

MUNI | RECETOX
SCI

2023

E2221 Environmentální analytická chemie – cvičení



Manuál k laboratorním úlohám z analytické chemie anorganických polutantů

Jan Kuta

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX)

Obsah

Analytická instrumentace použitá ve cvičení

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	3
Atomová absorpční spektrometrie (AAS) – analyzátor rtuti.....	5

Vlastní úlohy cvičení

Úloha č. 1: Stanovení esenciálních a toxických prvků ve vlasech.....	6
Teoretický úvod	6
Stanovení obsahu Zn a Cd ve vlasech metodou ICP-MS	7
Úloha č. 2: Stanovení rizikových prvků v půdách.....	11
Teoretický úvod	11
Stanovení vybraných prvků v půdách metodou ICP-MS	12
Úloha č. 3: Stanovení obsahu rtuti ve svalovině ryb.....	17
Teoretický úvod	17
Stanovení obsahu Hg ve svalovině ryb a korýšů různých trofických úrovní	18

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je moderní metoda prvkové analýzy s uplatněním v různých oblastech analytické chemie. V klasickém uspořádání se přístroj skládá ze zmlžovacího systému, iontového zdroje, kónusů, iontové optiky, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Jedinečný je především způsob ionizace analytů, který je pro oblast hmotnostní spektrometrie velmi netypický. Indukčně vázané plazma (ICP) je velmi silný ionizační zdroj, kde dochází k rozrušení všech původních vazeb ve vzorku a tím i ztrátě informací o struktuře sloučenin. Zdrojem iontů v ICP-MS je argonové plazma o teplotě 6000 - 10000 °C, které je udržováno pomocí střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole tzv. indukční vazbou.

Zjednodušeně lze princip stanovení popsat následujícím způsobem. Kapalný vzorek je čerpán peristaltickým čerpadlem ke zmlžovači, který z kapalného vzorku generuje aerosol. Aerosol dále prochází skrz mlžnou komoru, kde dochází k odstranění větších částic (aerosol by měl obsahovat maximum částic s velikostí pod 1 μm). Aerosol následně vstupuje do indukčně vázaného plazmatu (ICP), kde velmi rychle dochází k odpaření vody, atomizaci molekul a ionizaci atomů především do stavu M^+ . Ionty z ICP procházejí přes 2-3 vzorkovací kónusy do vakuové oblasti hmotnostního spektrometru a pomocí iontové optiky jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru. V hmotnostním analyzátoru (obvykle jednoduchý kvadrupól) jsou jednotlivé ionty rozděleny dle poměru hmotnost/náboj (m/z) a detekovány elektronásobičem.

Z hlediska analytických vlastností se ICP-MS vyznačuje především možností stanovení naprosté většiny prvků periodické tabulky, a to včetně i pro atomovou spektrometrii netypických prvků, jako jsou halogeny, sira či fosfor. Další důležitou vlastností je možnost stanovení více prvků vedle sebe v jednom analytickém kroku, který netrvá obvykle déle než několik minut. Spolu s atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací (ETAAS) se jedná o nejcitlivější metodu prvkové analýzy s mezemi detekce v oblasti $\leq \text{ng/L}$. Nicméně existují jistá omezení ohledně množství a složení matrice vzorků, která může významně ovlivnit kvalitu výsledků. V první řadě je to přítomnost nerozpuštěných látek, které mohou blokovat zmlžovač a ovlivňovat tvorbu aerosolu. Významné problémy mohou způsobit také vyšší koncentrace rozpuštěných látek ve vzorku. Matriční prvky společně s plazmovým plynem (Ar) mohou vytvářet tzv. polyatomické ionty, které mohou interferovat se signály analytů (stejně m/z). Tyto

interference se nazývají spektrální. Jako příklad lze uvést iont $^{75}\text{ArCl}^+$, který může navyšovat signál iontu $^{75}\text{As}^+$. Dalším problémem spojeným s vysokými koncentracemi rozpuštěných látek jsou tzv. nespektrální interference. V tomto případě jde o ovlivnění signálu stanovovaných analytů prostřednictvím různých jevů, které však nesouvisí s hmotnostními překryvy iontů. Matrice může ovlivnit míru ionizace analytů v ICP, prostorové rozložení iontů v iontovém paprsku apod. V neposlední řadě může docházet k depozici matrice na vzorkovacích kónusech a iontové optice, což způsobuje přístrojový drift. Z praktického hlediska je vhodné analyzovat roztoky neobsahující žádné nerozpuštěné látky a rozpuštěné látky anorganické povahy do koncentrace 2 g/L.

Měření budou prováděna na přístroji Agilent 7700x ICP-MS (Agilent Technologies). Jde o kvadrupólový hmotnostní spektrometr, jehož součástí je kolizně reakční cela, která se používá k potlačení spektrálních interferencí. Pro účely našeho měření bude použito helium jako kolizní plyn. Polyatomické ionty pocházející z matrice mají větší iontový průměr než jednoduché ionty analytů a tím i vyšší pravděpodobnost srážky s pracovním plynem v kolizní cele. Interferenty srážkami ztrácejí kinetickou energii a při správně nastavené potenciální bariéře na výstupu z cely neprocházejí interferenty dále do hmotnostního spektrometru. Nespektrální interference budou korigovány pomocí porovnávacích prvků. Do kalibračních grafů se pak bude vynášet poměr signálu analytu k signálu porovnávacího prvku. Tento poměr by při dané koncentraci měl ideálně být nezávislý na složení matrice. Nespektrální interference a přístrojový drift ovlivňují tedy v optimálním případě signál analytu a porovnávacího prvku stejnou měrou.

