna analitička zona gdje je utjecaj pozadinskog zračenja manje izražen i gdje se pobuđuje većina elemenata; 5. Niskotemperaturni rep plazme u kojem se pobuđuju elementi s niskim energijama pobude (Slika 2.).^{1, 2, 3}



Slika 2. Dijelovi i temperaturna područja induktivno spregnute plazme

2.2.1.2. Radiofrekvencijski generator

Radiofrekvencijski generator (*engl. radio frequency generator*, RF) je uređaj koji snabdijeva instrument ICP-AES snagom potrebnom za stvaranje i održavanje stabilnog izvora plazme. Snaga potrebna za formiranje plazme je 700-1500 W, a prenosi se putem indukcijske zavojnice na plin nosioc. Mnogi RF generatori za potrebe instrumenta ICP-AES rade na frekvenciji 27, 12 MHz ili 40 MHz, jer u tom frekvencijskom području je veća učinkovitost induktivnog sprezanja i smanjen je pozadinski šum instrumenta. Prema tipu oscilatora, dvije su vrste RF generatora koji se koriste u instrumentima ICP-AES: kvarcom kontrolirani i „free-running“ RF generator.

Kvarcom kontrolirani generator koristi piezoelektrični sklop napravljen od kristala kvarca, koji proizvodi radiofrekvencijski oscilirajući signal. Generator pojačava taj oscilirajući signal prije prijenosa na indukcijsku zavojnicu.

„Free-running“ generator radi na principu samopobude, a plazma je elektronički dio takvog generatora, pa oscilacijska frekvencija ne ovisi samo o učinkovitosti električnih sklopova, već i o uvjetima u izvoru plazme. U takvom sustavu nije potreban regulacijski sustav impedancije, a svaka promjena u sastavu aerosola neposredno utječe na radne uvjete plazme.²

2.2.1.3. Sustav za uvođenje uzorka

Raspršivač je dio sustava za uvođenje uzorka u instrumentu ICP-AES koji otopinu uzorka pretvara u aerosol. Nastanak aerosola je kritičan korak u sekvencijalnom procesu pobude uzorka, jer utječe na reproducibilnost plazme u procesima isparavanja, atomizacije i ionizacije specija u uzorku.

Dvije su osnovne sile kojima se tekućina prevodi u aerosol: pneumatska sila i ultrazvučna mehanička sila. U današnje vrijeme postoje različite konstrukcije raspršivača. Raspršivači pneumatskog tipa primjereni tehnici ICP-AES su: koncentrični raspršivači, raspršivači unakrsnog protoka (*engl. cross-flow nebulizer*) i Babington raspršivači.

Danas se najčešće koriste mikro-koncentrični raspršivači. Otopina uzorka ulazi u kapilaru kroz područje niskog tlaka, u kojem velikom brzinom prolazi pomoćni plin (*engl. make-up gas*). Niski tlak i ubrzani protok plina, razara otopinu uzorka na kapljice aerosola.

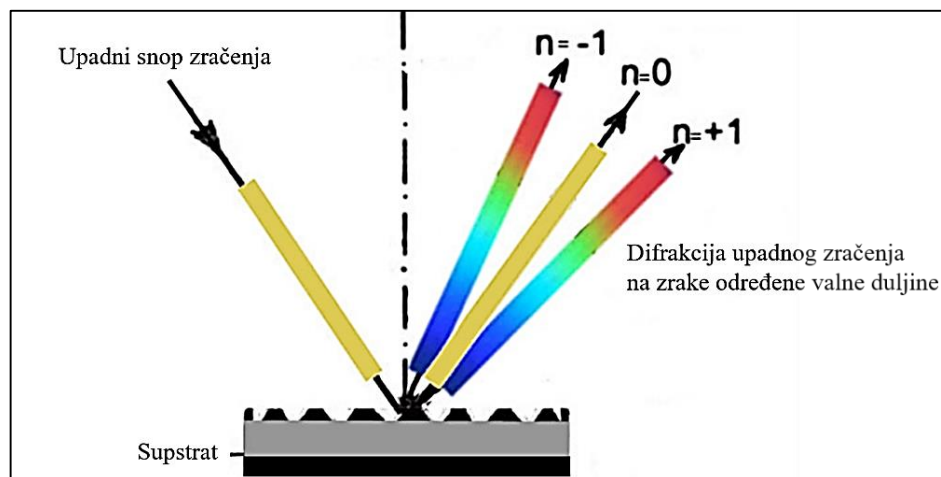
Zbog mogućnosti stvaranja sitnih kapljica aerosola, takvi raspršivači doprinose izuzetnoj analitičkoj osjetljivosti, te stabilnosti protoka. Potrebno je paziti na sastav otopine uzorka, jer ukoliko otopina sadrži do 20% soli ili talog, zbog mikro – promjera može doći do začepjenja kapilare.

Komore za raspršivanje odvajaju krupne kapi otopine od aerosola. Aerosol u protoku plina nosioca ulazi u područje plazme, dok se krupne kapi odvajaju u spremnik za otpad. Komore se izrađuju od istog materijala kao i raspršivači, ovisno o vrsti analize; za rutinske analize koriste se raspršivač i komora od kvarcnog stakla, a primjerice za analizu u fluorovodičnoj kiselini, koriste se raspršivač i komora napravljeni od teflona.²

2.2.1.4. Spektrometar

Nakon što se atomi i ioni uzorka pobude u izvoru plazme, povratkom u stanja niže energije emitiraju zračenje koje se sakuplja u spektrometru. Uloga spektrometra je da razdvaja polikromatsko zračenje na definirane zrake monokromatskog zračenja, te izdvaja valnu duljinu od interesa i usmjerava ju na detektor. Do druge polovice 20. stoljeća, koristili su se isključivo instrumenti koji su za disperziju valnih duljina koristili prizmu ili filtre. Od 1990. godine kao disperzni element koristi se ešeletna rešetka, koja omogućava istovremeno odvajanje velikog broja valnih duljina, smanjuje vrijeme trajanja analize, te omogućuje korekciju pozadinskog zračenja u realnom vremenu.

Ešeletna rešetka je tip refleksijske rešetke koja se sastoji od velikog broja paralelnih ureza na kojima dolazi do refleksije zračenja, te uskih neupotrebljivih površina (Slika 3.). Rešetka za ultraljubičasto i vidljivo zračenje sadrži od 300 do 2000 ureza/mm. Urezi su razmješteni na način da osiguravaju relativno široke glatke površine za djelotovornu difrakciju. Svaka se široka površina može promatrati kao točkasti izvor zračenja na kojemu upadne zrake međusobno interferiraju. Svakoj valnoj duljini odgovara određeni kut difrakcije, koji definira prostorno razlaganje složenog zračenja na monokromatske zrake. Konstruktivna interferencija se postiže kada se duljine puta zraka razlikuju za cjelobrojni višekratnik n valne duljine upadnog snopa. Pritom se n naziva redom difrakcije. Ešeletna rešetka proizvodi spektre vrlo visokih redova (preko 100), kod kojih često dolazi do preklapanja. U tom slučaju koristi se pomoćni disperzni element za razlučivanje redova, primjerice mala prizma ili druga refleksijska rešetka. Kombinacija dva disperzna elementa omogućava istovremenu detekciju više spektralnih redova u obliku dvodimenzionalne slike sa apcisonom koja označava valnu duljinu i ordinatom koja označava spektralne redove.^{1,4}

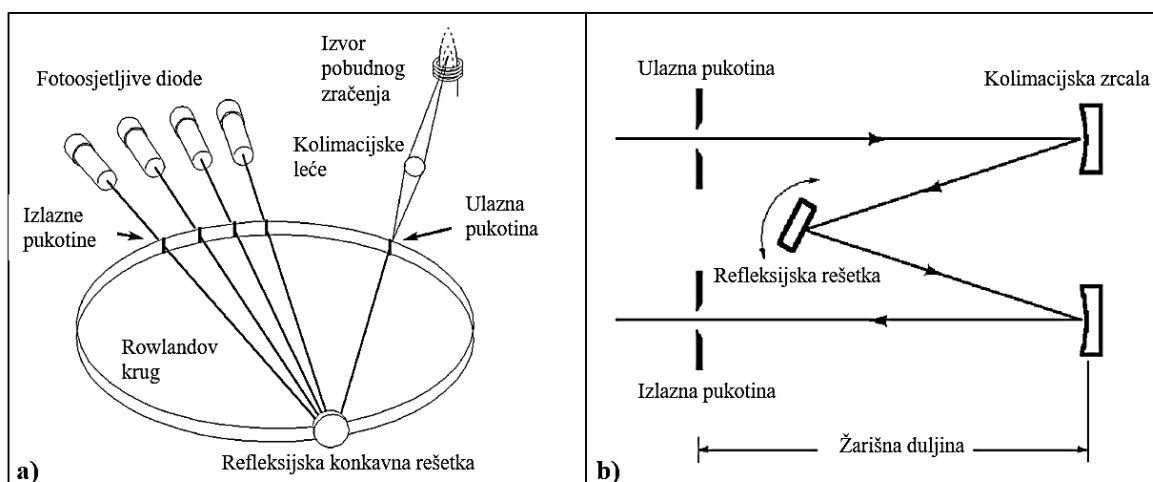


Slika 3. Mehanizam difrakcije na ešeletnoj rešetki

Multielementna analiza se može se ostvariti korištenjem monokromatora i polikromatora (Slika 4.). Kada se u istom spektrometru nalazi veći broj izlaznih pukotina i detektora, te se istodobna multielementna analiza ostvaruje na način da svakoj izlaznoj pukotini odgovara atomska ili ionska emisijska linija određenog elementa, takav uređaj se naziva polikromator. Standardni polikromator sadrži *Paschen-Runge* konstrukciju, te se sastoji od jedne ulazne pukotine, konkavne refleksijske površine i većeg broja izlaznih pukotina koji su periferno raspoređeni u tzv. *Rowlandovom* krugu.

Monokromatori sadrže samo jednu izlaznu pukotinu i detektor, te se koriste za sekvencijalnu multielementnu analizu, jer se brzo skeniraju jedna po jedna spektralna linija. To se ostvaruje rotacijom refleksijske rešetke ili detektora ukoliko je rešetka u fiksnom položaju. Standardni monokromator sadrži *Czerny-Turner* konstrukciju, te se sastoji od ulazne pukotine, sustava od dva kolimacijska zrcala za fokusiranje zračenja i jedne izlazne pukotine usmjerene prema detektoru.

Prednost polikromatora je detekcija emisijskih valnih duljina za vrijeme unošenja uzoraka u sustav, te skraćeno vrijeme trajanja analize. Međutim, polikromatori su ograničeni brojem detektora za istodobnu detekciju velikog broja spektralnih linija, zbog nedostatka raspoloživog prostora u spektrometru. S druge strane, monokromatori zahvaljujući sposobnosti brzog skeniranja, pogodni su za detekciju bilo koje spektralne linije, te imaju bolji sustav za korekciju pozadinskog zračenja jer temeljito skeniraju područje oko svake spektralne linije. No, sekvencijalna analiza monokromatorom zahtjeva veće količine uzorka, a ukoliko postoje spektralne interferencije, potrebno je odabrati drugu spektralnu liniju kod koje interferencije ne postoje, ili su barem umanjene.⁶



Slika 4. Schematski prikaz disperzijskih uređaja: a) Polikromator s Rowlandovim krugom, b) Monokromator s rešetkom prema Czerny-Turneru

Analitički značajno spektralno područje rada spektrometra je u rasponu od 190 do 450 nm, i tu se nalazi najveći broj korisnih emisijskih linija za tehniku ICP-AES. Postoje i neke važne emisijske linije u području od 160 do 190 nm kao i iznad 450 nm. Nažalost, u spektralnom području od 160 do 190 nm dolazi do jake apsorpcije molekula kisika iz zraka, stoga se za potrebe analize u tom spektralnom području mora u potpunosti ukloniti zrak iz instrumenta. Zrak iz spektrometra se može ukloniti propuhivanjem sustava s plinom, obično argonom ili dušikom, ili pomoću vakuumske sustava.²

2.2.1.5. Detektor

Nakon uspješnog izdvajanja emisijske linije u spektrometru, detektor i popratni elektronički sklopovi za prikupljanje signala, mjere intenzitet emisijske linije. Do 1960. godine, za detekciju su se koristili isključivo fotomultiplikatori, a zatim su zamijenjeni detektorima u čvrstom stanju, na bazi silicija. Takvi detektori temelje se na svojstvu fotoosjetljivosti silicija u čvrstom stanju, na način da foton UV/VIS zračenja razbija vezu Si-Si uz oslobađanje elektrona i stvaranje šupljina u kristalnoj strukturi. Uslijed narinutog električnog polja dolazi do gibanja elektrona i šupljina prema sloju Si-SiO₂, te stvaranju struje koja je proporcionalna količini fotona koja prodire u kristal.

Za primjenu u spektroskopskim instrumentima, koriste se višekanalni detektori, poput detektora sa diodnim nizom (engl. *photodiode array*, PDA), te detektora s prijenosom naboja (engl. *charge-transfer device*, CTD). Detektor s diodnim nizom je čip,

napravljen od 1000 ili više silicijskih fotodioda, nanizanih jedna do druge. Svaki čip sadrži kondenzator i električni prekidač za svaku diodu, kojom se kompjuterski upravlja. Širina izlazne pukotine, najčešće je jednaka širini jedne od silicijskih dioda. Izlazni signal svake od dioda odgovara zračenju pojedine valne duljine, a spektar se dobiva sekvencijalnim snimanjem tih izlaznih signala. Budući da je taj proces izuzetno brz, podatci cijelog spektra sakupljaju se kraće od jedne sekunde. Detektori s prijenosom naboja, također nastaju slaganjem pojedinačnih detektorskih elemenata u stupce i retke, tvoreći čip. Čip se sastoji od niza silicijskih fotodioda i elektroničkih sklopova, smještenih na podlozi od silicija. Količina akumuliranog naboja na fotodiodnom nizu je proporcionalna količini zračenja, kojoj je područje detektora bilo izloženo. Nakon prikupljanja naboja, u odsutstvu zračenja, vrši se digitalno „čitanje“ naboja s detektora. Spektrometrijski značajni su detektor s indukcijom naboja (*engl. charge-coupled device*, CCD), detektor s ubrizgavanjem naboja (*engl. charge-injection device*, CID) i detektor s indukcijom naboja i segmentiranim nizom (*engl. segmented array charge-coupled device*, SCD). CCD detektor prikuplja naboj na pikselima kroz određeno vrijeme i potom ga sekvencijalno odčitava u skupovima. Za razliku od CCD detektora, kod CID detektora se naboj na pikselima odčitava pojedinačno i u bilo kojem trenutku, čak i kad je područje čipa izloženo zračenju, no nedostaci su viši šum i utjecaji tamne struje na detekciju. SCD detektor je napravljen isključivo za instrument ICP-AES sa ešeletnom rešetkom. Umjesto čipa sa više od tisuću nizova dioda, SCD detektor sadrži skupinu manjih jedinica od 20 do 80 dioda, a za ešeletni spektar, na čipu je nanizano do 200 takvih jedinica. Takve jedinice mogu očitati više od 236 važnih spektralnih linija za 70 elemenata. Za razliku od CCD i CID detektora koji imaju slabu osjetljivost ispod 350 nm, SCD detektor pokriva spektralno područje od 160 do 782 nm.

