

SPECIACE STOPOVÝCH PRVKŮ VE VODÁCH, PŮDÁCH, SEDIMENTECH A BIOLOGICKÝCH MATERIÁLECH*

RICHARD KOPLÍK^a, EVA ČURDOVÁ^b
a OTO MESTEK^b

^aVysoká škola chemicko-technologická, Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bVysoká škola chemicko-technologická, Ústav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 4.XI. 1996

Obsah

1. Úvod
2. Přírodní vody
3. Sedimenty a půdy
4. Biologické materiály

1. Úvod

Studium chování stopových prvků v jednotlivých složkách životního prostředí^{1–3} přineslo v minulosti množství cenných informací o jejich výskytu, o zdrojích kontaminace, možnostech pohybu a o toxických účincích na organismy. Rozvoj analytických technik⁴, zejména metod atomové spektrometrie, aktivační analýzy a elektrochemické rozpouštěcí analýzy, v nedávné době umožnil sledování řady prvků ve vzorcích z životního prostředí i na ultrastopových hladinách. Informace získané kvantitativní analýzou, tj. údaje o celkovém obsahu určitého prvku ve zkoumaném materiálu, však nemusí být vždy dostatečné pro posouzení možných účinků této hladiny prvku v daném prostředí.

Poznatky toxikologů a fyziologů^{5,6} o různé míře toxických účinků a o kvalitativně rozdílných vlivech jednot-

livých sloučenin těžkých kovů a metaloidů na živé organismy vedly ke snahám o analytické rozlišení (speciaci) různých forem vazby prvků ve vzorcích z životního prostředí a v biologických materiálech. Již v šedesátých letech byly vyvinuty postupy pro stanovení vysoce toxické methylrtuti^{7–9} ve vzorcích ryb, vajec, masa, jater a tělních tekutin plynovou chromatografií. Jiný způsob diferenciaci mezi organickými a anorganickými formami rtuti byl založen na selektivní redukci sloučenin rtuti¹⁰ při stanovení rtuti technikou studených par AAS. Tyto postupy lze tedy považovat za první metody pro speciaci stopových množství tohoto toxického kovu.

Termín *speciace*¹¹ se v analytické literatuře rozšířil na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let. V současné době je používán ve dvou významech. Zpravidla označuje postup, který má za cíl rozlišení, případně stanovení jednotlivých forem prvku ve studovaném vzorku. Pak je slovo *speciace* synonymní s jednoznačnějším výrazem *speciační analýza*. Speciační analýzu Florence¹² definuje jako stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Druhým významem slova *speciace* může být také forma nebo formy prvku, v nichž se prvek ve vzorku vyskytuje, tedy fyzikálně-chemický stav prvku.

Rozlišované formy prvku mohou být různá chemická individua (např. ionty v různých oxidačních stupních, komplexy, organoprkové a organokovové sloučeniny atd.), případně mohou být definovány vazbou na jednotlivé fáze vzorku, subsystémy, skupiny sloučenin (např. bílkoviny, polysacharidy a pod.) nebo na biologické struktury. Někdy se formy odlišují a definují na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností jako je rozpustnost a extrahovatelnost různými rozpouštědly nebo afinita k chemicky modifikovaným fázím nebo různá reaktivita těchto forem se selektivními činidly. Další možností může být funkční definice, např. podíl prvku využitelný rostlinami, podíl prvku obsaženého v potravíně, který může být resorbován v gastrointestinálním traktu a podobně.

Speciační analýzu prvku lze vymezit jako diferenciaci

* Předneseno na XXX. semináři o metodice stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu (Karlík 3.–5.9.1996). Tato práce vznikla v rámci projektu „Hodnocení stavu životního prostředí: Monitoring cizorodých látek v životním prostředí“, který byl podpořen grantem Ministerstva životního prostředí ČR č. 402548048.

jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejich izolaci, detekci, kvantifikaci, charakterizaci, a případně identifikaci vazebných partnerů prvku (ligandů). V širším slova smyslu může jít i o určení fázové, nadmolekulární a molekulární distribuce prvku. Speciační analýza prvku tedy odpovídá na otázku v jaké formě (formách) je prvek ve vzorku přítomen.

Problematicke speciace stopových prvků je věnována řada monografií^{11,13,14} i přehledných článků¹⁵⁻¹⁶. Publikované přehledy jsou věnovány např. speciaci arsenu¹⁷, selenu^{18,19}, olova²⁰⁻²¹ nebo různých dalších prvků v přírodních vodách²², půdách^{23,24}, potravinách²⁵, biologických materiálech^{26,27} a tělních tekutinách²⁸. Další přehledné práce jsou zaměřeny na aplikaci jednotlivých analytických metod, např. chromatografie^{29,30}, radioanalytických metod³¹ či elektrochemických metod³² pro účely speciační analýzy.

2. Přírodní vody kadmia převažovat již při

Ve vzorcích přírodních vod jsou toxické prvky přítomny v různých formách jednak v kapalně fázi, jednak vázané v suspendovaných tuhých částicích^{1,33,34}. Mezi oběma fázemi se ustavuje rovnováha závislá na chemických vlastnostech vzorku (zejména na pH, koncentraci aniontů, rozpustných plynů a dalších látek). Tyto procesy často vedou u kontaminovaných vod k přechodu iontů těžkých kovů do tuhých částic postupnou precipitací (např. ve formě sulfidů) a adsorpcí, takže o úhrnném zatížení dané části hydrosféry vypovídá spíše koncentrace prvků v sedimentech. Nicméně i přechodně zvýšený obsah toxických stopových prvků v důsledku jednorázového znečištění může vést k poškození či úhynu vodních organismů. Např. pro ryby³⁵ jsou toxické již koncentrace mědi kolem 5 mg.l⁻¹. Toxický účinek je však závislý na zastoupení jednotlivých forem prvku, přičemž u mědi jsou za nejtoxičtější považovány ionty Cu²⁺ a hydroxokomplexy.

