

# ŠPECIÁCIA HLINÍKA VO VODÁCH A PÔDNYCH ROZTOKOCH

PETER MATUŠ A JANA KUBOVÁ

*Geologický ústav, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina G, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: matus@fns.uniba.sk*

Došlo dňa 11.V.2001

Kľúčové slová: hliník, toxicita, fyzikálna špeciácia, chemická špeciácia

## Obsah

1. Úvod
2. Fyzikálna špeciácia
  - 2.1. Filtrácia a ultrafiltrácia
  - 2.2. Dialýza
  - 2.3. Gélová permeačná chromatografia (GPC)
3. Chemická špeciácia
  - 3.1. Metódy založené na kinetike vzniku stabilných komplexných zlúčenín hliníka
  - 3.2. Metódy využívajúce iónovú výmenu
  - 3.3. Iónová chromatografia (IC)
4. Výpočtové metódy
5. Záver

## 1. Úvod

Objektívne hodnotenie toxicity hliníka<sup>1,2</sup> v životnom prostredí je z dôvodu jeho stále sa zväčšujúcej acidity veľmi aktuálnym problémom. Znižovanie kyslosti pôdnej reakcie spôsobuje zvýšenie rozpustnosti rôznych foriem Al s rozdielnou toxicitou pre živé organizmy. To prispieva k zväčšujúcej sa mobilite a reaktivite Al v pôdnom systéme. Monoméne iónové formy Al sú uvoľňované do pôdnych roztokov, podzemných a povrchových vôd predovšetkým ako polymerizované alebo komplexné zlúčeniny vytvárané prítomnými anorganickými a organickými ligandami. Za najviac toxické pre živé organizmy sú považované anorganické monoméne aqua- a hydroxidové a niektoré polymérne komplexy Al (cit.<sup>1</sup>). Zložitosť laboratórnej špeciácie Al súvisí s používaním principiálne rozdielnych metód pre stanovenie jednotlivých foriem Al (cit.<sup>3-9</sup>).

Cieľom predloženej práce je uviesť prehľad vybraných metód, používaných najčastejšie na špeciáciu Al vo vodách a pôdnych roztokoch za posledných asi desať rokov výskumu (s výnimkou uvádzania starších, ale pre danú metodiku podstatných prác), s upozornením na problémy a obmedzenia týchto postupov.

## 2. Fyzikálna špeciácia

Metódy fyzikálnej špeciácie Al umožňujú rozdelenie častíc alebo molekúl zlúčenín Al podľa ich veľkosti a tvaru, z čoho vyplýva jej šetrnejšie zaobchádzanie s prítomnými frakciami Al, ako v prípade chemickej špeciácie. Patrí sem filtrácia a ultrafiltrácia, dialýza a gélová permeačná chromatografia (GPC).

### 2.1. Filtrácia a ultrafiltrácia

Membránová filtrácia a ultrafiltrácia sú často využívané na oddelenie rozpustných foriem Al od jemných minerálnych koloidov a makromolekulových organických foriem Al počas predúpravy vzorky. Pri separácii nerozpustných frakcií Al membránovou filtráciou sa pracuje obvykle s veľkosťou pórov filtra od 10 do 0,1  $\mu\text{m}$ , najčastejšie sa používa veľkosť 0,45  $\mu\text{m}$ . Ultrafiltrácia využíva menšiu veľkosť pórov, až do 1 nm. Často sa vyskytujúcim problémom je adsorpcia analytu na filtri alebo na nerozpustných časticách a rôznej stupen zanesenia filtra, čo súvisí s materiálom, z akého je filter vyrobený.

Menzies a spol.<sup>10</sup> porovnávali acetát- a nitrátcelulózoové filtre s veľkosťou pórov 0,45, 0,22, 0,05 a 0,025  $\mu\text{m}$ . Významné zmeny v koncentrácii Al nastali len pri použití 0,025  $\mu\text{m}$  filtra pri pH 4,5 a 5,0. Ultrafilter využívajúci technológiu dutého vlákna aplikovali Lydersen a spol.<sup>11,12</sup> na separáciu koloidov od ostatných nerozpustných častíc Al pri súčasnom sledovaní vplyvu teploty a pH na koncentráciu Al špecií. Komplexáciu hliníka humínovými látkami a špecie Al v pôde študoval Gerke<sup>13</sup>. Kombináciou ultrafiltrácie cez triacetátcelulózoovú membránu a sorpcie na anexe stanovil „voľný monoméry“ Al (veľkosť pórov filtra definovaná  $M_r \sim 20\,000$ ) a „organicky viazaný“ Al. Metodika má viaceré nedostatky, autor nevyklučuje prítomnosť polymérnych foriem Al v prvej frakcii.

Chakrabarti a spol.<sup>14</sup> použili filtráciu (0,45  $\mu\text{m}$ ) a ultrafiltráciu ( $M_r \sim 500\text{--}100\,000$ ) v spojení s ďalšími metódami na špeciáciu Al a iných kovov. Lu a spol.<sup>15</sup> aplikovali filtráciu a ultrafiltráciu pri špeciácii Al a iných kovov v riečnej a dažďovej vode a v snehu. Vzorky dažďovej vody po filtrácii cez 0,45  $\mu\text{m}$  membránu obsahovali v nerozpustných frakciách až 74,3 % (pH 3,4), resp. 69,8 % (pH 4,7) celkového Al. Následnou ultrafiltráciou rozdelili frakcie Al podľa ich relatívnych molekulových hmotností. V riečnej vode (pH 8,0) mala najvyšší podiel frakcia Al s  $M_r > 100\,000$ , v snehu (pH 4,7) to bola naopak frakcia Al s  $M_r < 500$ . Podobným spôsobom stanovili aj Al frakcie s sulvokyselinami v modelovom roztoku (pH 5,0).

Vplyv filtrácie na výsledky špeciácie hliníka v pôdnych a modelových roztokoch pre pH 3,0 až 8,0 skúmali Kožuh a spol.<sup>16</sup> Pracovali s roztokmi filtrovanými cez nitrátcelulózoové membrány (0,01, 0,10 a 0,45  $\mu\text{m}$ ), resp. nefiltrovanými vôbec. Vplyvom filtrácie pôdnych roztokov z deviatich rôznych typov pôd sa koncentrácie celkového Al znížila oproti nefiltrovaným roztokom na 31–77 % (0,45  $\mu\text{m}$ ) a 21–65 % (0,10  $\mu\text{m}$ ) pôvodnej hodnoty v závislosti od pH (3,7–6,6) a obsahu organickej hmoty.

Van Hees a spol.<sup>17</sup> a van Hees a Lundström<sup>18</sup> dosiahli ultrafiltráciou oddelenie nízkomolekulových foriem Al ( $M_r \sim 1000$ ) pri stanovení komplexov Al s jednoduchými organickými kyselinami v pôde. Riise a spol.<sup>19</sup> podobným spôsobom separovali koloidy ( $M_r > 3000$ ), stredne veľké molekulové frakcie ( $1000 < M_r < 3000$ ) a nízkomolekulové frakcie ( $M_r < 1000$ ) Al pri štúdiu ich mobility v pôde.