Signal s detektora nakon očitavanja obično dolazi na procesor signala. Procesor signala je elektronička naprava koja pojačava, po potrebi mijenja i filtrira električni signal od neželjenih interferencija-šumova. Svaki instrument ICP-AES je spojen na računalo, koje služi za ugađanje spektrometra, te za obradu i ispis prikupljenih analitičkih podataka. Uz pomoć odgovarajućeg računalnog programa, mogu se ugađati radni parametri na instrumentu poput: brzine protoka argona, volumena uzorka, položaja plamenika, snage RF generatora, razmještaja leća i zrcala u spektrometru, uklanjanje interferencija i pozadinskog zračenja.²

2.2.2. Analitička obrada uzorka i mjerenje

Elementna analiza uzoraka često zahtijeva prethodnu pripremu, a najčešće su to različiti postupci razaranja uzorka, s ciljem da se elementi vezani u organskom materijalu prevedu u anorganski oblik, a zatim u vodenu otopinu, koja se koristi u daljnjim analitičkim procesima.

2.2.2.1. Mokra razgradnja uzoraka potpomognuta mikrovalnom energijom

Danas se najčešće primjenjuje postupak razgradnje uzoraka u mineralnim kiselinama pri povišenom tlaku i temperaturi. Rijetko se koristi lužina kao otapalo, jer dolazi do adsorpcije i taloženja metalnih oksida što može uzrokovati začepljenje kapilara instrumenta. Riječ je o metodi u kojoj se mikrovalnom energijom pospješuje ekstrakcija ispitivanih specija iz uzorka u otapalo. Mikrovalovi istodobno zagrijevaju cijeli uzorak i oštećuju međumolekulske interakcije, potičući rotaciju dipola. Gibanje otopljenih iona povećava prodiranje otapala u matricu i time potiče otapanje. Mikrovalovi zagrijevaju samo tekuću fazu dok pare ne apsorbiraju mikrovalnu energiju.

Postupak se provodi u zataljenim teflonskim posudama sa sigurnosnim ispustom za paru, smještenim u rotoru mikrovalne pećnice pod visokim tlakom, čime se postiže jednoliko zagrijavanje, skraćuje vrijeme razgradnje i koristi minimalan volumen kiseline. Materijal koji se koristi za izradu posuda u ovoj metodi je Teflon čija je radna temperatura 260 °C te tlak od 60-100 bara. Većina procesa mokre razgradnje uključuje kombinaciju oksidirajućih (HNO_3 , vruće koncentrirana HClO_4 , vruće koncentrirana H_2SO_4) i neoksidirajućih kiselina (HCl , HF) s vodikovim peroksidom. Dušična kiselina se najčešće koristi kao oksidirajući reagens pri razgradnji, s obzirom da je komercijalno dostupna u visokoj čistoći i ne interferira s mjernim elementima. Vodikov peroksid se dodaje za smanjenje količine dušikovog (II) oksida i tlaka u teflonskoj posudi, te za poboljšanje učinkovitosti razgradnje. Glavna prednost ove metode je mogućnost dobre kontrole tlaka i temperature, čime se postižu precizni i ponovljivi uvjeti razgradnje i ekstrakcije.⁷

2.2.2.2. Ugađanje instrumenta i mjerenje

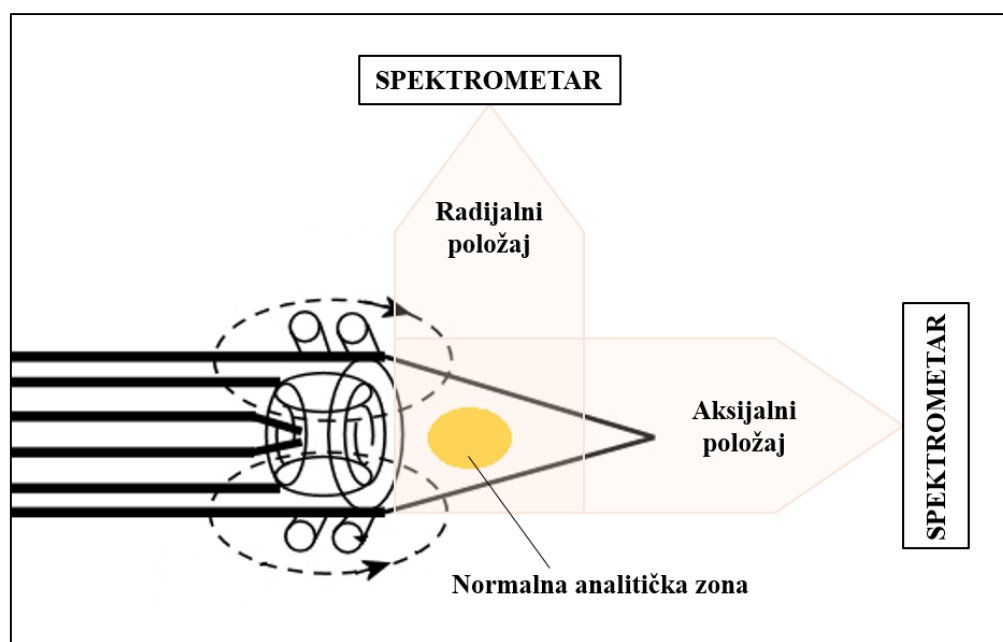
Osjetljivost instrumenta postiže se ugađanjem položaja dijelova optičkog sustava i protoka argona. Prije mjerenja potrebno je u programu definirati metodu kojom se dobiva odziv za željeni element. U metodi se definiraju emisijske linije elemenata, razlučivanje, koncentracijski raspon kalibracijskih otopina, te niz tehničkih parametara poput položaja plamenika, brzine protoka uzorka i snage radiofrekvencijskog generatora. U metodi se također definira i tip regresije za kalibracijsku krivulju, prema kojoj se izračunavaju koncentracije metala u uzorcima. Analiza započinje mjerenjem slijepih proba, otopina koje sadrže samo vodu i kiselinu čime se provjerava jasnoća analitičkog signala. Nakon toga se mjeri niz multielementnih kalibracijskih otopina prema rastućoj koncentraciji, definiraju se koncentracijski rasponi, a zatim se analiziraju otopine uzoraka. U tijeku mjerenja se za provjeru stabilnosti odziva, redovito analiziraju otopine standarda, a uz svaku skupinu uzoraka i odgovarajući referentni materijali koji služe za provjeru točnosti mjerenja.

Postupak mjerenja započinje provođenjem otopine uzorka pomoću peristaltičke pumpe i sustava kapilara do komore za raspršivanje, gdje se prevodi u aerosol. Aerosol se zatim uvodi u područje plazme gdje se daljnjim procesima razgrađuje na atome i ione. Atomi i ioni emitiraju zračenje, koje se usmjerava u spektrometar i razlaže na valne duljine karakteristične za pojedini element. Karakteristično zračenje se prikuplja na detektoru i prevodi u električni signal koji se računalno pretvara u analitički značajnu informaciju - koncentraciju.²

2.2.2.3. Položaj plamenika

Moguća su dva položaja plamenika plazme u odnosu na ulaznu pukotinu spektrometra: radijalni i aksijalni (Slika 5.). Radijalni položaj plamenika je okomit na ulaznu pukotinu spektrometra, kako bi se sakupljalo zračenje sa strane, emitirano iz područja plazme nazvano normalna analitička zona. Normalna analitička zona (*engl. normal analytical zone*, NAZ) je područje plazme u kojem dolazi do analitički značajne emisije zračenja atoma i iona uzorka, te se u tom području analiziraju gotovo svi elementi. Kod radijalnog položaja, smanjene su spektralne interferencije i pozadinsko zračenje, stoga je manje argona potrebno za propuhivanje sustava. Također, dulji je vijek trajanja plamenika.

Aksijalni položaj plamenika je horizontalan obzirom na ulaznu pukotinu spektrometra, stoga se prikuplja zračenje većeg intenziteta s vrha plazme. Zbog većeg intenziteta zračenja dolazi do većeg utjecaja pozadinskog zračenja, te spektralnih i ionizacijskih interferencija. Za aksijalni položaj plazme, potreban je dodatni dovod argona za rezanje repa plazme, koji se mora ukloniti s optičkog puta zračenja, u protivnom dolazi do smanjenja dinamičkog linearnog područja uslijed apsorpcije prisutnih atoma.⁶



Slika 5. Radijalni i aksijalni položaj plamenika

2.3. Spektralne značajke induktivno spregnute plazme

2.3.1. Ionizacijski procesi u induktivno spregnutoj plazmi

Plazma je ionizirani plin koji je makroskopski neutralan, jer sadrži jednak broj pozitivnih i negativnih čestica (iona i elektrona). Pošto se za stvaranje plazme koristi monoatomski plin, X , plazma se matematički opisuje jednadžbom:

$$X = \sum_{n=1}^q (X^{n+}) + \sum_{n=1}^q n_e \quad (1)$$

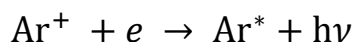
X^{n+} - ion sa pozitivnim n nabojem, n_e - broj elektrona.

Argon se najčešće koristi za stvaranje induktivno spregnute plazme, jer je monoatomski element, koji ima visoku ionizacijsku energiju (15,76 eV), kemijski je inertan, te slabo provodi toplinu. Osim rezonantnih linija koje se javljaju na 106,7 nm i 104,8 nm, argon ne daje ni jednu spektralnu liniju ispod 300 nm, pa je time smanjen utjecaj pozadinskog zračenja. Takav jednostavan emisijski spektar, ne utječe na analitičku osjetljivost instrumenta ICP-AES, za razliku od molekulskog emisijskog spektra dobivenog u izvoru plamena. Također, smanjene su kemijske interferencije, jer argon sa specijama u uzorku uglavnom ne stvara stabilne molekulske vrste, a one nestabilne molekularne vrste (poput ArH) disociraju odmah nakon relaksacije u stanje niže energije.

Ionizacijski procesi nastaju tijekom stvaranja plazme. Radiofrekvencijski generator proizvodi visokofrekvencijsko električno polje u kojem ubrzavaju elektroni, koji ioniziraju plin plazme i stvaraju sekundarne elektrone:



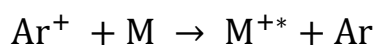
Zatim se nastali ioni argona rekombiniraju s elektronima i nastaju pobuđeni atomi argona uz emisiju zračenja ($h\nu$):



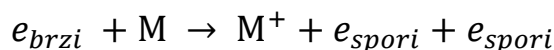
U procesu radijativne rekombinacije iona i elektrona u plazmi, nastaje pozadinsko zračenje $h\nu$, koje može značajno utjecati na analitički signal u dalekom UV dijelu spektra. Plazma veliku količinu energije prenosi na atome i ione analita, M , koji podliježu procesima pobude. Ionizacijski procesi u izvoru plazme su vrlo brzi i traju manje od milisekunde.

Glavni ionizacijski procesi u plazmi su:

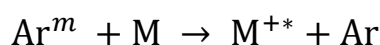
Ionizacija prijenosom naboja s iona argona na speciju M ,



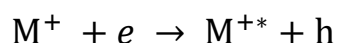
Ionizacija sudarom ubrzanih elektrona i atoma specije M ,



Penning ionizacija (ionizacija atoma specije M u sudaru s metastabilnom specijom argona, Ar^m),



Ion-elektron radijativna rekombinacija specije M i elektrona uz oslobađanje zračenja ($h\nu$),



Iako su ionizacijski procesi u plazmi bitni za razumijevanje generiranja signala u metodi spektrometrije masa (ICP-MS), njihovo poznavanje važno je za procjenu utjecaja na emisijeke signale u optičkoj spektrometriji.⁶

2.3.2. Vrste emisijskih linija

Emisijske linije elemenata se općenito mogu podijeliti u atomske ili ionske linije. Prema vrijednosti prvog i drugog ionizacijskog potencijala, emisijske linije se dijele na tvrde (prvi ionizacijski potencijal > 8 eV, a drugi ionizacijski potencijal > 15 eV) i meke (prvi ionizacijski potencijal < 8 eV, a drugi ionizacijski potencijal < 15 eV). Klasifikacija emisijskih linija je vrlo bitna kod ugađanja radnih parametara, jer parametri za detekciju tvrdih emisijskih linija, često ne odgovaraju pri detekciji mekih emisijskih linija.