Zastoupení jednotlivých forem stopových prvků ve vodách³³ je ovlivňováno následujícími činiteli: mínek se

- rozpustností sloučenin těchto prvků ve vodě, Existence
- oxidačním stupněm prvku,
- přítomností komplexotvorných látek, tvorbou komplexů a iontových párů,
- adsorpčními a desorpčními jevy,
- redoxním potenciálem a hodnotou pH prostředí.

Pro vyhodnocení relativního významu těchto činitelů je třeba vzít v úvahu kinetické a termodynamické faktory,

údaje o chemických rovnováhách, konstantách stability atd. Pokud vzorky vod obsahují jen stopy organických látek, je možné speciaci prvků odhadnout na základě příslušných výpočtů z výše uvedených dat³³. Např. u olova v přírodních vodách se může jednat o tyto anorganické formy: PbCO₃, Pb(CO₃)₂²⁻, PbCl⁺, PbCl₂, PbOH⁺ a Pb(OH)₂. Pouze ve velmi kyselém prostředí s nízkou koncentrací chloridů lze počítat s větším podílem iontů Pb²⁺. Ve sladkých vodách obvykle převažují karbonátové formy. Za přítomnosti organických komplexotvorných látek (např. aminokyselin, fulvokyselin, huminových látek, kyseliny citronové, glyk-olové, nitrilotrioctové a pod.) mohou převažovat stabilní komplexy olova s těmito látkami. V redukčních podmínkách může ve vodách vznikat málo rozpustný sulfid olovnatý, resp. sulfidy ostatních kovů.

V případě kadmia se v kyselém i neutrálním prostředí vyskytují ve vodách hydratované kademnaté ionty. Ty však tvoří dosti snadno chlorokomplexy (CdCl⁺, nedisociovaný CdCl₂, CdCl₃⁻), které začínají mezi rozpustnými formami 0,01-0,03 mol.l⁻¹. Formy CdOH⁺, Cd(OH)₂ a CdCO₃ se vyskytují pouze v alkalickém prostředí.

Pokud jde o formy dvojmocné anorganické rtuti ve vodách, převažují ve slabě kyselém prostředí chlorokomplexy (HgCl⁺, nedisociovaný HgCl₂, a HgCl₃⁻) a to již při nízkých analytických koncentracích chloridových iontů. V mořské vodě je dokonce hlavní anorganickou formou HgCl₄²⁻. Ionty Hg²⁺ však již při pH = 2 – 6 hydrolyzují na HgOH⁺ a Hg(OH)₂. V alkalickém prostředí je dominantní formou Hg(OH)₂, v neutrálních vodách se střední salinitou pak HgOHCl. Sulfid rtuťnatý a sloučeniny jednomocné rtuti, které mohou vznikat za redukčních podmínek, jsou málo rozpustné ve vodě, takže je lze očekávat spíše ve vodních sedimentech. Hlavními organickými formami rtuti ve vodách jsou CH₃HgOH ve sladkých vodách a CH₃HgCl v mořské vodě. Tyto sloučeniny vznikají meřhylačím účinkem vodních mikroorganismů³³⁻³⁵.

Arsen³³ se v životním prostředí může vyskytovat v oxidačních stupních -III, 0, III a V. Za mírných redukčních podmínek arsen vyskytuje v trojmocné formě jako arsenitan. V oxidacích stavech 0 a -III je ve vodách nepravděpodobná. Vyžaduje totiž silné redukční prostředí. Ve vodách obvykle převažuje As(V) jako HAsO₄²⁻. V pětimocné formě může arsen snadno precipitovat jako arseničnan železitý, chromitý nebo barnatý. As(III) se ve formě arsenitanu vyskytuje ve vodách hlavně v blízkosti hladiny. Ve větších hloubkách jezer nebo moří může za anaerobních podmínek vznikat málo rozpustný As₂S₃. Jako produkty

metabolické činnosti vodních organismů vznikají z anorganických sloučenin arsenu methylované formy, jako jsou dimethylarsinová kyselina ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$) (zkratka DMA), methylarsonová kyselina $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (zkratka MA) a arsenová analoga kvarterních amoniových sloučenin arsenobetain ($(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ (zkratka AB) a arsenocholin ($(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (zkratka AC). Toxicita sloučenin arsenu klesá v řadě $\text{As}^3\text{O}_3^- > \text{AsO}_4^{3-} > \text{MA} > \text{DMA} > \text{AB}$.

Diferenciace mezi jednotlivými formami stopových prvků ve vodách (speciační analýza) využívá řady principů. Prvním je rozlišení rozpustného podílu a podílu vázaného na tuhé částice jednoduchou filtrací¹⁶ filtrem o velikosti pórů 0,45 μm . Speciace prvků ve filtrátu vzorku je pak založena buď

1. na přímém použití látkově specifické analytické metody, kdy jen určité formy stanovovaného prvku poskytují analytický signál v závislosti na podmínkách, nebo
2. na kombinaci vhodné separační metody s citlivou prvkově specifickou detekční metodou (AAS, AES, ICP-MS). v kapalně fázi, tj. např.

Příkladem prvního postupu je použití anodické rozpouštěcí voltametrie (ASV) pro stanovení ASV - labilní frakce kovů (Cu, Pb, Cd, Zn), kterou se aproximuje podíl toxických forem³⁶. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu je nemožnost exaktního vyjádření výsledku speciace jako zastoupení chemických individuů.

