

**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**CENTRUM PRO VÝZKUM TOXICKÝCH LÁTEK V PROSTŘEDÍ**

# **Bakalářská práce**

**Brno 2014**

**Jakub Martiník**



**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**CENTRUM PRO VÝZKUM TOXICKÝCH LÁTEK V PROSTŘEDÍ**



# **JEDNOKROKOVÉ EXTRAKCE PRO STANOVENÍ FOREM ARSENU V SEDIMENTECH A PŮDÁCH**

**Jakub Martiník**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí práce: Mgr. Jan Kuta**

**Brno 2014**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Jakub Martiník  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

**Název práce:** Jednokrokové extrakce pro stanovení forem arsenu  
v sedimentech a půdách

**Studijní program:** Chemie  
**Studijní obor:** Chemie  
**Vedoucí práce:** Mgr. Jan Kuta  
**Akademický rok:** 2014  
**Klíčová slova:** arsen, biodostupnost, mobilita, jednokrokové extrakce,  
HPLC, ICP - MS

## Bibliographic Entry

**Author:** Jakub Martiník  
Faculty of Science, Masaryk University  
Research Centre for Toxic Compounds in the Environment

**Title of Thesis:** Single extraction schemes for determination of arsenic  
species in sediments and soils

**Degree programme:** Chemistry  
**Field of Study:** Chemistry  
**Supervisor:** Mgr. Jan Kuta  
**Academic Year:** 2014  
**Keywords:** arsenic, bioavailability, mobility, single extraction, HPLC,  
ICP - MS

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na jednokrokové extrakce, které se používají ke stanovení mobilní (biodostupné) frakce arsenu v půdách a sedimentech.

Teoretická část práce obsahuje studii problematiky stability forem arsenu před a v průběhu analýzy, dostupnosti arsenu pro rostliny a půdní organismy a souhrn analytických metod, používaných pro stanovení arsenu v půdách a sedimentech.

V experimentální části práce byla srovnána extrakční výtěžnost čtyř slabých extrakčních činidel (deionizovaná voda, 0,1M octan amonný, 0,01M fosforečnan a 0,01M fosforečnan s přísadkou 0,01M hydroxylamin hydrochloridu) na vybraných vzorcích půd. Tato činidla byla zvolena na základě studia literatury a měla by modelovat mobilní frakci arsenu vázanou na matici vzorků. V extraktech byla stanovena celková koncentrace arsenu metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) i zastoupení jednotlivých forem kombinovanou technikou HPLC-ICP-MS.

## **Abstract**

This work is focused on single extraction schemes used for determination of arsenic mobile (bioavailable) fraction in soils and sediments.

Theoretical part of this thesis contains study of changes in stability of arsenic species during sample pretreatment and extraction process, bioavailability for vegetation and soil organisms and summary of analytical methods, used for arsenic determination in soils and sediments.

Extraction abilities of four weak extractants (MQ water, 0,1M ammonium acetate, 0,01M phosphate and 0,01M phosphate with 0,01M hydroxylamine hydrochloride) on three soil samples was compared in experimental part of this work. These extractants were chosen after study of literature as a model reagents for determination of mobile fraction of arsenic in soil. Total content of arsenic in soils was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Arsenic speciation was performed by combined technique HPLC-ICP-MS.



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

<b>Jméno studenta/ky:</b>	<b>Jakub Martiník</b>	<b>UČO: 379445</b>
<b>Studijní program/Obor:</b>	B-CH/CHEO	
<b>Název práce:</b>	<b>Jednokrokové extrakce pro stanovení forem arsenu v sedimentech a půdách</b>	
<b>Název práce anglicky:</b>	<b>Single extraction schemes for determination of arsenic species in sediments and soils</b>	
<b>Vedoucí:</b>	Mgr. Jan Kuta	
<b>Konzultant(i):</b>		
<b>Datum zadání:</b>		
<b>Datum odevzdání:</b>		
<b>Předpokládaný rozsah:</b>	Cca 30 stran	

### **Anotace a cíle:**

V Současné době se používá několik extrakčních činidel pro odhad obsahu mobilních forem arsenu v těchto maticích, nicméně výtěžnosti u jednotlivých extrakčních postupů se významně liší. Dalším problémem je možná konverze specií v průběhu extrakce a tím znehodnocení výsledků. Neméně důležitou roli může hrát v případě speciálních analýz způsob zpracování a skladování vzorků před analýzou.

Cílem práce je nastudovat problematiku stanovení mobilních/biodostupných forem arsenu v sedimentech/půdách a experimentálně otestovat, jak se liší extrakčních výtěžnost různých forem As pro jednotlivé extrakční postupy. Do budoucna by měla práce vést k návrhu extrakčního postupu, který by nejlépe modeloval množství As dostupného pro rostliny a půdní živočichy.

### **Postup a zásady pro vypracování:**

#### **1) Vypracování rešerše**

- Výskyt a osud specií arsenu v půdách a sedimentech: přírodní a antropogenní zdroje, formy As v půdách/sedimentech, transport a transformace forem As v závislosti na složení půd, organické hmotě, Eh, pH ... Toxicita specií.
- Analytika As: odběr, zpracování a skladování vzorků pro stanovení celk. obsahů a specií v půdách. Stanovení celkového obsahu a frakcionace forem (jednokrokové, sekvenční extrakce). Instrumentace pro celkové obsahy – ICP, AAS, HG-AFS. Instrumentace pro speciace forem As - separace - LC, GC, CE + detekce prvkově selektivní (ICP, AFS) vs. molekulově selektivní (MS).
- Jednokrokové extrakce: extrakční testy pro stanovení biodostupných/mobilních forem As ve spojení se stanovením celkového obsahu i jednotlivých forem. Korelace extrahovaného obsahu s příjmem As rostlinami a živočichy.



## Postup a zásady pro vypracování (pokračování):

### 2. Experimentální část

- a) Seznámení se s kombinovanou technikou HPLC-ICP-MS pro stanovení jednotlivých forem arsenu – arsenitany, arseničnany, methylované formy arseničnanů
- b) Otestovat výtěžnost vybraných extrakčních postupů pro jednotlivé formy arsenu na půdách či sedimentech s rozdílnými fyzikálně-chemickými parametry (např. obsah organického uhlíku, pH půdního výluhu ...)

## Doporučená literatura:

- Články z databází Web of Science, ScienceDirect ... a knihy např.
- Dean J.R. (2003): Methods for Environmental Trace Analysis
- Mitra S. (2003): Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry

V Brně dne: 12.8.2013

Podpis vedoucího práce:

Mgr. Jan Kůta

Podpis studenta/ky:

Jakub Martiník

Podpis ředitele Centra:

Prof. RNDr. Ivan Holoubek, CSC.

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu Mgr. Janu Kutovi za odbornou pomoc, ochotu a cenné rady při tvorbě této práce, a také Mgr. Blance Maňákové za poskytnutí vzorků půd pro experimentální část.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 28. května 2014

.....  
podpis studenta



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>9</b>
2.1	<b>Výskyt a osud specií arsenu v půdách a sedimentech .....</b>	<b>9</b>
2.1.1	Zdroje arsenu v prostředí.....	9
2.1.2	Toxicita a transformace specií.....	10
2.1.3	Dostupnost As pro rostliny .....	12
2.1.4	Dostupnost As pro půdní organismy.....	13
2.2	<b>Analytická chemie arsenu .....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Instrumentace .....	14
2.2.2	Odběr a zpracování vzorků.....	16
2.2.3	Stanovení celkového obsahu As a frakcionační analýzy.....	18
2.2.4	Stanovení biodostupné/mobilní frakce As.....	19
<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>22</b>
3.1	Chemikálie .....	22
3.2	Přístroje.....	22
3.3	Testování extrakčních činidel.....	22
3.4	Analýza vzorků půd.....	23
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>Použité symboly a zkratky.....</b>	<b>31</b>

# 1 Úvod

Kontaminace půd a sedimentů arsenem se v současné době odvozuje z celkového obsahu tohoto prvku, zjištěného rozkladem matrice směsí silných kyselin, například výluhem lučavkou královskou. Takovýto výluh však nedává relevantní informaci o skutečné toxicitě půdy nebo sedimentu, jelikož většina arsenu je na matrici vázána natolik pevně, že při působení přírodních podmínek prakticky nemůže dojít k jejímu rozpuštění. Pro odhad obsahu mobilních forem arsenu se používá několik extrakčních postupů, které se ale významně liší ve výtěžnostech. Kromě samotného extrakčního postupu je také důležitým aspektem zpracování vzorků a s tím spojené nebezpečí konverze forem arsenu před a během analýzy.