U tablici 1. su prikazane odabrane emisijske linije elemenata te odgovarajući ionizacijski potencijali.⁶

Tablica 1. Odabrane emisijske linije elemenata te odgovarajući ionizacijski potencijali

Element	Emisijska linija (nm)	Prvi ionizacijski potencijal (eV)	Drugi ionizacijski potencijal (eV)
Fe	259,940	7,90	16,19
Pb	220,353	7,42	15,03
Zn	213,856	9,39	17,96
Cu	324,754	7,73	20,29
Na	588,995	5,14	47,29
K	766,490	4,34	31,63

Za potrebe analitičkih mjerenja, emisijske linije se odabiru pomoću nekoliko jednostavnih pravila:

- 1) Ionske linije su analitički osjetljivije od atomskih linija, kada je zbroj njihovih ionizacijskih energija manji od vrijednosti ionizacijske energije argona (16 eV). To vrijedi za elemente poput Al, Ba, Be, Ca, Ce, Co, Cr, Fe, Hf, Hg, In, Ir, Mg, Mo, Nb, Ni, Os, Pb, Sc, Sn, Sr, Ta, Th, Ti, U, V, W, Y, Zn, Zr i elemente rijetkih zemalja.
- 2) Atomske linije visoke analitičke osjetljivosti imaju elementi poput Ag, As, Au, B, Bi, Ga, Ge, K, Li, Na, Rb, S, Sb, Se i Si.
- 3) Atomske i ionske linije slične analitičke osjetljivosti imaju elementi poput Cu, Pd, Pt, Rh i Ni.⁶

2.3.3. Robustni uvjeti u plazmi

Termodinamička ravnoteža je idealno stanje plazme, u kojem je ne postoji temperaturni i koncentracijski gradijent, te je plazma u potpunosti homogena. U laboratorijskim uvjetima nije moguće postići potpunu termičku ravnotežu, jer postoje svojevrsni temperaturni i koncentracijski gradijenti koji uzrokuju varijacije u procesima pobude i ionizacije, karakteristične za pojedine elemente ili skupine elemenata. Međutim, ukoliko je elektronska gustoća plazme dovoljno velika, te razmjena energije između čestica dovoljno brza, u pojedinim dijelovima plazme se može uspostaviti lokalna termodinamička ravnoteža (*engl. local thermodynamic equilibrium, LTE*). U tom temperaturnom području postižu se robustni uvjeti plazme, pri kojima se temperatura pobude i elektronska gustoća značajno ne mijenjaju. Matematičkim i statističkim modelima opisuju se termodinamička

stanja plazme. Takvim modelima je moguće povezati ionizacijsko stanje elementa sa radnim parametrima plazme poput temperature, tlaka i elektronske gustoće. Primjerice, za opis raspodjele čestica po energijskim stanjima, koja je određena temperaturom pobude primjenjuje se Boltzmannov zakon,

$$\frac{n_m}{N} = \frac{g_m e^{\left(\frac{-E_m}{kT_{pob}}\right)}}{Z} \quad (2)$$

n_m - popunjenost energijskih stanja, N - maksimalna popunjenost energijskih stanja, g_m - statistički faktor energijskog stanja, Z - elektronska particijska funkcija, T_{pob} - temperatura pobude, E_m - energijsko stanje atoma

a za procjenu mogućih ionizacijskih stanja elemenata, te definiciju ionizacijsko-rekombinacijske ravnoteže u plazmi, primjenjuje se Saha jednadžba:

$$\frac{n_{q+1}n_e}{n_q} = \left(\frac{2Z_{q+1}}{Z_q}\right) \left(\frac{(2\pi km_0)^{1/2}}{h}\right)^3 T^{3/2} e^{\left(\frac{-E_{ion}}{kT}\right)} \quad (3)$$

n_{q+1} i n_q - ionizacijska stanja, n_e - elektronska gustoća, h - Planckova konstanta, k - Boltzmannova konstanta, Z_q i Z_{q+1} - elektronske particijske funkcije, T_{ion} - temperatura ionizacije, E_{ion} - ionizacijska energija između stanja $q+1$ i q , m_0 - masa elektrona ^{6, 8}

2.3.4. Omjer intenziteta ionska linija/atomska linija

Teorijski modeli za opis termodinamičkog stanja plazme su složeni i nemaju praktičnu primjenu, pa je uvedena jednostavna metoda mjerenja omjera intenziteta ionska linija/atomska linija za pojedini element. Cilj je izračunati teorijski omjer ionske linije i atomske linije elementa za lokalnu termodinamičku ravnotežu plazme, te prema tome usporediti dobiveni eksperimentalni omjer. Atomske linije nisu osjetljive na uvjete pobude kao ionske linije, stoga je omjer njihovih intenziteta prosječna vrijednost.

$$\frac{I_i}{I_a} = \left(\frac{4.83 \times 10^{21}}{n_e}\right) \left(\frac{g_i A_i \lambda_a}{g_a A_a \lambda_i}\right) T_e^{\frac{3}{2}} e^{\left(\frac{-E_{ion}}{kT_e}\right)} e^{\left(\frac{-E_{pob,i} - E_{pob,a}}{kT_{pob}}\right)} \quad (4)$$

I_i - intenzitet ionske linije, I_a - intenzitet atomske linije, n_e - elektronska gustoća, g_i i g_a - statističke težine, A_i i A_a - vjerojatnosti prijelaza između energijskih stanja, λ_a i λ_i - valne duljine atoma i iona elementa, T_e - temperatura elektronske gustoće, T_{pob} - temperatura pobude, E_{ion} - ionizacijska energija, E_{pob} - energija pobude, k - Boltzmannova konstanta

Od svih elemenata, najčešće se koristi omjer intenziteta spektralnih linija magnezija: Mg II 280,270 nm (ili Mg II 279,553 nm) i Mg I 285,213 nm, tzv. Mermetov omjer. Spektralne linije magnezija odabrane su jer su bliske po vrijednostima energija pobude atomskih i ionskih linija (35051 i 35669 cm^{-1}), te su vrijednosti za vjerojatnost elektronskog prijelaza precizno određene, zbog čega se može izračunati teorijski omjer izabranih linija (Tablica 2.). Osim za procjenu odstupanja sustava od lokalne termodinamičke ravnoteže u plazmi, omjer intenziteta ionske i atomske linije primjenjuje se i za ispitivanje ICP-AES radnih parametara poput frekvencije, brzine protoka aerosola, brzine protoka plina nosioca, te rada mikroraspršivača i plamenika.

Tablica 2. Temperatura (K), elektronska gustoća (m^{-3}) i omjer intenziteta spektralnih linija Mg II 280,270 nm/ Mg I 285,213 nm

T/K	$(10^{20} n_e) / \text{m}^{-3}$	I_i / I_a
6500	1,01	10,8
7000	2,83	11,4
7500	6,90	12,1
8000	15,1	12,7
8500	30,1	13,4
9000	55,7	14,1
9500	97,0	14,8
10000	160	15,4

Teorijski odnos I_i/I_a se određuje kao funkcija od n_e . Kada je sustav u stanju lokalne termodinamičke ravnoteže, ovaj omjer varira između 10 i 14 za odgovarajući raspon vrijednosti n_e . Eksperimentalni omjer se kreće od 1 do 14. Kada je iznad vrijednosti 8, postignuti su robustni uvjeti plazme, što znači da se dolazi do procesa potpune atomizacije i ionizacije. Takvi radni uvjeti se postižu pri visokoj snazi RF generatora i maloj brzini plina nosioca, a utjecaji matrice su minimalni. No kada je omjer ispod vrijednosti 4, radni uvjeti nisu optimizirani, pa se u analizi pojavljuje značajan utjecaj matrice. Iako se omjer linija Mg II/Mg I najčešće koristi, postoje i parovi linija drugih elemenata koji se mogu primijeniti (Cd II 226,502 nm/ Cd I 228,802 nm, Cr II 267,716 nm/ Cr I 357,868 nm, Ni II 231,604 nm/ Ni I 232,138 nm, Pb II 220,353 nm/ Pb I 217,000 nm i Zn II 206,200 nm/ Zn I 213,857 nm).^{6,8}

2.4. Interferencije u emisijskoj plazma spektrometriji

Interferencija u spektroskopiji je fenomen koji uzrokuje promjene u intenzitetu analitičkog signala. Promjena analitičkog signala u tehnici ICP-AES proizlazi iz fluktuacija u radu raspršivača, te kemijskih, ionizacijskih i spektralnih interferencija. Utjecaj navedenih interferencija ovisi o radnim parametrima, te o kvaliteti pojedinih dijelova instrumenta.

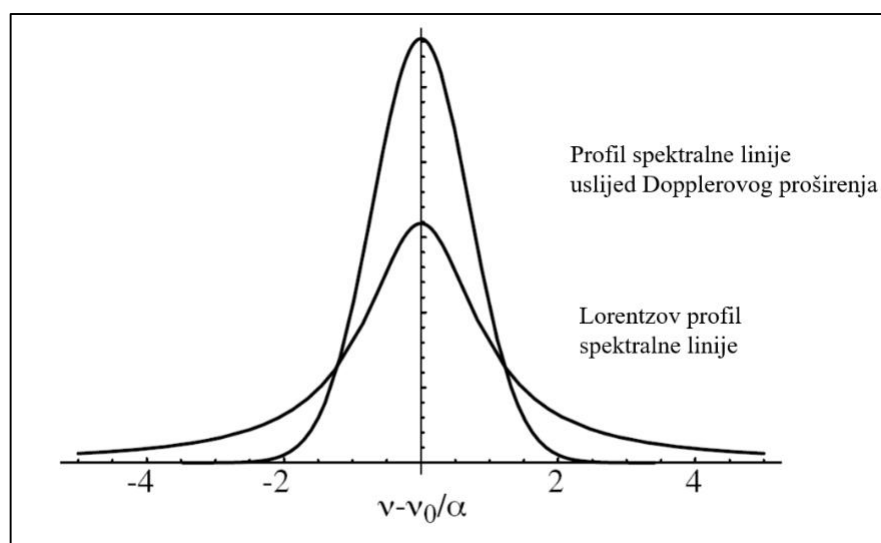
Interferencije zbog rada raspršivača nastaju tijekom nejednolikog raspršenja aerosola uzorka. Učinkovitost raspršenja aerosola ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima uzorka poput viskoznosti, površinske napetosti, tlaka para, gustoće i kemijskog sastava. Regulacija temperature sustava za raspršivanje je vrlo bitna jer utječe na prijenos mase aerosola. Povišena temperatura uvjetuje pojačanu hlapivost uzorka i veću količinu nastalog aerosola. Osim temperature, ugađa se i brzina pumpe, jer utječe na protok aerosola i učinkovitost raspršivanja. Brzina protoka uzorka u raspršivač ne smije biti velika, jer dolazi do stvaranja krupnih kapi aerosola, što dovodi do povećanja pozadinskog zračenja koje ometa analizu. Kemijske interferencije se obično ne javljaju u tehnici ICP-AES. Razlog tomu je vrlo visoka temperatura plazme, dulje zadržavanje uzorka u plazmi (oko 2 ms) i inertna atmosfera, zbog čega se nastale molekulske vrste potpuno razgrade. Za eliminaciju takvih interferencija, potrebno je postići robustne uvjete plazme, tj. povećati snagu RF generatora, smanjiti brzinu protoka plina nosioca i propuhivati instrument inertnim plinom.

Ionizacijske interferencije u tehnici ICP-AES ne predstavljaju značajan problem, jer velika elektronska gustoća plazme može pobuditi i elemente visokih ionizacijskih energija, dok elementi malih ionizacijskih energija, poput alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, emitiraju linije vrlo visokog intenziteta. Radijalni položaj plamenika koristi se za snimanje emisijskih linija visokog intenziteta, jer u tom položaju se prikuplja analitički signal umjerenog intenziteta u odnosu na neposredni aksijalni položaj.⁶

2.4.1. Spektralne interferencije u tehnici ICP-AES

Spektralne interferencije su jako izražene u tehnici ICP-AES. Visoka temperatura plazme dovodi do pobude velikog broja elemenata, te nastaju spektri bogati emisijskim linijama kod kojih dolazi do preklapanja kada su dvije linije odvojene za red veličine 0,001 nm. Takve interferencije potječu od emisijskih linija atomskih i molekulskih vrsta prisutnih

u plazmi, te u manjoj mjeri od spektra argona. Intenzitet i širina spektralne linije ukazuju na nastanak spektralnih interferencija. Varijacija intenziteta linije dovodi do promjena u analitičkom signalu te se ne postiže dobra ponovljivost mjerenja. S druge strane, različiti utjecaji dovode do širenja i pomaka spektralnih linija, poput prirodnog proširenja linije koji je posljedica prosječnog životnog vijeka atoma u pobuđenom stanju, Dopplerovog proširenja linije koje se javlja uslijed termičkog gibanja emitirajućih čestica u odnosu na optički sustav, te tlačnog proširenja linije koje je uzrokovano interakcijom emitirajućih čestica s okolnim neutralnim i nabijenim česticama (Slika 6.).⁹



Slika 6. Profili spektralne linije

Pojava kontinuiranog spektra nastaje kao posljedica radijativne rekombinacije elektrona sa atomima argona. Povećanje snage RF generatora, dovodi do porasta elektronske gustoće u izvoru plazme, što pojačava utjecaj pozadinskog zračenja na čistoću analitičkog signala. Pozadinsko zračenje nastaje i zbog lošeg pozicioniranja optičkog sustava prema ulaznom zračenju, te zbog zasićenosti detektora. Utjecaji spektralnih interferencija se mogu smanjiti na nekoliko načina: odabir druge emisijske linije koja je slobodna od interferencija, primjena metoda odvajanja analita iz matrice prije analize (ekstrakcija, ionska izmjena, itd.), korekcija pozadinskog zračenja, te upotreba kvalitetnijih optičkih komponenata.⁶

2.4.2. Utjecaj matrice uzorka s visokim udjelom kalcija na jasnoću analitičkog signala

Elementna analiza tehnikom ICP-AES se provodi na otopinama uzoraka, u kojima je vrlo važno razlikovati analit od matrice, te definirati kemijski sastav matrice uzorka. Matrica uzorka je multielementni medij, koji se sastoji od vode, organskih spojeva, kiselina i soli, te u kojem specije u velikoj koncentraciji mogu utjecati na analitički signal. Najčešći kontaminanti matrice su elementi s niskim ionizacijskim energijama, poput alkalijskih i zemnoalkalijskih metala. Utjecaj takvih elemenata se proučava otkad su prvi put uočeni u tradicionalnim izvorima emisijske spektrometrije, iako je utjecaj lako ionizirajućih elemenata u tehnici ICP-AES manje izražen nego u tehnikama koje kao izvor koriste plamen i druge vrste plazme. Osim lako ionizirajućih elemenata, elementi s visokim ionizacijskim energijama također mogu utjecati na čistoću analitičkog signala, ukoliko su u matrici prisutni u koncentracijama većim od $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Kalcij je sastavni dio matrice geoloških uzoraka. Za razliku od specija prisutnih u matrici, kalcij uzrokuje veće interferencije i jako utječe na osjetljivost tehnike ICP-AES u analizi elemenata u tragovima. Snažan utjecaj kalcija obično se pojavljuje u elementnoj analizi uzoraka vapnenačkog porijekla. Kemijski sastav vapnenca varira između čistog kalcijevog karbonata i materijala koji sadrži manje od pola teorijske koncentracije kalcija. Koncentracija kalcija u uzorcima vapnenca je stalno promjenjiva zbog ionske izmjene magnezijevih i željezovih iona sa ionima kalcija u strukturi.