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) – analyzátor rtuti

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je klasickou metodou prvkové analýzy, a to pro oblast stopové analýzy i oblast analýzy majoritních prvků. V klasickém uspořádání se kapalným vzorkem zavádí pomocí zmlžovače do vysokoteplotního plamene (FAAS – flame atomic absorption spectrometry), nebo se dávkuje na elektricky vyhřívanou kyvetu (ETAAS – electro thermal atomic absorption spectrometry). Ohřevem vzorku dochází k odpaření roztoku a rozrušení chemických vazeb za vzniku atomů. Podmínky atomizace jsou voleny tak, aby za daných podmínek bylo co nejvíce analytu ve formě atomů v základním (neexcitovaném) stavu. Přes oblak atomů je následně veden paprsek světla dané vlnové délky, který je částečně absorbován atomy stanovovaného prvku. Hodnota vlnové délky je specifická pro daný prvek a míra absorpce záření je závislá na koncentraci prvku ve vzorku. Intenzita záření se stanovuje pomocí fotonásobiče.

Analyzátoary rtuti jsou jednoúčelové atomové absorpční nebo fluorescenční spektrometry umožňující přímou analýzu pevných a kapalných vzorků bez nutnosti předchozí úpravy či extrakce vzorků. Právě možnost přímé analýzy pevných vzorků je velmi výhodná z důvodu možných ztrát Hg v průběhu rozkladu vzorků sorpcí na stěny nádob či vytěkáním ze vzorků. Spektrometry obvykle využívají techniky generování par rtuti s následným zakoncentrováním analytu pomocí amalgamace, což umožňuje stanovit velmi nízké obsahy Hg ve vzorcích. V neposlední řadě se jedná o velmi produktivní techniky, poněvadž analýza jednoho vzorku trvá obvykle jednotky minut.

Měření budou prováděna na analyzátoru AMA254 českého výrobce Altec s.r.o. Jedná se o termo-oxidační atomový absorpční spektrometr se zakoncentrováním rtuti na zlatém amalgamátoru. Vzorek je zde umístěn na niklovou lodičku a vložen do spalovací pece přístroje. Nejprve dochází k sušení vzorku při 120 °C a poté k postupnému spálení při 850 °C v proudu kyslíku. Veškerá uvolněná atomární Hg ve formě par je dále zachycována na pozlaceném písku (amalgamátoru). Po dokončení rozkladu vzorku je krátkým ohřevem amalgamátoru vypuzena veškerá rtuť do absorpční kyvety, kde je zaznamenána absorbance při vlnové délce 253,7 nm. Přístroj dosahuje meze detekce 0,003 ng s horní hranicí pracovního rozsahu 200 ng Hg. Při navážce 100 mg vzorku tyto hodnoty činní 0,00003 a 2 µg/g. Výhodou je, že přístroj není nutné kalibrovat na každodenní bázi – obvykle se pouze ověřuje platnost kalibrace na standardy.

Úloha č. 1: Stanovení esenciálních a toxických prvků ve vlasech

Teoretický úvod

Lidé a obecně živočichové potřebují ke správné funkci těla kromě kyslíku, vody, bílkovin, vitamínů apod. také dostatečný přísun stopových prvků. Řada esenciálních prvků (např. Fe, Zn, Cu) je klíčovou součástí metaloenzymů nebo jsou spojené s rozhodujícími biologickými funkcemi, jako transport kyslíku nebo hormonální aktivita. Na druhé straně v prostředí existuje mnoho prvků, které nejsou pro lidský organismus esenciální a při určité expozici mohou vykazovat toxické účinky (např. Pb, Cd, Hg, As). Sledováním hladin toxických a esenciálních prvků v populacích ve vztahu k lidskému zdraví se zabývá vědní disciplína zvaná humánní biomonitoring. V rámci humánního biomonitoringu se stanovují v populacích koncentrace tzv. biomarkerů (např. Cd v moči, Zn v krevním séru, Hg ve vlasech). Volba vhodného biomarkeru je vždy odvislá od rychlosti a způsobu metabolismu různých forem (specií) daného prvku (tzv. toxodynamika a toxokinetika). Ideálním biomarkerem by byl obsah prvku v cílovém orgánu. Nicméně to by znamenalo biopsii orgánů, jako jsou játra, ledviny či mozek, což je z etického i praktického hlediska neproveditelné. V praxi se pro posouzení expozice toxickým prvkům či nedostatku esenciálních prvků využívá analýzy vzorků plné krve, krevní plazmy/séra a moči. Dále se studují možnosti využití alternativních biomarkerů/matric. Takovým typem matrice by mohli být vzorky vlasů, které lze snadno a neinvazivně odebrat. Odběr je levný, vzorek snadno uskladnitelný a transportovatelný do laboratoře k analýze. Zajímavá je i možnost analyzovat vzorky po částech a tím rekonstruovat expozici daného jedince v čase zpět (rychlost růstu vlasů je přibližně 1 – 1,25 cm za měsíc). Tyto vlastnosti dělají vlasy atraktivním materiálem pro biomonitoring, nicméně použití vlasů v rutinním biomonitoringu má prozatím své limity a to např. nejasný vztah mezi expozicí a obsahem prvků ve vlasech a neexistence referenčních mezí pro většinu prvků.

Z analytického hlediska se pro analýzu vlasů využívá především metod atomové spektrometrie, a to konkrétně atomové absorpční spektrometrie s atomizací prvků v plameni (FAAS) či elektricky vyhřívané kyvetě (ETAAS), optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Všechny tyto techniky vyžadují převedení vzorků do roztoku (mineralizaci vzorků). Vlasy je tedy potřeba před analýzou rozložit v prostředí silných kyselin a oxidačních činidel. Mineralizace může být dle povahy analytů (těkavost, riziko kontaminace z vnějšího prostředí)

provedena v otevřeném systému (např. v kádince na plotně) či lépe v uzavřeném systému (autoklávy, mikrovlnná rozkladná zařízení).