Druhý přístup předpokládá dělení^{13,29,30} jednotlivých prvkových forem a jejich následné stanovení. Jako dělicí metody se uplatňují zejména:

- extrakce organickými rozpouštědly (oddělení nepolárních organokovových sloučenin), případně chelatace analytu s následnou extrakcí,
- sorpce na iontoměničích včetně chelatačních iontoměničů se zabudovanými skupinami iminodioxetové kyseliny nebo s thiolovými skupinami (zachycení volných iontů a labilních komplexů s afinitou k ionexu),
- převedení na těkavé sloučeniny, jejich zachycení a postupné uvolňování,
- plynová chromatografie těkavých forem, případně původně netěkavých forem po jejich derivatizaci,
- kapalinová chromatografie,
- elektromigrační metody.

Separční zařízení může být spojeno s prvkově specifickým měřicím přístrojem on-line, takže je možné získat kontinuální záznam měření, například chromatogram nebo elektroforegram jednotlivých forem daného prvku.

Některé příklady speciačních postupů pro vzorky vod uvádí tabulka I.

3. Sedimenty a půdy

Obsah toxických prvků v sedimentech vodních toků a nádrží odráží celkovou kontaminaci dané lokality lépe, než okamžitá koncentrace těchto prvků ve vodě³³. Proto je rozbor těchto vzorků častým analytickým úkolem. Ke kontaminaci půd^{1,3,33} přispívá atmosferická depozice tuhých částic i používání agrochemikálií.

Vodní sedimenty i půda představují heterogenní polyfázový systém obsahující anorganickou i organickou hmotu, a to živou i neživou, v koloidním stavu i ve stavu drobných částic, vodu a různé plyny v proměnlivých proporcích. Mezi jednotlivými složkami se ustavuje rovnováha. Hlavními minerálními složkami půd³³ jsou písky, silt a jíly. Organická hmota v horním půdním horizontu tvoří asi 2-5 %.

Pro odhad mobility těžkých kovů v životním prostředí je u půd a sedimentů důležité vyhodnocení jejich obsahu v půdním roztoku resp. určení jejich vyluhovatelnosti ze vzorku působením různých extrakčních činidel. Extrakční pokusy mohou simulovat vymývání toxických prvků z půd nebo sedimentu, ke kterému dochází v přírodním prostředí, případně mohou poskytnout informace o podílu prvků přístupného rostlinám absorpcí kořenovým systémem.

Speciační analýza toxických i esenciálních prvků v těchto materiálech využívá hlavně extrakčních postupů. Nejobjektivnější informaci o rozpustném podílu prvku v původním stavu vzorku lze nejlépe získat izolací půdního roztoku bez použití extrakčního činidla pouhou centrifugací a filtrací⁵⁷; tento způsob izolace však bývá pro malý obsah půdní vody dosti obtížný. Půdní roztok pak může být použit ke stanovení celkového rozpustného podílu prvku a k podrobnější speciaci⁵⁸ rozpustných forem s využitím prakticky všech metod uvedených v kapitole 2.

Extrakce půd nebo sedimentů různými činidly a následné stanovení příslušných prvků v připravených extraktech vhodnými instrumentálními metodami (AAS, ICP-AES, ICP-MS a pod.) umožňuje odhadnout rozpustný podíl a podíly vázané na různé složky půdy nebo sedimentu.

Používaná extrakční činidla jsou buď roztoky neutrálních solí (CaCl_2 nebo MgCl_2), acátové či oxalátové tlumivé roztoky, roztoky chelatačních činidel (EDTA nebo DTPA), redukčních činidel ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), silné kyseliny a oxidační činidla (HCl , HNO_3 , HClO_4 , HF , H_2O_2) nebo roztoky alkálií (NaOH , Na_2CO_3). Ve speciačních schématech lze použít buď sekvenční extrakce řadou extrakčních čini-

Tabulka 1

Speciace stopových prvků v přírodních vodách

Prvek	Úprava vzorku a separační technika	Stanovené formy prvků	Metoda stanovení prvku	Lit.
Cd, Pb, Cu, Zn	filtrace; sorpce na Chelexu 100, eluce 2 mol.l ⁻¹ HNO ₃	volné ionty, labilní formy za podmínek metody	DPASV	37
Cd, Pb, Cu	filtrace, úprava pH, UV fotolýza za přít. H ₂ O ₂	ASV labilní frakce a celkový rozpustný podíl	ASV	38
Cu	sorpce na sloupci katexu AG 50W-X12 a Chelexu 100, eluce 2 mol.l ⁻¹ HNO ₃	Cu ²⁺ a labilní komplexy	AAS	39
Cd, Cu, Zn	sekvence sorpce: 1. na Chelexu 100, 2. na anexu AG MP-1	3 frakce podle afinity k ionexům	AAS	40
Cr	chelatační extrakce Cr(III) s 8-chinololem do MIBK	Cr(III) a celkový Cr	GF AAS, meze detekce 12 ng.l ⁻¹ Cr ³⁺ , 39 ng.l ⁻¹ Cr	41
Cr	mořská voda bez úpravy, resp. s UV fotolýzou	Cr(VI), celkový Cr	katalytická katodická rozpouštěcí voltametrie	42, 43
Pb	chelatační extrakce s diethyldithiokarbamatem do hexanu, reextrakce zředěnou HNO ₃ , odstranění Pb ²⁺ koprecipitací s BaSO ₄	R ₃ PbX	DPASV, mez detekce 0,5 ng.l ⁻¹	44
Pb	chelatační extrakce s diethyldithiokarbamatem, alkylace s BuMgBr, dělení tetraalkylderivátů metodou GC	Me ₂ PbX ₂ , Me ₃ PbX Et ₂ PbX ₂ , Et ₃ PbX	detekce QFAAS	45
Pb	chelatační extrakce s diethyldithiokarbamatem, alkylace s PrMgBr, dělení derivátů metodou GC	organokovové sloučeniny	detekce AES, mez detekce 1 ng.l ⁻¹	46, 47