Obzirom na raznolikost uzoraka i promjene kroz koje uzorak prolazi tijekom pripreme, utjecaj matrice s visokim udjelom lako ionizirajućih elemenata je vrlo složen i djelomično objašnjen fenomen. Varijabilnost podataka iz brojnih studija o utjecajima matrice uzorka, ukazuje na to da nema općenitog mehanizma prema kojem bi se takve vrste interferencija klasificirale i objasnile, prema tome svaki utjecaj matrice uzorka se treba promatrati zasebno.^{10, 11}

2.4.3. Metode uklanjanja utjecaja matrice uzorka

Utjecaj matrice uzorka se može se manifestirati na mnogo načina. Zbog promjena u visokoznosti otopine, prisutnost kiseline u matrici utječe na analitičku osjetljivost metode, stoga se takav utjecaj uklanja dodatkom kiseline određene koncentracije u otopine uzoraka i u standardne kalibracijske otopine. Prigušenje analitičkog signala uzrokuju elementi koji su u većoj koncentraciji zastupljeni u matrici uzorka, a čije spektralne linije prekrivaju linije elemenata od interesa. Takav utjecaj se može ukloniti dodatkom poznate koncentracije standardne otopine elementa od interesa u otopinu uzorka (*engl. matrix matching*). Vrlo je bitno poznavati područja u plazmi na kojima se pojavljuju utjecaji matrice, posebno u analizi elemenata u tragovima. U području plazme 15 do 20 mm iznad indukcijske zavojnice, visoka je analitička osjetljivost za alkalijske metale jer dolazi do pobude kolizijom, no već na visini od 12 mm iznad indukcijske zavojnice, dolazi do ambipolarne difuzije, gdje se specije različitih ionizacijskih potencijala gibaju jednakom brzinom, zbog čega pada analitička osjetljivost za elemente u tragovima na atomskim i ionskim linijama.

Upotrebom aksijalnog položaja plamenika analizira se cijelo područje plazme, pa se utjecaji matrice pojavljuju već u zoni atomizacije, što smanjuje analitičku osjetljivost za analizu elemenata u tragovima. Robustni uvjeti plazme su prvenstveno učinkoviti za ionske linije elemenata. Tako se ugađanjem radnih parametara, poput veće snage RF generatora, manje brzine protoka plina nosioca, te modifikacijom plamenika i raspršivača, mogu smanjiti interferencije lako ionizirajućih elemenata i kiselina sadržanih u matrici. Osim postizanja robustnih uvjeta plazme, dodatak unutarnjeg standarda u slijepe probe, otopine uzoraka i standardne otopine, može se ukloniti depresija analitičkog signala, koja se najčešće pojavljuje na ionskim linijama elemenata.^{12, 13}

2.5. Određivanje metala u biološkim uzorcima

Za mjerenja vrlo niskih koncentracija metala u vodama i otopinama bioloških uzoraka, primjenjuju se različite analitičke tehnike, poput elektrokemijskih tehnika i odgovarajućih spregnutih tehnika atomske apsorpcijske ili emisijske spektrometrije. Primjena elektrokemijskih tehnika omogućava osjetljive i ponovljive analize velikog broja bioloških uzoraka uz minimalno narušavanje kemijske ravnoteže uzorka i to u koncentracijskim rasponima nižim od 10^{-9} mol/L. Navedene tehnike za određivanje metala u otopinama bioloških uzoraka i voda, često zahtijevaju prethodnu pripremu uzoraka.

Metali u vodi, nalaze se u tragovima ili ultra-tragovima, u obliku jednostavnih anorganskih i organskih spojeva, metalnih kompleksa, te kao specije adsorbirane na čvrstim i koloidnim česticama.¹

2.5.1. Metali u školjkašima

S obzirom na način prehrane školjkaša, koji se hrane neselektivno filtrirajući čestice iz morske vode, metali se u njihovom organizmu akumuliraju u koncentracijama znatno većim od onih u okolnoj morskoj vodi, a zbog nemogućnosti biorazgradnje, gotovo ih je nemoguće potpuno odstraniti iz organizma. Na unos metala u morski organizam utječu brojni fizikalno-kemijski parametri (salinitet, temperatura, strujanje vode, koncentracija otopljenog kisika, pH) i fiziološko stanje organizma (stadij gonadnog ciklusa, veličina, rast i starosna dob). Različita je koncentracija metala u tkivu i ljušturi školjkaša. Tkivne koncentracije metala pod stalnim su utjecajem sezonskih varijacija, koje se javljaju zbog promjena u dotoku slatke vode i promjenama suhe tvari u tkivu, pa je za razumijevanje koncentracijskih raspona i raspodjele metala u tkivu nužno poznavati morfološke i fiziološke značajke određene vrste školjkaša, detaljne karakteristike uzgojnog područja, te kemijska svojstva pojedine specije metala. Za razliku od tkiva, raspodjela metala ugrađenih u mineralnu strukturu ljušture školjkaša nije podložna fiziološkim i reproduktivnim čimbenicima vrste, te je njihovo uklanjanje puno sporije nego u tkivu. Sorpcija i procesi uklapanja metala u strukturu ljušture školjkaša još nisu u potpunosti razjašnjeni. Elementi poput kalcija, magnezija, stroncija, barija i mangana, obično su zastupljeni u višim koncentracijama u kalcitnom skeletu ljušture,

a metali u tragovima poput bakra, kadmija, kroma, olova, cinka, nikla, kobalta, željeza i žive, obzirom na radijuse iona ugrađuju se u slojeve kalcita (Fe, Mn, Cu, Zn) i aragonita (Cd, Ba, Pb) kroz dulje vremensko razdoblje.¹⁴⁻¹⁶

Za određivanje koncentracija metala i polumetala akumuliranih u mekom tkivu i ljušturi školjkaša, najčešće se primjenjuje atomska apsorpcijska spektrometrija (*engl. atomic absorption spectrometry, AAS*) uz elektrotermičku atomizaciju, tehnike atomske emisijske spektrometrije temeljene na plazmi, kao i tehnika rentgenske fluorescencije koja je nedestruktivna tehnika, te se koristi direktno na uzorku liofiliziranog tkiva ili ljušture. Zadovoljavajući analitički rezultati dobiveni su primjenom spregnute tehnike laserske ablacije i atomske emisijske spektrometrije temeljene na plazmi, uz maseni spektrometar kao detektor (*engl. laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, LA-ICP-MS*). Tom metodom je razjašnjen proces uklapanja pojedinih metala u strukturu slojeva kalcita i aragonita.^{17, 18}

2.5.2. Kunjka

Kunjka (*lat. Arca noae*, Linnaeus 1758) je jestivi školjkaš iz porodice Arcidae, koji nastanjuje područje Mediterana, istočnog Atlantika, Crnog mora, te zapadnog Indijskog oceana gdje živi pričvršćen bisusnim nitima na šljunčanom dnu, na dubini većoj od 100 m. Meko tkivo kunjke obavija tanki plašt i vanjski epitel iz kojega se izlučuju kalcijeve soli i grade simetričnu lijevu i desnu vapnenu ljušturu (školjku). Ljušture su spojene elastičnom vezom ili ligamentom, a sastoje se od tri sloja: vanjski tanki sloj izgrađen od proteina konhiolina, deblji prizmatični međusloj izgrađen pretežito od aragonita ili kalcita, te unutrašnji sedefasti sloj, koji školjkašima služi kao zaštita mekanog tkiva, a sastoji se od slojeva minerala aragonita i proteina konhiolina organiziranih kružno oko jezgre nastajanja. Vrh ili umbo najstariji je dio ljušture koji ukazuje na starost, a linije rasta ukazuju na razvoj i brzinu rasta kunjke.



Slika 7. Kunjka (lat. *Arca noae*, Linnaeus 1758)

U Jadranskom moru prirodna staništa kunjki nalaze se na zapadnoj obali Istre, oko otoka Paga, u Pašmanskom kanalu, te Kaštelanskom i Malostonskom zaljevu. Biološkim istraživanjima dobiveni su podaci o broju, rastu i razvoju kunjki iz prirodnih staništa, koji svjedoče o smanjenju populacije zbog česte eksploatacije u komercijalne svrhe, kojoj je prethodio veliki pomor kunjki 1940. godine uzrokovan nepoznatim čimbenikom. Postoje pretpostavke da se učestala eksploatacija kunjke događa na određenim područjima u Jadranskom moru, na kojima je potrebno uvesti strožu kontrolu kako bi spriječili istrebljenje ove vrste.¹⁹⁻²²

2.5.3. Kemijska karakterizacija kunjke

Iako se kemijski sastav tkiva kunjke određuje rutinski u kontroli zdravstvene ispravnosti proizvoda, dosad je na tu temu objavljen rad o termogravimetrijskom određivanju sadržaja vode te suhe tvari organskog i anorganskog porijekla, dok cjelovita analiza elementnog sastava kunjki nije provedena. Po uzoru na uspješnu metodu procjene stanja okoliša, korištenjem mediteranske dagnje (lat. *Mytilus galloprovincialis*) kao indikatorskog organizma, ljuštura kunjki nalaze svoju primjenu kao učinkoviti biomarkeri. Podaci o elementnom sastavu ljuštura kunjki koriste se za indirektnu procjenu čistoće akvatorija, te geoloških značajki područja na kojima vrsta obitava. Ljuštura kunjke ima strukturu u kojoj se trajno zadržavaju elementi u tragovima iz okolne morske vode. Stabilnost kemijskog sastava ljuštura, omogućava lakšu i pouzdaniju analizu od one provedene na uzorku morske vode ili na tkivu kunjke.²³⁻²⁵

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu su:

- Destilirana deionizirana voda, Milli-Q Element 18 system, (Millipore, USA)
- Dušična kiselina, HNO_3 , *Suprapure* (Merck, Darmstadt, Germany)
- Vodikov peroksid, H_2O_2 , (Kemika, Zagreb, Croatia)
- Jednoelementne standardne otopine metala Ag, Al, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn, 100 mg L⁻¹ u 5% HNO_3 , Plasma Pure (Leeman Labs, Hudson, NH, USA)
- Multielementna standardna otopina koja sadrži metale Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn, 100 mg L⁻¹ u 5% HNO_3 , ICP-Mehrelement-Standardlösung IV (Merck, Darmstadt, Germany)

Certificirani materijali korišteni u ovom radu su:

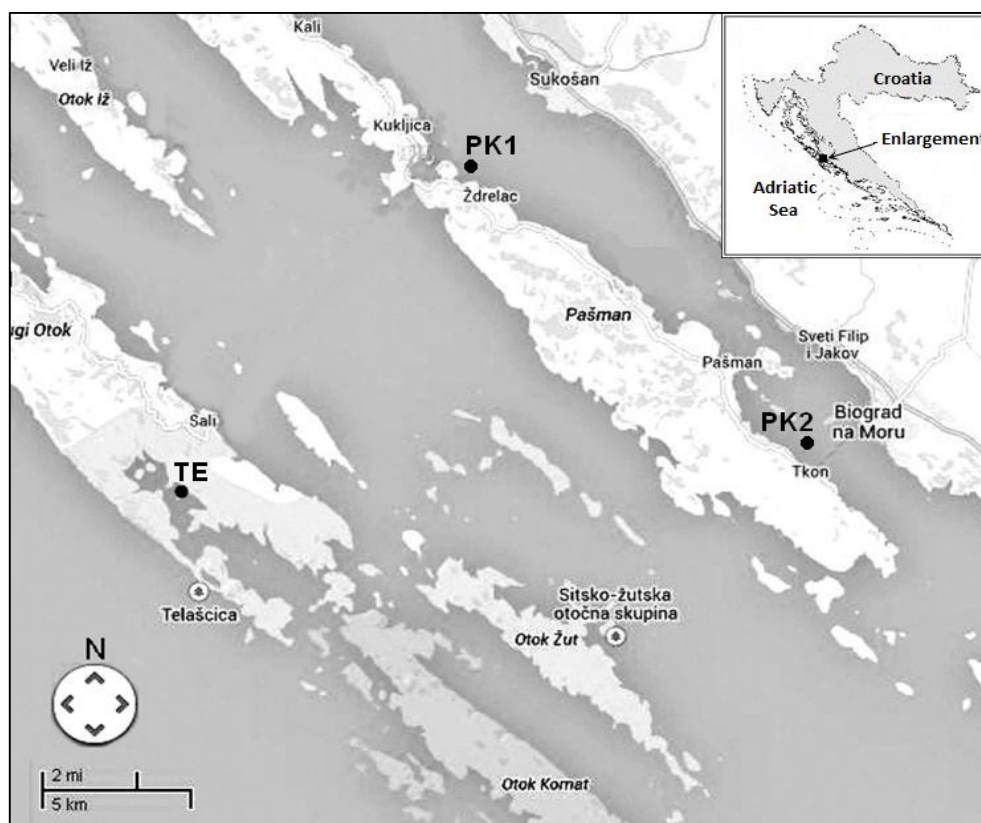
- SRM 1d (*engl. argillaceous limestone*), uzorak glinenog škriljevca, Standard Reference Material, National Institute of Standards and Technology
- SRM 88b (*engl. dolomitic limestone*), uzorak dolomitske stijene, Standard Reference Material, National Institute of Standards and Technology

3.2. Instrumenti

- mikrovalna pećnica MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany)
- Atomijski emisijski spektrometar uz induktivno spregnutu plazmu *Prodigy High Dispersion ICP* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA)

3.3. Uzorkovanje

Kunjke iz prirodnog staništa prikupljene su za potrebe ovog istraživanja tijekom pet mjeseci (siječanj, lipanj, rujn, studeni i prosinac) 2014. godine, na tri lokacije u istočnom dijelu Jadranskog mora: u Pašmanskome kanalu (PK1 44° 01'11,0"N 15°16'30,8"; PK2 43°55'49,1"N 15°24'58,4"E) i Parku prirode Telašćica (TE 43°55'01,0"N 15°09'05,0"E). Lokacije su naznačene na slici 8. Nakon uzorkovanja, tkivo je odmah uklonjeno iz ljuštura i prikladno pohranjeno za potrebe daljnjih bioloških istraživanja. Ljušturae su temeljito očišćene od obraštenih organizama i uronjene u destiliranu vodu tijekom noći. Svaki uzorak se sastojao od cijele dvodijelne ljušturae kunjke, gotovo iste duljine (5-6 cm). Uzorci ljuštura pohranjeni su zasebno u polietilenskim vrećicama i dostavljeni u laboratorij na daljnu analizu.