Stanovení obsahu Zn a Cd ve vlasech metodou ICP-MS

1. Úvod

Pro úlohu byly vybrány 2 prvky, které reprezentují jak esenciální (Zn), tak i toxické prvky (Cd). Vzorek vlasů jako matrice byl vybrán z důvodu snadného odběru, manipulace a také pro svou potenciální neinfekčnost. Pracovat byste měli se svým vzorkem vlasů. Pokud z jakéhokoli důvodu nechcete či nemůžete vzorek poskytnout, poskytně Vám ho vedoucí cvičení.

Vzorek vlasů před vlastním stanovením je třeba zbavit exogenní kontaminace (proplach vzorku) a převést do roztoku. Vzorek se rozkládá v mikrovlnném rozkladném zařízení za použití koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Prvky v roztoku se stanoví hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

2. Chemikálie, pomůcky a přístroje

- Aceton, p.a.
- Demineralizovaná vysoce čistá voda (vodivost 0,054 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- Kyselina dusičná konc., p.a.
- Peroxid vodíku konc., p. a.
- Pracovní kalibrační standardy o koncentraci Zn 100 mg/L a Cd 10 $\mu\text{g}/\text{L}$
- Roztok porovnávacích prvků (Ge, Rh) o koncentraci 1 mg/L
- Odměrné baňky o objemu 25ml
- PE zkumavky o objemu 15 ml
- Nůžky a filtrační papír
- Automatické pipety s nastavitelným objemem v rozsahu 0,01 – 5 ml
- Laboratorní váhy
- Mikrovlnné rozkladné zařízení MARS-6 vč. PFA rozkladných nádobek o objemu 20 ml
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7700x ICP-MS

3. Postup pro odběr a promývání vzorků vlasů

Úzký svazek vlasů se odebere nůžkami z temenní části hlavy, pokud možno co nejbližší kůži. K odstranění exogenní kontaminace a prachu z povrchu vlasů se použije jako promývací medium aceton a demineralizovaná voda v pořadí aceton, demineralizovaná voda, aceton. V každém rozpouštědle se nechají vlasy louhovat 5 minut za občasného promíchání. Následně se nechají vlasy vysušit na filtračním papíře za laboratorní teploty mimo dosah veškerých chemikálií (mimo pracovní plochu v digestoři).

4. Postup pro rozklad vzorků vlasů

Vzorek se mineralizuje v prostředí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku při teplotě 180 °C pomocí mikrovlnného rozkladného zařízení MARS-6 v uzavřených nádobkách z PFA (chemicky rezistentní fluoropolymer). Ohřev vzorku je zabezpečen pomocí mikrovln a teplota v nádobkách je kontrolována infračervenými čidly. Nádobky jsou uzavřeny PTFE inserty a PFA víčky, které umožňují pracovat se vzorky za vysokých tlaků a tím i teplot. Při rozkladu dochází k oxidaci organické hmoty až na oxid uhličitý, případně jiné vodou rozpustné organické sloučeniny. Vysoká teplota urychluje rozklad organické matrice.

Postup pro rozklad vzorků je následující:

- Vzorek umytých a vysušených vlasů vložíme do 20 ml PFA nádobky a zvážíme
- Přidáme 2 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku
- Nádobku uzavřeme PTFE insertem a přišroubujeme PFA víčko. Stejným způsobem připravíme i tzv. slepé pokusy/blanky (nádobky s kyselinou a peroxidem, ale bez vzorku vlasů)
- Sešroubované nádobky umístíme do karuselu mineralizačního zařízení a spustíme mineralizační program
- Po skončení programu nádobky vyjmeme, rozšroubujeme a mineralizát kvantitativně převedeme pomocí deionizované vody do 25 ml odměrných baněk z PE.

5. Stanovení prvků metodou ICP-MS

Měření budou prováděna na přístroji Agilent 7700x ICP-MS. Jde o kvadrupólový hmotnostní spektrometr, jehož součástí je kolizně reakční cela, která slouží k redukci spektrálních

interferencí. Pro účely našeho měření bude použito helium jako kolizní plyn. Nespektrální interference budou korigovány pomocí porovnávacích prvků Ge (pro Zn) a In (pro Cd).

Pracovní postup

Připraví se sada směsných kalibračních roztoků o následujících koncentracích:

- Roztok 1: kalibrační nula (0 $\mu\text{g/L}$ Zn a Cd, pouze roztok zředěné HNO_3)
- Roztok 2: 0,1 mg/L Zn a 0,02 $\mu\text{g/L}$ Cd
- Roztok 3: 0,2 mg/L Zn a 0,05 $\mu\text{g/L}$ Cd
- Roztok 4: 0,4 mg/L Zn a 0,1 $\mu\text{g/L}$ Cd
- Roztok 5: 1 mg/L Zn a 0,2 $\mu\text{g/L}$ Cd

Pro přípravu kalibračních roztoků se použijí zásobní kalibrační standardy o koncentraci Zn 100 mg/L a Cd 10 $\mu\text{g/L}$. Kalibrační roztoky obsahují jako matici zředěnou kyselinu dusičnou o koncentraci 2 ml kyseliny na 25 ml roztoku (tj. stejně jako vzorky). Roztok porovnávacích prvků je již připraven a přimíchává se k roztoku vzorku v průběhu měření pomocí peristaltického čerpadla. Při analýze postupujeme od kalibračního standardu s nejvyšší koncentrací po kalibrační standard s nejnižší koncentrací, následně proměříme slepé pokusy (blanky) společně se vzorky – blanky by v sekvenci měli být rovnoměrně rozprostřeny mezi vzorky.