## 2.2. Dialýza

Metóda je založená na difúzii foriem Al s určitou molekulovou veľkosťou, tvarom a nábojom cez polopriepustnú membránu (najčastejšie 1–55 nm) s čo najväčším povrchom, ktorá oddeľuje roztok vzorky (dialyzát) od roztoku, do ktorého špecie Al difundujú (difuzát). Nevýhodou dialyzačnej techniky špeciácie je hlavne jej časová náročnosť. V dialyzáte s vysokým obsahom organickej hmoty, vzniká na membráne tzv. Donnanov potenciál, redukujúci množstvo predifundovaného Al (cit.<sup>20,21</sup>). Ďalším nepriaznivým javom pri dialýze je osmóza, tj. difúzia rozpúšťadla z difuzátu do dialyzátu, ktorý sa následne zrieduje. Ďalšie problémy vyskytujúce sa pri používaní dialyzačných membrán sú obdobné ako pri filtrácii a ultrafiltrácii (napr. adsorpcia analytu).

24 hodinovú dialýzu použili na frakcionáciu hliníka a iných kovov v povrchovej vode Beneš a Steinnes<sup>22</sup>. LaZerte<sup>21</sup> zistil, že 6–12 % organickej hmoty (nízkomolekulové fulvokyseliny a jednoduché organické kyseliny;  $M_r < 1000$ ) pri frakcionácii Al v prírodných vodách prešlo za 24 h cez dialyzačnú membránu. Salbu a spol.<sup>23</sup> potrebovali na dosiahnutie rovnovážneho stavu *in situ* dialýzy povrchovej vody tri týždne. Dlhý čas analýzy zapríčinil zmenšenie efektívnej veľkosti pórov membrány vplyvom adsorpcie anorganických zlúčenín železa, ktoré sa nachádzali vo vzorke.

Berggren<sup>24</sup> dialyticky separoval počas 48 h humínové kyseliny ( $M_r > 1000$ ) pri špeciácii Al a iných kovov v pôdnom roztoku. Morrison<sup>25</sup> oddelil *in situ* dialýzou rozpustné a koloidné špecie Al za štyri dni. Formy hliníka naviazaného na humínové kyseliny a fulvokyseliny študovali Clarke a spol. v prácach<sup>26,27</sup>, kde sa dialýza použila ako referenčná metóda ( $M_r \sim 1000$ ; 48 h (cit.<sup>26</sup>), 96–120 h (cit.<sup>27</sup>)).

## 2.3. Gélová permeačná chromatografia (GPC)

Separáciu špecií Al umožňujú hydrofilné gély, najčastejšie s polymérnou štruktúrou, ktoré sú chemicky inertné. Obsahujú pritom veľké množstvo zosieťovaných pórov. Molekuly s veľkou väčšou, ako sú póry gélu, prechádzajú cez kolónu bez zadržania, kým menšie molekuly sa zachytia v póroch gélu a eluujú neskôr. Výhodou GPC je používanie malých objemov vzorky.

Rengasamy a Oades<sup>28</sup> kombinovali GPC, dialýzu a ultrafiltráciu pri štúdiu polymerizácie hliníka a interakcií medzi monomérnym a polymérnym Al. Špecie Al v pôdnych roztokoch s použitím GPC študovali Gardiner a spol.<sup>29</sup> Kerven a spol.<sup>30</sup> sledovali distribúciu Al vo vzorkách obsahujúcich fulvokyseliny. Dokonalú separáciu organického Al dosiahli pri pH 3,5. Pri vyššom pH eluovali všetky frakcie spolu. Rovnaký efekt mala aj prítomnosť síranov. GPC na frakcionáciu síranových komplexov Al aplikovali Alva a Sumner<sup>31</sup>. GPC, filtráciu a ultrafiltráciu použili Itoh a spol.<sup>32</sup> pri separácii

vysokomolekulových foriem Al vo vodných vzorkách. Al sa nachádzal vo frakcii s  $M_r > 300\,000$ .

Van Hees a spol.<sup>17</sup> oddelili pomocou GPC komplexné formy Al s nízkomolekulovými jednoduchými organickými kyselinami v pôdnych roztokoch. Zistili, že obsahujú priemerne 25 % celkového Al vo vzorkách. Výsledky porovnali s hodnotami získanými ultrafiltráciou ( $M_r \sim 1000$ ), ktoré dosahovali priemerne 34 % celkového Al vo vzorkách. Rozdiel vysvetľujú autori nízkou priemernou výťažnosťou GPC (79 %) vzhľadom na celkový Al. V prefiltrovanom roztoku naopak nevyučujú prítomnosť iných organických molekúl s naviazaným Al.

## 3. Chemická špeciácia

Metódy chemickej špeciácie poskytujú za cenu vyššieho rizika (porušenie rovnovážneho stavu medzi jednotlivými formami Al, zmena pôvodnej formy Al, kontaminácia vzorky) komplexnejšie výsledky. Patria sem metódy založené na rozdielnej kinetike vzniku stabilných komplexných zlúčenín Al, metódy využívajúce iónovú výmenu a iónová chromatografia (IC).

### 3.1. Metódy založené na kinetike vzniku stabilných komplexných zlúčenín hliníka

Najpoužívanjšia a najstaršia technika špeciácie je založená na tvorbe stabilných komplexných zlúčenín hliníka najčastejšie so spektrofotometrickými a fluorometrickými činidlami (organické komplexotvorné zlúčeniny). Princípom techniky je použitie vhodného reakčného času, ktorý rozdelí špecie Al na rýchlo (prevažne anorganické monoméne formy Al) a pomaly (organické formy Al) reagujúce s činidlom pri určitej hodnote pH. Činidlo sa pridáva vo veľkom nadbytku, aby sa zaručila jednoduchá kinetika reakcie. Výsledný produkt sa v prípade malej rozpustnosti vo vode extrahuje do organického rozpúšťadla. Výhodou metódy je možnosť jej automatizácie (FIA – Flow Injection Analysis), ktorá prispieva k lepšej reprodukovateľnosti výsledkov, skráteniu času analýzy a presnejšie definovaným reakčným časom. Metodika býva často využívaná v spojení s inými technikami, hlavne v kombinácii s iónovou výmenou (odsek 3.2.).

#### 8-hydroxychinolín (oxín)

Oxín tvorí s Al vo vode málo rozpustný trioxinátový komplex. Po extrakcii do vhodného organického rozpúšťadla sa stanovuje najčastejšie spektrofotometricky pri 390 nm alebo metódami atómovej spektroskopie. Extrakcia pri pH 8 kvantitatívne separuje fluoridové komplexy, ale ponecháva vo vodnej fáze dostatočné množstvo oxínových aniónov na pokračovanie reakcie. Pri pH 5 nastane úplné ukončenie reakcie, ale bez separácie fluoridových komplexov.<sup>7</sup>

Barnes<sup>33</sup> modifikovala a aplikovala oxínovú extrakčnú metódu na frakcionáciu Al v prírodných vodách. Po filtrácii cez 0,1 mm membránu, reakcii s oxínom (10–30 s) a úprave pH na 8, sa komplex extrahoval metylizobutylketónom (MIBK) a obsah Al sa stanovil s FAAS (atómová absorpčná spektrometria s plameňovou atomizáciou) s detekčným limi-

tom 2  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  pri 100-násobnom prekoncentračnom faktore. Stanovený „reaktívny“ Al reprezentoval „rýchlo reagujúce špecie Al“.

Bloom a spol.<sup>34,35</sup> extrahovali Al trioxinátový komplex do butylacetátu a následne merali spektrofotometricky a fluorometricky jeho absorpciu s detekčným limitom 0,3–50  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použili reakčný čas 15 min pri pH 5. James a spol.<sup>36</sup> a James a Riha<sup>37</sup> upravili metódu podľa Blooma a spol.<sup>34</sup> znížením reakčného času na 15 s, aby minimalizovali disociáciu Al komplexov pri analýze modelových roztokov obsahujúcich fluoridy a citrónany<sup>36</sup> a roztokov z lesných pôd<sup>37</sup>.

