

Současné stanovení toxických a esenciálních iontů těžkých kovů

Teoretická část: metody pro stanovení těžkých kovů, jejich instrumentace, výhody a nevýhody různých postupů pro přípravu vzorků.

Praktická část: elektrochemická analýza zinečnatých, olovnatých, kademnatých a měďnatých iontů.

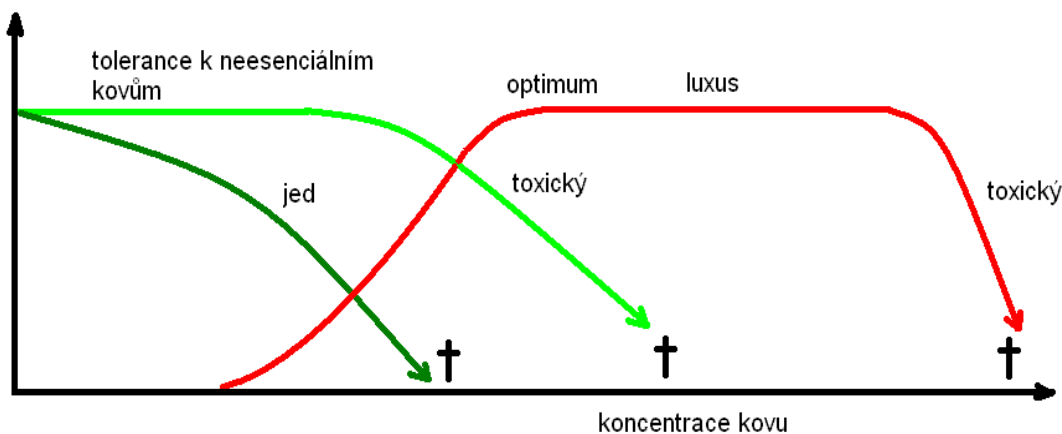
I. ÚVOD

1. Těžké kovy

Těžké kovy ($\rho > 5 \text{ g.cm}^{-3}$) jsou přírodní složkou Zemské kůry. Nemohou být degradovány na jednodušší látky ani zničeny. Podle vlivu na lidský organismus dělíme těžké kovy vstupující do potravních řetězců všech živých organismů na dvě skupiny: toxické a esenciální [2].

1.1 Esenciální těžké kovy

Esenciální těžké kovy jsou pro mnoho organismů nezbytné pro život. Vyskytují se jako složky mnoha enzymů a proteinů. Je důležité upozornit, že vysoké koncentrace esenciálních těžkých kovů mají za určitých podmínek toxické účinky stejně jako jejich nedostatek (Obr. 1).



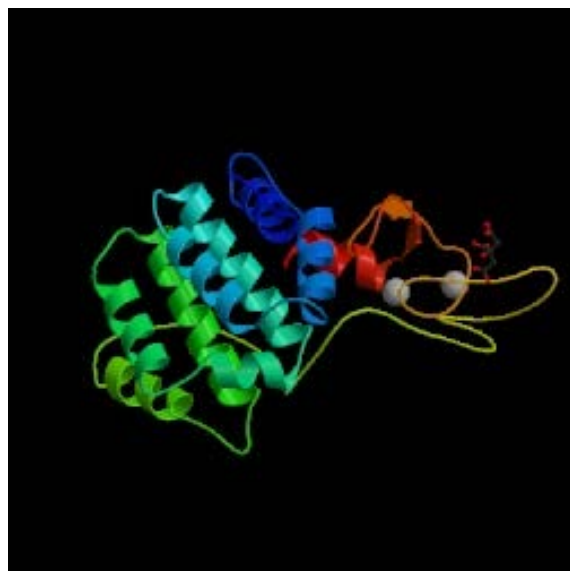
Obrázek 1.: Na organismy působí ionty kovů – 1. toxicky (takové látky označujeme jako jedy). Již velmi nízká koncentrace vyvolá závažnou, většinou nevratnou negativní metabolickou změnu, která vede ke smrti organismu (tmavě zelená). 2. chronicky (světle zelená). Méně toxické ionty kovů vyvolávají v organismech závažné negativní metabolické změny (nemusí končit smrtí organismu). U iontů kovů, které jsou potřebné pro organismus (esenciální), pozorujeme nejdříve pozitivní zvyšování metabolické aktivity, až do koncentrace optima. Při dalším zvyšování koncentrace kovu nedochází ke změně metabolické aktivity (fáze nadbytku – luxusu). V určité koncentraci kovu však dochází k prudké negativní metabolické aktivitě (červená).