Pokračování tabulky I

Prvek	Úprava vzorku a separační technika	Stanovené formy prvků	Metoda stanovení prvku	Lit.
Sn	chelatační extrakce s diethyldithiokarbamatem, alkylace s AmMgBr, dělení derivátů metodou GC převedení na příslušné hydridy redukci s NaBH ₄ ; alkyl-cín-hydridy se zachytí vymražením v chromatog. koloně a po vyhřátí se dělí metodou GC	Me _n Sn _{4-n} Bu _n Sn _{4-n} anorganické formy Sn a Bu ₃ SnX	QF AAS, mez detekce 2–25 ng.l ⁻¹ QF AAS	48, 49 50
Sn	dělení metodou RP-HPLC, on-line fotolytický rozklad eluátu, převedení na SnH ₄ okyselení, redukce analytů na hydridy s NaBH ₄ , zachycení hydridů vymražením v trubici s chromatog. materiálem, sekvenční volatilizace podle teploty varu dělení HPLC (mobilní fáze: 0,04 mol.l ⁻¹ Cys, 0,1 mol.l ⁻¹ HOAc), poklonové převedení na elementární Hg chromatografie na měnič kationtů	organocinické sloučeniny Me _n SnX _{4-n} Bu _n SnX _{4-n} MeHg ⁺ , EtHg ⁺	AAS QF AAS CVAAS v průtokovém uspořádání	51 52 53
As	redukce s NaBH ₄ na arsiny, zachycení v plině U trubici chlazené kapalným dusíkem, postupné zplynění filtrace, přímé stanovení Se(IV) ve filtrátu, celkový Se po redukcí Se(VI) na Se(IV) kyselinou chlorovodíkovou	As(III), As(V), MA, DMA, AC anorg. formy As, MA, ethylarsonová kyselina celkový Se, celkový rozpustný Se, Se(IV) a Se(VI)	GFAAS QF AAS DPP a DPCSV mez detekce 10 µg.l ⁻¹ resp. 0,04 µg.l ⁻¹	54 55 56

Tabulka II

Sekvenční extrakce stopových prvků ze vzorků půd a sedimentů podle Tessiera⁶⁰

Krok	Izolovaná frakce	Extrakční činidlo
1	Iontově výměnný podíl	1 mol.l ⁻¹ MgCl ₂ , pH = 7
2	Podíl vázaný na uhlíčitany	1 mol.l ⁻¹ NaOAc + HOAc, pH = 5
3	Podíl vázaný na oxidy Mn a Fe	0,04 mol.l ⁻¹ NH ₂ OH.HCl v 25 % HOAc
4	Podíl vázaný na organické látky a sulfidy	30 % H ₂ O ₂ + HNO ₃ , pH = 2 / NH ₄ OAc
5	Zbytkový podíl (vázaný v silikátové matici)	rozklad HF + HClO ₄ (2 : 1)

del o rostoucí účinnosti, která rozpouští postupně jednotlivé děnými roztoky elektrolytů a komplexotvorných látek. frakce, nebo paralelní extrakce původního vzorku jednotlivými činidly⁵⁹. Nejčastěji používaný postup sekvenční extrakce půd a sedimentů podle Tessiera⁶⁰ umožňuje rozlišení pěti frakcí. Postup extrakce je zřejmý z tabulky II.

S použitím Tessierova⁶⁰ postupu nebo mírně modifikovaného postupu⁶¹ byla získána data^{61,62} o distribuci řady prvků. Kromě Tessierova postupu existuje i řada jiných podobných procedur, které rozlišují přibližně stejné kategorie vazeb kovů v půdách a sedimentech. Některé z nich⁶³⁻⁶⁶ umožňují podrobnější rozlišení, např. vazby na amorfni a krystalické oxidy železa, na oxidy manganu, vazby na rozpustné a nerozpustné organické látky. Jednotlivé postupy jsou kriticky zhodnoceny v Hirnerově práci⁶⁷.

Odhad podílu stopových prvků v půdě, který je využitelný kořenovým systémem rostlin, se provádí stanovením v extraktech půd, které byly připraveny za mírných chemických podmínek. Zpravidla jde o extrakci vodou nebo zředěnými⁶⁸ roztoky elektrolytů jako je 0,1 mol.l⁻¹ CaCl₂. Někdy se používají i účinnější extrakční činidla jako roztoky komplexonů (zejména DTPA a EDTA). Jejich použití simuluje chování kořenů rostlin³, které vylučují do svého nejbližšího okolí v půdě některé látky s komplexotvornými a rozpouštěcími účinky (zřejmě organické kyseliny) a ty pak rozpouští i některé formy prvku, které nejsou primárně přítomny v půdním roztoku.

Jiný navržený roztok⁶⁹ pro extrakci využitelného podílu zinku, železa, manganu a mědi je 0,005 mol.l⁻¹ DTPA + 0,1 mol.l⁻¹ triethanolamin + 0,01 mol.l⁻¹ CaCl₂, (pH = 7,3). Podle údajů v literatuře⁷⁰⁻⁷² se zdá, že roztok CaCl₂ je vhodný pro určování využitelného podílu zinku a kadmia, nikoliv však olova a mědi.