LaZerte<sup>21</sup> zjednodušil oxínovú extrakčnú metódu podľa Barnesovej<sup>33</sup>. Reakčný čas znížil na 15 s, pH extrakcie upravil na 8,3–8,8 a obsah extrahovaného Al stanovil s GFAAS (atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou v grafitovej kyvete). V stanovenom „rýchlo reaktívnom“ Al sa potvrdila prítomnosť fluoridových a citrónanových komplexov Al. Lalande a Hendershot<sup>38</sup> použili metódu podľa Blooma a spol.<sup>34</sup> pre rôzne reakčné časy a pH (15 s pre pH 5,0; 15 s pre pH 8,3 a 60 min pre pH 8,3), aby získali viaceré frakcie Al. Pri reakčnom čase 60 min a pH 8,3 stanovili viac ako 60 % komplexného Al. Podľa ich zistenia nie je oxínová extrakcia vhodná na separáciu anorganických a organických foriem Al. Výsledky prác<sup>39,40</sup> potvrdili, že oxínovou metódou (15 s pre pH 5,0) sa separujú síranové, ale nie fluoridové komplexy Al. Boudot a spol.<sup>41</sup> použili reakčný čas 5 s a pH 5,0 pri špeciácii hliníka v modelových a pôdnych roztokoch.

Clarke a spol.<sup>26,42</sup> aplikovali spojenie oxínovej metódy a FIA na stanovenie „rýchlo reagujúceho“ Al v modelových roztokoch a prírodných vodách. Použili reakčný čas 2,3 s pri pH 5,0 a chloroform ako extrakčné činidlo. Stanovená frakcia obsahovala  $\text{Al}^{3+}$ , kationické monoméne hydroxidové, síranové, kremičitanové a uhličitanové komplexy Al. Veľké polymérne hydroxidové, fluoridové, citrónanové a humínové komplexy Al sa v tejto frakcii nenachádzajú, fosforečnanové a šfavelanové komplexy Al len čiastočne. Výhodou metódy s detekčným limitom cca 5  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  je malý dávkovací objem vzorky (12–250  $\mu\text{l}$ ) a vysoká vzorkovacia frekvencia (66  $\text{h}^{-1}$ ). Clarke a spol.<sup>43</sup> modifikovali uvedenú metódu (pH 4,5), aby odstránili komplex  $\text{AlHPO}_4^+$  z meranej frakcie hliníka. Pôvodnú metodiku<sup>42</sup> použili Clarke a spol.<sup>27</sup> pri štúdiu komplexácie Al s humínovými kyselinami a fulvokyselinami. Simultánnu špeciáciu hliníka a železa uskutočnili Clarke a Danielsson<sup>44</sup>. V povrchových vodách oddelili „voľné“ ióny  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  s labilnými komplexami Al, napr.  $\text{AlSO}_4^+$ .

#### Pyrokatecholová violet (PCV)

Komplex hliníka s PCV je vo vode rozpustný (pH ~ 6,1) a absorbuje pri 580–585 nm. Metóda, ktorá je založená na stanovení celkového Al podľa Dougana a Wilsona<sup>45</sup>, je zaťažená interferenciou so železom a kremíkom, resp. kremičitanmi<sup>46,47</sup>.

Seip a spol.<sup>48</sup> stanovili „celkový monomérny“ Al vo vodných vzorkách pri reakčnom čase 4 min. Noller a spol.<sup>49</sup> navrhli frakčionačnú schému na stanovenie „labilného“ Al (monoméne hydroxidové a fluoridové komplexy). FIA v spojení s touto metódou použili Henshaw a spol.<sup>50</sup>, aby stanovili „monomérny“ Al, ktorý obsahoval aj fluoridové komplexy Al. Autori vylúčili vo frakcii prítomnosť komplexov Al s organickými látkami. Podľa ich zistení humínové látky redukujú

množstvo „monoméneho“ Al vo vzorke. K podobným záverom prišli aj Lewis a spol.<sup>51</sup>

Kerven a spol.<sup>52</sup> navrhli reakčný čas 60 s pre oddelenie „anorganického monoméneho“ Al v pôdnom roztoku. Testy s rôznymi organickými ligandami ukázali, že frakcia obsahuje aj isté množstvo organicky viazaného hliníka. Metóda bola kombinovaná s filtráciou a ultrafiltráciou<sup>10</sup>. Morrison<sup>25</sup> zistil, že reakčný čas 10 s je príliš dlhý na dokonalú separáciu anorganického Al. Dôkazom je prítomnosť koloidov vo frakcii.

#### Aluminón

Aluminón alebo kyselina auríntrikarboxylová poskytuje s hliníkom vo vode rozpustné komplexy, ktoré absorbujú pri 515–530 nm.

Blamey a spol.<sup>53</sup> aplikovali na frakcionáciu hliníka aluminónovú metódu pre stanovenie celkového Al (cit.<sup>54</sup>). Využili poznatok, že polymérne špecie a fosforečnanové komplexy Al reagujú s aluminónom veľmi pomaly. Po reakčnom čase 30 min oddelili monomérny a polymérny Al. Metóda bola použitá pri štúdiu toxicity hliníka na rastliny<sup>55–58</sup>.

Parker a spol.<sup>59</sup> považuje reakčný čas 30 min za nie dostatočný na zreagovanie celkového monoméneho Al. Alva a spol.<sup>40</sup> zistili, že iba časť fluoridových komplexov Al reaguje s aluminónom (reakčný čas 15 s), aj keď Noble a spol.<sup>39</sup> považujú tieto špecie za dostatočne rýchlo reagujúce. Kerven a spol.<sup>30</sup> stanovili za 30 min 80 % Al viazaného na fulvokyselinu v meranej frakcii. 30 s reakčný čas podľa nich umožňuje lepšiu separáciu, hoci ich výsledky dokazujú, že „anorganický monomérny“ Al obsahuje aj organické komplexy Al.

Gintinf a spol.<sup>60</sup> porovnávali aluminónovú a PCV metódu (reakčný čas 30 s) pri skúmaní vplyvu piatich jednoduchých organických aniónov na koncentráciu hliníka. Z koncentrácií „reaktívneho“ Al vypočítaných z konštánt stability zistili, že PCV metóda túto frakciu nadhodnocuje, tj. podceňuje komplexáciu organických aniónov. Aluminón poskytuje lepšiu odhad „reaktívneho“ Al.

#### Ferrón

Ferrón (kyselina 8-hydroxy-7-jódchinolín-5-sulfónová) je derivátom oxínu a s hliníkom tvorí vo vode rozpustné komplexy, ktoré absorbujú pri 370 nm. Interferencie s rovnako absorbujúcimi humínovými látkami zvyšujú signál hliníka.

Bersillon a spol.<sup>61</sup> aplikovali ferrón a reakčný čas 30 s na separáciu „monoméneho“ a „polyméneho“ Al. Bertsch a spol.<sup>62</sup> zistili, že nimi stanovená frakcia monoméneho Al obsahuje aj malé množstvo polyméneho Al, a frakciu polyméneho Al identifikovali podobne ako neskôr Parker a Bertsch<sup>63</sup> so špeciami  $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$ . Parker a spol.<sup>64,65</sup> použili ferrónovú metódu na štúdium toxicity Al.