Mezi esenciální těžké kovy se zpravidla řadí kobalt, měď, železo, mangan, molybden, nikl, selen, vanad a zinek. Měďnaté ionty slouží jako součást aktivních center některých enzymů. Měď je také nezbytná pro efektivní využití železa a pro biosyntézu některých fyziologicky významných sloučenin. Hořčík je součástí listového barviva chlorofylu. Mangan významně ovlivňuje oxidačně-redukční procesy při přeměně dvojmocného železa na železo trojmocné. A jedním z nejzajímavějších a nejstudovanějších esenciálních těžkých kovů je zinek [3].

1.1.1 Zinek

Čerstvě připravený zinek je stříbřitý s namodralým leskem, který rychle na vlhkém vzduchu ztrácí. Je to relativně měkký kov, snadno reaguje s anorganickými kyselinami i s organickými látkami. Ve sloučeninách se vyskytuje ve stavu Zn(II) [2].

Obsah zinku v zemské kůře je 68 ppm. Je to chalkofilní prvek, který se v redukční atmosféře, která převládala při tuhnutí zemské kůry, vyloučil jako sfalerit (nebo vzácněji jako wurtzit) ZnS. Vlivem povětrnostních podmínek došlo později k vyluhování části zinku a k jeho vysrážení ve formě uhličitanu ZnCO₃ (kalamín), křemičitanu nebo fosforečnanu [2].



Obrázek 2.: Lidský zinkový prst
FYVE, www.expasy.org.

Zinek je esenciální pro většinu organismů a zároveň je druhým nejčastěji se vyskytujícím přechodným kovem v jejich tělech. Je známo, že lidské tělo obsahuje průměrně 2 g tohoto kovu. Nejvíce distribuován je krvi, játrech, ledvinách, kostech a mozku. Zinek je kofaktorem pro více než 300 enzymů anebo metaloproteinů, přičemž celkový seznam proteinů obsažených v lidském těle, které ve své molekule obsahují tento kov, obsahuje více než tři tisíce záznamů. Tyto zinek-obsahující proteiny a enzymy hrají mnoho důležitých, biologicky významných rolí v mitotickém buněčném dělení, syntéze proteinů, DNA a RNA syntéze atd. [4,5]. Mezi jedny z nejdůležitějších enzymů obsahujících tento esenciální těžký kov patří karboxypeptidasa A (katalyzuje v procesu trávení hydrolýzu koncové peptidické vazby v bílkovinách) a karbonatdehydratasa (existuje v několika formách a je značně rozšířena rostlinách i zvířatech) [3]. Je zcela nezbytné zmínit také zinkové prsty, což je doména v proteinech, která je schopna se vázat na DNA (Obr. 2). Skládá se ze dvou antiparalelních β řetězců a α helixu. Struktura každého zinkového prstu je vysoce konzervativní a obsahuje okolo 30 aminokyselinových zbytků, které mají ve svém středu zinek [3,4].

Díky všem svým funkcím je zinek naprosto nezbytný pro správný růst a vývoj organismu [5]. V roce 1961 byla poprvé publikována práce, kde bylo popsáno, že nedostatek zinku způsobuje u lidí zakrslost a zpomalený fyzický a sexuální vývoj [6]. Dnes je všeobecně známo, že nedostatek zinku způsobuje poškození imunitního systému, nepříznivě ovlivňuje růst těla a sexuální vývoj, a že vede k poruchám čichových a chuťových vjemů. Také je velmi zajímavá a stále ne zcela objasněná je role tohoto prvku v mozku, kde je nejvíce zastoupeným kovem [4,7,8].

1.2 Toxické těžké kovy

Toxicita je vlastnost, která vyjadřuje míru škodlivosti (jedovatosti) dané látky na živý organismus, resp. na jeho části. Míra toxicity pro organismus závisí na dávce látky, velikosti organismu, na způsobu vstupu do organismu, délky expozice, metabolismu aj. [3].