Vyhodnocení naměřených dat

Kalibrační závislost se sestojí z poměrů signálu analytů a signálu porovnávacího prvku (tzn. poměr signálů (např. Zn/Ge a Cd/Rh) proti koncentraci Zn a Cd v kalibračních roztocích). Tentýž přepočít se provede i pro signály vzorků a slepých pokusů. Přes kalibrační závislost se vypočte koncentrace prvků v roztocích slepých pokusů a vzorků v mg/L resp. $\mu\text{g/L}$. Střední hodnota koncentrace analytů v slepých pokusech (medián) se odečte od koncentrace analytů ve vzorcích. Spočte se mez detekce metody (LOD) jako trojnásobek směrodatné odchylky (SD) koncentrace analytů v slepých pokusech a LOD porovnáme s koncentracemi analytů ve vzorcích po odečtu mediánu slepých vzorků. Pokud jsou koncentrace prvků ve vzorcích vyšší, než je hodnota LOD, přepočteme koncentrace z $\mu\text{g/L}$ resp. mg/L na obsah prvků ve vlasech v jednotkách $\mu\text{g/g}$ resp. mg/g – v úvahu bereme celkový objem roztoku (25 ml) a navážku vzorku v gramech. Najdeme-li ve vzorcích koncentraci nižší, než je hodnota LOD, vyjádříme

výsledek analýzy jako $< "X"$, kde X je číselná hodnota LOD v $\mu\text{g/g}$ resp. mg/g (např. $< 0,6 \mu\text{g/g}$). Přepočítání LOD z $\mu\text{g/L}$ na $\mu\text{g/g}$ je stejný, jako v případě hodnot $> \text{LOD}$, akorát pro výpočet se bere číselná hodnota LOD v $\mu\text{g/L}$ resp. mg/L . Každý vzorek má tedy vlastní hodnoty LOD v závislosti na navážce vzorku. Výsledky zaokrouhlujeme na 3 platné číslice (např. 0,679 namísto 0,6795465231 nebo 563 namísto 563,154895). Hodnota meze detekce (LOD) se vyjadřuje na 1 platné číslo, tj. třeba 0,008 namísto 0,00864594. Čísla se pak zaokrouhlují na první platnou číslici LOD a maximálně na 3 platné číslice. Velmi častou chybou, která se v protokolech opakuje je, že směrnice/úsek lineární regrese je uveden pouze s jednou platnou číslicí. Kalibrační závislost pak vypadá třeba takto $y = 0,0004 + 3\text{E-}07$, přičemž směrnice teoreticky může nabývat hodnot mezi 0,00035 až 0,00044 a výrazně tím dojde k zaokrouhlení výsledku. Je třeba zde přes formát popisku spojnice trendu v grafu přidat další platné číslice (alespoň 3).

6. Vypracování protokolu

Úvodní část protokolu by měla obsahovat základní informace o vlastnostech, toxicitě a esencialitě sloučenin Zn a Cd. Dále byste měli dohledat data/studie (referenční meze, medián, rozptyly atd.) ohledně obsahů těchto prvků ve vlasech populace ideálně Vám věkem a geografickým původem blízké (např. mladí lidé jiného evropského státu) – s těmito čísly, budete naše data porovnávat – alespoň 2 studie pro srovnání.

Protokol by měl dále po výsledkové stránce obsahovat následující informace:

- Tabulky signálů analytů a porovnávacích prvků v kalibračních roztocích, slepých pokusech a vzorcích
- Poměry signálu Zn/Ge a Cd/Rh a vypočtené koncentrace (i pro kalibrační roztoky)
- Parametry lineární regrese ve formě $y = ax + b$, kde parametry a a b budou vypočteny s přesností alespoň na 3 platné číslice
- Vypočtené střední hodnoty (mediány) u slepých pokusů, jejich SD a vypočtené LOD
- Vypočtené hodnoty obsahů prvků ve vlasech

Protokol se odevzdává v elektronické podobě. S protokolem odevzdejte i soubor se zdrojovými daty a výpočty (např. excel), snáze se pak hledají případné chyby. Dále by měl protokol obsahovat navážku vzorku a popis případných odchylek od výše uvedeného postupu. Není třeba kopírovat části manuálu do protokolu metodou ctrl-c → ctrl-v.

Úloha č. 2: Stanovení rizikových prvků v půdách

Teoretický úvod

Jedním ze závažných environmentálních problémů současné doby je kontaminace životního prostředí toxickými látkami. Mezi významnou skupinu toxických látek patří i těžké nebo přesněji, toxické či rizikové kovy. Do jisté míry jsou toxické kovy přirozenou součástí všech složek životního prostředí, poněvadž vznikly se vznikem Země termojadernými reakcemi z lehčích prvků. Jsou z podstaty nedegradabilní, jejich celkové množství v prostředí (v planetárním měřítku) se nemění. Nicméně v důsledku přírodních procesů i lidské činnosti dochází k jejich redistribuci v prostředí, a tedy i akumulaci v zemědělských půdách např. hnojením půd, atmosférickou depozicí či splachy z okolí. Sloučeniny kovů dále mohou podléhat různým reakcím, při kterých dochází k změnám struktury jejich sloučenin, síly vazby na půdní matici, a tedy i dostupnosti a toxicity pro různé organismy. Do skupiny rizikových prvků v zemědělských půdách patří např. arsen, kadmium, kobalt, chrom, měď, rtuť, thalium, molybden, nikl, olovo, zinek a beryllium.