Cílem práce je studovat problematiku stanovení mobilních/biodostupných forem arsenu v půdách a sedimentech a experimentálně otestovat, jak se liší výtěžnost různých forem arsenu pro jednotlivé vybrané extrakční postupy. Do budoucna by měla práce vést k návrhu extrakčního postupu, který by nejlépe modeloval množství arsenu, dostupného pro rostliny a půdní živočichy, tedy arsenu, který je reálně nebezpečný pro živé organismy a člověka.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Výskyt a osud specií arsenu v půdách a sedimentech

#### 2.1.1 Zdroje arsenu v prostředí

**Přírodní zdroje:** Arsen se v přírodě vyskytuje v malých množstvích, především v sulfidické formě nebo ve formě oxidů a arsenidů, ryzí jen výjimečně. Minerály arsenu jsou arsenopyrit  $\text{FeAsS}$ , auripigment  $\text{As}_2\text{S}_3$ , realgar  $\text{As}_4\text{S}_4$  a nikelin  $\text{NiAs}$ . Průměrný obsah arsenu v kontinentální kůře je přibližně 3 mg/kg, kromě běžných hornin se koncentruje na některých ložiscích nerostných surovin, především hnědého uhlí, kde koncentrace arsenu dosahuje desítek až stovek mg/kg. Arsen netvoří těkavé anorganické sloučeniny, jeho přirozeným zdrojem v ovzduší je především vulkanická činnost. Atmosférickým spadem nebo vymytím se dostává do vody nebo půdy. Mikrobiálním působením dochází k tvorbě methylovaných forem arsenu.<sup>1</sup>

**Antropogenní zdroje:** Mezi nejvýznamnější antropogenní zdroje arsenu patří spalování fosilních paliv (spaliny, popel a struska), dále pak hutní a rudný průmysl, používání organických a anorganických sloučenin arsenu jako herbicidních a insekticidních prostředků, látek na konzervaci dřeva, textilní a sklářský průmysl. Celosvětové emise arsenu do atmosféry, jejichž zdrojem je lidská činnost, činí 75 - 100 tisíc tun ročně.<sup>2 3 4</sup>

Průmyslově nejvíce používané sloučeniny arsenu jsou následující:

#### *Organické sloučeniny*

- methylarseničnan sodný (MSMA) – neselektivní herbicid, defoliant, silvicid
- methylarseničnan disodný (DSMA) – selektivní herbicid, silvicid
- methylarseničnan amonný (MAMA) – selektivní herbicid
- methylarseničnan vápenatý (CAMA) – selektivní herbicid
- kyselina kakodylová (DMA) a její sodná sůl – neselektivní herbicid, defoliant

#### *Anorganické sloučeniny*

- oxid arsenitý – zastaveno využívání
- arsenitan sodný – pesticid
- arsenitan vápenatý – insekticid, ochrana ovoce
- arsenitan měďnatý – insekticid, konzervování dřeva

- acetoarsenitan měďnatý - insekticid
- kyselina arseničná – herbicid, defoliant, konzervování dřeva
- arseničnan sodný – zastaveno využívání
- arseničnan vápenatý – herbicid (plevel), insekticid (housenky)
- arseničnan zinečnatý – insekticid, ochrana brambor a rajčat

## 2.1.2 Toxicita a transformace specií

### Toxicita:

Nebezpečnost sloučenin arsenu pro živočichy je poměrně rozdílná, vzhledem k unikátním metabolickým přeměnám jednotlivých specií, a také k různé schopnosti jejich bioakumulace. Obecně platí, že toxicita specií arsenu klesá v řadě  $As^{III} > As^V >> MMA, DMA$ . Arsenocholin a arsenobetain nejeví toxicitu prakticky žádnou.

Chronická expozice zvýšené koncentrace arsenu v pitné vodě vede k poškození kardiovaskulárního systému, příkladem je tzv. blackfoot disease, gangrenózní onemocnění indikované na Taiwanu, vyvolané expozicí 0,01 až 0,5 mg As/kg/den, nebo zvýšení výskytu Raynaudovy nemoci a cyanózy v Chile (0,02 až 0,06 mg As/kg/den).

Hematologickým efektem je anemie a leukopenie, výrazná expozice arsenu vede k řídnutí kostí. Požití více než 10 mg/kg  $AsH_3$  má smrtelné důsledky během několika hodin kvůli hemolýze červených krvinek.

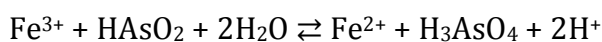
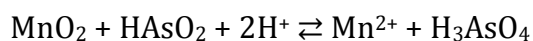
Chronická hepatotoxicita se projevuje otokem jater, ascites nebo žloutenkou, při expozici alespoň 0,02 až 0,1 mg As/kg/den.

Akutní intoxikace arsenem může vést k částečnému až úplnému selhání ledvin, vzhledem k transformaci  $As^V$  na toxičtější a méně rozpustnou formu  $As^{III}$ .

Poškození periferního a centrálního nervového systému po expozici arsenem se projevuje encefalopatií.<sup>5</sup>

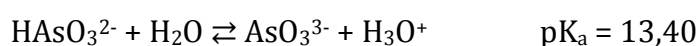
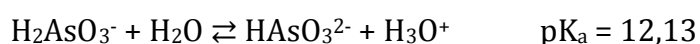
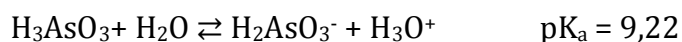
### Transformace forem:

V půdách převládají anorganické formy arsenu  $As^{III}$  a  $As^V$ , jejich poměr je dán fyzikálně-chemickými podmínkami. Nezanedbatelnou část tvoří organické methylované formy arseničnanů MMA a DMA, vznikající mikrobiální aktivitou. Oxidace arsenitanu na arseničnan je katalyzována oxidy  $Mn^{IV}$  a  $Fe^{III}$ :

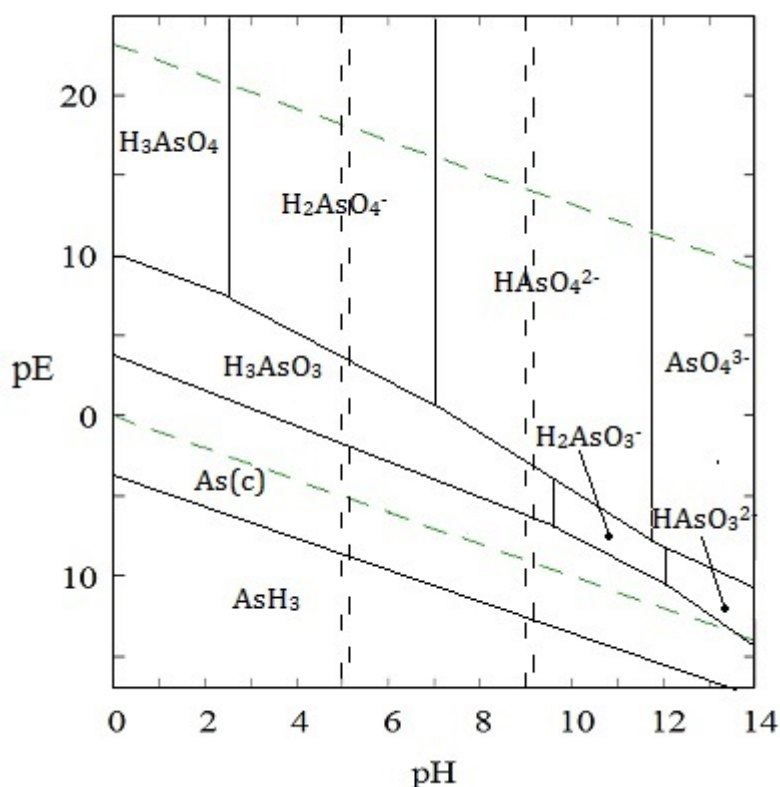
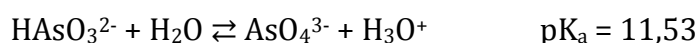
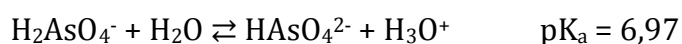
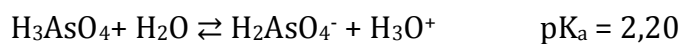


Za normálních podmínek je pH půdy závislé na jejím typu a obsahu organické hmoty, nejčastěji se pohybuje v rozmezí 5 – 9. Vliv pH a redoxního potenciálu prostředí na transformaci anorganických forem arsenu je znázorněn v následujících rovnicích a obrázku č. 1.