V půdách, které byly kontaminovány odpadními materiály, např. čistírenskými kaly⁶⁴, bývají toxické prvky na tuhou matici vzorku vázány méně pevně, takže jsou snadněji solubilizovány již při extrakci vodou nebo velmi zře-

Speciace stopových prvků v půdním roztoku ve smyslu charakterizace případně kvantifikace originálních vazebných forem prvků musí vycházet z fyzikální separace půdního roztoku ze vzorku, např. centrifugací. Použití extrakčních činidel totiž představuje změnou pH a iontové síly drastický zásah do chemických rovnováh v půdním roztoku. V těchto případech se využívají elektroanalytické metody⁷³, zejména voltametrie v průtokovém uspořádání, po případě i v kombinaci s membránovou separací⁷⁴. Další možností je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie jako metody pro separaci prvkových forem v půdním roztoku ve spojení s vhodným detekčním systémem. Např. kombinace HPLC s GF AAS^{57,75} byla použita pro stanovení vazebných forem mědi v půdních roztocích. Gelová chromatografie s chemickým reakčním detektorem⁷⁶ umožnila detekci labilních forem zinku, hliníku a železa, ale i ligandů těchto prvků podle obsahu funkčních skupin (aminoskupin, sulfhydrylových skupin, hydroxylových skupin) v jejich molekulách.

Při stanovení organokovových a organoprvkových složenin v půdách a sedimentech je hlavním problémem izolace analytů ze vzorku. Pro alkylsloučeniny olova⁷⁷ se využívá např. extrakce ze suspenze vzorku ve fosfátovém pufru do směsi hexan-benzen za přítomnosti dithizonu, reextrakce 0,15 mol.l⁻¹ roztokem HNO₃ a opětné převedení do organické fáze extrakcí roztokem APDC v hexanu. Alikvotní podíl zahuštěného organického extraktu je pak analyzován metodou HPLC s obrácenými fázemi s detekcí AAS v křemenné kyvetě. K dělení tetraalkylderivatů olova byla použita i plynová chromatografie ve spojení s GF AAS⁷⁸. Pro izolaci organocínicitých sloučenin ze sedimentů lze využít extrakci kyselinou octovou a jejich převedení na těkavé hydridy cínu, které jsou pak analyzovány plynovou chromatografií s AAS detekcí⁷⁹.

Jednotlivé formy arsenu (tj. anorganický trojmocný

a pětimočný arsen a dále MA a DMA) lze z půd extrahovat roztokem amoniaku. Po přečištění extraktu sloupcovou chromatografií se analyty dělí metodou HPLC s detekcí GF AAS⁸⁰. Výťažnost postupu se pro jednotlivé sloučeniny arsenu dosti liší a je závislá i na druhu půdy⁸¹. Pro stanovení methylrtuti jako hlavní organokovové formy rtuti v půdách se používají stále modifikace⁸² původní metody plynové chromatografie^{8,9}.

4. Biologické materiály

Speciace stopových prvků v biologických materiálech^{26,27} je mimořádně obtížná. Je to dáno zejména velkou různorodostí vazebných forem stopových prvků v biologických materiálech, malou stabilitou těchto forem i samotných bioligandů stopových prvků a skutečností, že je nutné detegovat až ultrastopová množství příslušného prvku v připravené frakci.

Stopové prvky v biologických maticích interagují s přítomnými biomolekulami⁸³ i ostatními složkami biologického materiálu. Mohou se vyskytovat např. v následujících formách:

- Elementární forma
- Volné nebo hydratované ionty kovů a nekovů v různých oxidačních stupních
- Komplexní sloučeniny kovů s anorganickými ligandy nebo s organickými ligandy o různé molekulové hmotnosti jako jsou např. aminokyseliny, peptidy a bílkoviny, cukry a polysacharidy, polární lipidy, hydroxykarboxylové kyseliny, kyselina fytová (tj. 1,2,3,4,5,6-cyklohexanhexaox-hexakis(dihydrogenfosfát)), rostlinné fenolové látky, třísloviny a flavonoidy, porfyriny a korinoidy aj.
- Málo rozpustné sloučeniny (sulfidy, sírany, fosforečnany, šťavelany, hydroxidy, fyty)
- Organokovové sloučeniny
- Kovalentní sloučeniny nekovových a polokovových prvků (např. selenová analoga sírných aminokyselin, arsenová analoga kvarterních amoniových sloučenin apod.)
- Kovové ionty nebo komplexy vázané na povrchu nerozpustných biopolymerů.

Při speciální analýze většiny biologických materiálů je třeba počítat s tím, že stopové prvky i majoritní složky jsou ve vzorku distribuovány nerovnoměrně a navíc jsou obsaženy v různých nadmolekulárních strukturách, buněčných stěnách či buněčných kompartmentech. Proto se k separaci

jednotlivých podílů vzorku (např. jednotlivých buněčných organel z tkáňového homogenátu) používá zejména diferenciální centrifugace⁸⁴. Způsob izolace a frakcionace analytů se musí volit s ohledem na možné změny distribuce stopových prvků mezi jednotlivé fáze nebo chemicky definované frakce účinkem chemických a fyzikálních činitelů při izolaci a frakcionaci. Je tedy třeba uvažovat o důsledcích možné denaturace biopolymerů, parciální hydrolyzy určitých složek nebo chemických změn způsobených vlastními enzymy vzorku, které po rozrušení buněčných kompartmentů přicházejí do styku s reaktivními substráty.

Speciální postupy se při analýze biologických materiálů²⁶ navzájem dosti liší podle stanovovaného prvku i podle charakteru vzorku. Jiný přístup je třeba volit při analýze rostlinných materiálů, jiný u živočišných tkání, mikrobiální biomasy, jiný u tělních tekutin a podobně.