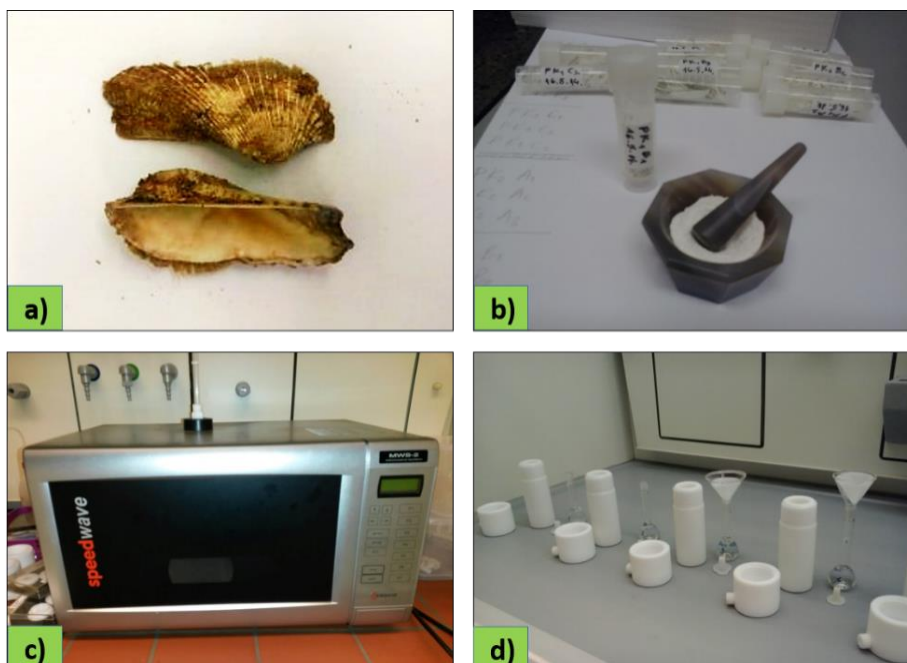


Slika 8. Lokacije uzorkovanja

3.4. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci ljuštura temeljito su isprani u destiliranoj deioniziranoj vodi (Milli-Q Element 18 system, Millipore, USA), zatim osušeni na sobnoj temperaturi i razlomljeni u komadiće. Kako bi se uklonila organska tvar, razlomljeni komadići dvodijelnih ljuštura, žareni su zasebno u porculanskim lončićima na temperaturi od 900 °C, te je produkt žarenja ručno usitnjen u ahatnom tarioniku do bijelog praha. Analitička odvaga od 200 mg praha svakog pojedinog uzorka, prenesena je u teflonske posude i podvrgnuta mokroj razgradnji potpomognutoj mikrovalnom energijom u zatvorenom sustavu uređaja MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany). U sustav za mikrovalnu razgradnju uzoraka, dodano je 8 mL koncentrirane HNO_3 (*Suprapure*, E. Merck, Darmstadt, Germany) i 1 mL H_2O_2 (Kemika, Zagreb, Croatia), a razgradnja se odvijala u tri koraka (130 °C / 15 min; 180 °C / 15 min; 100 °C / 10 min). Nakon razgradnje, dobivene bistre otopine prenesene su u mjerne tikvice od 25 mL i razrijeđene do oznake deioniziranom vodom (Slika 5). Zbog visoke koncentracije kalcija u matrici uzorka, te visokih vrijednosti intenziteta za alkalijske i zemnoalkalijske metale, otopine uzoraka su dodatno razrijeđene 400 puta.

Kako bi se potvrdila točnost analitičkog postupka, korišteni su referentni materijali sedimenata (NIST SRM 1d *argillaceous limestone* i NIST SRM 88b *dolomitic limestone*). Referentni materijali odabrani su za usporedbu s uzorcima na temelju sličnog elementnog sastava, te zbog deklariranog udjela kalcija od 38% i 21% w/w. U svrhu proučavanja utjecaja matrice s visokim udjelom kalcija, korištene dvije analitičke odvage od 200 mg čistog kalcijevog karbonata. Prije postupka mikrovalne razgradnje, u jedan uzorak čistog kalcijevog karbonata dodano je 10 mg L^{-1} standardne multielementne otopine (*engl. spiking*). Svi navedeni uzorci, referentni materijali i slijepe probe, korišteni su kao duplikati i prošli su istu analitičku obradu.



Slika 9. Analitička obrada uzoraka

3.5. Instrumentacija i mjerni postupak

3.5.1. Priprema kalibracijskih otopina

Jednoelementne standardne otopine Ag, Al, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn, (Plasma Pure, Leeman Labs, Hudson, NH, USA), te multielementna standardna otopina ICP-Mehrelement-Standardlösung IV (Merck, Darmstadt, Germany), korištene su za pozicioniranje plazme u mjernom instrumentu i za pripremu kalibracijskih otopina. Iz osnovnih standardnih otopina, razrjeđenjem u HNO_3 2 % v/v, pripremljene su otopine za kalibraciju u rasponu $0,1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$. U svrhu proučavanja utjecaja matrice s visokim udjelom kalcija na koncentraciju elemenata u otopinama, pripremljene su dodatne multielementne kalibracijske otopine u koje je dodano 35 mg L^{-1} standardne otopine kalcija, koliko je očekivano u uzorcima kunjki. Set od tri standardne otopine čistog kalcijevog karbonata i tri otopine kalcijevog karbonata s prethodno dodanih 10 mg L^{-1} standardne multielementne otopine, razrijeđene su 400 puta kao i otopine uzoraka kunjki, te korištene za proučavanje utjecaja matrice s visokim udjelom kalcija na intenzitet emisijskih linija elemenata, snimljenih u aksijalnom ili radijalnom položaju plamenika. Navedene otopine podvrgnute su metodi dodatka standarda, uz dodatak multielementne standardne otopine do konačnih koncentracija $0,0 \text{ mg L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

3.5.2. Značajke instrumenta

Optički emisijski spektrometar *Prodigy High Dispersion ICP* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA; Slika 10.), korišten je za elementnu analizu otopina uzoraka kunjki i odgovarajućih referentnih materijala. Instrument je opremljen s radiofrekvencijskim generatorom (40 MHz, tip “free-running”) i spektrometrom koji sadrži ešeletnu rešetku, te L-PAD detektor (*engl. large-format programmable array detector*). Sustav za uvođenje uzorka u instrument sastoji se od peristaltičke pumpe i sustava kapilara, te protočne staklene komore za raspršivanje i staklenog koncentričnog raspršivača. Radijalni položaj plamenika korišten je za snimanje alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, a aksijalni položaj plamenika za ostale metale i metale u tragovima. Brzina protoka otopina uzorka ugođena je na $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. Stalna i stabilna snaga generatora od 1,2 kW, te brzina protoka argona (glavni protok 18 L min^{-1} , pomoćni protok $0,8 \text{ L min}^{-1}$) održavane su tijekom cijele analize. Snimljeni su položaji odabranih emisijskih linija na L-PAD detektoru, koje nemaju značajnih spektralnih interferencija. Provedena je korekcija pozadinskog zračenja s obzirom na utjecaj matrice sa visokim udjelom kalcija. Vrijeme integracije postavljeno je na 10 s za emisijske linije niske osjetljivosti i na 5 s za emisijske linije veće osjetljivosti. Snimanja u aksijalnom i radijalnom položaju plamenika ponavljana su po tri puta tokom mjerenja svake otopine. Preciznost mjerenja intenziteta na odabranim emisijskim linijama, postignuta je u rasponu od 0,1-1,7 % RSD. Granice detekcije izračunate su kao tri standardne devijacije (3δ) prosječne vrijednosti slijepe probe ($n = 11$) bez dodatka i sa dodatkom standardne otopine kalcija (35 mg L^{-1}) za usporedbu, u svrhu proučavanja utjecaja matrice s visokim udjelom kalcija na elemente u otopinama. Emisijske linije i odgovarajuće detekcijske granice navedene u tablici 3. (poglavlje 4. *Rezultati i rasprava*).



Slika 10. Optički emisijski spektrometar Prodigy High Dispersion ICP
(Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA)

3.6. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni elementnom analizom sastava ljuštore kunjki, koncentracije osamnaest mjerenih metala, podvrgnuti su univarijatnoj i multivarijatnoj statističkoj analizi, kako bi se ispitale moguće sličnosti ili odstupanja između uzoraka prikupljenih na tri različite lokacije uzorkovanja u Jadranskom moru. U tu svrhu, korištena je metoda ne-parametarskog Tukey box plot i analiza glavnih komponenti (*engl. Principal Components Analysis, PCA*) u istom programskom paketu *Statistica 12.7*. Rezultati su prikazani dijagramom s pravokutnikom (*engl. box and whisker plot*). Dijagram s pravokutnikom je jednostavan grafički prikaz rezultata kojim se očitava srednja vrijednost (medijan) i raspon vrijednosti varijable. Sastoji se od pravokutnika koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila. Crta u sredini pravokutnika označava median. Donje i gornje horizontalne linije, *engl. whisker*, mogu se različito definirati, ali najčešće predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila. Sve točke izvan te granice se crtaju posebno i smatraju vrijednostima koje odudaraju od očekivanih vrijednosti (*engl. outliers*). Izgled dijagrama *b-w* ukazuje na stupanj raspršenosti i asimetričnosti (*engl. skewness*).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Procjena utjecaja matrice s visokim sadržajem kalcija na emisijske signale

U otopinama uzoraka ljuštura kunjki određen je sadržaj osamnaest elemenata (Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Na, Ni, Pb, Sr i Zn) metodom ICP-AES. Visoka koncentracija kalcija u matrici uzoraka često uzrokuje anomalije u intenzitetu emisijskih linija pojedinih elemenata.²⁶ Zbog toga je prethodno ispitan utjecaj matrice na koncentraciju elemenata u kalibracijskim multielementnim otopinama koncentracije 0,5 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹. U otopine je dodano 35 mg L⁻¹ jednoelementne standardne otopine kalcija, odnosno u koncentraciji koja je očekivana u uzorcima kunjki. Usporedbom detekcijskih granica za pojedine elemente, izračunatih kao tri standardne devijacije (3σ) prosječne vrijednosti slijepe probe ($n = 11$) bez dodatka i sa dodatkom standardne otopine kalcija, vrijednosti detekcijskih granica su veće u slučaju kada je u matrici prisutna visoka koncentracija kalcija. Nakon korekcije pozadinskog zračenja pomoću slike na L-PAD detektoru ešaletnog optičkog spektrometra, linearnost svih emisijskih linija bila je u zadovoljavajućem rasponu vrijednosti koeficijenta korelacije (R^2). Odabrane emisijske linije elemenata, vrijednosti koeficijenta korelacije R^2 , te detekcijske granice za standardnu kalibraciju i kalibraciju s dodatkom standardne otopine kalcija, prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Emisijske linije elemenata, vrijednosti koeficijenta korelacije (R^2), te detekcijske granice ($\mu\text{g L}^{-1}$) za standardnu kalibraciju i kalibraciju uz dodatak standardne otopine kalcija (35 mg L^{-1})

Element	λ / nm	Standardna kalibracija (R^2)	$c_L / \mu\text{g L}^{-1}$	Kalibracija uz dodatak Ca (R^2)	$c_L (\text{Ca}_{\text{dod}}) / \mu\text{g L}^{-1}$
Ag	328,068	0,99998	1,8	0,99999	1,9
Al	396,152	0,99994	3,8	0,99993	11,1
B	249,677	0,99998	5,0	0,99984	17,9
Ba*	455,403	0,99995	1,2	0,99995	1,7
Cd	214,441	0,99999	0,4	0,99989	0,6
Co	236,379	0,99999	1,3	0,99992	3,4
Cr	205,552	0,99999	2,4	0,99992	2,5
Cu	324,754	0,99998	1,3	0,99991	1,7
Fe	259,940	0,99999	0,8	0,99994	6,1
K	766,491	0,99351	3,0	0,99984	6,3
Li*	670,784	0,99993	9	0,99999	0,3
Mg*	279,553	0,99988	0,2	0,99997	0,3
Mn	257,610	0,99996	0,3	0,99999	0,3
Na	589,592	0,99963	3,8	0,99900	4,9
Ni	221,648	0,99999	2,1	0,99991	2,8
Pb	220,353	0,99998	6,4	0,99989	13,1
Sr*	421,552	0,99999	0,3	0,99996	0,4
Zn	206,201	0,99999	0,3	0,99991	1,4

* elementi snimljeni u radijalnom položaju plamenika

Metodom dodatka standarda u otopine kalcijeva karbonata, promatran je međusoban utjecaj kalcija iz matrice i ostalih elemenata u otopini, na emisijskim linijama kalcija 317,933 nm i 422,673 nm snimljenim u aksijalnom i radijalnom položaju plamenika. Kalibracijske krivulje dobivene snimanjem intenziteta emisijskih linija kalcija u aksijalnom položaju, imaju vrijednosti omjera nagiba bliske 1 i zadovoljavajuće su linearnosti, za razliku od kalibracijskih krivulja dobivenih snimanjem u radijalnom položaju. Vrijednosti omjera nagiba na odabranim emisijskim linijama kalcija, snimljenim u aksijalnom i radijalnom položaju plamenika, prikazane su u tablici 4. Iz vrijednosti omjera nagiba kalibracijskih krivulja, može se zaključiti da postoje anomalije u intenzitetu emisijskih linija kalcija u radijalnom položaju, a uzrok tome može biti utjecaj emisije ostalih elemenata na intenzitet spektralnih linija kalcija, te nemogućnost postizanja robustnih uvjeta plazme uz postavljene radne parametre.

Tablica 4. Vrijednosti omjera nagiba kalibracijskih krivulja za čisti kalcijev karbonat i uz dodatak standardne multielementne otopine na odabranim emisijskim linijama kalcija. Mjereni rezultati su dobiveni snimanjem u radijalnom i aksijalnom položaju plamenika

Emisijska linija	Položaj plamenika	Omjeri nagiba krivulja: a (CaCO ₃) / a (CaCO ₃ + multi)
317,933	radijalni	1,070
	aksijalni	1,003
422,673	radijalni	1,050
	aksijalni	0,997

Za utvrđivanje točnosti mjerenja, korišteni su referentni materijali dvije vrste vapnenca (*argillaceous limestone* NIST SRM 1d, i *dolomitic limestone* NIST SRM 88b). Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 5.