**Disociace kyseliny arsenité:**



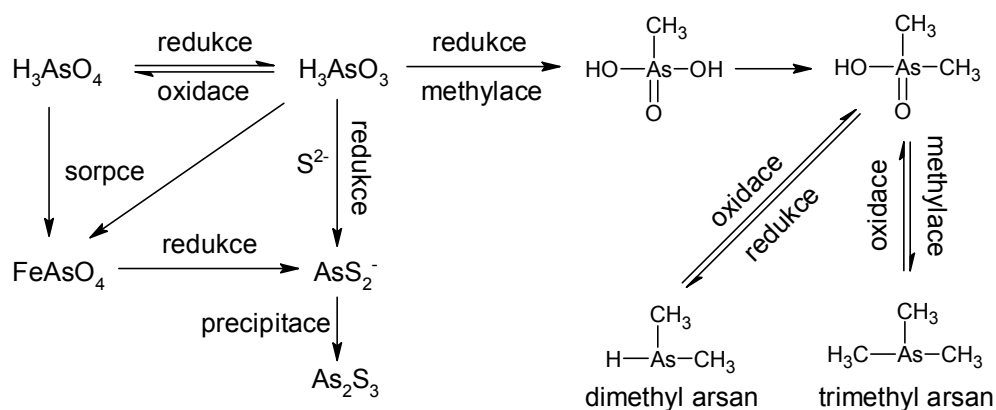
**Disociace kyseliny arseničné:**



Obrázek č. 1: pE – pH diagram pro arsen, t = 25 °C

Z uvedených rovnic vyplývá, že při obvyklých hodnotách pH v půdě převládá plně protonovaná (elektroneutrální) forma arsenitanu, zatímco arseničnan se vyskytuje v částečně deprotonovaných (aniontových) formách. Z pE/pH diagramu lze odvozovat, že k redukci arseničnanu na arsenitan v půdě dochází při pE = 5 až -5 v závislosti na rostoucím pH půdy.

Transformace sloučenin arsenu v půdním prostředí je znázorněna na obr. č. 2. Převládající procesy závisí na obsahu prvků, s kterými se arsen asociuje (Fe, Mn), a množství organické hmoty, která zprostředkovává redukční podmínky. V případě sedimentů je transformace posunuta více ve směru redukce, vzhledem k anaerobnímu prostředí a většímu podílu organické složky.



Obrázek č. 2: Transformace sloučenin arsenu v půdách

### 2.1.3 Dostupnost As pro rostliny

Není známo, že by byl arsen pro rostliny esenciálním prvkem, přestože jeho příjem v nízkých koncentracích podporuje jejich růst. Množství arsenu, které je rostlina schopna přijmout, se liší velmi výrazně mezi jednotlivými druhy. Zdá se, že rostliny, které produkují méně biomasy, jako trávy rodu *Agrostis*, mají menší schopnost absorbovat fosfor/arsen z půdy. Oproti tomu například kapradiny *P. Vittata* a *P. Calomelanos*, tvořící velké množství biomasy, fungují jako hyperakumulátory arsenu, díky čemuž jsou vhodnými kandidáty pro fytořediační procesy.<sup>6</sup>

Absorpce arsenu kořenovým systémem rostlin je uskutečňována transportními proteiny, jako jsou akvaporiny, které transportují primárně vodu, ale i další neutrální molekuly, například  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ , a také proteiny, zodpovědnými za přenos fosforu. Vzhledem k podobným hodnotám disociačních konstant kyselin arsenu a fosforu a rozpustností

jejich solí dochází k transportu  $As^V$  přes membránu spolu s  $P^V$ . Organické formy arsenu jsou absorbovány hůře, než anorganické.

Pokud trpí rostlina nedostatkem fosforu, je schopna vypouštěním kořenových exudátů (karboxylových kyselin) do rhizosféry mobilizovat fosfor vázaný na půdní frakce. Vzhledem k výše zmíněné podobnosti dochází zároveň k mobilizaci arsenu. Je známo, že se pH v rhizosféře může lišit až o 2 jednotky od pH v půdním roztoku, což může mít vliv na dostupnost arsenu pro rostliny. Zvýšení pH podporuje rozpustnost  $As^V$  sloučenin a nízké zase rozklad oxidů/hydroxidů železa, s kterými se arsen asociuje. <sup>4</sup>

#### **2.1.4 Dostupnost As pro půdní organismy**

Lee et al. (2013) zkoumali vliv vlastností půdy na biodostupnost arsenu pro *E. Fettida*. Za hlavní faktory, ovlivňující příjem arsenu žížalami, byly označeny obsahy oxidů železa v půdě, síranů a DOC (rozpuštěný organický uhlík) v půdním roztoku. Oxidy železa v půdě fungují jako sorpční místa pro rozpuštěný arsen a snižují tedy jeho mobilitu a dostupnost. Zdá se, že zvýšení koncentrace síranů v půdním roztoku má za následek snížení příjmu arsenu žížalami. Příčinou může být nízké pH půdy, které je zodpovědné za zvýšení množství síranů v roztoku, jelikož kyselá půda výrazně ovlivňuje biologickou aktivitu žížal. Druhou možností je podobný mechanismus transportu přes buněčnou membránu pro tetraedrické molekuly síranů a arseničnanů, kdy adsorpce síranů omezuje příjem arseničnanů. DOC zvyšuje množství ve vodě rozpustného arsenu, dochází k redukci hydroxidů Fe a Mn, což má za následek uvolnění As do půdního roztoku, navíc také organická hmota podporuje redukci  $As^V$  na mobilnější formu  $As^{III}$ . Z předešlé práce výše uvedených autorů (2008) vyplývá, že vyšší koncentrace chloridů v roztoku ( $>8,2 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) vede ke tvorbě As-Cl komplexů ( $AsCl_5$  a  $AsCl_3$ ), a tedy ke snížení biodostupnosti arsenu. Překvapivě také zjistili, že přidavek fosforečnanu v půdě sice zvyšuje iontovou výměnou koncentraci arsenu, ale jeho příjem žížalami naopak snižuje, díky konkurenci v transportním mechanismu přes buněčnou membránu, jako u výše zmíněných síranů. <sup>7 8</sup>

## 2.2 Analytická chemie arsenu

### 2.2.1 Instrumentace

**Detekce:** Většina metod používaných pro stanovení arsenu vyžaduje vzorek v podobě roztoku. Pro kvantitativní stanovení arsenu ve vzorcích se používají prvkově selektivní metody atomové absorpční spektrometrie a optické nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Pro snížení detekčních limitů se používá metoda generování těkavých hydridů arsenu ( $\text{AsH}_3$ ) pomocí směsi  $\text{HCl}$  a  $\text{KBH}_4$ , hydridy se následně zavádějí do atomizátorů či ICP. Arsenobetain a arsenocholin musí být nejprve převedeny na anorganické formy arsenu, jelikož netvoří hydridy.<sup>9 10</sup>

**Atomová absorpční spektrometrie:** Arsen absorbuje záření o vlnové délce 193,7 nm, tedy na rozhraní blízkého a dalekého UV spektra. Atomizace u FAAS probíhá nejčastěji v argon–vodíkovém plamenu, v případě ETAAS se používá diskontinuální elektrotermická atomizace. K excitaci dochází pomocí výbojek s dutou katodou a měření je pokles intenzity záření na řečené vlnové délce.

**Atomová fluorescenční spektrometrie:** Detekční metoda používaná ve spojení s generováním hydridů arsenu. Po jejich termickém rozkladu a ozáření světlem z výbojky s dutou katodou je měřena rezonanční fluorescence arsenu o vlnové délce 193,7 nm.

**Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem:** Po excitaci arsenu v indukčně vázaném plazmatu dochází k emisi záření o vlnové délce 193,7 nm, které se detekuje pozorováním plazmatu v axiálním i radiálním uspořádání.

**Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem:** Jediným stabilním izotopem arsenu je  $^{75}\text{As}$ , který se detekuje hmotnostním spektrometrem, po ionizaci v indukčně vázaném plazmatu. Při použití nejběžnějšího argonového plazmatu hrozí spektrální interference  $^{75}\text{As}$  s ionty  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ . Tyto interference mohou být potlačeny zařazením hexa nebo oktapólové kolizní cely, vyplněné vodíkem či heliem, nebo pomocí programu „studeného“ plazmatu, kdy dochází k potlačení vzniku polyatomických iontů nosného plynu s matričními prvky. K potlačení spektrálních interferencí můžeme použít také vhodnou separační techniku před vstupem vzorku do ionizačního zdroje.<sup>10</sup>



**Separace:** Výše zmíněné techniky poskytují signál nezávislý na formě stanovovaného prvku. Pokud chceme získat informace o formách, ve kterých se arsen ve vzorku vyskytuje, musíme před vybranou atomizační a detekční metodu zařadit vhodnou separační techniku. Nejpoužívanějšími jsou chromatografické metody separace.

**Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC):** Vzhledem k chemismu arsenu je HPLC nejvíce využívanou separační metodou. Chromatografickou kolonu vybíráme podle toho, na které formy arsenu ve vzorku cílíme. Pro toxikologický výzkum využíváme především iontově výměnnou chromatografii, a to buď v izokratickém, nebo gradientovém módu. Je možné použít také iontově párovou chromatografii na reverzní fázi. Při spojení s metodou ICP je potřeba vzít v úvahu, že použití organických rozpouštědel v mobilní fázi a gradientový mód mohou způsobovat nestabilitu plazmy. Pro účinnost separace je kromě volby kolony důležitý také typ a koncentrace mobilní fáze, která by měla být inertní k povrchu kolony a neměla by chemicky reagovat s eluovaným vzorkem. Pro separaci arsenu na aniontově výměnné koloně se používají nejčastěji mobilní fáze na bázi kyseliny octové nebo fosforečnanového roztoku.<sup>9</sup>

**Plynná chromatografie (GC):** Metoda založená na separaci látek v plynném stavu. Protože arsen netvoří těkavé sloučeniny, je nutné je získat chemickou úpravou vzorku, nejčastěji technikou generování těkavých hydridů. Vzhledem ke stejnému produktu hydrogenace anorganických forem arsenu ( $AsH_3$ ) je tato metoda vhodná pouze pro speciální analýzu organických forem. Plynná mobilní fáze umožňuje přímé zavádění separovaného vzorku do ICP, ale je třeba zabránit kondenzaci mezi výstupem z GC a vstupem do ICP.<sup>10</sup>

**Kombinace metod:** Separální a detekční metody, uvedené výše, se ve speciální analýze arsenu různě kombinují. Výběr může být ovlivněn ekonomickými možnostmi, požadavky na citlivost metody, formami, které jsou předmětem zájmu práce, nebo jinými okolnostmi. Shrnutí kombinovaných metod ve své práci uvedli Taboada et al. (1998).<sup>9</sup>

**HPLC – AAS (Hansen, 1992):** Použitelné jen při koncentracích látek  $> 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Poskytuje retenční časy jak pro známé, tak neznámé sloučeniny arsenu. Separace na aniontově a kationtově výměnné koloně, atomizace v argon-vodíkovém plameni. Limity detekce 150 – 470 krát horší než spojení HPLC – ICP – MS.<sup>11</sup>

**HPLC – HG – AAS (Hakala, 1992):** Větší citlivost než HPLC – AAS, problém s převodem As<sup>B</sup> a As<sup>C</sup> na těkavé hydridy. Separace na koloně s reversní fází C18. LOD pro As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA, DMA v rozmezí 1 – 5 µg·l<sup>-1</sup>.<sup>12</sup>

**HPLC – HG – AFS (Yuan, 2007):** Srovnatelné s metodou absorpční spektrometrie. Použita aniontově výměnná kolona a argon-vodíkový atomizátor. LOD pro As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA, DMA v rozmezí 3 – 7 µg·l<sup>-1</sup>.<sup>13 14 15 16</sup>

**HPLC – ICP – MS (Beauchemin, 1989):** Aniontově výměnná chromatografie méně citlivá na změny v matrici vzorku než iontově párová, ale s nižším rozlišením. Citlivá metoda s limity detekce závislými na koncentraci interferenčních iontů Ar<sup>40</sup>Cl<sup>35</sup>, obvykle v rozmezí 0,5 – 5 µg·l<sup>-1</sup>.<sup>17 18 19</sup>

**CE – ICP – MS (Liu, 1995):** Úspěšná aplikace CE/DIN (direct injection nebuliser) pro ICP-MS detekci 4 standardů specií arsenu. Spojení vysoké separační účinnosti CE s vysokou citlivostí ICP-MS. Limity detekce pro As<sup>III</sup> a As<sup>V</sup>: 0,10 a 0,02 µg·l<sup>-1</sup>.<sup>20</sup>

## 2.2.2 Odběr a zpracování vzorků

Ve speciální analytice platí, že čím méně úkonů je nutné udělat mezi odběrem vzorku a jeho analyzováním, tím lépe. Ideální způsob analýzy je měření *in situ*, například metodou DGT (difuzní gradient v tenkém filmu), která eliminuje možnost transformace a změn dostupnosti kovových specií před analýzou. Pokud ale nemáme možnost analyzovat vzorky na místě odběru, musíme je podrobit úkonům, popsáním v této kapitole. Je také potřeba znát jejich dopady na fyzikální a chemické vlastnosti půdy, jakož i na transformace zájmových specií arsenu.

**Vzorkování půdy:** Pro stanovení obsahu těžkých kovů se provádí odběr svrchní vrstvy půdy (do 30 cm), zbavené případného travního porostu. Vzhledem k nehomogenitě a omezenému transportu látek v půdě tvoříme směsný vzorek z většího množství vzorkovacích míst podél vytyčené zájmové plochy. Směsný vzorek se následně zbavuje biologického materiálu (kořínky, rostliny, živočichové) a zmenšuje na požadovaný objem kvartací. Je možné také odebírat vzorky půdního profilu, při použití speciálních vzorkovačů.

**Vzorkování sedimentu:** Odběr svrchní vrstvy sedimentu provádíme vzhledem k danému vzorkovacímu místu buď plastovou lopatkou, nebo drapákovým

vzorkovačem. Pro výzkum historického znečištění můžeme použít jádrové vzorkovače, kterými získáme vertikální profil sedimentu. Po odběru stejně jako u půdy zbavujeme sediment nečistot. Vzorkování je nutné provádět správnými nástroji, v případě analýzy kovů se jedná o lopatky a vzorkovače z umělé hmoty, vzhledem k možnosti kontaminace vzorku kovovým odběrovým zařízením. U odběru sedimentu to může být problém, protože většina drapákových vzorkovačů je kovových. Také při práci s tímto vzorkovačem hrozí ztráta jemných částic sedimentu při průchodu vodním sloupcem.

**Transport:** Pokud není vzorek analyzován ihned na místě odběru, je pro jeho přepravu třeba zajistit vhodnou vzorkovnici, v které je převážen do laboratoře. Pro analýzu kovů se používají k transportu vzorků plastové nádoby. V případě sedimentů může hrát transport významnou roli v transformaci specií arsenu, především oxidací vzdušným kyslíkem po vytažení sedimentu z anaerobního prostředí dna na souš. <sup>21</sup>

**Sušení:** Vzorek půdy nebo sedimentu po transportu zbavujeme pórové vody vysušením. Klasické sušení na vzduchu se jeví jako metoda nejméně ovlivňující speciaci a extrahovatelnost arsenu z matrice (Huerga, 2005), přestože je to metoda časově nejnáročnější. Je možné vzorek vysušet také pomocí mikrovln nebo v elektrické peci, tyto metody ale vedou k imobilizaci části arsenu v matrici půdy, a tedy ke snížení extrakčních výtěžků. Druhou vyhovující metodou je lyofilizace. <sup>15</sup>

**Drcení, sítování, mletí:** Vzorky s velikostí zrn větší než 2 mm se drtí v třecí misce s tloučkem, nebo v jiném nástroji pro zmenšení zrnitosti. Pomocí síta s určitou velikostí ok se získá frakce vzorku s požadovanou velikostí zrn. Matera et al. (2003) ve své práci zjistili, že největší množství arsenu obsahuje frakce menší, než 2  $\mu\text{m}$ . Pokud to analýza vyžaduje, pracujeme s mletým vzorkem. Mletí provádíme například v kulovém mlýnu s vnitřním povrchem a koulemi z karbidu wolframu nebo oxidu zirkoničitého. Je třeba dbát na nebezpečí kontaminace vzorku z použitých nástrojů. Drcení a mletí vzorku má za následek narušování povrchu krystalové struktury minerálů, a tedy k uvolňování iontů nebo atomů na nich vázaných. Na druhou stranu absence těchto úprav může, především u půd, zapříčinit nehomogenitu vzorku. <sup>22</sup>

**Uchování vzorků:** Vzorky půd a sedimentů pro analýzu obsahu arsenu je ideální uchovávat po vysušení v plastových nádobách, namleté vzorky v uzavíratelných sáčkách z polyetylenové fólie. Skladování vzorků bez vysušení není pro speciální analýzu

vhodné, vzhledem k transformačním dějům, jako je oxidace nebo mikrobiální degradace, které ve vodném prostředí mohou probíhat.<sup>21</sup>

### 2.2.3 Stanovení celkového obsahu As a frakcionační analýzy

Pro stanovení celkových obsahů stopových prvků v půdách a sedimentech bylo vyvinuto mnoho extrakčních metod. Tyto metody mají za úkol kvantitativní převedení prvku z požadované frakce půdy do roztoku. Vzhledem ke kvantitativní povaze extrakcí jsou často používány extrémní podmínky, jako například vysoká teplota nebo nízké pH.