Toxické těžké kovy jsou obecně charakteristické svou vysokou nebezpečností pro organismy a představují jednu z nejvýznamnějších skupin škodlivých látek. V prostředí se vyskytují přirozeně a nebo mohou být původu antropogenního tj., že jsou produkovány působením člověka. Toxickými těžkými kovy pro člověka jsou nejčastěji označovány arsen, kadmium, olovo a rtuť [2,3].

1.2.1 Kadmium

Kadmium (Cd) je stříbřitý chalkofilní kov, v anorganických i organických sloučeninách se vyskytuje v oxidačním stupni +2. S organickými sloučeninami tvoří mnoho komplexů (např. thiokarbamáty). Obsah kadmia v zemské kůře je 0.16 ppm (např. minerál greenockitu – CdS) [2].

Kadmium je poměrně vzácný prvek a nemá esenciální podobu v žádném živém organismu, proto je i jeho malá koncentrace pro organismus toxická (tolerovaná denní dávka kadmia pro dospělého člověka činí 67 – 83 μg , zatímco LD50 je 88 mg/kg při orálním podání CdCl₂ pro krysou). Má podobnou elektronegativitu a podobné chemické vlastnosti jako esenciální těžký kov zinek a to způsobuje, že se toxicita kadmia projevuje výhradně tehdy, když nahrazuje zinek v životně důležitých proteinech (zinkové prsty). K tomu přispívá i stejný mechanismus

příjmu a transportu těchto dvou kovů v organismu. Iontový poloměr Zn (0.074 nm) je však nižší než iontový poloměr Cd (0.097 nm), a to při společném vstupu kovů ulehčuje Zn, aby přednostně obsadil cílová místa v proteinech, a tím celkově snižoval toxicitu kadmia [9].

Od začátku padesátých let minulého století se pozornost široké vědecké veřejnosti zaměřila na studium toxicity kadmia a nebezpečnosti jeho akumulace pro lidskou populaci. Kadmium je označován jako kumulativní jed, jehož obsah se zvyšuje se stoupajícím věkem živého organismu. Nejvíce zasaženým orgánem jsou ledviny [10]. Při dosažení kritického koncentrace může dojít až k selhání tohoto orgánu. Ačkoliv některé studie ukazují, že tyto efekty jsou reversibilní v případě krátkého vystavení tomuto kovu a následnému snížení jeho koncentrace [11]. Kromě výše zmíněné poruchy funkce ledvin může kadmium způsobovat průjemy, bolesti žaludku, zvracení, zvýšenou lámavost kostí, narušení reprodukce a v některých případech i neplodnost, poškození nervového a imunitního systému, psychické nemoci a pravděpodobně poškozuje DNA [3,12,13]. Jeho vliv na vývoj rakoviny je studován [14,15].

Pro nekuřáky je největším zdrojem kadmia potrava. Je to hlavně způsobeno přítomností stopových množství tohoto prvku v potravinách například z důvodu používání fosfátových hnojiv. Mezi potraviny s nejvyšším obsahem tohoto toxického prvku patří houby, měkkýši a kakao. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je průměrný denní příjem kadmia 10-25 μg na den a osobu, což je přibližně čtyřikrát méně, než je doporučená denní dávka. Je nezbytné zmínit, že se tato dávka může měnit v závislosti na místě a průmyslové výrobě v dané oblasti.

1.3 Metody pro stanovení těžkých kovů

Pro studium těžkých kovů je nyní využíváno mnoho analytických metod od spektrofotometrických až po elektrochemické. Nejrozšířenější metodou pro stanovení těžkých kovů je v nynější době atomová absorpční spektrometrie (AAS), která je používána pro široké spektrum biologických a environmentálních vzorků [16-22]. A navíc byl nedávno publikován souhrnný článek popisující využití průtokové injekční analýzy ve spojení s AAS ke stanovení stopových množství těžkých kovů [23]. Mezi metody využívající pro detekci těžkých kovů