Pro stanovení rizikových prvků v půdách se obvykle používají techniky roztokové analýzy, a to především techniky atomové absorpční spektrometrie (AAS) a spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP). Existují sice metody, pomocí kterých lze stanovit celkový obsah prvků v půdách přímo bez rozkladu vzorku, nicméně analýza roztoků v oblasti stopové analýzy kovů stále převládá. Je to dáno nedostatečnými mezemi detekce pro některé stopové prvky (rentgenová fluorescence) či stavem některých technik, které mají spíše výzkumný charakter a v běžné analytické praxi se příliš neuplatňují (laserová ablace a elektro-termické odpařování ve spojení s ICP nebo AAS spektrometrií).

Vzorek půdy je tedy obvykle třeba převést do roztoku. Pro stanovení celkových obsahů rizikových prvků se používají rozklady vzorků, které probíhají zpravidla v oxidačním prostředí za přítomnosti silných minerálních kyselin (HNO_3 , HClO_4) a kyseliny fluorovodíkové. Kyselina fluorovodíková hraje zcela zásadní roli při rozpouštění silikátové matrice vzorků. Rozklad může být prováděn v otevřeném nebo uzavřeném systému, s klasickým nebo mikrovlnným ohřevem. Kromě toho se používá také tavení vzorků např. s boritanem lithným a rozpuštění taveniny v kyselinách. Stanovení skutečných celkových obsahů rizikových prvků těmito postupy je poměrně málo časté. Důvodem je náročnost postupů rozkladu vzorků půd a vysoká toxicita kyseliny fluorovodíkové. Častější je použití metod stanovení uzančných celkových

obsahů rizikových prvků, tzv. pseudototálních obsahů. Tyto obsahy jsou dobrým ukazatelem kontaminace půdy, poněvadž těmito postupy se extrahují všechny formy prvků vyjma těch, které jsou pevně vázané v silikátové matici půd a nepředstavují potenciální riziko pro životní prostředí. Z hlediska provedení jsou postupy stanovení méně pracné a řada z nich je zahrnuta do souboru norem. Jedním takovým celosvětovým standardním postupem je extrakce půdy horkou lučavkou královskou. V ČR se pro stanovení indikačních mezí používal v minulosti extrakt 2 mol/L HNO_3 za laboratorní teploty.

Pro odhad přechodu rizikových prvků z půdy do potravního řetězce, do spodních vod apod. se často doporučuje stanovení jejich mobilní, resp. snadno mobilizovatelné frakce. Pro určení aktuální mobility rizikových prvků se využívají extrakce se zředěnými roztoky neutrálních solí (chlorid vápenatý, dusičnan sodný, dusičnan amonný), voda za normální teploty nebo za varu, zředěné roztoky chelatačních činidel (např. EDTA) a zředěné roztoky slabých kyselin (kyselina octová, kyselina citronová).

Stanovení vybraných prvků v půdách metodou ICP-MS

1. Úvod

Pro úlohu byly vybrány 2 typy extrakcí, a to extrakce do 2M HNO_3 a 1M NH_4NO_3 (obojí za laboratorní teploty). Extrakce do 2M HNO_3 reprezentuje tzv. pseudototální obsah prvků. Extrakce půd roztokem 1M NH_4NO_3 probíhá při vlastním pH půdy, extrahují se tedy především formy sorbované na půdní povrch a formy, které se původně nacházely v půdní vodě. Tato frakce obsahu reprezentuje tzv. bio-dostupnou či snadno mobilizovatelnou část kovů v půdě. Vybrané prvky (Ni, As, Cd a Pb) v roztoku se stanoví hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

2. Chemikálie, pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy, horizontální třepačka, centrifuga
- Automatické pipety s nastavitelným objemem v rozsahu 0,01 – 10 ml
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7700x ICP-MS
- Polypropylenové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml
- Polypropylenové zkumavky o objemu 10 ml pro analýzu vzorků

- Stříkačkové membránové filtry (velikost ok 0.45 μm)
- Odměrné baňky o objemu 25 ml
- Kyselina dusičná, koncentrovaná, 65% (m/m)
- 2M kyselina dusičná (13,9 ml koncentrované HNO_3 se zředí vodou na objem 100 ml)
- 1M dusičnan amonný (1 mol/l acc. to DIN 19730, Merck)
- Demineralizovaná vysoce čistá voda (vodivost 0,054 $\mu\text{S/cm}$)
- Kalibrační standardy Astasol s koncentrací analytů Ni, As, Cd a Pb 100 mg/L
- Roztok porovnávacích prvků (Ge, In, Bi) o koncentraci 5 mg/L

3. Mechanická úprava vzorků půd

Ve většině případů je třeba před vlastní analýzou vzorky půd nejprve mechanicky upravit sušením, proséváním, dělením (kvartací) případně i mletím. Nejprve se ze vzorku odstraní větší kameny či části rostlin. Vzorek se následně nechá vyschnout, obvykle za laboratorní teploty v bezprašném prostředí. Suchý vzorek se prosévá přes síto, v našem případě sítem o velikosti ok 2 mm. Vzorek se pak případně dále dělí ták, abychom získali vzorek reprezentativní k původnímu celku (např kvartací). Pokud je pro některé metody stanovení potřebná navážka menší než 0,5 g, vzorek se upraví mletím.