**Totální obsah arsenu** se stanovuje rozkladem matrice vzorku. Rozklad se provádí silnými koncentrovanými kyselinami nebo jejich směsmi. Běžně používaným činidlem je roztok lučavky královské (směs HCl a HNO<sub>3</sub> v poměru 3:1) nebo směs kyseliny dusičné a chloristé. V případě, že je zapotřebí rozpustit i základní silikátovou matici půdy, je nutné použít kyselinu fluorovodíkovou. V české legislativě se také uvádí výluh 2M HNO<sub>3</sub> pro monitorování obsahu As v půdách.<sup>21</sup>

**Frakcionační analýzy** jsou sekvenčními extrakcemi, majícími za úkol kvantitativní převedení sloučenin arsenu do roztoku z jednotlivých frakcí půdní matrice. Vzhledem k vazbám, které arsen se složkami půdy tvoří, rozlišujeme labilně vázaný arsen, ke kterému patří adsorbovaná, iontově vyměnitelná a uhličitánová frakce, a arsen stabilně vázaný na oxidy železa a manganu, na organickou hmotu, sulfidy a residuální frakci, obsahující základní hlinitanovou a křemičitanovou matici půdy. Extrakce jsou prováděny postupně, vždy se zbytkem vzorku po přechodím kroku. Základní metoda, získávající informace o obsahu stopových prvků v těchto frakcích, je Tessierova sekvenční extrakce (1979).<sup>23</sup>

Pro frakcionaci arsenu se modifikuje třetí krok Tessierovy sekvenční extrakce tak, aby bylo možné rozlišit vazby na oxidy manganu od amorfních a krystalických oxidů železa. Jednu z úprav použili ve své práci Matera et al. (2003):<sup>22</sup>

1. **Vyměnitelná frakce** – 1M MgCl<sub>2</sub> (pH = 7,0) při pokojové teplotě, 1 hodina
2. **Uhličitánová frakce** – 1M CH<sub>3</sub>COONa (pH = 4,5) při pokojové teplotě, 15 hodin
3. **Oxidy železa a manganu:**
  - A. **Oxidy Mn** – 0,04M NH<sub>2</sub>OH·HCl v 25% CH<sub>3</sub>COOH, 95 °C, 5,5 hod
  - B. **Amorfní oxidy Fe** – 0,2M šťavelan v 0,2M kyselině šťavelové, 4 hod ve tmě

C. **Krystalické oxidy Fe** – 0,2M šťavelan v 0,2M kyselině šťavelové a 0,1M kyselině askorbové, 30 minut ve vařící vodní lázni

4. **Organická hmota a sulfidy** – 0,02M HNO<sub>3</sub> + 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při 85 °C, 5 hodin, následně přídavek 3,2M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> v 20% HNO<sub>3</sub>

5. **Zbytkový podíl** – rozklad směsí HF a HClO<sub>4</sub> v poměru 5:1

Wenzel et al. (2001) zkoušeli extrahovat vzorky půdy činidly, obecně používanými pro sekvenční extrakce kovů, selenu a fosforu. Kvůli nízkým výtěžkům vyřadili NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COONa, NH<sub>2</sub>OH·HCl, EDTA, NH<sub>4</sub>OH a NH<sub>4</sub>F. Jejich finální sekvenční extrakce nakonec obsahovala kroky: <sup>24</sup>

1. **nespecificky sorbovaný As** – 0,05M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 °C, 4 hod

2. **specificky sorbovaný As** – 0,05M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 °C, 16 hod

3. **amorfní oxidy Fe a Al** – 0,2M šťavelan v 0,2M kyselině šťavelové, 4 hod ve tmě

4. **krystalické oxidy Fe a Al** - 0,2M šťavelan v 0,2M kyselině šťavelové a kyselině askorbové, 96 °C, 30 minut

5. **residuální frakce** – mikrovlnný rozklad směsí HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 2.2.4 Stanovení biodostupné/mobilní frakce As

Určování biodostupného, respektive mobilního arsenu, probíhá v podmínkách napodobujících přírodní působení. Jejich účelem není kvantitativní extrakce veškerého arsenu z půdních frakcí, ale pouze arsenu, který je v přírodních podmínkách opravdu mobilní. Vzhledem k faktorům, ovlivňujícím mobilitu a dostupnost arsenu pro rostliny a půdní organismy, jež byly popsány v kapitolách 2.1.3 a 2.1.4, není prakticky možné jednoznačně určit jednu univerzální metodu, která by modelovala množství arsenu, přijatelné všemi druhy rostlin, protože se toto množství pro různé druhy rostlin logicky mění. Přesto bylo již vymyšleno mnoho extrakčních postupů, které mají za úkol identifikovat biodostupný arsen. Tato kapitola se bude těmito metodami detailněji zabývat.

Ellwood et al. (2002) prováděli výzkum extrahovatelnosti specií arsenu z mořských sedimentů. Jako extrakční činidlo použili směs 0,5M kyseliny fosforečné s přídavkem 0,1M NH<sub>2</sub>OH·HCl, jako stabilizačního činidla pro zamezení konverze specií arsenu během extrakce. Výtěžky hodinové extrakce, s následnou separací na aniontové výměnné koloně HPLC s ICP – MS detekcí, se pohybovaly mezi 40 – 75 % celkového obsahu arsenu v sedimentu. Je třeba dodat, že tato práce nebyla zaměřena na stanovení

biodostupné frakce arsenu, ale na co možná nejvyšší výtěžnost As bez změn ve speciaci forem.<sup>25</sup>

Huerga et al. (2005) také prováděli speciaci sloučenin arsenu v říčním sedimentu po extrakci jemnými činidly. V jejich práci byla použita extrakce vodou, pro určení rozpustného arsenu a fosfátovým roztokem, pro iontově vyměnitelnou frakci. Extrakce byla podpořena ultrazvukem. Analýzu prováděli separací na iontově – párové HPLC koloně s HG – AFS detekcí. Vodným výluhem získali přibližně 60 µg/kg As<sup>III</sup> i As<sup>V</sup>, fosfátovým roztokem oproti tomu detekovali až 460 µg/kg As<sup>V</sup>. V práci bohužel chybí informace o celkovém obsahu arsenu, podle kterého by se daly výsledky speciální analýzy porovnávat.<sup>15</sup>

Bergqvist et al. (2014) zkoumali příjem arsenu běžně pěstovanou zeleninou (mrkev, salát, špenát) ve třech typech půdy, různě kontaminované arsenem. Mobilizovatelný arsen v půdě stanovili extrakcí 0,1M HCl. Celkový obsah byl stanoven metodou HG – AAS, speciální analýza proběhla na aniontově výměnné koloně HPLC ve spojení s AAS. Porovnáním extraktů samotné půdy s rhizosférou půdy vyšlo najevo, že půda přiléhající ke kořenům obsahuje až dvojnásobné množství extrahovatelného arsenu. Tento nárůst mohl být způsoben jak kořenovými exudáty rostlin, mezi nimiž převládala kyselina jantarová, tak zvýšenou mikrobiální aktivitou v blízkosti kořenů. Vyšlo také najevo, že příjem arsenu rostlinou není přímo úměrný celkovému množství arsenu v půdě. Přestože byla jedna z půd silně znečištěná arsenem (142 mg/kg), kvůli velkému obsahu jílu (40 – 60 %) a organické hmoty (11 %) nebyla mobilizovatelná frakce arsenu v rhizosféře (4 mg/kg) ani zdaleka tak vysoká, jako v případě méně znečištěné (78 mg/kg) písčité půdy (jíl < 5 %), s nízkým obsahem organické hmoty (2 %). Tato půda obsahovala extrahovatelného arsenu v rhizosféře až 70 mg/kg.<sup>26</sup>

Anawar et al. (2008) se ve své práci snažili odhalit extraktant, který by se výtěžkem arsenu nejvíce přiblížil hodnotám, naměřeným v rostlinách, jež na testované půdě rostly. Byly použity jedнокrokové extrakce následujícími činidly, seřazenými podle vzrůstajícího výtěžku celkového obsahu arsenu v půdě:

- vodný výluh (0,13 % celk. As )
- 1,0M octan sodný v kyselině octové – slabě adsorbovaná a rozpustná frakce (1,2 % celk. As)

- 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – specificky i slabě adsorbovaná a rozpustná frakce (6 % celk. As)
- 0,05M HCl a 0,025M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – frakce vázaná na amorfny oxidy železa a manganu (16 % celk. As)
- 0,04M NH<sub>2</sub>OH·HCl v 25% kyselině octové – frakce vázaná na amorfny oxidy železa a manganu a část arsenu vázaná v krystalové struktuře matrice (32 % celk. As)
- 0,2M šťavelan amonný – frakce vázaná na amorfny a krystalické oxidy železa a manganu (41 % celk. As)

Vzoroky byly měřeny pomocí atomové absorpční spektrometrie. Porovnání výtěžků jednokrokových extrakcí s množstvím nalezeným v rostlinách přineslo zjištění, že nejlépe modeluje biodostupnou frakci extrakce octanem sodným.<sup>27</sup>

Georgiadis et al. (2006) se zaměřili na stabilitu specií arsenu během extrakce fosforečnanovým činidlem. Zjistili totiž, že při použití samotného fosfátu prakticky okamžitě dochází k oxidaci As<sup>III</sup> na As<sup>V</sup>. Přídavek EDTA jako komplexačního činidla, který byl úspěšně použit pro zabránění konverze specií ve vzorcích vod, nepřinesl pozitivní výsledky. Přídavek 1% NH<sub>2</sub>OH·HCl, díky slabým redukčním vlastnostem, oddálil oxidaci As<sup>III</sup> až po dobu 12 hodin extrakce, na druhou stranu ovšem může uvolňovat stabilně vázaný arsen. Nejlepší výsledek byl zaznamenán po použití 10mM fosforečnanu s 0,5% NaDDC (diethyl-dithiokarbamat sodný), který stabilizoval specie po dobu 24 hodin. Pro analýzu využili aniontově výměnnou HPLC kolonu s HG – AFS detekcí.<sup>28</sup>

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

- deionizovaná voda (Millipore Simplicity 185)
- hydrogenfosforečnan sodný (Merck, p. a.)
- dihydrogenfosforečnan sodný (Merck, p. a.)
- hydroxylamin hydrochlorid (Lach:ner p. a.)
- směsný standard As ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , MMA, DMA),  $c = 1 \text{ mg/l}$
- kyselina octová (Merck, p. a.)
- octan amonný (Merck, p. a.)
- amoniak (Merck, p. a.)