indukčně vázaného plazmatu patří hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) [24-27] a optická emisní spektrometrie (ICP-OES) [26,28-30]. Metody ICP-MS využil například Ayrault *et. al.* pro detekci těžkých kovů v ovzduší [31] nebo Lee *et. al.* pro studium environmentálních vzorků [32]. Naopak de la Rosa *et. al.* využili techniku ICP-OES pro velmi citlivé stanovení iontů kadmia [33]. Výhody a nevýhody ICP-MS a ICP-OES byly shrnuty a porovnány Grotiim *et. al.* [34]. Kromě klasických metod spektrálních se stále častěji prosazují velmi citlivé, rychlé a levné metody elektrochemické. Jednou z nejcitlivějších analytických metod pro analýzu kovů je diferenční pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie (DPASV) [35-42]. Mezi nejnovější elektrochemické metody, které jsou využívány pro stanovení kovů, je odčítací anodická rozpouštěcí voltametrie [43]. Výše uvedené metody využívají jako pracovní elektrodu převážně visící rtuťovou kapkovou elektrodu, ovšem lze také využít speciální elektrody jako např. bizmutovou elektrodu [37,41,44] a uhlíkovou elektrodu, která se využívá pro detekci platinových cytostatik [45].

Nedávno bylo publikováno několik prací popisujících stanovení těžkých kovů pomocí biosenzorů založených na interakci těžkého kovu s DNA [46-50], enzymem (především ureasou, kde se detekuje snížení aktivity enzymu) [51-54], bakterií [55,56] a proteinem [57-60]. Wu a Lin publikovali práci popisující využití metalothioneinu pro konstrukci proteinového biosenzoru detekujícího těžké kovy [57,61-65].

2. Elektrochemické metody

Vysoce citlivé, rychlé a selektivní metody detekce anorganických i organických látek ve složité biologické matici jsou metody elektrochemické, elektroanalytické [66,67]. Podstatou elektrochemických metod je studium závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkují jeho spojení s měřicím přístrojem, který sleduje některé z elektrických veličin (proud I , potenciál E , vodivost G , elektrický náboj Q , kapacitu C , aj. [66,67].

2.1 Voltametrie a polarografie

Voltametrie a polarografie jsou elektrochemické metody založené na sledování intenzity proudu na velikosti proměnlivého vloženého napětí vkládaného mezi pracovní (polarizovatelnou) a referentní (nepolarizovatelnou) elektrodu – dvouelektrodové zapojení. Z důvodu eliminace rušivých elementů plynoucích z dvouelektrodového zapojení (např. proudového zatížení referentní elektrody) se v dnešní době používá kromě pracovní a referentní i elektroda pomocná – tříelektrodové zapojení. Na pracovní elektrodě probíhá elektrodový proces, který sledujeme. Jako pracovní elektrody se nejčastěji používají rtuťové (DME – kapající rtuťová elektroda, HMDE – visící rtuťová kapková elektroda) anebo pevné (uhlíkové – pastová uhlíková elektroda, elektroda ze skelného uhlíku a elektroda z pyrolytického uhlíku; kovové – zlatá, stříbrná apod.). Potenciál pracovní elektrody je kontrolovaný vůči elektrodě referentní s konstantním potenciálem. Vlastní referentní elektroda je od měřeného roztoku oddělena solným můstkem se zatavenou hustou skleněnou fritou. Nejvíce používanou referentní elektrodou v dnešní době je elektroda argentchloridová ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$). Proud protéká elektrodami pomocnou a pracovní. Pomocná elektroda je převážně z ušlechtilého kovu (Au, Ag, Pt). Metody, kde se stále využívá rtuťové kapkové elektrody, se nazývají polarografické [66,67].

Roztokem neprochází proud, pokud zkoumaný vzorek neobsahuje elektroaktivní látku, tzv. depolarizátor, který se v daném potenciálovém rozsahu oxiduje nebo redukuje. Přítomnost depolarizátoru se při určitém potenciálu projeví zvýšením proudu. Elektrodové děje (oxidace anebo redukce) způsobují změny jen ve velmi těsné blízkosti povrchu polarizovatelné elektrody. Samotný elektrodový proces zahrnuje děje, které jsou spojeny s transportem elektroaktivní látky (analytu) k elektrodě, vlastním elektrodovým dějem a vylučováním produktu na elektrodě, případně jeho transportem od elektrody [66-68]. Transport elektroaktivní látky je ke elektrodě zprostředkován třemi pochody:

- Difúzí, která je řízena koncentračním spádem v těsné blízkosti elektrody. Koncentrační spád je vyvolán úbytkem elektroaktivní látky u povrchu elektrody způsobeným jejím vylučováním na elektrodě.