4. Extrakce vzorků půd

2M HNO_3

Do třech PP centrifugačních zkumavek se naváží ($1,00 \pm 0,01$) g vzorku a přidá se pipetou 10 ml 2 M HNO_3 . Po důkladném protřepání se vzorek extrahuje 60 min na horizontální třepačce při frekvenci 180 ot/min. Po extrakci se vzorek centrifuguje při 6000 ot/min po dobu 10 min. V případě čirého vzorku je odebráno 0,5 ml roztoku pomocí automatické pipety a vzorek je 10x ředěn deionizovanou vodou do 10 ml PP zkumavky (tj. 0,5 ml vzorku + 4,5 ml deionizované vody). V případě zakaleného vzorku se provede filtrace přes stříkačkový membránový filtr do PP zkumavky o objemu 10 ml, přičemž první 2 ml filtrátu se použijí pro propláchnutí filtru. Následně se vzorek 10x ředí deionizovanou vodou. Společně se vzorky se stejným způsobem zpracují slepé vzorky (3 blanky), jako slepý vzorek slouží pouze roztok 2M HNO_3 .

1M NH₄NO₃

Do třech centrifugačních zkumavek se naváží (4,00±0,01) g vzorku a přidá se pipetou 10 ml 1M NH₄NO₃. Po důkladném protřepání se vzorek extrahuje 120 min na horizontální třepače při frekvenci 180 ot/min. Po extrakci se vzorek centrifuguje při 6000 ot/min po dobu 10 min. V případě čirého vzorku je 3 ml roztoku převedeno pomocí automatické pipety do 10 ml PP zkumavky. V případě zakaleného vzorku se provede filtrace přes stříkačkový membránový filtr do PP zkumavky o objemu 10 ml, přičemž první 2 ml filtrátu se použijí pro propláchnutí filtru. Aby se zamezilo ztrátám analytů sorpcí na stěny nádoby, je potřeba filtrát okyselit přídavkem koncentrované kyseliny dusičné v množství 0,03 ml na 3 ml extraktu. Společně se vzorky se stejným způsobem zpracují slepé vzorky (3 blanky), jako slepý vzorek slouží pouze roztok 1M NH₄NO₃.

5. Stanovení kovů metodou ICP-MS

Měření budou prováděna na přístroji Agilent 7700x ICP-MS. Jde o kvadrupólový hmotnostní spektrometr, jehož součástí je kolizně reakční cela, která slouží k redukci spektrálních interferencí. Pro účely našeho měření bude použito helium jako kolizní plyn. Nespektrální interference budou korigovány pomocí porovnávacích prvků Ge (pro Ni a As), In (pro Cd) a Bi (pro Pb).

Pracovní postup

Připraví se sada směsných kalibračních roztoků o následujících koncentracích:

- Roztok 1: kalibrační nula (0 µg/L Ni, As, Cd a Pb, pouze roztok zředěné HNO₃)
- Roztok 2: 5 µg/L Ni, As, Cd a Pb
- Roztok 3: 20 µg/L Ni, As, Cd a Pb
- Roztok 4: 100 µg/L Ni, As, Cd a Pb
- Roztok 5: 500 µg/L Ni, As, Cd a Pb

Pro přípravu kalibračních roztoků se použije zásobní kalibrační standard o koncentraci Ni, As, Cd a Pb 100 mg/L. Kalibrační roztoky obsahují jako matici zředěnou kyselinu dusičnou o koncentraci odpovídající 0,1 ml kyseliny na 10 ml roztoku). Roztok porovnávacích prvků je již připraven a přimíchává se k roztoku vzorku v průběhu měření pomocí peristaltického čerpadla.

Při analýze postupujeme od kalibračního standardu s nejvyšší koncentrací po kalibrační standard s nejnižší koncentrací, následně proměříme slepé pokusy (blanky) společně se vzorky – blanky by v sekvenci měli být rovnoměrně rozprostřeny mezi vzorky.

Vyhodnocení naměřených dat

Kalibrační závislost se sestojí z poměrů signálu analytů a signálu porovnávacího prvku (poměr signálů Ni/Ge, As/Ge, Cd/In a Pb/Bi proti koncentraci Ni, As, Cd a Pb v kalibračních roztocích). Tentýž přepoččet se provede i pro signály vzorků a slepých pokusů. Přes kalibrační závislost se vypočte koncentrace prvků v roztocích slepých pokusů a vzorků v $\mu\text{g/L}$. Střední hodnota koncentrace analytů v slepých pokusech (medián) se odečte od koncentrace analytů ve vzorcích. Spočte se mez detekce metody (LOD) jako trojnásobek směrodatné odchylky (SD) koncentrace analytů v slepých pokusech a LOD porovnáme s koncentracemi analytů ve vzorcích po odečtu mediánu slepých vzorků. Pokud jsou koncentrace prvků ve vzorcích vyšší, než je hodnota LOD, přepočteme koncentrace z $\mu\text{g/L}$ na obsah prvků ve vzorku půdy v jednotkách $\mu\text{g/g}$ – v úvahu bereme celkový objem roztoku (10 ml), navážku vzorku v gramech a faktor ředění u extrakce 2M HNO_3 . Najdeme-li ve vzorcích koncentraci nižší, než je hodnota LOD, vyjádříme výsledek analýzy jako $< "X"$, kde X je číselná hodnota LOD v $\mu\text{g/g}$ (např. $< 0,6 \mu\text{g/g}$). Přepoččet LOD z $\mu\text{g/L}$ na $\mu\text{g/g}$ je stejný, jako v případě hodnot $> \text{LOD}$, akorát pro výpočet se bere číselná hodnota LOD v $\mu\text{g/L}$. Na závěr spočteme střední hodnotu výsledku (medián obsahů) a její směrodatnou (SD) + relativní směrodatnou odchylku (RSD).