### 3.2 Přístroje

- váhy (Navigator <sup>TM</sup>, Ohaus)
- třepačka (GLF 3006)
- centrifuga (Hettich, EBA 20)
- pH metr (UltraBasic, Denver Instrument)
- HPLC (Agilent, 1100 series) – aniontově výměnná kolona Hamilton PRP-X100, mobilní fáze 0,04M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH = 6,0, průtok 0,8 ml/min, nástřik vzorku 20  $\mu\text{l}$
- ICP – MS (Agilent 7500ce ICP-MS, Agilent technologies, Japonsko)
- ICP – MS (Agilent 7700x ICP-MS, Agilent technologies, Japonsko)

### 3.3 Testování extrakčních činidel

Úkolem bylo otestovat před analýzou reálných vzorků účinnost separace forem arsenu na aniontově výměnné koloně HPLC, při použití fosforečnanových extrakčních činidel o různé koncentraci.

#### Postup práce:

#### **0,04M $\text{CH}_3\text{COOH}$**

Mobilní fáze pro kapalinovou chromatografii byla připravena odpipetováním 2,29 ml koncentrované  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do kádinky ( $V = 1000 \text{ ml}$ ), doplněna asi na 900 ml MQ vodou. Pomocí amoniaku bylo pH upraveno na 6,0 a následně roztok doplněn na objem 1000 ml MQ vodou.



### **0,1M fosforečnan (A)**

Zásobní roztok extrakčního činidla byl připraven rozpuštěním 4,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 3,45 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v odměrné baňce ( $V = 250 \text{ ml}$ ) MQ vodou a doplněn po rysku.

### **0,1M fosforečnan + 0,1M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (B)**

Zásobní roztok extrakčního činidla byl připraven stejným způsobem, jako roztok fosforečnanu, pouze bylo v odměrné baňce rozpuštěno ještě 1,74 g  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ .

### **Vlastní měření**

Ředěním zásobních roztoků (A) a (B) byla připravena sada vzorků o koncentracích extrakčních činidel 0,01/0,03/0,05/0,07/0,10M s přídatkem 50  $\mu\text{l}$  směsného standardu arsenových specií. Analýzou na HPLC – ICP – MS byl zkoumán vliv zvyšující se koncentrace fosforečnanu a  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  na účinnost separace arsenových specií a možné spektrální interference argon-chloridových iontů.

## **3.4 Analýza vzorků půd**

### **Popis vzorků:**

- **Půda:** CVM 12 9/2010 – neznečištěná zemědělská půda z okolí cementárny Mokrá, lokalita 12
- **Půda + kal:** PB-3, směs 5 kg půdy CVM 12 a 396 g kalu z čistírny odpadních vod průmyslového provozu zpracovávajícího fosfáty, silně znečištěného arsenem (396 mg/kg). Kal má anorganickou povahu s mírně zásaditým pH a celkovým obsahem uhlíku 1,0 % z hmotnosti kalu.
- **Kompost:** K8 – směs trávy, koňského hnoje a čistírenského kalu v poměru 1:3:6 po osmi týdnech kompostovacího procesu <sup>29</sup>

### **Postup práce:**

#### **Příprava extrakčních činidel**

- MQ voda
- 0,1M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  – rozpuštění 1,93 g octanu amonného ve 250 ml odměrné baňce, doplněné MQ vodou po rysku

- 0,01M fosforečnan – ředěním zásobního roztoku (A)
- 0,01M fosforečnan a 0,01M hydroxylamin hydrochlorid – ředěním zásobního roztoku (B)

### ***Kalibrační závislost***

Ředěním směsného standardu As specií byla do HPLC vialek připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích As od 0,5 do 400,0 µg/l, které byly následně analyzovány společně s půdními extrakty na HPLC – ICP – MS.

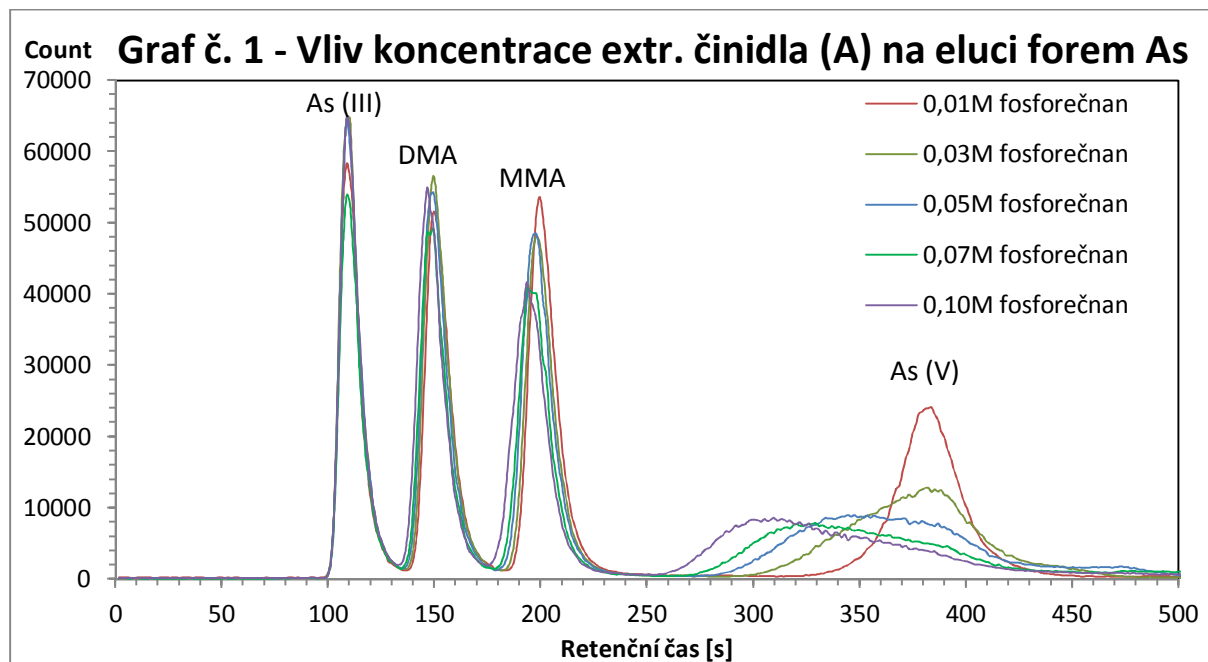
### ***Analýza půd***

Vzorky půd byly v třecí misce lehce rozmělněny a zhomogenizovány. K navážce 1,00 g půdy v polyethylenových centrifugačních zkumavkách bylo přidáno 10,0 ml extrakčního činidla. Jednotlivé typy půd byly extrahovány všemi činidly ve třech opakováních, 5 hodin v třepačce při 150 rpm a následně 10 minut centrifugace při 6000 rpm. Supernatant byl oddělen plastovou injekční stříkačkou a přefiltrován přes 0,45 µm membránový filtr. První část extraktu byla podrobena analýze na HPLC – ICP – MS, druhá byla nejprve okyselena přídatkem koncentrované HNO<sub>3</sub> a následně analyzována na ICP – MS pro porovnání celkového obsahu arsenu v extraktu se součtem jednotlivých specií po separaci na chromatografické koloně.