U řady biologických materiálů (rostlinné materiály, potraviny) je frakcionace²⁵⁻²⁷ vzorku založena na sekvenci nebo paralelní extrakci vodou, vodnými roztoky elektrolytů (izolace bílkovin) a organickými rozpouštědly (izolace lipidového podílu vzorku a oddělení organokovových sloučenin). Další frakcionace vodného extraktu spočívá např. v precipitaci bílkovin⁸⁵ změnou pH, nebo v chromatografickém dělení; využívá se zejména principů gelové a iontoměničové chromatografie^{26,27,29}. Ke stanovení sledovaných prvků v připravených frakcích se používají zejména citlivé spektrometrické metody (GF AAS, ICP-AES a ICP-MS).

Pokud jde o speciaci toxických stopových prvků v rostlinných materiálech, zaměřovala se dosud zejména na studium forem kadmia, případně mědi a zinku v rostlinách hydroponicky pěstovaných v médiu s vyšším obsahem kovových iontů⁸⁶⁻⁸⁸ nebo v rostlinách pěstovaných v kontaminované půdě^{89,90}. Pozornost byla věnována také speciaci thalia a kadmia⁹¹ v řepce (*Brassica napus*) a speciaci zinku a kadmia v některých významných druzích zeleniny⁹² při normálních hladinách těchto prvků.

Z živočišných materiálů byla věnována velká pozornost tkáním mořských živočichů - ryb, paryb, ale i měkkýšů a koryšů. Řada těchto živočichů totiž akumuluje⁹³ ve svých tělech značná množství rtuti, arsenu⁹⁴, v některých případech i kadmia, zinku a selenu. Lovené ryby a ostatní mořské požívatiny v některých zemích přispívají rozhodující měrou k dietární dávce rtuti a arsenu⁹⁵. Speciální studie arsenu v tkáni žraloků⁹⁶ prokázala jako hlavní sloučeninu arsenu arsenobetain. Metodou FAB-MS byla potvrzena přítomnost této látky i u tresky, platýše, makrely a hřebenatek⁹⁷. U garnáty je hlavní formou arsenocholin⁹⁷. U sladkovodních ryb⁹⁷ tyto sloučeniny prokázány nebyly.

Pro speciaci arsenu se často používá kombinace kapalinové chromatografie s ICP-MS^{96,98,99} nebo selektivní redukce jednotlivých sloučenin arsenu a stanovení hydridovou technikou AAS¹⁰⁰.

Speciace rtuti v rybách, ale i v jiných biologických materiálech, spočívá zejména ve stanovení methylrtuti plynovou chromatografií^{8,9}. Izolace methylrtuti ze vzorku je založena na extrakci z prostředí zředěné kyseliny chlorovodíkové do benzenu nebo toluenu a následné reextrakci neutrálním vodným roztokem cysteinu. Po opětovném oxy-selení se analyt znovu extrahuje do benzenu a následuje stanovení plynovou chromatografií s použitím detektoru elektronového záchytu.

Jiný přístup spočívající v kombinaci gelové chromatografie s voltametří a AAS byl použit při speciaci kadmia, zinku, mědi a stříbra^{101,102} v tkáních humra a slávky.

Z ostatních živočišných materiálů byla při speciálních studiích věnována pozornost zejména ledvinové a jaterní tkáni různých hospodářských zvířat. Zde se totiž těžké kovy výrazně akumulují^{3,103} a jsou fixovány ve specifických vazebných polypeptidech tzv. metalothioneinech¹⁰⁴. Ke speciaci se používá zejména spojení gelové chromatografie s technikou ICP-MS^{105,106}.

Specifickou kategorií speciální analýzy představuje studium vazebných forem stopových prvků v tělních tekutinách a tekutých tkáních^{28,107}. Získávané výsledky přispívají k podrobnějšímu poznání mechanismů resorpce, transportu a metabolismu stopových prvků v těle experimentálních zvířat nebo člověka. Práce tohoto druhu se zaměřují především na vazbu hliníku¹⁰⁸, chromu¹⁰⁷, arsenu¹⁰⁷, olova, mědi a zinku¹⁰⁹ na plasmatické bílkoviny a jiné složky krve.

S e z n a m p o u ž í t ý c h z k r a t e k a s y m b o l ů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AB	arsenobetain
AC	arsenocholin
AES	atomová emisní spektrometrie
Am	amyl
APDC	pyrrolidindithiokarbamat amonný
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie
CV AAS	technika studených par atomové absorpční spektrometrie
Cys	cystein
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
DMA	dimethylarsinová kyselina

DPAS	V diferenční pulsní anodická rozpouštěcí voltametrie
DPCSV	diferenční pulsní katodická rozpouštěcí voltametrie
DPP	diferenční pulsní polarografie
DTPA	dithylentriaminpentaoctová kyselina
FAB-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací rychlými atomy (fast atom bombardment mass spectrometry)
GF AAS	atomová absorpční spektrometrie s atomizací v grafitové kyvetě
HOAc	octová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
MA	methylarsonová kyselina
MIBK	methylisobutylketon
QF AAS	atomová absorpční spektrometrie s atomizací v křemenné kyvetě

LITERATURA

- Merian E.: *Metals and Their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
- Bencko V., Cikrt M., Lener J.: *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Grada Publishing, Praha 1995.
- Cibulka J.: *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. Academia, Praha 1991.
- Alfassi Z. B.: *Determination of Trace Elements*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994.
- Goyer R. A., Mehlman M. A.: *Toxicology of Trace Elements*. J. Wiley, New York 1977.
- Mertz W.: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, New York 1987.
- Westö G.: Acta Chem. Scand. 20, 2131 (1966).
- Westö G.: Acta Chem. Scand. 21, 1970 (1967).
- Westö G.: Acta Chem. Scand. 22, 2277 (1966).
- Magos L.: Analyst 96, 847 (1971).
- Bernhard M., Brinckman F. E., Sadler P. J.: *The Importance of Chemical „Speciation“ in Environmental Processes*. Springer, Berlin 1986.
- Florence T. ML: Talanta 29, 354 (1982).
- Harrison R. M., Rapsomanikis S.: *Environmental*