Jardine a Zelazny<sup>66,67</sup> skúmali vplyv anorganických a organických aniónov na frakcionáciu hliníka. Zistili, že niektoré komplexy Al (síran, fulvokyseliny) reagujú s ferrónom rovnako ako monomérny Al. Neplatí to pre fluoridové, fosforečnanové, citrónanové a šfavelanové komplexy Al. Reakciu fluoridových a síranových komplexov Al s ferrónom študovali Alva a spol.<sup>40</sup> pre rôzne reakčné časy (15 s až 30 min). Síranové komplexy Al reagovali kvantitatívne bez ohľadu na reakčný čas, zatiaľ čo fluoridové komplexy Al reagovali len čiastočne

pre všetky sledované časy. Jardine a Zelazny<sup>68</sup> oddelili monomérmny a polymérmny Al v roztokoch s obsahom anorganických a organických aniónov.

#### Chrómazurol S (CAS)

Absorpčné maximum komplexu Al s CAS leží pri 545 nm. Zöltzer a Schwedt<sup>69</sup> použili CAS v zapojení FIA a CFA (Continuous Flow Analysis), aby stanovili kineticky labilný Al. Interferencie železa boli potlačené prídavkom kyseliny askorbovej. Kennedy a Powell<sup>70</sup> aplikovali CAS pri pH 4,9 a zistili, že veľké polymérne hydroxykomplexy s CAS nereagujú v čase do 1 hod. Simpsonovi a spol.<sup>71</sup> slúžila metóda modifikovaná podľa Hawke a Powella<sup>72</sup> (reakčný čas 7 s) ako referenčná pri hodnotení 1,3 s oxínovej techniky v spojení s FIA.

#### Kyselina 8-hydroxychinolín-5-sulfónová (HQS)

Vo vode rozpustný komplex Al(HQS)<sub>3</sub> absorbuje pri 370 nm, kde sa prejavujú interferencie humínových látok, podobne ako v prípade ferrónu. Backes a Tipping<sup>73</sup> použili na špeciáciu hliníka HQS zmiešanú s NaF. Monomérmny Al obsahujúci aj fluoridové a humínové komplexy Al reagoval rýchlo (<1 min). Reakcia polymérnych hydroxykomplexov Al bola pomalá. HQS slúži často ako činidlo pri postkolónovej fluorimetrickej detekcii, hlavne pri iónovej chromatografii (odsek 3.3.).

#### Eriochrómkyanín (ECR)

Komplex Al s ECR má absorpčné maximum pri 535 nm. Kerven a spol.<sup>30</sup> zistili, že ECR pre dlhý reakčný čas zreaguje s viac ako 80 % Al naviazaného na fulvokyseliny. Hawke a Powell<sup>74</sup> porovnávali ECR s CAS a PCV pri stanovení toxického Al. Aplikovali reakčné časy 10 s a 10 min vo FIA zapojení. Adams a Moore<sup>75</sup> a Adams a Hathcock<sup>76</sup> považujú ECR za nevhodný na separáciu toxických foriem Al.

### 3.2. Metódy využívajúce iónovú výmenu

Metodika špeciácie hliníka formou iónovej výmeny na vhodnom sorbente sa často využíva kvôli relatívne jednoduchšej inštrumentácii a možnosti separácie a prekoncentrácie analytu podobne ako pri oxínovej extrakcii, čo pri súčasnom odstránení prípadných interferentov významne zvyšuje citlivosť merania signálu. Toxické anorganické formy Al majú kladný náboj, kým komplexy Al s organickými látkami majú prevažne záporný náboj. Pri použití katexu sa na ňom zachytia anorganické monomérmne labilné formy Al a organické frakcie Al zostanú v roztoku, alebo pretečú cez kolónu, záleží na technickom prevedení (vsádková alebo kolónová technika). V prípade anexu, ktorý sa na tento účel používa menej často, je to naopak.

V roku 1980 navrhol Driscoll<sup>77</sup> frakcionačnú schému na stanovenie rôznych foriem Al, ktorú vyhodnotil a aplikoval v neskorších prácach<sup>78,79</sup>. Skombinoval ferrónovú, resp. oxínovú metódu podľa Barnes<sup>33</sup>, so sorpciou na kolóne. Oxínovou metódou pri pH 1 stanovil „celkový reaktívny“ Al. Na separáciu „monomérmneho“ Al použil oxín bez predchádzajúceho okyslenia. Rozdiel medzi oboma frakciami nazval ako „kyslo-reaktívny“ Al, ktorý reprezentoval koloidné, polymérne a organicky viazané formy Al. Frakciu „monomérmneho“ Al

sorboval na katexe Amberlite 120. Na kolóne sa zachytil anorganický monomérmny „labilný Al“, reprezentujúci aqua-, hydroxidové, síranové, kremičitanové a fluoridové komplexy Al. Organický „nelabilný Al“ cez kolónu pretiekol. Aby sa vyhol disociácii organických komplexov Al na kolóne, ktorej rozsah sa pohybuje medzi 0–34 % v závislosti od pomeru Al/C vo vzorke<sup>24,30,80</sup> (pre nízky pomer Al/C je disociácia zanedbateľná a naopak), zvolil dostatočne rýchly prietok. Výsledky porovnal s hodnotami frakcií Al získanými výpočtom z rovnováh. Dobrú zhodu našiel pre nízke obsahy organicky viazaných foriem Al. Goenaga a spol.<sup>81</sup> aplikovali PCV miesto oxínu. Driscollova metóda<sup>77</sup> bola mnohými spôsobmi modifikovaná<sup>11,12,24,80–87</sup>. Väčšina ďalej uvádzaných prác vychádza z pôvodnej Driscollovej frakcionačnej schémy<sup>78</sup>.

Campbell a spol.<sup>88</sup> skombinovali filtráciu, sorpciu na chelatačnom katexe a fotooxidáciu. Vzorka bola filtrovaná cez 0,4 μm membránu. Vo zvyšku na filtru stanovili po kyslom rozklade „nerozpustný“ Al (A), vo filtráte priamym stanovením s GFAAS „úplne rozpustný“ Al (B), po ustálení rovnováhy s katexom (Chelex 100) v roztoku „nevýmenniteľný“ Al (C) a po fotooxidácii organických látok vo filtráte a aplikácii Chelexu 100 „nevýmenniteľný anorganický“ Al (D). „Výmenniteľný“ Al (E) bol daný rozdielom B–C a „nevýmenniteľný organický“ Al (F) ako rozdiel C–D. Viac ako 85 % monomérmneho anorganického Al spolu s polymérmnymi hydroxidovými komplexami Al sa na Chelex 100 nasorbovalo do 30 min. Postup bol aplikovaný na povrchové vody s detekčným limitom 1 μg.l<sup>-1</sup>.

Hodges<sup>89</sup> porovnával výsledky špeciácie Al v pôdnych roztokoch získané metódami podľa Driscolla<sup>78</sup> a Campbella a spol.<sup>88</sup> Frakcia monomérmneho anorganického Al stanovená druhou metódou bola väčšia. Autor to zdôvodňuje väčšou agresivitou chelatačného katexu v reakcii s komplexami Al v porovnaní s kyslým katexom.