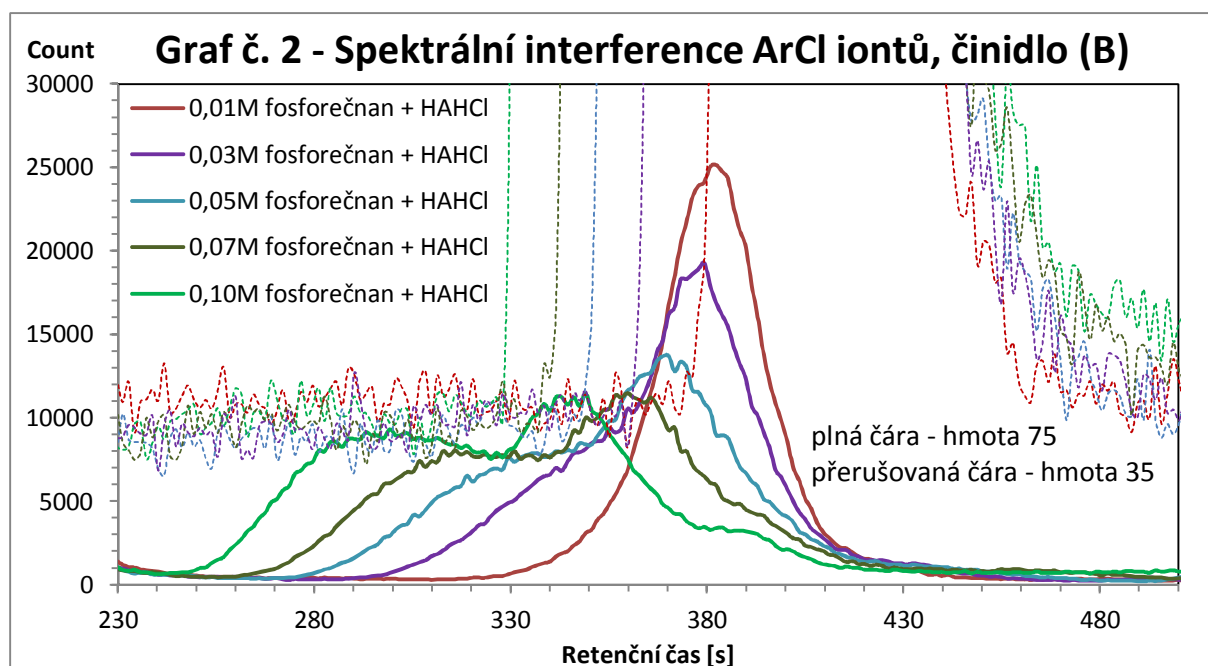
## **4 Výsledky a diskuse**

V první části experimentu byla na základě studia literatury zvolena extrakční činidla pro pozdější analýzu reálných vzorků. Jednalo se o deionizovanou (MQ) vodu, 0,1M octan amonný, který se v laboratořích recetox používá pro rutinní speciální analýzu As v půdách a sedimentech, 0,1M fosforečnan pro mobilizování specificky sorbované frakce arsenu a směs 0,1M fosforečnanu s přídatkem 0,1M hydroxylamin hydrochloridu, který byl v literatuře popsán jako činidlo zamezující oxidaci As<sup>III</sup> na As<sup>V</sup> během extrakce.<sup>28</sup> Protože se s fosforečnanovým extraktem na koloně Hamilton PRP-X100 s 0,04M kyselinou octovou jako mobilní fází ještě nepracovalo, bylo nutné zjistit jeho vliv na separaci forem arsenu. Jak je vidět na grafu č. 1, nárůst koncentrace fosforečnanu způsobil rozšíření zóny arseničnanového píku. Důvodem je zřejmě zaplnění aktivních míst aniontově výměnné kolony konkurenčními fosforečnanovými

ionty.  $\text{As}^{\text{V}}$  je v takovém případě méně zadržován v koloně a je z ní vymýván z určité části už společně s fosforečnanem. Ostatní formy arsenu fosforečnanové činidlo neovlivňuje.



Stejné rozmytí je patrné na grafu č. 2, který znázorňuje jen arseničnanový pík při použití směsi fosforečnanu s hydroxylamin hydrochloridem. Kromě rozmytí je zde ale patrná také spektrální interference argon-chloridových iontů (hmota 75). Přerušované čáry zobrazují eluční časy chloridových iontů (hmota 35), které jasně odpovídají časům interferencí. Vzhledem k výsledkům analýzy byla pro extrakci vzorů půd vybrána fosforečnanová činidla o koncentraci 0,01M.



V druhé části experimentu byla provedena speciální analýza vybraných půd čtyřmi extrakčními činidly. Mezní hodnoty pro detekci a kvantifikaci forem arsenu (tab. 1) byly určeny z poměrů velikostí signálů specií a šumu, v případě limitu detekce (LOD) 3:1, kvantifikace (LOQ) 10:1.

*Tabulka č. 1: Limity detekce a kvantifikace jednotlivých specií As*

[mg/kg]	As(III)	DMA	MMA	As(V)
<b>LOD</b>	0,002	0,002	0,002	0,004
<b>LOQ</b>	0,007	0,005	0,006	0,012

Druhá tabulka zobrazuje celkové obsahy arsenu v lučavkovém výluhu použitých půd a frakci mobilizovanou 0,1M octanem amonným. Měření (1) bylo provedeno Mgr. Blankou Maňákovou (2011), hodnoty (2) byly pro porovnání zjištěny v naší práci (2014). Extrakce octanem amonným od sebe dělí zhruba 3 roky, přesto jsou hodnoty srovnatelné, ukazující na fakt, že se v době skladování vzorků mobilizovatelná frakce nijak významně nezměnila.

*Tabulka č. 2: Celkový obsah arsenu v půdách*

vzorek	lučavka (1) [mg/kg]		NH <sub>4</sub> Ac (1) [mg/kg]		NH <sub>4</sub> Ac (2) [mg/kg]	
	obsah	SD	obsah	SD	obsah	SD
<b>půda</b>	9,3	0,1	0,038	0,002	0,027	0,003
<b>půda + kal</b>	30	13	0,78	0,01	0,84	0,04
<b>kompost</b>	285	17	3,74	0,07	3,52	0,11

Tabulky č. 3 – 5 obsahují srovnání celkového množství arsenových specií, které byly detekovány metodou HPLC – ICP – MS, s hodnotou celkového obsahu arsenu v extraktu, stanoveného bez separačního kroku na ICP – MS (výťažnost separace). Hodnoty obsahů jednotlivých forem As byly sníženy o hodnoty blanků. V případě půdy a půdy s příměsí kalu byla množství As<sup>III</sup>, MMA a DMA ve všech případech pod limity kvantifikace, jako celkový stanovený arsen je proto brán pouze As<sup>V</sup>, u kompostu je použita suma kvantifikovatelných forem, které jsou vidět v tabulce č. 6. Výťažností

extrakce je myšlen poměr vyextrahovaného arsenu k hodnotě celkového obsahu v lučavkovém výluhu. Hodnoty výtěžností extrakce MQ vodou a octanem amonným se od sebe příliš neliší. Fosforečnanová činidla vyextrahovala až desetkrát více arsenu než MQ voda a octan, což ukazuje na velké množství specificky iontově vázaného arsenu. Tento extraktant by mohl být používán pro identifikaci maximálního množství potenciálně labilního arsenu, zatímco octan amonný reprezentuje mobilní frakci za velmi mírných podmínek. Pro takovéto závěry je ale třeba dalšího výzkumu, založeného na porovnání výluhů půdy s akumulovaným množstvím arsenu v rostlinách na ní rostoucích.

Tabulka č. 3: Extrakce vzorku půdy

půda	As(V) [mg/kg]		celk. As (ICP-MS) [mg/kg]		výtěžnost separace [%]	výtěžnost extrakce [%]
	obsah	SD	obsah	SD		
MQ	0,0258	0,0009	0,038	0,003	68,1	0,3
octan amonný	0,017	0,003	0,027	0,003	63,3	0,2
fosforečnan	0,15	0,01	0,180	0,009	85,6	1,7
fosforečnan + HAHCl	0,21	0,01	0,222	0,003	94,2	2,2

Tabulka č. 4: Extrakce vzorku půdy smíšené s kalem

půda + kal	As(V) [mg/kg]		celk. As (ICP-MS) [mg/kg]		výtěžnost separace [%]	výtěžnost extrakce [%]
	obsah	SD	obsah	SD		
MQ	0,74	0,03	0,72	0,03	102,7	2,5
octan amonný	0,82	0,08	0,84	0,04	97,0	2,7
fosforečnan	5,1	0,1	5,3	0,2	95,7	16,9
fosforečnan + HAHCl	5,4	0,4	5,3	0,6	100,8	18,0

Tabulka č. 5: Extrakce vzorku kompostu

kompost	suma specií As [mg/kg]	celk. As (ICP-MS) [mg/kg]		výťažnost separace [%]	výťažnost extrakce [%]
		obsah	SD		
MQ	3,19	3,19	0,06	100,0	1,1
octan amonný	3,44	3,52	0,11	97,6	1,2
fosforečnan	36,1	34,1	0,2	105,7	12,7
fosforečnan + HAHCi	31,5	27,2	0,3	115,6	11,1

Vzorek kompostu byl jediným, ve kterém se podařilo kvantifikovat i jiné formy arsenu, než je As<sup>V</sup>. Díky mikrobiálnímu působení zde byly stanoveny methylované formy arseničnanů, DMA všemi extrakčními činidly, MMA ve fosforečnanových extraktech. Přestože byl přídavek hydroxylamin hydrochloridu použit pro stabilizaci forem arsenu během extrakce, není vidět výrazný nárůst koncentrace As<sup>III</sup> oproti snížení výtěžku As<sup>V</sup> v tomto výluhu. V průběhu extrakce tedy nedocházelo k redoxním změnám. Na tomto vzorku je vidět, že výluh MQ vodou extrahoval podstatně méně As<sup>III</sup>, než ostatní činidla. Výťažnost As<sup>V</sup> octanem amonným je srovnatelná s MQ vodou, na rozdíl od ní ale octan extrahuje stejné množství As<sup>III</sup> jako fosforečnanová činidla, což ukazuje na fakt, že je As<sup>III</sup> nespecificky vázán na matrici půdy. Zatímco DMA má výtěžnost srovnatelnou všemi činidly, MMA se zdá být silněji sorbovaná na matrici půdy.