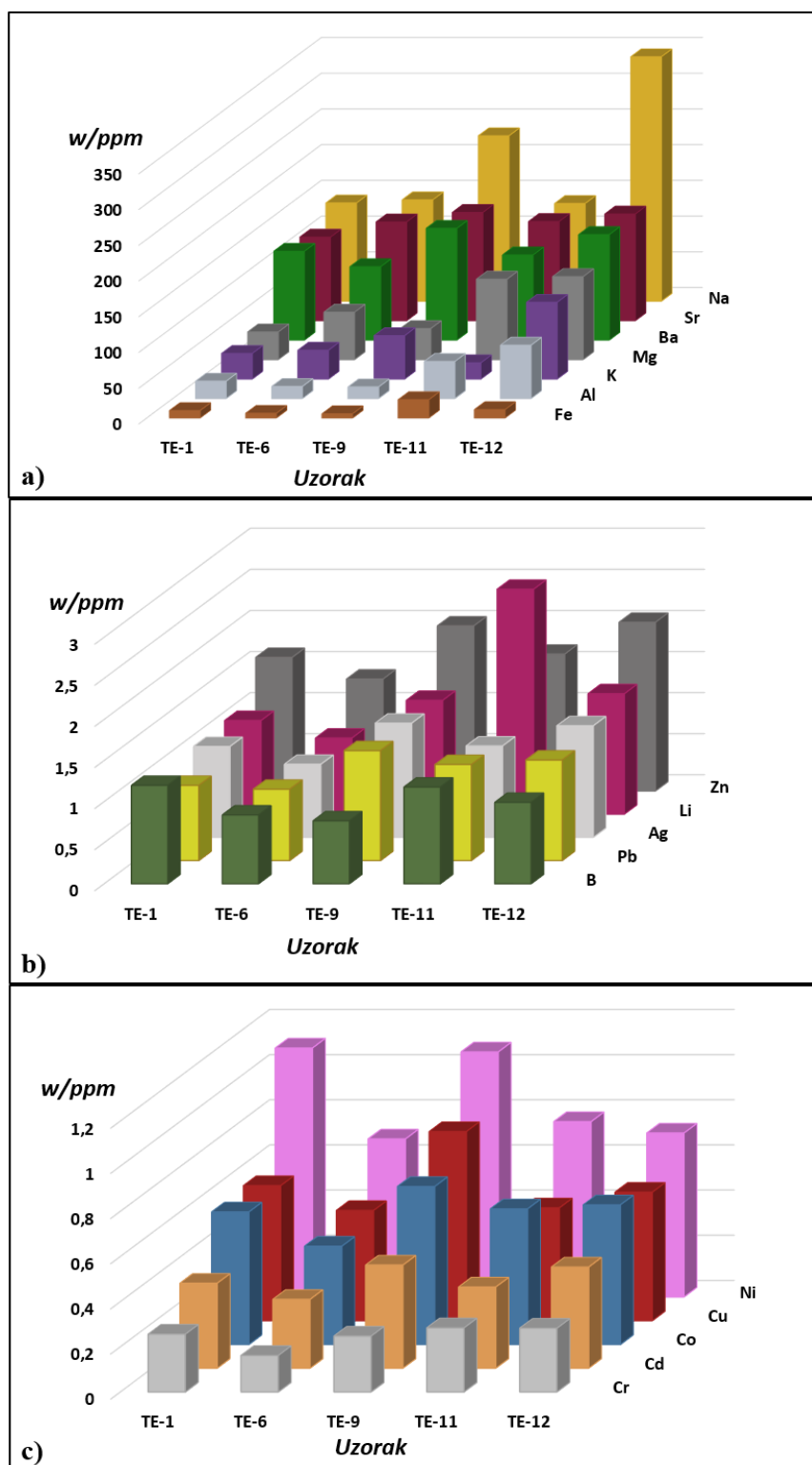
Tablica 5. Elementni sastav certificiranih referentnih materijala NIST SRM 1d (*argillaceous limestone*) i NIST SRM 88b (*dolomitic limestone*)

Element	SRM 1d			SRM 88b		
	Certificirana vrijednost (µg/g)	Mjerena vrijednost (µg/g)	Analitički povrat (%)	Certificirana vrijednost (µg/g)	Mjerena vrijednost (µg/g)	Analitički povrat (%)
Al	2784 ± 69	2281 ± 190	82	1778 ± 69	911 ± 86	51
Ca	377714	370281 ± 82	98	214049 ± 357	202922 ± 1898	95
Co	-	-	-	1,02	1,5	147
Cr	8,21 ± 1,37	6,52 ± 0,1	79	2,33	0,95 ± 0,09	41
Fe	2231,9 ± 47,6	2230,7 ± 6,7	100	1937 ± 14	1896 ± 174	98
K	1127 ± 38	1059 ± 16	94	855,1 ± 19,9	625,5 ± 9,6	73
Mg	1815,2 ± 60,3	1714,8 ± 3,6	94	126819 ± 422	114124 ± 924	90
Mn	209 ± 5	175 ± 20	84	123,9 ± 9,3	87,0 ± 0,1	70
Na	80,9 ± 11,9	129,0 ± 0,6	159	215,14 ± 5,19	238,86 ± 17,23	111
Ni	4	3,07 ± 0,03	77	-	-	-
Sr	256,2 ± 8,5	230,0 ± 1,7	90	-	-	-
V	10	6	60	-	-	-
Zn	17,7 ± 2,4	17,8 ± 0,1	101	-	-	-

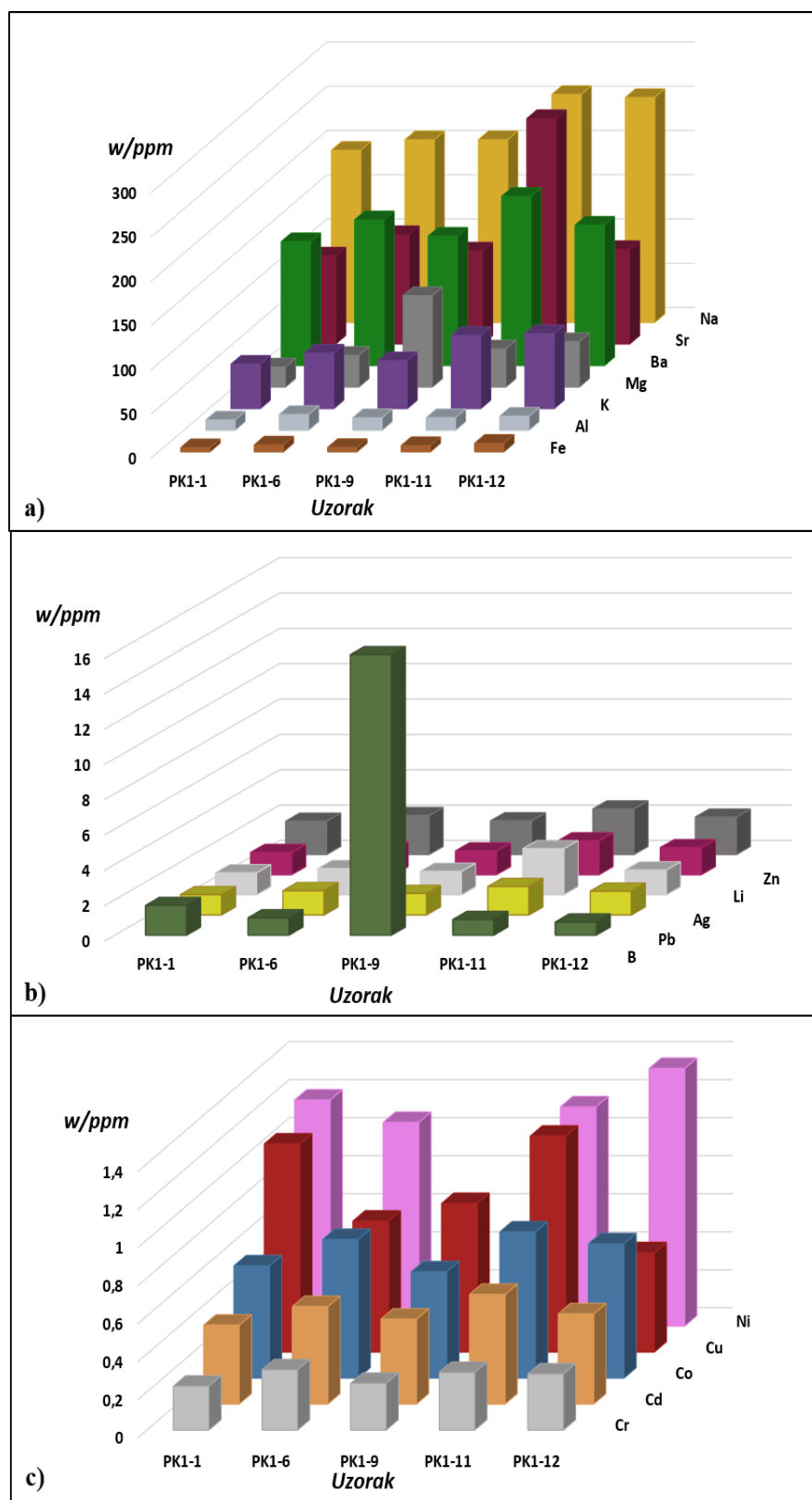
Mjerene vrijednosti koncentracije elemenata u uzorcima pokazuju dobro podudaranje s certificiranim vrijednostima koncentracija oba referentna materijala. Statistička usporedba dobivenih rezultata, provedena je pomoću uparenog *t*-testa na razini statističke značajnosti od $P=0,05$. Izračunata *t*-vrijednost od 0,2949 za SRM 1d i 0,8934 za SRM 88b niža je od kritične vrijednosti 2,201, odnosno 2,306. Usporedba certificiranih vrijednosti i mjerenih vrijednosti koncentracija elemenata nije pokazala značajnu razliku.

4.2. Prikaz mjerenih rezultata za analizu elementnog profila ljuštura kunjki

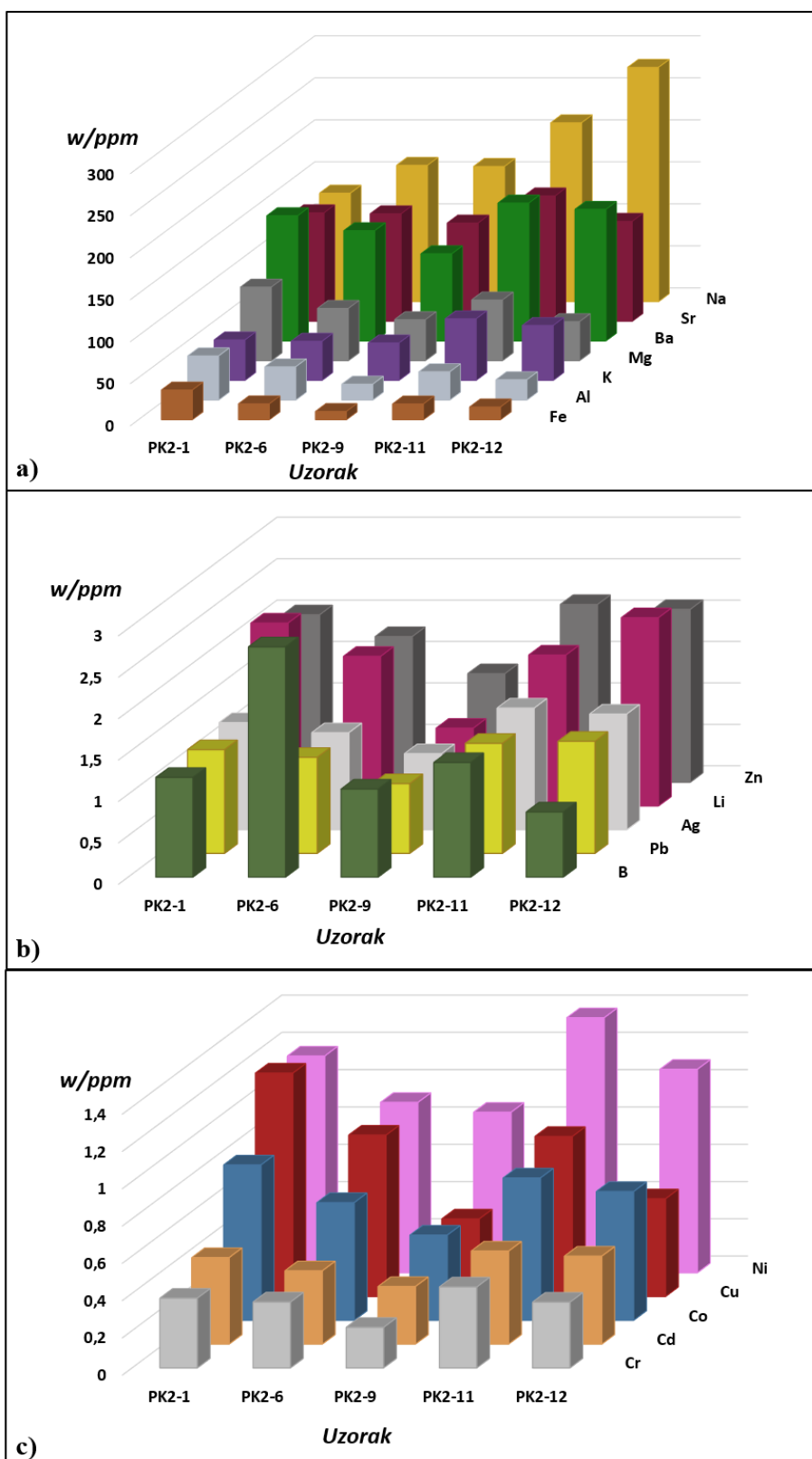
Grafički prikazi mjerenih rezultata za uzorke ljuštura kunjki prezentirani su na slikama 11-13. Rezultati na slikama su podijeljeni na tri podjedinice; sadržaj glavnih elemenata, elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu i elemenata u tragovima u uzorcima ljuštura kunjki.