Landing a spol.<sup>90</sup> použili na frakcionáciu Al a iných kovov vo vodách s vysokým obsahom organickej hmoty tri sekvenčné kolóny (hydrofilný Fractogel TSK ako filter na separáciu nerozpustného, koloidného a vysokomolekulárneho organického Al, anex Fractogel DEAE na separáciu rozpustných humínových látok a ich komplexov s Al, oxínom derivatizovaný Fractogel TSK na separáciu kationických foriem Al). Metodiku upravili a zautomatizovali Simpson a spol.<sup>71</sup> a Powell<sup>91</sup>, keď oxín-gélom naplnili reakčnú kolónu vo FIA. Roztokom NaOH eluovaná frakcia obsahovala buď „voľný“ Al (Al<sup>3+</sup>, Al(OH)<sup>2+</sup> a labilné komplexy Al) a fluoridové komplexy Al alebo hydroxidové polymérne formy Al v závislosti od koncentrácie NaOH. Metóda bola aplikovaná na humínové a pôdne roztoky<sup>71</sup> a pri skúmaní komplexačnej kapacity hliníka s fulvokyselinami<sup>91</sup>.

Miller a Andelman<sup>92</sup> modifikovali metódu pre rôzne časy sorpcie na Chelexe 100 a aplikovali ju na štúdium distribúcie Al vo vodných vzorkách. Duffy a spol.<sup>93</sup> použili kombináciu katexu a anexu na špeciáciu Al a iných kovov v pôdnych roztokoch. Eluent z kolóny s anexom bol následne prepustený cez kolónu s katexom. Hliník v eluátoch bol stanovený s NAA (nukleárna aktivačná analýza). Výsledky porovnali s hodnotami frakcií Al získanými oxínovou extrakčnou metódou pre rôzne reakčné časy, pričom deklarovali dobrú zhodu medzi nimi.

Henshaw a spol.<sup>50</sup> aplikovali kationovú výmenu spolu s PCV vo FIA zapojení na prírodné vody, aby separovali monomérmny Al. Achilli a spol.<sup>94</sup> použili kombináciu kationo-



vej výmeny a PCV na oddelenie monoméneho a polyméneho Al v podzemných vodách s ICP AES (atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou) na detekciu signálu. Quintela a spol.<sup>95</sup> porovnali výsledky získané použitím FIA s katexom a PCV (reakčný čas 15 s) s Driscollovou metódou<sup>78</sup>. FIA poskytovala lepšiu reprodukovateľnosť a bola rýchlejšia, pri Driscollovej metóde sa dosiahla vyššia citlivosť.

Kerven a spol.<sup>30</sup> vyhodnotili použitie katexu (Amberlite 200) a chelatačného katexu (Chelex 100) na odstraňovanie anorganického monoméneho Al z roztoku v prítomnosti fulvokyselín. Po aplikácii sorbentu bol pozorovaný pokles pH v roztoku. Pettersson a spol.<sup>96</sup> separovali frakcie Al zvlášť na katexe a zvlášť na anexe. Haraldsson a spol.<sup>97</sup> použili chelatačný katex na stanovenie voľných iónov a labilných komplexov, anex na komplexy s humínovými kyselinami a C-18 na nepolárne organické komplexy Al a iných kovov. Chelatačný katex Hyphan Cellulose použil Burba<sup>98</sup> na špeciáciu Al a iných kovov. Separoval štyri rôzne frakcie Al v roztoku humínových látok.

Chakrabarti a spol.<sup>14</sup> skombinovali v špeciálnej schéme pre Al a iné kovy kationovú výmenu (Chelex 100) s filtráciou, ultrafiltráciou a ASV (anódová rozpúšťacia voltametria). V ultrafiltráte stanovili kationovou výmenou na kolóne „priemerne labilný“ a vsádkovou metódou „málo labilný“ Al. Lu a spol.<sup>15</sup> aplikovali Chelex 100 na kolóne a vsádkovo na špeciáciu Al a iných kovov v povrchovej a dažďovej vode a snehu. Chemická reaktivita Al s katexom bola meraná v ultrafiltrovaných roztokoch.

Berdén a spol.<sup>99</sup> porovnali metodiku špeciácie podľa Driscolla<sup>78</sup> a oxínovú metódu s reakčným časom 2,3 s podľa Clarke a spol.<sup>42</sup> pre modelové roztoky a prírodné vody. Prítomnosť fluoridových komplexov Al zistili iba vo frakcii „labilný“ Al (cit.<sup>78</sup>), komplexy Al s citrónanom a humínovými kyselinami sa nenachádzali ani v „labilnom“ Al, ani v „rýchlo reagujúcom“ Al (cit.<sup>42</sup>). Detekčné limity oboch metód sú rovnaké ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), vzorkovacia frekvencia vychádza priaznivejšie pre FIA ( $66 \text{ h}^{-1}$  oproti  $5 \text{ h}^{-1}$ ).

Možnosť špeciácie Al v rozsahu pH 3,0–8,0 skúmalí Kožuh a spol.<sup>16</sup> Použili kationovú výmenu na kolóne s Chelexom 100 v spojení s ICP AES a oxínovú spektrofotometrickú metódu podľa Jamesa a spol.<sup>36</sup> Stanovené frakcie Al obsahovali kladne nabitú monoménu aqua-, hydroxidovú a síranovú komplexy Al. Chelex 100 ešte navyše sorboval fluoridové komplexy Al a oxín reagoval aj s väčšinou organického Al. Metodiku aplikovali na vodné a pôdne vzorky a modifikovali ju použitím mikrokolóny s Chelexom 100 v spojení s GFAAS (atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou v grafitovej kvete)<sup>100</sup>.

Pesavento a spol.<sup>101</sup> študovali špeciáciu Al vo vode s využitím sorpcie na Chelexe 100 a skúmali povahu vzniknutého komplexu. Bérubé a Brúlé<sup>102</sup> navrhli špeciálnu schému pre analýzu Al vo vode, ktorá obsahovala iónovú výmenu na kolóne s Chelexom 100 po prefiltrovaní vzorky. Wickström a spol.<sup>103</sup> porovnali päť analytických metód na špeciáciu Al v prírodných vodách, v ktorých boli využité rôzne frakčionálne princípy (kationová výmena, tvorba komplexov s oxínom a PCV).

### 3.3. Iónová chromatografia (IC)

Iónová chromatografia s postkolónovou fluorimetrickou alebo spektrofotometrickou detekciou umožňuje na rozdiel od

iónovej výmeny priame stanovenie reaktívnych anorganických špecií. Ďalšou výhodou IC je veľmi malý objem vzorky potrebný na stanovenie a rýchlosť analýzy. Pri fluorimetrickej detekcii je to jej nízky detekčný limit.

Bertschovi a Andersonovi<sup>104</sup> sa podarilo s IC separovať  $\text{Al}^{3+}$  ióny od fluoridových ( $\text{AlF}_2^+$ ), citrónanových a šťavelanových komplexov Al v modelových roztokoch pri detekčnom limite  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky boli porovnané s hodnotami získanými výpočtom z rovnováh. Willett<sup>105</sup> použil kationovú kolónu,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  pri pH 3,0 ako elučné činidlo a PCV ako postkolónové činidlo pri separácii  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  a  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  od fluoridových a šťavelanových komplexov Al. Metóda je vhodná aj na stanovenie nízkych koncentrácií komplexov Al s humínovými kyselinami. Gibson a Willett<sup>106</sup> a Jones<sup>107</sup> aplikovali HQS ako postkolónové činidlo pre fluorimetrickú detekciu na zlepšenie detekčného limitu metódy ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jones<sup>107</sup> stanovil vo vode monoménu hydroxidovú komplexu Al.