Tabulka č. 6: Speciace forem As ve vzorku kompostu

kompost	As(III) [mg/kg]		DMA [mg/kg]		MMA [mg/kg]		As(V) [mg/kg]	
	obsah	SD	obsah	SD	obsah	SD	obsah	SD
MQ	0,009	0,003	0,0093	0,0003	< 0,006	-	3,17	0,20
octan amonný	0,201	0,009	0,0097	0,0001	< 0,006	-	3,22	0,09
fosforečnan	0,191	0,004	0,0091	0,0024	0,0085	0,0006	35,9	2,7
fosforečnan + HAHCi	0,201	0,005	0,0113	0,0007	0,0092	0,0006	31,3	3,1

## 5 Závěr

V teoretické části práce byl shrnut výskyt a osud forem arsenu v životním prostředí, spolu s možnými dopady jeho zvýšené expozice na lidské zdraví. Také byly diskutovány způsoby stanovení obsahu arsenu ve vzorcích půd a sedimentů, a to jak zaměřené na celkový obsah arsenu, tak na speciální a biodostupnou frakci.

Z dostupné literatury je zřejmé, že množství mobilního arsenu je různé v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech půdy, stejně jako na typech vegetace, které na znečištěné půdě rostou. Uvažovat o jednom extrakčním postupu, který by jasně modeloval veškerý biodostupný arsen pro všechny typy půd a rostlin, je proto složité. Je ale možné navrhnout metodu, která bude toto množství modelovat přesněji, než jak ho v této době určuje výluh lučavkou královskou.

Experimentální část byla zaměřena na otestování jednokrokových extrakčních postupů, majících za úkol mobilizovat frakci arsenu dostupnou pro rostliny a půdní organismy. Extrakce MQ vodou a 0,1M octanem amonným mobilizovala 0,2 – 3,0 % arsenu v porovnání s výluhem lučavkou královskou. Extrakce fosforečnanovými činidly díky iontové výměně mobilizovala 1,7 – 18,0 % celkového obsahu arsenu. Octan amonný by mohl reprezentovat okamžitě dostupný arsen v půdách a fosfátový roztok modelovat reálně dostupný arsen při působení přírodních podmínek.

V průběhu extrakce nedocházelo k transformaci forem arsenu, vzhledem k stejným výtěžkům, které byly zaznamenány při použití fosforečnanu s přídavkem hydroxylamin hydrochloridu i bez něj. Extrakce MQ vodou a octanem amonným poskytovaly srovnatelné výsledky až na to, že octan mobilizoval výrazně větší množství  $As^{III}$  z kompostu. Porovnáním s daty Mgr. Maňákové bylo zjištěno, že se frakce arsenu extrahovatelná octanem amonným nezměnila během doby, po kterou byly vzorky ve vysušeném stavu uchovány.

Do budoucna by bylo vhodné korelovat obsahy arsenu v rostlinkách hořčice, která byla pěstována na půdách s přídavky čistírenského kalu, s množstvím arsenu ve výluzích půdy slabými extrakčními činidly (MQ, octan, fosforečnan, atd.) pro ověření jejich schopnosti (nebo neschopnosti) modelovat biodostupnou frakci arsenu.

## 6 Seznam literatury

- (1) Toužín, J. *Stručný přehled chemie prvků*. V Tribunu EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, **2008**, 225 s. ISBN 978-80-7399-527-0.
- (2) Pertold, Z. Arzen v životním prostředí. *Časopis Vesmír*, **1998**, 77, 323, dostupné z: <http://vesmir.cz/clanek/arzen-v-zivotnim-prostredi> (accessed Apr 21, 2014).
- (3) <http://www.arnika.org/arsen> (accessed Apr 21, 2014).
- (4) Moreno-Jimenez, E.; Esteban, E.; Penalosa, J. M. *Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol 215* **2012**, 215, 1–37.
- (5) Saha, J. C.; Dikshit, A. K.; Bandyopadhyay, M.; Saha, K. C. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1999**, 29, 281–313.
- (6) Fitz, W. J.; Wenzel, W. W. *J. Biotechnol.* **2002**, 99, 259–278.
- (7) Lee, B.-T.; Lee, S.-W.; Kim, K.-R.; Kim, K.-W. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, 20, 8326–8333.
- (8) Lee, B.-T.; Kim, K.-W. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, 27, 2488–2495.
- (9) Taboada-de la Calzada, A.; Villa-Lojo, M. C.; Beceiro-González, E.; Alonso-Rodríguez, E.; Prada-Rodríguez, D. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, 167–175.
- (10) Heumann, K. G. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*; John Wiley & Sons, 2004.
- (11) Hansen, S.; Larsen, E.; Pritzl, G.; Cornett, C. *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, 7, 629–634.
- (12) Hakala, E.; Pyy, L. *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, 7, 191–196.
- (13) Yuan, C.-G.; He, B.; Gao, E.-L.; Lue, J.-X.; Jiang, G.-B. *Microchim. Acta* **2007**, 159, 175–182.
- (14) Montperrus, M.; Bohari, Y.; Bueno, M.; Astruc, A.; Astruc, M. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 347–354.
- (15) Huerga, A.; Lavilla, I.; Bendicho, C. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 534, 121–128.
- (16) Gallardo, M. V.; Bohari, Y.; Astruc, A.; Potin-Gautier, M.; Astruc, M. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 441, 257–268.
- (17) Beauchemin, D.; Siu, K.; McLaren, J.; Berman, S. *J. Anal. At. Spectrom.* **1989**, 4, 285–289.
- (18) Hamon, R. E.; Lombi, E.; Fortunati, P.; Nolan, A. L.; McLaughlin, M. J. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 1794–1798.
- (19) Chen, Z.; Akter, K. F.; Mahmudur, M.; Rahman; Naidu, R. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 2671–2676.
- (20) Liu, Y.; Lopez-Avila, V.; Zhu, J. J.; Wiederin, D.; Beckert, W. F. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2020–2025.
- (21) Mitra, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; Wiley, 2004.
- (22) Matera, V.; Le Hécho, I.; Laboudigue, A.; Thomas, P.; Tellier, S.; Astruc, M. *Environ. Pollut.* **2003**, 126, 51–64.
- (23) Tessier, A.; Campbell, P.; Bisson, M. *Anal. Chem.* **1979**, 51, 844–851.
- (24) Wenzel, W. W.; Kirchbaumer, N.; Prohaska, T.; Stinger, G.; Lombi, E.; Adriano, D. C. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 436, 309–323.
- (25) Ellwood, M. J.; Maher, W. A. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 477, 279–291.
- (26) Bergqvist, C.; Herbert, R.; Persson, I.; Greger, M. *Environ. Pollut.* **2014**, 184, 540–546.
- (27) Anawar, H. M.; Garcia-Sanchez, A.; Santa Regina, I. *Chemosphere* **2008**, 70, 1459–1467.
- (28) Georgiadis, M.; Cai, Y.; Solo-Gabriele, H. M. *Environ. Pollut.* **2006**, 141, 22–29.



- (29) Maňáková, B. Možnosti snížení rizikovosti arsenu v problematických kalech, **2011**, diplomová práce, MUNI, Brno.  
Dostupné z [https://is.muni.cz/auth/th/211127/prif\\_m/Manakova\\_DP.pdf](https://is.muni.cz/auth/th/211127/prif_m/Manakova_DP.pdf)

## **7 Použité symboly a zkratky**

<b>MMA</b>	monomethyl arseničná kyselina
<b>DMA</b>	dimethyl arseničná kyselina
<b>HAHCl</b>	hydroxylamin hydrochlorid
<b>DOC</b>	rozpuštěný organický uhlík
<b>MQ</b>	ultračistá voda, typ 1
<b>rpm</b>	počet otáček za minutu
<b>LOD</b>	limit detekce
<b>LOQ</b>	limit kvantifikace
<b>SD</b>	směrodatná odchylka