Slika 11. Koncentracije elemenata u uzrocima ljuštura kunjki prikupljenih u Parku prirode Telašćica (TE) tijekom siječnja, lipnja, rujna, studenog i prosinca 2014. godine ($n=5$, $RSD < 1,6\%$). a) glavni elementi, b) elementi u srednjem koncentracijskom rasponu, c) elementi u tragovima



Slika 12. Koncentracije elemenata u uzrocima ljuštura kunjki prikupljenih na lokaciji u Pašmanskome kanalu (PK1) tijekom siječnja, lipnja, rujna, studenog i prosinca 2014. godine ($n=5$, $RSD < 1,0\%$). a) glavni elementi, b) elementi u srednjem koncentracijskom rasponu, c) elementi u tragovima



Slika 13. Koncentracije elemenata u uzrocima ljuštura kunjki prikupljenih na lokaciji u Pašmanskom kanalu (PK2) tijekom siječnja, lipnja, rujna, studenog i prosinca 2014. godine ($n=5$, $RSD < 1,5\%$). a) glavni elementi, b) elementi u srednjem koncentracijskom rasponu, c) elementi u tragovima

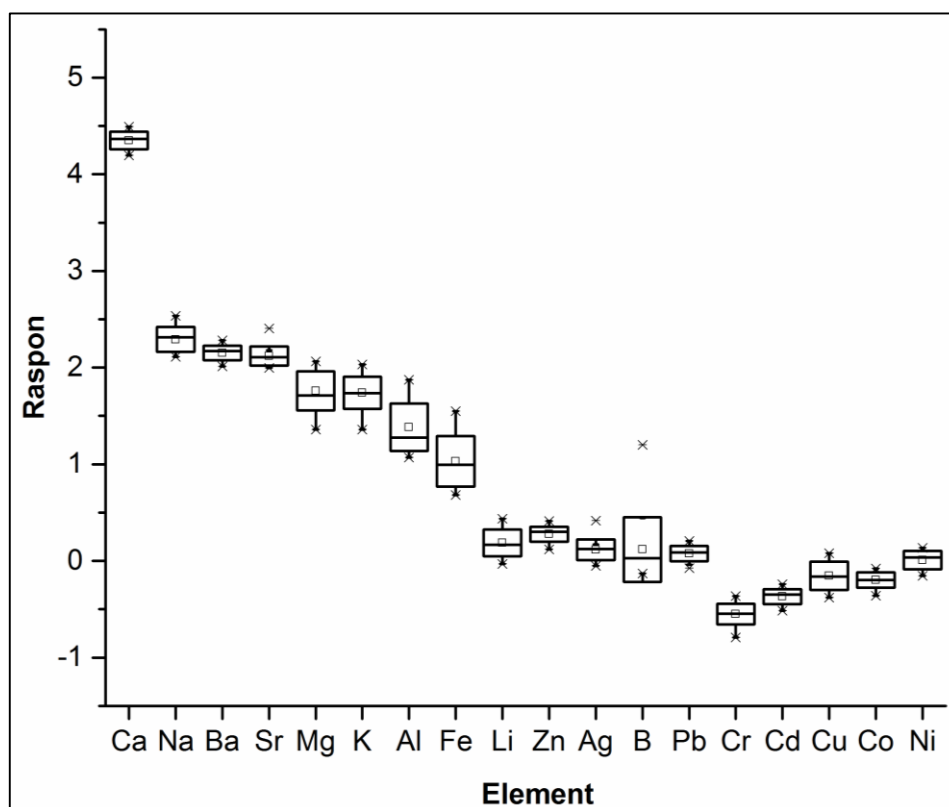
Koncentracije glavnih elemenata izmjerenih u uzorcima kunjki s tri različite lokacije pokazale su gotovo jednoliku raspodjelu, neovisno o lokacijama uzorkovanja. Uočen je blagi porast u koncentracijama glavnih elemenata tijekom mjeseci, od siječnja do prosinca, u sve tri skupine uzoraka kunjki (PK1, PK2 i TE). Koncentracijski rasponi glavnih elemenata u uzorcima su: 129-342 $\mu\text{g g}^{-1}$ za Na; 100-255 $\mu\text{g g}^{-1}$ za Sr; 119-191 $\mu\text{g g}^{-1}$ za Ba; 23-116 $\mu\text{g g}^{-1}$ za Mg; 23-107 $\mu\text{g g}^{-1}$ za K. i 150-540 $\mu\text{g g}^{-1}$ za K. Zbog znatno povišene koncentracije, Fe i Al su također svrstani u koncentracijski raspon glavnih elemenata. U uzorcima kunjki iz Parka prirode Telaščica, te sjeverne i južne lokacije u Pašmanskome kanalu, izmjereni koncentracijski raspon za Fe iznosi 5-25 $\mu\text{g g}^{-1}$, a za Al 12-75 $\mu\text{g g}^{-1}$. Varijacije u koncentraciji Fe i Al pokazuju značajne razlike između lokacija uzorkovanja, pogotovo u skupini uzoraka kunjki iz Pašmanskog kanala (PK2) gdje je uočena veća koncentracija Fe i Al nego u preostale dvije skupine uzoraka (PK1 i TE). Dobiveni rezultati usporedivi su s koncentracijskim rasponima željeza i aluminija, pronađenih u ljušturama drugih vrsta školjakaša.²⁷ Obzirom da je elementni sastav ljušture školjakaša usko povezan s biomineralizacijskim procesima, tijekom kojih dolazi do akumulacije metala iz okoliša, utvrđeno je da koncentracijski rasponi metala prate stanje u okolišu. Varijacije u mjerenim koncentracijama Fe i Al u uzorcima kunjki s tri različite lokacije, vjerojatno su uzrokovane razlikama u kemijskom sastavu podloge na kojoj vrste rastu.

Mjerene koncentracije elemenata u srednjem i niskom koncentracijskom rasponu pokazale su blage varijacije između uzoraka kunjki s različitih lokacija uzorkovanja. Uočen je karakterističan porast u koncentracijama tih elemenata tijekom nekoliko mjeseci, od siječnja do prosinca, u sve tri skupine uzoraka kunjki (PK1, PK2 i TE). Međutim, u skupini uzoraka sa sjeverne lokacije u Pašmanskome kanalu (PK1), utvrđene su vrlo niske vrijednosti koncentracije elemenata srednjeg i niskog koncentracijskog raspona, za razliku od ostale dvije skupine uzoraka (PK2 i TE). Niža koncentracija elemenata srednjeg i niskog koncentracijskog raspona u uzorcima kunjki sa sjeverne lokacije Pašmanskog kanala (PK1) vjerojatno postoji zbog razlika u geološkoj osnovi te lokacije. Naime, sjeverna lokacija uzorkovanja u Pašmanskome kanalu nalazi se u otvorenom protočnom dijelu kanala, za razliku od južne lokacije u Pašmanskome kanalu (PK2), te lokacije unutar Parka prirode Telaščica (TE), koje su smještene u zaljevima u kojima s vremenom dolazi do veće bioakumulacije metala.

Koncentracije elemenata u tragovima u uzorcima ljuštura kunjki, bliske su detekcijskim granicama metode i izmjerene su u rasponu od 0,2-1,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ za Cd, Co, Cr, Cu i Ni. Novija istraživanja na temu specijacije elemenata u tragovima pokazuju da takvi elementi definiraju kemijski „otisak prsta“ neke vrste, te se mogu koristiti u razlikovanju jedinki iz geografski bliskih populacija. Istraživanjem populacijske varijabilnosti i bioraznolikosti vrsta dagnji²⁸, utvrđeno je da nema značajnih razlika u vrstama na određenim lokacijama uzorkovanja, no uočena je povezanost udaljenosti vrsta sa elementnom raspodjelom. Zastupljenost elemenata u tragovima u karbonatnom skeletu kunjki, izravno je povezana s metabolizmom vrste i uvjetima okoliša. Stoga je antropogeno onečišćenje jedan od mogućih uzroka povećanih koncentracija Cu, Ni, Pb i Cd u usporedbi s koncentracijama istih elemenata u uzorcima kunjki s nenapučenih i zaštićenih područja.

4.3. Kemometrijski alati u procjeni elementnog profila kunjki

Za bolju procjenu raspodjele elemenata u uzorcima kunjki, dobiveni rezultati su prevedeni u logaritamske vrijednosti koje su podvrgnute univarijatnoj statističkoj analizi. Rezultati su prikazani grafički na slici 14. Specifične karakteristike pojedine varijable u skupu podataka prikazane su pomoću metode dijagrama s pravokutnikom (*b-w*), gdje svaki pravokutnik sadrži vrijednost medijana, 25° i 75° percentila i horizontalne linije (*engl. whiskers*), koje predstavljaju najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila.

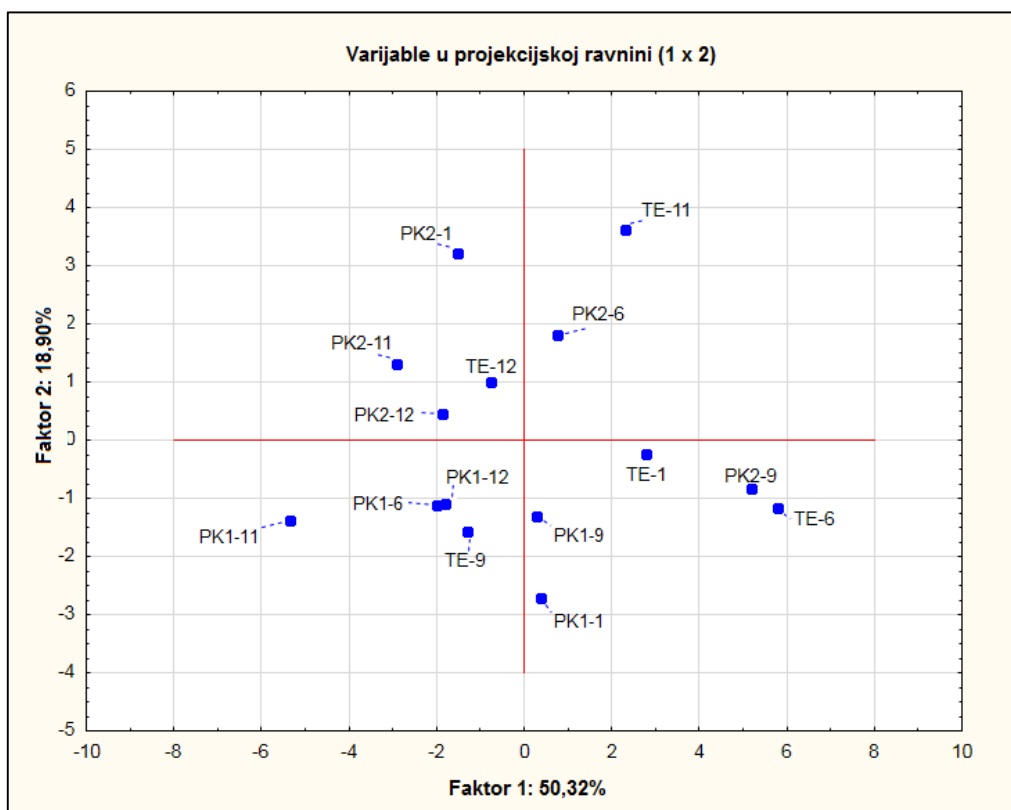


Slika 14. Distribucija mjerenih koncentracija elemenata prikazana dijagramom *b-w*

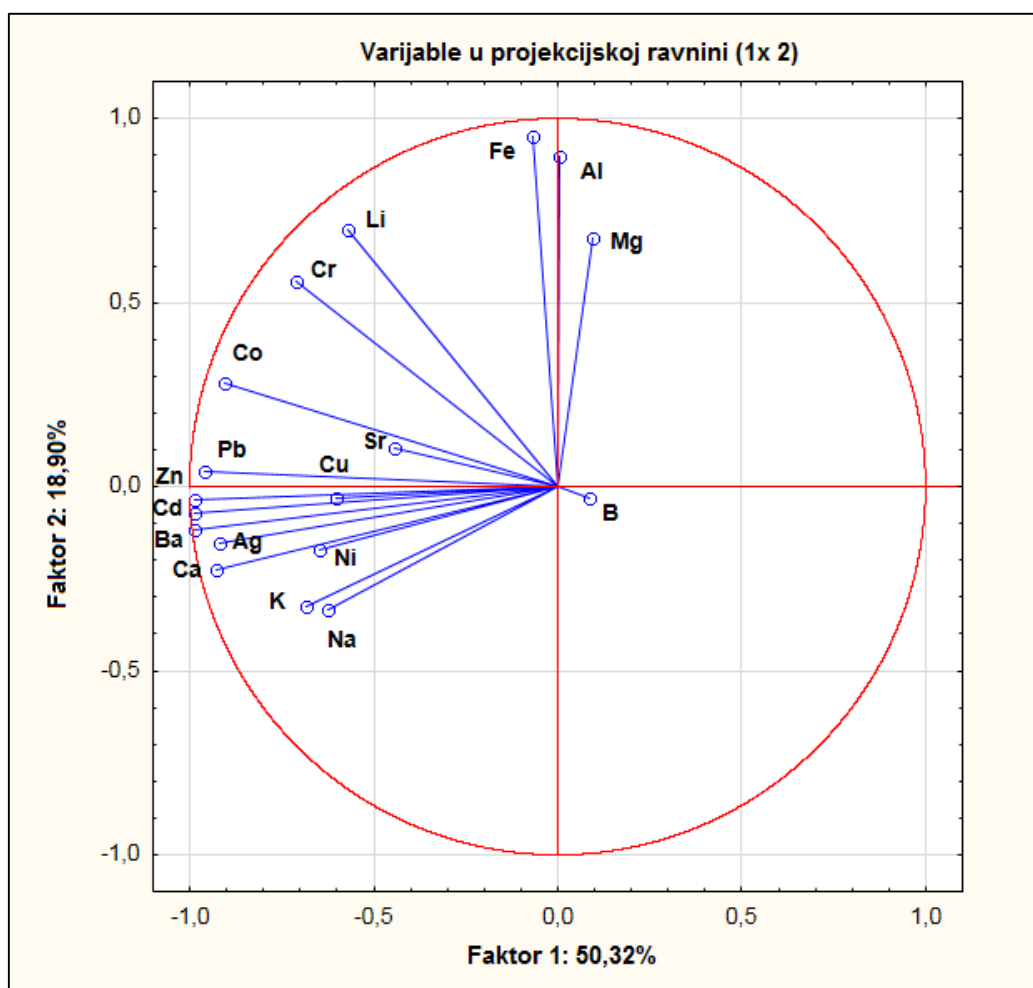
Elementni profil ljuštare kunjki vidljiv je iz dijagrama *b-w*. Izuzev kalcija, koji je najzastupljeniji element u elementnom sastavu ljuštare kunjki, u visokim koncentracijama prisutni su Na, Ba, Sr, Mg i K, te Al i Fe. Elementi srednjeg koncentracijskog raspona su: Li, Zn, Ag, B i Pb, a elementi u tragovima su Cr, Cd, Cu, Co i Ni. Izgled dijagrama *b-w* za glavne elemente i elemente u srednjem koncentracijskom rasponu ukazuje na njihovu ujednačenu raspodjelu. Uočen je veći stupanj raspršenosti podataka za Cu, Cd i Ni, što je

razumljivo s obzirom da su mjerenja tih elemenata u tragovima vrlo blizu detekcijskih granica metode, te asimetričnost mjerenih rezultata kod Al, Fe i B, na koje također utječe osjetljivost mjerenja.

Multivarijatna analiza provedena je na cijelom skupu dobivenih rezultata, nakon što su prevedeni u logaritamske vrijednosti.^{29,30} Korelacijska matrica izvedena je uz 18 stupaca koji predstavljaju varijable (elementi) i 15 redaka koji predstavljaju uzorke sa svih mjesta u određenim mjesecima uzorkovanja. Analizom glavnih komponenti (*engl. principal components analysis*, PCA), utvrđeno je da prve četiri svojstvene vrijednosti (*engl. eigenvalues*) objašnjavaju 87% ukupne varijance skupa podataka. Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2), koje objašnjavaju 69% ukupne varijance, grafički su prikazane na slici 15a, kao dijagrami pogodaka za dobivene vrijednosti. Slika 15b prikazuje faktorska opterećenja (*engl. loading*) svakog od elemenata. Slika 15c prikazuje dendrogram pogodaka za dobivene vrijednosti, grupirane u klustere prema izračunu Euklidskih udaljenosti.