IC s nepolárnym polystyréndivinylbenzénom ako stacionárnou fázou a s fluorimetrickou detekciou umožnila Michalasi a spol.<sup>108</sup> stanoviť komplexy Al s fluoridmi a kyselinou šťavelovou, citrónovou a vínnou. Sutherland a Cabaniss<sup>109</sup> chromatograficky separovali fluoridové, kremičitanové, octanové a citrónanové komplexy Al v povrchovej vode. Disociáciu komplexov na kolóne autori vylúčili. Na fluorimetrickú detekciu použili komplex Al-lumogallion. Tiron ako postkolónové činidlo použili Boudot a spol.<sup>41</sup> pri separácii monoméneho Al s IC na sorbente Dionex v pôdnych roztokoch a povrchových vodách.

Mitrović a spol.<sup>110</sup> použili pre špeciáciu Al v širokom rozpätí pH techniku FPLC (rýchlo proteínová kvapalinová chromatografia) v „off-line“ zapojení s ICP AES. Kladne nabitú monoménu špecie Al boli separované od polymérnych, neutrálnych a záporne nabitých špecií Al na katexovej FPLC kolóne a s  $\text{NaNO}_3$  boli eluované v troch pikoch. Prvý pik (retenčný čas 1,5 min) reprezentoval  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  a síranové, difluoridové, šťavelanové a citrónanové komplexy Al; druhý (4,0 min)  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  a fluoridové komplexy Al a tretí (4,5 min)  $\text{Al}^{3+}$  ióny. Pri nízkom pH (4) eluovali citrónany Al v druhom a treťom píku. Detekčný limit metódy bol  $120 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Metódu autori aplikovali na pôdne roztoky<sup>110</sup> a po modifikácii zmenou elučného činidla ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) a detekčnej metódy (GFAAS) s detekčným limitom  $3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  na vodné a pôdne vzorky<sup>111</sup>.

Bantan a spol.<sup>112</sup> použili na stanovenie citrónanových, šťavelanových a EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová) komplexov Al v modelových roztokoch aniónovú FPLC s  $\text{NaNO}_3$  ako elučným činidlom a ICP AES detekciou. Detekčný limit metódy bol  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bantan a spol.<sup>113</sup> kombinovali kationovú a aniónovú FPLC („fast protein“ kvapalinová chromatografia) s ICP AES a s GFAAS a ES MS MS („electrospray“ hmotnostná spektrometria) pri špeciácii nízkomolekulárnych komplexov Al v rastlinách. Analýza ukázala, že separované špecie so záporným nábojom sú zložené predovšetkým z citrónanových a akonitanových komplexov Al.

Fairman a spol.<sup>114</sup> porovnali fluorimetrickú (HQS) a ICP MS (hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou) detekciu pri chromatografickom stanovení  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{AlF}_2^+$  špecií vo vode. ICP MS sa napriek výraznejšej interferencii pozadia javí ako selektívnejšia metóda. Dosiahli detekčný limit  $0,3\text{--}0,6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hils a spol.<sup>115</sup> použili katex v iónovej chromatografii s ICP MS detekciou na oddelenie anorganického a organického Al vo vodných vzorkách.

#### 4. Výpočtové metódy

Výpočtovými metódami s využitím chemických rovnovážnych modelov možno predpovedať rozdelenie rôznych foriem Al v danom roztoku. Použitie výpočtových programov si vyžaduje hodnoty konštánt stability a rovnovážnych konštánt prítomných látok (špecií, komplexov, zlúčenín a pod.) v modeloch zohľadňujúcich ich možné vzájomné reakcie pri danej teplote, iónovej sile, pH a dosiahnutí rovnovážneho stavu. V mnohých prípadoch sú ale rovnovážne konštanty neznáme, alebo majú nesprávne hodnoty (napr. pre komplexy s humínovými látkami). Dokonalá zhoda medzi experimentálne získanými výsledkami a predpovedanými hodnotami špecií Al nie je reálna. Nesúlad je zapríčinený nedostatkami oboch prístupov. Pri použití výpočtových programov sú to predovšetkým rozdielne údaje pre rovnovážne konštanty, ktoré vyplývajú často z nedostatočného zohľadnenia reakčnej kinetiky a nedostatočného definovania podmienok. Využitie počítačových programov znamená napriek tomu prínos pre špeciáciu Al, pretože laboratórne metódy sú finančne a časovo veľmi náročné. Najviac používané výpočtové programy pre vody a pôdne roztoky sú napr. HALTAFALL<sup>116</sup>, SOLGASWATER<sup>117</sup>, ALCHEMI<sup>118</sup>, MINEQL+<sup>119</sup>, GEOCHEM-PC<sup>120</sup>.

#### 5. Záver

Špeciácia Al je v súčasnej dobe predmetom mnohých výskumných a monitorovacích programov, v ktorých je potrebné porovnať a vyhodnotiť výsledky získané rôznymi laboratóriami. Veľký počet metód používaných na frakcionáciu Al je založených predovšetkým na operačnej špeciácii, pri ktorej sú jednotlivé špecie definované podľa postupu, ktorý bol použitý pre ich separáciu. Spoločným znakom týchto metód je ich malá robustnosť, tj., pri aplikácii jednej špeciálnej techniky sa získavajú rozdielne výsledky pri malých zmenách podmienok analytického postupu (pH, teplota a pod.). Údaje získané viacerými analytickými metódami v rôznych laboratóriách často nie je možné porovnať a správnosť výsledkov nemožno overovať kvôli neexistencii certifikovaných referenčných materiálov pre Al špecie. V súčasnej dobe najúčinnším spôsobom testovania spoľahlivosti dosiahnutých výsledkov sú medzilaboratórne porovnávanie výsledkov získaných frakcionáciou tých istých vzoriek metódami založenými na rôznych princípoch.

Vývoj metodológie frakcionácie Al vo vodách a pôdnych roztokoch smeruje ku kombináciám jednotlivých metód, ktorých princípy sú opísané v predloženej práci. Väčšinou sú to ale metódy časovo a finančne veľmi náročné a nie je možné ich rutinne využívať v bežných laboratóriách pre rýchle a aktuálne poskytovanie informácií o prítomnosti jednotlivých foriem Al vo vodách a pôdnych roztokoch. Trendom v súčasnosti je preto vypracovať rýchlu, spoľahlivú a v rámci možností jednoduchú metodiku špeciácie Al, ktorá by spájala princípy už známych techník za účelom potlačenia operačného definovania špecií a zvýšenia robustnosti metódy.

*Autori sú riešitelia projektu VEGA (Vedecká grantová agentúra Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied) č. 1/7390/20: „Vypracovanie a hodnotenie analytických postupov pre špeciáciu hliníka v pôdach a pôdnych roztokoch“.*