- Analysis Using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*. Ellis Horwood, Chichester 1989.
14. Batley G. E.: *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. CRC Press, Boca Raton 1989.
 15. Van Loon J. C., Barefoot R. R.: *Analyst* 117, 563 (1992).
 16. Lund W.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 337, 557 (1990).
 17. Morita M., Edmonds J. S.: *Pure Appl. Chem.* 64, 575 (1992).
 18. Dauchy X., Potin-Gautier M., Astruc A., Astruc M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 792 (1994).
 19. Munoz Olivas R., Donard O. F. X., Cámara C., Quevauviller P.: *Anal. Chim. Acta* 286, 357 (1994).
 20. Baxter D. C., Frech W.: *Pure Appl. Chem.* 67, 615 (1995).
 21. Pyrzyska K.: *Mikrochim. Acta* 722, 279 (1996).
 22. Salbu B.: *Mikrochim. Acta* 1991, II, 29.
 23. Ure A. M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 337, 577 (1990).
 24. Ure A. M.: *Mikrochim. Acta* 1991, II, 49.
 25. Schwedt G.: *Trends Anal. Chem.* 2, 39 (1983).
 26. Behne D.: *Analyst* 117, 555 (1992).
 27. Gardiner P. H. E., Delves H. T., v knize: *Trace Element Analysis in Biological Specimens*. (Herber R. F. M., Stoeppler M., ed.). Elsevier, Amsterdam 1994.
 28. Das A. K., Chakraborty R., Cervera M. L., de la Guardia M.: *Mikrochim. Acta* 122, 209 (1996).
 29. Chau Y. K.: *Analyst* 117, 571 (1992).
 30. Lobiński R.: *Analisis* 22, 37 (1994).
 31. Cornelis R.: *Analyst* 117, 583 (1992).
 32. Florence T. M.: *Analyst* 111, 489 (1986).
 33. Fergusson J. E.: *The Heavy Elements. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Pergamon Press, Oxford 1990.
 34. Pitter P.: *Hydrochemie*. SNTL Praha 1990.
 35. Lloyd R.: *Pollution and Freshwater Fish*. Blackwell Scientific Ltd., Oxford 1992.
 36. Florence T. M.: *Analyst* 117, 551 (1992).
 37. Martinotti W., Queirazza G., Realini F., Ciceri G.: *Anal. Chim. Acta* 261, 323 (1992).
 38. Iyer V. N., Rao K. S. M., Sarin R.: *Indian J. Environ. Prot.* 9, 104 (1989).
 39. Miwa T., Murakami M., Mizuike A.: *Anal. Chim. Acta* 219, 1 (1989).
 40. Liu Y., Ingle J. D. Jr.: *Anal. Chem.* 61, 525 (1989).
 41. Beceiro-Gonzales E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 649 (1993).
 42. Boussemart M., Van den Berg C. M. G., Ghaddaf M.: *Anal. Chim. Acta* 262, 103 (1992).
 43. Boussemart M., Van den Berg C. M. G.: *Anal. Proc.* 28, 68 (1991). *Assessing Bioavailable Metals in Sludges and Soil*.
 44. Mikac N., Branica M.: *Anal. Chim. Acta* 264, 249 (1992).
 45. Chakraborti D., Dirkx W., Van Cleuvenbergen R., Adams F.: *Sci. Total Environ.* 84, 249 (1989).
 46. Lobiński R., Adams F. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 7, 987 (1992).
 47. Lobiński R., Adams F. C.: *Anal. Chim. Acta* 262, 285 (1992).
 48. Dirkx W. M. R., Adams F. C.: *Mikrochim. Acta* 109, 79 (1992).
 49. Dirkx W., Van Mol W. E., Van Cleuvenbergen R. J. A., Adams F. C.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 335, 769 (1989).
 50. Ritsema R.: *Mikrochim. Acta* 109, 61 (1992).
 51. Ebdon L., Hill S. J., Jones P.: *Talanta* 38, 607 (1991).
 52. Chamzas M., Khasawneh I. M., Winefordner J. D.: *Talanta* 35, 519 (1988).
 53. Munaf E., Haraguchi H., Ishii D., Takeuchi T., Goto M.: *Anal. Chim. Acta* 235, 399 (1990).
 54. Sturgeon R. E., Siu K. W. M., Willie S. N., Berman S. S.: *Analyst* 114, 1393 (1989).
 55. Van Cleuvenbergen R. J. A., Van Mol W. E., Adams F. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 3, 169 (1988).
 56. Campanella L., Ferri T., Morabito R., Paoletti A. M.: *Chim. Ind.* 69, 90 (1987).
 57. Morrisson A. R., Park J. S., Sharp B. L.: *Analyst* 115, 1429 (1990).
 58. Verloo M., Eeckhout M.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 39, 179 (1990).
 59. Calvet R., Bourgeois S., Msaky J. J.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 39, 31 (1990).
 60. Tessier A., Cambell P. G. C., Bisson M.: *Anal. Chem.* 51, 844 (1979).
 61. Rauret G., Rubio R., Lopez-Sanchez J. F., Casassas E.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 35, 89 (1989).
 62. Spěváčková V., Kučera J.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 35, 241 (1989).
 63. Kersten M., Foerstner U.: *Wat. Sci. Technol.* 18, 121 (1986).
 64. Spozito G., Lund L. J., Chang A. C.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 260 (1982).
 65. Shuman L. M., Hargrove W. L.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 1117 (1985).
 66. Zeien H., Bruemmer G. W.: *Mitt. Dt. Bodenkundl. Ges.* 59, 505 (1989).
 67. Hirner A. V.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 46, 77 (1992).
 68. Delschen T., Werner W.: *Landwirtsch. Forsch.* 42, 40 (1989).
 69. Lindsay W. L., Norwell W. A.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421, (1978).
 70. Sauerbeck D. R., Styperek P.: *Chemical Methods for* Elsevier, Amsterdam 1985.