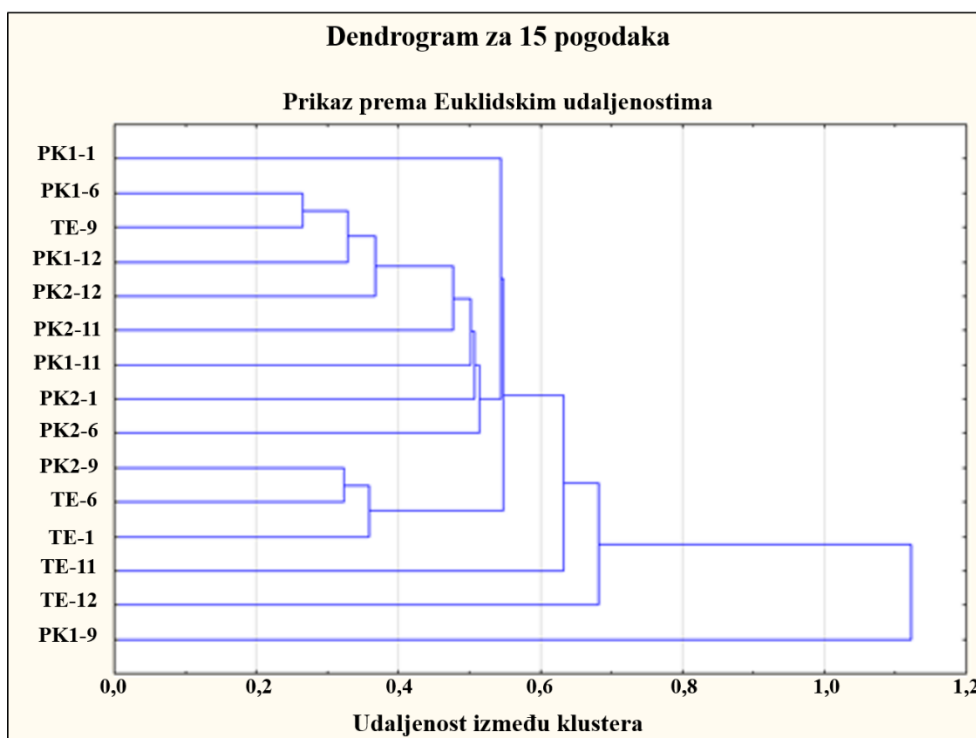


Slika 15a. Klasifikacija uzoraka analizom glavnih komponenti (PCA) : dijagram pogodaka u sustavu prve dvije glavne komponente PC1/PC2



Slika 15b. Faktorska opterećenja varijabli u sustavu PC1/PC2

Promjene u grupiranju uzoraka vidljive su u dva smjera. Analizom glavnih komponenti utvrđeno je da se uzorci svrstavaju duž osi druge glavne komponente i da se cijeli skup podataka može podijeliti u dvije skupine. Prva skupina duž pozitivne osi PC2 je karakterizirana višim opterećenjem obzirom na elemente: Pb, Sr, Co, Cr, Li, Fe, Al i Mg. U tu skupinu spadaju uzorci ljuštura kunjki prikupljenih s lokacije u Pašmanskome kanalu PK2, te dva uzorka iz Parka prirode Telaščica (TE). Druga skupina duž negativne osi PC2 pokazuje raspodjelu elemenata: Zn, Cd, Cu, Ba, Ag, Ca, Ni, K, Na i B. U tom slučaju teže je karakterizirati opterećenja obzirom da se elementi gusto grupiraju oko osi PC2. U tu skupinu spadaju uzorci ljuštura kunjki sa lokacije u Pašmanskome kanalu (PK1) i nekoliko uzoraka iz Parka prirode Telaščica (TE).



Slika 15c. Dendrogram pogodaka svrstanih u klustere prema Euklidskoj udaljenosti

Male, no uočljive razlike u koncentracijama elemenata u tragovima u uzorcima kunjki prikupljenih na različitim lokacijama uzorkovanja, indirektno prikazuju stanje okoliša na kojem vrsta obitava, te su usko povezane sa sezonom uzorkovanja. U prikazanom dendrogramu se uzorci prikupljeni na različitim geološkim lokacijama, u različitim sezonama uzorkovanja (proljeće-zima) grupiraju u klustere prema prosječnoj elementnoj raspodjeli. Iako je manji broj parametara utjecao na slabije odijeljivanje, u prikazu su vidljiva gotovo četiri klustera. Iz klustera se može do određene mjere pratiti pravilnost grupacije uzoraka s istih lokacija uzorkovanja PK1, PK2 i TE, s time da odstupaju vrijednosti za uzorke TE-9, PK1-11 i PK1-9. Također, uočena je grupacija uzoraka prema sezoni uzorkovanja od siječnja do rujna, odnosno od rujna do prosinca.

Uzorci ljuštura kunjki približne su veličine i starosti. Iz bioloških istraživanja poznato je da je rast i razvoj kunjki Jadranskog mora vrlo spor, te je potrebno 3-7 godina da kunjka dostigne svoju komercijalnu duljinu od 50 mm. U ovom radu, korišteni su uzorci cijelih dvodijelnih ljuštura, stoga je moguće zaključiti o prosječnoj elementnoj raspodjeli i kemijskom „otisku prsta“ cijele populacije kunjki. Dobiveni rezultati raspodjele elemenata u ljušturama kunjki i robustnost primijenjenih kemometrijskih metoda, pokazuju potencijal primjene elementnog profiliranja u akvatičnim organizmima na geografski bliskim lokacijama.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivanje utjecaja matrice s visokim udjelom kalcija pokazalo je da je utjecaj na intenzitete emisijskih linija elemenata značajan pri snimanju u radijalnom položaju plamenika. Jedan od mogućih razloga je nemogućnost postizanja robustnih uvjeta u plazmi uz primjenjene radne parametre. Točnost postupaka ispitana je uz odgovarajuće referentne materijale, koji su korišteni i za usporedbu mjerenih rezultata s onima dobivenim analizom uzoraka kunjki. Sadržaj osamnaest elemenata analiziran je pomoću metode atomske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu, te uz primjenu kemometrijskih metoda na skupovima mjerenih rezultata.

Primjenom univarijatne statističke analize (*box-whisker plot*), dobiven je uvid u opći elementni profil ljuštura kunjki. Multivarijatna analiza tj. analiza glavnih komponenti (PCA), koja uključuje podatke o koncentraciji svih izmjerenih elemenata, dijeli uzorke u dvije skupine. Znatna varijabilnost između te dvije skupine, pripisuje se biomineralizacijskim procesima tijekom rasta kunjki na različitim lokacijama i uz različite uvjete okoliša. Primijenjenim kemometrijskim alatima potvrđena je razlika u elementnom sastavu uzoraka kunjki prikupljenih u zaštićenom području Parka prirode Telašćica i na frekventnoj pomorskoj ruti Pašmanskog kanala.

6. POPIS LITERATURE

1. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed., Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA, 2007.
2. C. B. Boss, K. J. Fredeen, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 2nd ed., The Perkin-Elmer Corporation, USA 1997.
3. <http://analyticalprofessional.blogspot.hr/2013/06/inductive-coupled-plasma-optical.html> (14.09.2016.)
4. <http://www.pno-astronomy.com/Spettroscopia/Teoria/spettroscopia.htm> (14.09.2016.)
5. O. Schultz, P. Heitland, Application of prominent spectral lines in the 125-180 nm range for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* **371** (2001), 1070-1075.
6. S. J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2007.
7. Z. Mester, R. Sturgeon ed., *Sample Preparation for Trace Metal Analysis*, in Wilson & Wilson's *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol XLI, Elsevier, Amsterdam, 2003.
8. J. Dennaud, A. Howes, E. Poussel, J. M. Mermet, Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers, *Spectrochim. Acta, Part B* **56** (2001), 101-112.
9. http://irina.eas.gatech.edu/EAS8803_Fall2009/Lec5.pdf (14.09.2016.)
10. M. Thompson, M. H. Ramsey, Matrix effects due to calcium in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Their nature, source and remedy, *Analyst* **110** (1985), 1413-1422.
11. J. L. Todolí, L. Gras, V. Hernandis, J. Mora, Elemental matrix effects in ICP-AES, *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002), 142-169.
12. M. Stepan, P. Musil, E. Poussel, J. M. Mermet, Matrix induced shift effects in axially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B* **56** (2001), 443-453.
13. M. Thompson, S. L. R. Ellison, A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty, *Accred. Qual. Assur.* **10** (2005), 82-97.

14. B. Morton, M. Peharda, The biology and functional morphology of *Arca noae* (Bivalvia: Arcidae) from the Adriatic Sea, Croatia, with a discussion on the evolution of the bivalve mantle margin, *Acta Zoologica* **89** (2008), 19–28.
15. D. Medaković, T. Dolenc, D. Karlović, P. Vrhovnik, N. Rogan Šmuc, S. Rončević, L. Pitarević-Svedružić, M. Dolenc, Trace metals in fish biominerals as environmental indicators: handheld XRF analyses, *Key Eng. Mat.* **672** (2015), 328-339.
16. M. H. Al-Jaberi, Heavy metal concentrations in the bivalve *Corbicula fluminalis* shells from Shatt Al-Arab River, *Intern. J. Mar. Sci.* **5** (2015), 1-4.
17. R. Cornelis *et al*, *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, Book News Inc, Portland, 2004.
18. A. Barats, C Pécheyran, D. Amouroux, S. Dubascoux, L. Chauvaud, O. F. X. Donard, Matrix- matched quantitative analysis of trace-elements in calcium carbonate shells by laser-ablation ICP-MS: Application to the determination of daily scale profiles in scallop shell (*lat. Pecten maximus*), *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007), 1131-1140.
19. http://huntingbook.hr/hr_HR/ribolov/morski-ribolov/lovina/kunjka (14.09.2016.)
20. M. Peharda, J. Bolotin, N. Vrgoč, N. Jasprica, A. Bratoš, B. Skaramuca, A study of Noah's Ark shell (*Arca noae* Linnaeus 1758) in Mali Ston Bay, Adriatic Sea, *J. Shellfish Res.* (2003), 705-709.
21. M. Peharda, C. A. Richardson, V. Onofri, A. Bratoš, M. Crnčević, Age and growth of the bivalve *Arca noae* L. in the Croatian Adriatic Sea, *J. Moll. Stud.* **68** (2002), 307–310.
22. S. Puljas, M. Peharda, I. Župan, F. Bukša, Maximum recorded life span of *Arca noae* Linnaeus, 1758 in the marine protected area Telašćica, Adriatic Sea, *Cah. Biol. Mar.* **56** (2015), 163-168.
23. F. Ricardo, L. Génio, M. Costa Leal, R. Albuquerque, H. Queiroga, R. R. Calado, R. Calado, Trace element fingerprinting of cockle (*Cerastoderma edule*) shells can reveal harvesting location in adjacent areas, *Sci. Rep.* **5** (2015), 1-9.
24. S. Rončević, L. Pitarević-Svedružić, J. Smetiško, D. Medaković, ICP-AES analysis of metal content in shell of mussel *Mytilus galloprovincialis* from Croatian coastal waters, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **90** (2010), 620-632.
25. S. Pérez-Mayol, J. Blasco, V. Tornero, B. Morales-Nin, A. Massanet, A. Tovar-Sánchez, Are the shells of *Scrobicularia plana* useful for monitoring trace metal pollution events?, *J. Env. Biol.* **35** (2014), 9-17.

26. S. Rončević, I. Nemet, L. Pitarević-Svedružić, D. Medaković, Chemical Vapour Generation for Tin Determination in High-content Calcium Matrix by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Croat. Chem. Acta* **87** (2014), 17-22.
27. C. Palpandi, K. Kesavan, Heavy metal monitoring using *Nerita crepidularia*-mangrove mollusc from the Vellar estuary, Southeast coast of India, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2** (2012), 358-367.
28. H. S. Carson, P. C. López-Duarte, G.S. Cook, F. J. Fodrie, B. J. Becker, C. DiBacco, L. A. Levin, Temporal, spatial, and interspecific variation in geochemical signatures within fish otoliths, bivalve larval shells, and crustacean larvae, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **473** (2013) 133-148.
29. D. Bingöl, Ü. Ay, S. Karayünlü Bozbaş, N. Uzgören, Chemometric evaluation of the heavy metal distribution in waters from the Dilovasi region in Kocaeli, Turkey, *Marine Poll. Bull.* **68** (2013), 134-139.
30. I. Burstyn, Principal component analysis is a powerful instrument in occupational hygiene inquiries, *Ann. Occup. Hyg.* **48** (2004), 655-661.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. travnja 1991. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Dr. Ante Starčevića u Zagrebu, 2006. godine upisujem VII. Opću gimnaziju u Zagrebu. Potom 2010. godine upisujem Sveučilišni preddiplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje 2014. godine stječem akademski stupanj prvostupnice kemije. Završetkom preddiplomskog studija, 2014. godine upisujem Sveučilišni diplomski studij kemije, smjer: Analitička i Organska kemija, na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Nagrade i priznanja:

2004. – 2006. Dvostruko sudjelovanje na tradicionalnoj nacionalnoj izložbi inovacija „INOVA“, te osvajanje nagrade (srebrna i brončana medalja) za samostalan inventivan rad
2016. Sudjelovanje na natječaju za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016. sa znanstvenim radom Određivanje elementnog sastava ljušture kunjke (*lat. Arca noae*, Linnaeus, 1758.) emisijskom plazma spektrometrijom

Popis radova:

1. Kobelja, Kristina; Nemet, Ivan; Župan, Ivan; Čulin, Jelena; Rončević, Sanda.
Elemental profiling of Noah's Ark shell (*Arca noae*, Linnaeus, 1758) by plasma optical spectrometry and chemometric tools. *Journal of trace elements in medicine and biology*. (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.011>

Sudjelovanja na konferencijama:

1. Nemet, Ivan; Kobelja, Kristina; Rončević, Sanda; Čulin, Jelena; Župan, Ivan.
Elemental Profiling of Noah's Ark Shell Crust by Plasma Spectrometry Methods // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Abstracts XI ISTERH Conference, Recent Advances in Trace Element Research in Health and Disease / Jurasović, Jasna; Aschner, Michael (ur.). Amsterdam: Elsevier, 2015. 27-27 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Kobelja Kristina; Nemet, Ivan; Rončević, Sanda. Karakterizacija analitičkih mogućnosti metode ICP-AES za određivanje fosfora i sumpora // X. Susret mladih kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka / Findrik Blažević, Zvezdana; Sudar, Martina; Šalić, Anita; Vrsalović Presečki, Ana; Vrsaljko, Domagoj (ur.). Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2014. 85-85 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).