Výsledky zaokrouhlujeme na 3 platné číslice (např. 0,679 namísto 0,6795465231 nebo 563 namísto 563,154895). Hodnota meze detekce (LOD) se vyjadřuje na 1 platné číslo, tj. třeba 0,008 namísto 0,00864594. Čísla se pak zaokrouhlují na první platnou číslici LOD a maximálně na 3 platné číslice. Velmi častou chybou, která se v protokolech opakuje je, že směrnice/úsek lineární regrese je uveden pouze s jednou platnou číslicí. Kalibrační závislost pak vypadá třeba takto $y = 0,0004 + 3\text{E}-07$, přičemž směrnice teoreticky může nabývat hodnot mezi 0,00035 až 0,00044 a výrazně tím dojde k zaokrouhlení výsledku. Je třeba zde přes formát popisku spojnice trendu v grafu přidat další platné číslice (alespoň 3).

6. Vypracování protokolu

Úvodní část protokolu by měla obsahovat základní informace o kontaminaci půd sloučeninami Ni, As, Cd a Pb. Dále byste měli dohledat vyhlášku 153/2016 Sb., která stanovuje limity pro

obsahy prvků v zemědělských půdách a porovnat získaná data s limity (pseudotoální obsah je zde reprezentovaný extrakcí do lučavky královské). Výsledky slovně zhodnoťte.

Protokol by měl dále po výsledkové stránce obsahovat následující informace:

- Tabulky signálů analytů a porovnávacích prvků v kalibračních roztocích, slepých pokusech a vzorcích
- Poměry signálu analyt/vnitřní standard a vypočtené koncentrace (i pro kalibrační roztoky)
- Parametry lineární regrese ve formě $y = ax + b$, kde parametry a a b budou vypočteny s přesností alespoň na 3 platné číslice
- Vypočtené střední hodnoty (mediány) u slepých pokusů, jejich SD a vypočtené LOD
- Vypočtené hodnoty obsahů prvků v půdě, střední hodnoty, SD a RSD
- Poměr bio-dostupné složky prvků vůči pseudotoálnímu obsahu

Protokol se odevzdává v elektronické podobě. Společně s protokolem odevzdejte i soubor se zdrojovými daty a výpočty (např. excel), snáze se pak hledají případné chyby. Dále by měl protokol obsahovat návážky vzorků a popis případných odchylek od výše uvedeného postupu. Není třeba kopírovat části manuálu do protokolu metodou ctrl-c → ctrl-v.

Úloha č. 3: Stanovení obsahu rtuti ve svalovině ryb

Teoretický úvod

Hlavními přírodními zdroji sloučenin rtuti v prostředí jsou zvětrávání minerálů a sopečná aktivita. Kromě těchto přírodních pochodů hraje stále větší roli průmyslové znečištění spojené např. s elektrochemickými výrobami, zpracováním rud apod. Na tomto znečištění se podílí i spalování fosilních paliv. Těkavá elementární rtuť i sloučeniny rtuti vázané na prachové částice jsou z atmosféry vymývány srážkami a hromadí se ve vodách a půdách. Velká část rtuti může reagovat v anoxických podmínkách v sedimentech za vzniku nerozpustných sloučenin, jako např. HgS, nicméně v sedimentech může docházet i k alkylaci dostupných anorganických forem rtuti za vzniku velmi toxických organokovových sloučenin.

Analýza vzorků ryb je užitečným nástrojem pro posouzení expozice sloučenině zvané methylrtuť (MeHg). Jedná se o organickou sloučeninu rtuti, která vzniká z anorganických dvojmocných forem reakcí zvanou methylace. Methylace může probíhat abioticky i prostřednictvím bakterií žijících především v dnových sedimentech. Methylrtuť dále prostupuje potravinovým řetězcem a kumuluje se ve vrcholových predátorech vodního prostředí (např. tuňák, mečoun, tuleň). Většina methylrtuti v lidských tělech pak pochází z konzumace kontaminovaných ryb a mořských plodů, nicméně konzumaci rybího masa bychom neměli z tohoto důvodu omezovat (přítomnost esenciálních mastných kyselin, vitamínů, stopových prvků), důležitý je výběr druhů s nižší kontaminací.

Methylrtuť je snadno absorbována v trávicím traktu a po průchodu hematoencefalickou bariérou vstupuje do centrálního nervového systému (CNS), cílovým orgánem je tedy mozek. V membránových proteinech a enzýmech se váže na SH-skupiny a způsobuje tak nevratné poškození centrálního nervového systému. U dospělých lidí se poškození vztahuje na oblasti mozku, ve kterých jsou soustředěny smyslové a koordinační funkce. Vysoká koncentrace methylrtuti způsobuje u těhotných žen poškození plodu. Hromadné otravy lidí organokovovými sloučeninami rtuti byly zaznamenány v Minamatě v Japonsku (1952) a v Iráku (1971).

Z analytického hlediska se stanovují povětšinou celkové obsahy Hg ve svalovině ryb. Svalovina ryb obvykle obsahuje kolem 80–100 % Hg ve formě methylrtuti. Z praktického hlediska se snáze stanovuje celkový obsah Hg ve srovnání se stanovením MeHg, poněvadž speciální

analýza je náročnější po přístrojové i procesní stránce (extrakce, přečištění extraktů, derivatizace ...). Celkové obsahy Hg lze stanovit přímo z pevných vzorků pomocí analyzátorů rtuti na bázi termo-oxidační atomové absorpční (AAS) či fluorescenční spektrometrie (AFS). Další možností je převedení vzorků do roztoku mineralizací silnými minerálními kyselinami (např. HNO_3) a oxidačními činidly (H_2O_2) za pomoci mikrovlnného rozkladného zařízení. Získané mineralizáty se následně analyzují většinou pomocí AFS nebo AAS s generováním studených par Hg, případně metodou ICP-MS