71. Koester W., Merkel D.: *Landwirtsch. Forsch. Sonderh.* 39, 245 (1982).
72. Száková J., Tlustoš P., Balík J., Příbyl A.: *Sborník přednášek z XXVIII. semináře o metodice stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu*. Karlík, 16.–17. 5. 1994, str. 76.
73. Edmonds T. E.: *Anal. Proc.* 21, 366 (1984).
74. Berggren D.: *Int J. Environ. Anal. Chem.* 41, 133, (1990).
75. Brown L., Haswell S. J., Rhead M. M., O'Neil P., Bancroft K. C. C.: *Analyst* 108, 1511 (1983).
76. Dunemann L., Schwedt G.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 317, 394 (1984).
77. Blais J. S., Marshall W. D.: *J. Anal. At. Spectrom.* 4, 271 (1989).
78. Cruz R. B., Lorouso C., George S., Thomassen Y., Kinrade J. P., Butler L. R. P., Lye J., Van Loon J. C.: *Spectrochim. Acta* 35B, 775 (1980).
79. Martin F. M., Tseng Ch. M., Belin C., Quevauviller P., Donard O. F. X.: *Anal. Chim. Acta* 286, 343 (1994).
80. Iadevaia R., Aharonson N., Woolson E. A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 742 (1980).
81. Mohan M. S., Zingaro R. A., Micks P., Clark P. J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 11, 175 (1982).
82. Analytical Methods Committee: *Analyst* 102, 769 (1977).
83. Eichhorn G. L.: *Inorganic Biochemistry*, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam 1973.
84. Miko M., v knize: *Biochemické laboratorné metódy* (Ferenčík M., Škárka B., ed.), str. 724. Alfa, Bratislava 1981.
85. Yasumoto K., Suzuki T., Yoshida M.: *J. Agric. Food Chem.* 36, 463 (1987).
86. Cataldo D. A., Garland T. R., Wildung R. E., Drucker H.: *Plant Physiol.* 62, 566 (1978).
87. Casterline J. L., Barnett N. M.: *Plant Physiol.* 69, 1004 (1982).
88. Khan A., Weaver C. M., Sather S.: *J. Food Sci.* 55, 263 (1990).
89. Yoshida S.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 2273 (1986).
90. Yoshida S., Tanaka R., Kashimoto T.: *J. Food Hyg. Soc. Japan* 27, 64 (1986).
91. Günther K., Umland F.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 331, 302 (1988).
92. Günther K., Waldner H.: *Anal. Chim. Acta* 259, 165 (1992).
93. Gutenmann W. H., Bache C. A., McCahan J. B., Lisk D. J.: *Nutr. Rep. Int.* 38, 1157 (1988).
94. Irgolic K. J.: *Appl. Organomet. Chem.* 2, 303 (1988).
95. Van Dokkum W., De Vos R. H., Muys Th., Wesstra J. A.: *Brit. J. Nutr.* 61, 7 (1989).
96. Beauchemin D., Bednas M. E., Berman S. S., McLaren J. W., Siu K. W. M., Sturgeon R. E.: *Anal. Chem.* 60, 2209 (1988).
97. Lawrence J. F., Michalik P., Tam G., Conacher H. B. S.: *J. Agric. Food Chem.* 34, 315 (1986).
98. Shum S. C. K., Neddersen R., Houk R. S.: *Analyst* 117, 577 (1992).
99. Demesmay C., Olle M., Porthault M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 205 (1994).
100. Münz H., Lorenzen W.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 319, 395 (1984).
101. Chou C. L., Uthe J. E., Guy R. D.: *J. AOAC Int.* 76, 794 (1993).
102. Luten J. B., Bognet W., Burggraaf M. M., Rus J.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 579 (1986).
103. Vreman K., van der Veen N. G., van der Molen E. J., de Ruig W. G.: *Neth. J. Agric. Sci.* 34, 129 (1986).
104. Kagi J. H. R., Vallee B. L.: *J. Biol. Chem.* 235, 3460 (1960).
105. Crews H. M., Dean J. R., Ebdon L., Massey R. C.: *Analyst* 114, 895 (1989).
106. Owen L. M. W., Crews H. M., Hutton R. C., Walsh A.: *Analyst* 117, 649 (1992).
107. Cornelis R., De Kimpe J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 945 (1994).
108. Keirsse H., Smeyers-Verbeke J., Verbeelen D., Massart D. L.: *Anal. Chim. Acta* 96, 103 (1987).
109. Gercken B., Barnes R. M.: *Anal. Chem.* 63, 283 (1991).

R. Koplík^a, E. Čurdová^b and O. Mestek^b (^a*Department of Food Chemistry and Analysis*, ^b*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Trace Element Speciation in Water, Soils, Sediments and Biological Materials**

The term speciation refers to element occurrence in various chemical forms or species as well as to chemical investigation of these forms including their isolation from the sample, separation, detection, determination, characterization or identification as individual chemical compounds. Individual element species can be defined not only as specific compounds, but also with respect to biological availability of individual species, their physico-chemical properties, binding of elements to sample phases, fractions or structural components etc. The review is focused on analytical problems of speciation of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se, Sn and Zn in environmental and biological matrices. The applicability of diverse analytical approaches, such as hyphenated chromatographic-atomic spectrometric techniques or electrochemical methods, are discussed and illustrated by a number of practical examples.