- Migrací, kterou vyvolává elektrické pole mezi elektrodami svým působením na nabitě částice.
- Konvekcí, kterou je tok částic vyvolaný mícháním.

Cílem elektrochemické detekce je zjištění koncentrace elektroaktivní látky. Z tohoto důvodu je sledována především difúze, která na ní závisí, a naopak potlačena migrace elektroaktivní látky. Přidáme-li do zkoumaného roztoku nosný (indiferentní) elektrolyt v koncentraci asi stokrát převyšující koncentraci elektroaktivní látky, převážnou část náboje přenášejí ionty nosného elektrolytu a migrace elektroaktivní látky je zanedbatelně malá. Současně je tím významně snížen elektrický odpor roztoku. Dále je nezbytné před samotným měřením odstranit z nosného elektrolytu veškerý kyslík, protože jeho vylučování na povrchu elektrody znemožňuje detekci ostatních elektroaktivních látek přítomných v roztoku, protože se sám zúčastňuje elektrodové reakce. Odstranění kyslíku se provádí probubláváním roztoku inertním plynem (např. dusík, argon) [66,67,69].

Dosáhne-li potenciál polarizované elektrody hodnoty rozkladného potenciálu elektroaktivní látky, kdy začne její vylučování, snižuje se koncentrace této látky na povrchu elektrody v důsledku elektrodové reakce. Vylučovat se může jen ta látka, která se nachází těsně u povrchu elektrody, a tam se dostane difúzí (migraci eliminuje přítomnost nosného elektrolytu). Proto je procházející proud označován jako difúzní. Zvyšuje-li se dále vložené napětí, narůstá vylučování elektroaktivní látky. Tento růst nastává pouze potud, pokud se nezačne vylučovat každá částice elektroaktivní látky, která je k povrchu elektrody difúzí transportována. Tím klesne koncentrace elektroaktivní látky u povrchu elektrody na nulovou hodnotu. Zvyšování napětí již neurychluje její vylučování, protože tato látka u povrchu elektrody prostě není. Proud dosáhl hodnoty limitního difúzního proudu. Jeho velikost je určena rychlostí difúze elektroaktivní látky k povrchu elektrody. Elektroda se polarizovala koncentrační polarizací [66,67].

Proudová odezva při aplikaci pulsu se skládá ze dvou složek:

1. kapacitní proud (IC) – je potřebný k vytvoření elektrické dvojrvtvy na rozhraní rtu' – roztok. Tento proud nesouvisí s přeměnou elektroaktivní látky. U DME dochází k neustálému obnovování povrchu, a proto se musí každá kapka nabít na daný potenciál a tak vzniká kapacitní

proud, který je funkcí vloženého potenciálu, velikosti povrchu kapky a povahy základního elektrolytu. Tento proud snižuje citlivost měření.

2. difúzní proud (ID) – má faradaický charakter a je rozhodující pro stanovení koncentrace depolarizátoru. Jeho velikost je dána: velikostí náboje vyměňovaného mezi polarizovanou elektrodou a roztokem za jednotku času, počtem elektronů vyměňovaných v elektrodové reakci, koncentrací depolarizátoru a rychlostí jeho přenosu z roztoku na povrch elektrody [69].

2.2 Diferenční pulzní polarografie a voltametrie

Při diferenční pulzní polarografii (DPP) a voltametii (DPV) jsou na lineární potenciálovou rampu aplikovány pulsy s konstantní amplitudou. Měřený signál odpovídá rozdílu proudů (ΔI), které jsou měřeny v krátkých intervalech, a to před začátkem napěťového pulsu a těsně před koncem napěťového pulsu. U DPP má závislost proudu na napětí tvar píku. Při DME je doba kapky seřízená na určitý čas kratší než přirozená doba kapky. Délka doby kapky se užívá obvykle 2 až 3 s. Puls je vložen na kapku ve stejnou dobu jejího trvání. Je nutné použít co nejkratší dobu k měření, aby byla získána co největší proudová odezva, ale současně dostatečně dlouhou dobu, aby kapacitní proud byl nízký. Doba pulsu se využívá řádově desítky ms. Další charakteristikou je tzv. doba předpolarizace, což je doba odkápnutí předešlé kapky do vložení pulsu. Velikost amplitudy se v praxi obvykle používá 5 až 100 mV [66,67].