#### LITERATÚRA

1. Kovářová Z.: Chem. Listy 88, 32 (1994).
2. Zatta P., Zambenedetti P., Milačič R.: *Analisis* 26, 72 (1998).
3. Driscoll C. T., Schecher W. D., v knihe: *Metal Ions in Biological System* (Sigel H., Sigel A., ed.). Marcel Dekker, New York 1988.
4. Bloom P. R., Erich M. S.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1, 2 (1989).
5. Klöppel H., Kördel W., Schmid S., Klein W., v knihe: *Metal Speciation in the Environment* (Broekaert J. A. C., Güçer S., Adams F., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
6. Boudot J. P., Becquer T., Merlet D., Rouiller J.: *Ann. Sci. For.* 51, 27 (1994).
7. Clarke N., Danielsson L.-G., Sparén A.: *Pure Appl. Chem.* 68, 1597 (1996).
8. Bloom P. R., Erich M. S., v knihe: *The Environmental Chemistry of Aluminium* (Sposito G., ed.). CRC Press, Boca Raton 1996.
9. Pyrzynska K., Gucer S., Bulska E.: *Water Res.* 34, 359 (2000).
10. Menzies N. W., Bell L. C., Edwards D. G.: *J. Soil Sci.* 42, 585 (1991).
11. Lydersen E., Salbu B., Polèo A. B. S., Muniz I. P.: *Water Air Soil Pollut.* 51, 203 (1990).
12. Lydersen E., Salbu B., Polèo A. B. S.: *Analyst* 117, 613 (1992).
13. Gerke J.: *Geoderma* 63, 165 (1994).
14. Chakrabarti C. L., Lu Y., Cheng J., Back M. H., Schroeder W. H.: *Anal. Chim. Acta* 267, 47 (1993).
15. Lu J. Y., Chakrabarti C. L., Lu Y., Back M. H., Sekaly L. R., Gregoire D. C., Schroeder W. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 1189 (1996).
16. Kožuh N., Milačič R., Gorenc B.: *Ann. Chim. (Rome)* 86, 99 (1996).
17. van Hees P. A. W., Lundström U. S., Giesler R.: *Geoderma* 94, 173 (2000).
18. van Hees P. A. W., Lundström U. S.: *Geoderma* 94, 201 (2000).
19. Riise G., van Hees P., Lundström U., Strand L.T.: *Geoderma* 94, 237 (2000).
20. Florence T. M., Batley G. E.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 9, 219 (1980).
21. LaZerte B. D.: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 766 (1984).
22. Beneš P., Steinnes E.: *Water Res.* 9, 741 (1975).
23. Salbu B., Bjørnstad H. E., Lindström N. S., Lydersen E., Brevik E. M., Rambaek J. P., Paus P. E.: *Talanta* 32, 907 (1985).
24. Berggren D.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 35, 1 (1989).
25. Morrison G. M.: *Analyst* 115, 1371 (1990).
26. Clarke N., Danielsson L.-G., Sparén A.: *Fin. Humus News* 3, 253 (1991).
27. Clarke N., Danielsson L.-G., Sparén A.: *Water, Air, Soil Pollut.* 84, 103 (1995).
28. Rengasamy P., Oades J. M.: *Aust. J. Soil Res.* 16, 53 (1978).
29. Gardiner P. E., Schierl R., Kreutzer K.: *Plant Soil* 103, 151 (1987).
30. Kerven G. L., Edwards D. G., Asher C. J., Hallman P. S., Kokot S.: *Aust. J. Soil Res.* 27, 79 (1989).

31. Alva A. K., Sumner M. E.: *Water, Air, Soil Pollut.* 57–58, 121 (1991).
32. Itoh A., Aikawa M., Sawatari H., Hirose A., Haraguchi H.: *Chem. Lett.* 1993, 1017.
33. Barnes R. B.: *Chem. Geol.* 15, 177 (1975).
34. Bloom P. R., Weaver R. M., McBride M. B.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 713 (1978).
35. Bloom P. R., McBride M. B., Weaver R. M.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43, 488 (1979).
36. James B. R., Clark C. J., Riha S. J.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 893 (1983).
37. James B. R., Riha S. J.: *Can. J. Soil Sci.* 64, 637 (1984).
38. Lalande H., Hendershot W. H.: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 231 (1986).
39. Noble A. D., Sumner M. E., Alva A. K.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 1059 (1988).
40. Alva A. K., Sumner M. E., Li Y. C., Miller W. P.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 38 (1989).
41. Boudot J. P., Merlet D., Rouiller J., Maitat O.: *Sci. Total Environ.* 158, 237 (1994).
42. Clarke N., Danielsson L.-G., Sparén A.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 48, 77 (1992).
43. Clarke N., Guan X., Gobran G. R.: *Eur. J. Soil Sci.* 48, 553 (1997).
44. Clarke N., Danielsson L.-G.: *Anal. Chim. Acta* 306, 5 (1995).
45. Dougan W. K., Wilson A. L.: *Analyst* 99, 413 (1974).
46. Evans D. F., Parr J., Coker E. N.: *Polyhedron* 9, 813 (1990).
47. Exley C., Birchall J. D.: *Polyhedron* 11, 1901 (1992).
48. Seip H. M., Müller L., Naas A.: *Water, Air, Soil Pollut.* 23, 81 (1984).
49. Noller B. N., Cusbert P. J., Currey N. A., Bradley P. H., Tuor M.: *Environ. Technol. Lett.* 6, 381 (1985).
50. Henshaw J. M., Lewis T. E., Heithmar E. M.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 34, 119 (1988).
51. Lewis T. E., Dobb D. E., Henshaw J. M., Simon S. J., Heithmar E. M.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 34, 69 (1988).
52. Kerven G. L., Edwards D. G., Asher C. J., Hallman P. S., Kokot S.: *Aust. J. Soil Res.* 27, 91 (1989).
53. Blamey F. P. C., Edwards D. G., Asher C. J.: *Soil Sci.* 136, 197 (1983).
54. Hsu P. H.: *Soil Sci.* 96, 230 (1963).
- F55. Alva A. K., Edwards D. G., Asher C. J., Blamey F. P. C.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 133 (1986).
- F56. Alva A. K., Edwards D. G., Asher C. J., Blamey F. P. C.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 959 (1986).
- F57. Noble A. D., Sumner M. E., Alva A. K.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 1398 (1988).
58. Alva A. K., Sumner M. E.: *Soil Sci.* 147, 278 (1989).
59. Parker D. R., Zelazny L. W., Kinraide T. B.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 67 (1988).
60. Ginting S., Wilkens S., Johnson B. B.: *Aust. J. Soil Res.* 38, 807 (2000).
61. Bersillon J. L., Hsu P. H., Fiessinger F.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 630 (1980).
62. Bertsch P. M., Layton W. J., Barnhisel R. I.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 1449 (1986).
63. Parker D. R., Bertsch P. M.: *Environ. Sci. Technol.* 26, 908 (1992).
64. Parker D. R., Zelazny L. W., Kinraide T. B., v knihe: *Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminium* (Lewis T. E., ed.). Lewis Publishers, Chelsea 1989.
65. Parker D. R., Kinraide T. B., Zelazny L. W.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 789 (1989).
66. Jardine P. M., Zelazny L. W.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 885 (1987).
67. Jardine P. M., Zelazny L. W.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 889 (1987).
68. Jardine P. M., Zelazny L. W., v knihe: *Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminium* (Lewis T. E., ed.). Lewis Publishers, Chelsea 1989.
69. Zöltzer D., Schwedt G.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 317, 422 (1984).
70. Kennedy J. A., Powell H. K. J.: *Anal. Chim. Acta* 184, 329 (1986).
71. Simpson S. L., Powell K. J., Nilsson N. H. S.: *Anal. Chim. Acta* 343, 19 (1997).
72. Hawke D. J., Powell H. K. J., Gregor J. E.: *Marine Freshwater* 47, 11 (1996).
73. Backes E., Tipping E.: *Water Res.* 21, 211 (1987).
74. Hawke D. J., Powell H. K. J.: *Anal. Chim. Acta* 299, 257 (1994).
75. Adams F., Moore B. L.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 99 (1983).
76. Adams F., Hathcock P. J.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1305 (1984).
77. Driscoll C. T.: *Ph.D. Thesis*. Cornell University, Ithaca 1980.
78. Driscoll C. T.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 16, 267 (1984).
79. Driscoll C. T., Van Breeman N., Mulder J.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 437 (1985).
80. Backes C. A., Tipping E.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 30, 135 (1987).
81. Goenaga X., Bryant R., Williams D. J. A.: *Anal. Chem.* 59, 2673 (1987).
82. Cronan C. S., Walker W. J., Bloom P. R.: *Nature* 324, 140 (1986).
83. Berggren D., Bergkvist B., Falkengren-Grerup U., Folkeson L., Tyler G.: *Sci. Total Environ.* 96, 103 (1990).
84. Vogt R., Seip H. M., Christophersen N., Andersen S.: *Sci. Total Environ.* 96, 139 (1990).
85. Christophersen N., Neal C., Vogt R., Esser J. M., Andersen S.: *Sci. Total Environ.* 96, 175 (1990).
86. McAvoy D. C., Santore R. C., Shosa J. D., Driscoll C. T.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 449 (1992).
87. Alvarez E., Perez A., Calvo R.: *Sci. Total Environ.* 133, 17 (1993).
88. Campbell P. G. C., Bisson M., Bougie R., Tessier A., Villeneuve J.-P.: *Anal. Chem.* 55, 2246 (1983).
89. Hodges S. C.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 57 (1987).
90. Landing W. M., Haraldsson C., Paxéus N.: *Anal. Chem.* 58, 3031 (1986).
91. Powell K. J.: *Analyst* 123, 797 (1998).
92. Miller J. R., Andelman J. B.: *Water Res.* 21, 999 (1987).
93. Duffy S. J., Hay G. W., Micklethwaite R. K., Van Loon G. W.: *Sci. Total Environ.* 76, 203 (1988).
94. Achilli M., Ciceri G., Ferraroli R., Culivicchi G., Pieri S.: *Water Air Soil Pollut.* 57–58, 139 (1991).
95. Quintela M. J., Gallego M., Valcárcel M.: *Analyst* 118, 1199 (1993).