Stanovení obsahu Hg ve svalovině ryb a korýšů různých trofických úrovní

1. Úvod

Pro úlohu byli vybráni 3 mořští živočichové, kteří reprezentují 3 různé trofické úrovně. Krevety jsou všežravci živící se ze dna moře. Treska obecná se živí převážně korýši (mimo jiné i krevetami) a menšími druhy ryb. Tuňák obecný je zástupce vrcholových mořských predátorů, kteří se živí výhradně rybami. Dále byly vybrány 4 zástupci sladkovodních ryb (amur, kapr, cejn a sumec), kteří se běžně vyskytují na území ČR. Všechny tyto ryby byly odloveny na jedné nádrži v jihomoravském kraji ve stejném čase, přičemž orientační stáří jednotlivých ryb je následující: kapr 3 roky, amur 4 roky, sumec 3 - 4 roky a cejn 5 – 7 let. Amur se živí převážně rostlinou potravou. Kapr a cejn jsou všežravci živící se bentosem, tj. živočišnými a rostlinnými organismy obývající břeh a dno vod. Sumec se živí živočišnou potravou, a to především rybami a obojživelníky, ve vzácných případech může pozřít i vodní ptactvo či drobné savce.

Rtuť ve vzorku svaloviny ryb je stanovena pomocí analyzátoru rtuti metodou termo-oxidační atomové absorpční spektrometrie (AAS). Metoda nevyžaduje extrakci Hg ze vzorku, pouze jeho mechanickou úpravu (lyofilizace, mletí).

2. Chemikálie, pomůcky a přístroje

- Analyzátor rtuti AMA254
- Kulový oscilační mlýn Retsch MM301 + ZrO_2 mlecí nádoby
- Keramický nůž
- Certifikované referenční materiály TORT-3 a ERM-BB442
- Demineralizovaná vysoce čistá voda (vodivost 0,054 $\mu\text{S}/\text{cm}$)

3. Mechanická úprava vzorků ryb

Vzorky je třeba před analýzou nejprve řádně vysušit. V případě vzorků ryb se používá nejčastěji lyofilizace, tedy vysušení vzorku za nízké teploty a tlaku sublimací vody. Metoda je velmi šetrná jak ke vzorkům, tak k analytům, u kterých by jinak hrozila ztráta vytěkáním. Zpracovávat vzorky v cvičení budeme již lyofilizované, poněvadž tento proces obvykle trvá několik dní. Po lyofilizaci je třeba ze vzorku odebrat pomocí keramického nože reprezentativní část, která je následně zpracovávána mletím. Finální navážky pro analýzu se pohybují kolem 50 mg, takže je třeba zabezpečit homogenitu materiálu na této úrovni. V ideálním případě by vzorek po mletí měl být bez hrubých částic znatelných při tření prsty. Vzorky pro stanovení rtuti umístíme do PE sáčku a uchovááme při laboratorní teplotě (min 1 g).

Postup zpracování vzorků je následující:

- Pomocí keramického nože odřízneme menších několik částí z různých míst vzorku
- Potřebné množství vzorku (cca polovinu mlecí nádoby) umístíme do čisté mlecí nádoby z ZrO_2 a spolu s mlecími koulemi upevníme do držáku
- Spustíme mletí s parametry 20 kmitů/s po dobu 2 min
- Rozeberme nádobku, zkontrolujeme hrubost materiálu a případně mletí opakujeme
- Přesypeme vzorek do PE sáčku

4. Stanovení Hg ve svalovině ryb

Rtuť ve vzorku svaloviny ryb je stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) s dávkováním pevných vzorků pomocí přístroje AMA254 (Altec s.r.o, Česká republika). Postup stanovení je následující:

- Otevřeme přívod kyslíku, zapneme přístroj AMA254 (červené tlačítko) a zapneme ovládací PC. Po naběhnutí systému spustíme program AMA254 a vyčkáme přibližně 20 min pro dosažení požadované teploty ve spalovací peci.
- Vyčištění systému – ikona „L“ – otevření panelu Clean – spuštění analýzy s parametry 60/150/45 (doba sušení/termického rozkladu/čekání). Pro analýzu dávkujeme 100 μ l vodovodní vody. Analýzu je třeba opakovat do dosažení konstantní hodnoty absorbance.

- Nastavení slepého pokusu – ikona „B“ – otevření panelu Blank – (20/200/45), spustit tlačítkem „start“, po vysunutí lodičky vyčkat asi 20 s, než lodičku stiskem „Continue (Insert)“ zasuneme zpět.
- Ověření správnosti měření – ikona „A“ – panel Analysis – parametry analýzy: 20/200/45. Dávkuje přibližně 50 mg certifikovaného referenčního materiálu svaloviny ryb (ERM-BB442) a korýšů (TORT-3) na Ni lodičku.
- Vlastní analýza vzorků – ikona „A“ – panel Analysis – parametry analýzy: 20/200/45. Navažujeme přibližně 50 mg vzorku
- Vyčistíme systém nadávkováním 100 μ l vodovodní vody s parametry analýzy 60/150/45

5. Vyhodnocení naměřených dat a zpracování protokolu

Exportovaná data jsou již v jednotkách μ g/g (resp. ppm), takže není třeba provádět další výpočty. Protokol by měl obsahovat krátký úvodní text o toxicitě a kontaminaci ryb rtutí. Dále by součástí protokolu měla být naměřená data, srovnání naměřené hodnoty s certifikovanou a slovní hodnocení nalezených obsahů Hg tj. srovnání s hygienickým limitem pro potraviny resp. ryby (např. US-EPA, WHO, EFSA, nařízení Evropské komise) a porovnáním s běžnými obsahy nalezenými v literatuře.