2.3 Rozpouštěcí voltametrie

Stanovení elektroaktivních složek se provádí nikoliv při jejich vylučování na polarizovatelné elektrodě, ale naopak při jejich elektrolytickém rozpouštění [66,67,69]. Rozpouštěcí voltametrie probíhá ve třech krocích:

1. depozice: při elektrolytickém nahromadění se vylučují stanovované látky na elektrodě. Provádí se za intenzivního míchání při konstantním potenciálu (potenciál depozice) odpovídajícímu limitnímu proudu stanovované látky. Ionty se dostávají k povrchu elektrody konvekcí, proto je limitní proud podstatně vyšší než v nemíchaném roztoku. Nahromadění

probíhá dobu, která závisí na obsahu stanovované složky v roztoku (řádově desítky sekund až desítky minut).

2. čas depozice: míchání se vypne ale na elektrodu je stále vkládán potenciál depozice. Přisun elektroaktivní látky k elektrodě konvekcí přestane a elektrodě je připravena k měření. Tato fáze trvá 10 – 20 s.

3. rozpouštění: v posledním kroku probíhá vlastní rozpouštění nahromaděných produktů elektrolýzy na povrchu pracovní elektrody lineární změnou potenciálu a zaznamenává se proudová odezva. Dochází zde ke změně polarizace elektrody.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Chemikálie

- 1) Připravíme si zásobní roztoky $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , CdCl_2 a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $10 \mu\text{M}$ do 100 ml odměrných baněk. Chemikálie v ACS čistotě ředíme pomocí MiliQ vody.
- 2) Ze zásobního roztoku připravíme **pracovní roztoky** o koncentraci 0.001, 0.01, 0.1, 1 a $5 \mu\text{M}$ do 25 ml odměrných baněk pro každý kov samostatně. Roztoky ředíme pomocí MiliQ vody.
- 3) Dále vytvoříme tzv. **směsný standard** o koncentraci $1 \mu\text{M}$ do 25 ml odměrné baňky, kde budou obsaženy všechny detekované kovy.
- 4) Acetátový pufr o molární koncentraci 0.2 M připravíme z CH_3COOH a CH_3COONa o různých pH hodnotách (4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0). Roztoky (100 ml) připravíme z chemikálií o ACS čistotě a MiliQ vody. K přípravě roztoků o různé pH využijeme Laboratorní příručku autorů Klikorka a Zátka (na žádost poskytnete cvičící).

4. Přístroj

Roztoky jsou analyzovány metodou diferenční pulsní anodické rozpouštěcí voltametrie na přístroji 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) s chlazeným prostorem pro uložení vzorků. Elektrochemický analyzátor je sestaven v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou je visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0.4 mm^2 ; referentní elektrodou je $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ a pomocnou platinová elektroda. Experimenty jsou prováděny při laboratorní teplotě, v potenciálovém rozsahu od $-1,2 \text{ V}$ do $+0,1 \text{ V}$, potenciálový krok $1,05 \text{ mV}$, pulsní amplituda $25,05 \text{ mV}$, časový interval $0,2 \text{ s}$, doba akumulace 240 s , potenciál akumulace $-1,1 \text{ V}$. Jako základní elektrolyt je použit acetátový pufr.

5. Experiment

- 1) Kadmnaté ionty o koncentraci $1 \mu\text{M}$ budeme analyzovat v acetátovém pufru o různém pH. Získané záznamy vyneseme do grafu závislosti výšky signálu na pH pufru. Z výsledků zvolíme nejvhodnější pufr pro další analýzy.
- 2) V prostředí acetátového pufru o nejvhodnějším pH budeme analyzovat **pracovní roztoky** jednotlivých kovů o koncentraci 0.001, 0.01, 0.1, 1 a $5 \mu\text{M}$. Z výsledků získáme kalibrační závislosti.