96. Pettersson C., Håkansson K., Karlsson S., Allard B.: *Water Res.* 27, 863 (1993).
97. Haraldsson C., Lyvén B., Pollak M., Skoog A.: *Anal. Chim. Acta* 284, 327 (1993).
98. Burba P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 348, 301 (1994).
99. Berdén M., Clarke N., Danielsson L.-G., Sparén A.: *Water, Air, Soil Pollut.* 72, 213 (1994).
100. Kožuh N., Milačič R., Gorenc B., Abollino O., Sarzanini C.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 67, 27 (1997).
101. Pesavento M., Biesuz R., Palet C.: *Analyst* 123, 1295 (1998).
102. Bérubé D., Brûlé D. G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363, 566 (1999).
103. Wickstrøm T., Clarke N., Derome K., Derome J., Røgeberg E.: *J. Environ. Monit.* 2, 171 (2000).
104. Bertsch P. M., Anderson M. A.: *Anal. Chem.* 61, 535 (1989).
105. Willett I. R.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1385 (1989).
106. Gibson J. A. E., Willett I. R.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22, 1303 (1991).
107. Jones P.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 44, 1 (1991).
108. Michalas F., Glavac V., Parlar H.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 343, 308 (1992).
109. Sutheimer S. H., Cabaniss S. E.: *Anal. Chem.* 67, 2342 (1995).
110. Mitrović B., Milačič R., Pihlar B.: *Analyst* 121, 627 (1996).
111. Mitrović B., Milačič R., Pihlar B., Simončič P.: *Analisis* 26, 381 (1998).
112. Bantan T., Milačič R., Pihlar B.: *Talanta* 46, 227 (1998).
113. Bantan T., Milačič R., Mitrović B., Pihlar B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 365, 545 (1999).
114. Fairman B., Sanz-Medel A., Jones P., Evans E. H.: *Analyst* 123, 699 (1998).
115. Hils A., Grote M., Janßen E., Eichhorn J.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 364, 457 (1999).
116. Ingri N., Kakolowicz W., Sillén L. G., Warnqvist B.: *Talanta* 14, 1261 (1967).
117. Eriksson G.: *Anal. Chim. Acta* 112, 375 (1979).
118. Schecher W. D., Driscoll C. T.: *Water Resour. Res.* 23, 525 (1987).
119. Schecher W. D., McAvoy D.: *Comput. Environ. Urban Syst.* 16, 65 (1992).
120. Parker D. R., Norvell W. A., Chaney R. L., v knihe: *Soil Chemical Equilibrium and Reaction Models* (Loeppert R. H., Schwab A. P., Goldberg S., ed.). SSSA, Madison 1995.

**P. Matúš and J. Kubová** (*Geological Institute, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Speciation of Aluminium in Waters and Soil Solutions**

Toxicity of aluminium depends on its chemical forms occurring in nature. Unequivocally toxic for live organisms are inorganic aqua/hydroxo monomeric and some polymeric complexes of aluminium. Most laboratory speciation methods use operational definitions of determined species, depending on the type of the applied method. The principles of the most frequently used laboratory methods are based on the size and shape of particles or molecules of Al compounds (filtration and ultrafiltration, dialysis, gel chromatography), on different kinetics of formation of stable complex Al compounds and on the type and bond strength in Al compounds (ion exchange and ion chromatography). In addition to a survey of methods of Al speciation in water and soil solutions, methods based on chemical equilibrium calculations used for identification of chemical forms of aluminium or for comparison with experimental results are given.



# VYUŽITIE MIKROVLNNEJ ENERGIE PRI INTERAKCII S ANORGANICKÝMI ZLÚČENINAMI A NERASTNÝMI SUROVINAMI

INGRID MUROVÁ<sup>a</sup>, MILAN HÁJEK<sup>b</sup>  
a MICHAL LOVÁS<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav geotechniky, Slovenská akadémia vied, Watsonova 45, 043 53 Košice, Slovenská republika, <sup>b</sup>Ústav chemických procesů, Akademie věd České republiky, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6  
e-mail: murova@saske.sk, hajek@icpf.cas.cz

Došlo dňa 25.V.2001

Kľúčové slová: mikrovlnná energia, ohrev, chemická úprava

## Obsah

1. Úvod
2. Princíp mikrovlnného ohrevu
3. Mikrovlnné zariadenia
4. Využitie mikrovlnnej energie v chémii a príbuzných priemyselných odvetviach
5. Interakcie mikrovln s materiálmi (chemické zlúčeniny, minerály)
6. Výsledky a diskusia
  - 6.1. Ohrev minerálov v mikrovlnnej peci
  - 6.2. Sušenie
  - 6.3. Intenzifikácia rozpojovania a separácie rúd
  - 6.4. Desulfurizácia uhlia
7. Záver

## 1. Úvod

Medzi progresívne technológie, ktoré sa v posledných rokoch úspešne začali uplatňovať v rôznych priemyselných odvetviach, patria aj technológie využívajúce mikrovlnné žiarenie. Mikrovlnné žiarenie je využívané predovšetkým pre komunikačné účely, ale má široké uplatnenie aj v priemysle a v domácnostiach ako zdroj rýchleho objemového ohrevu potravín a širokého sortimentu tuhých aj kvapalných látok. Významné je tiež jeho použitie ako intenzifikačného činiteľa rôznych technologických procesov najmä v chemickom, potravinárskom a keramickom priemysle. V oblasti spracovania nerastných surovín bolo uplatnenie mikrovlnného žiarenia orientované predovšetkým na oblasť sušenia a tepelného spracovania nerastných surovín, intenzifikácie procesov rozpojovania, chemickej úpravy minerálov a uhlia. Spomenuté možnosti využitia mikrovlnného žiarenia sú podmienené vlastnosťami ožarovaných látok.

## 2. Princíp mikrovlnného ohrevu

Vysokofrekvenčné elektromagnetické žiarenie s vlnovou dĺžkou od 1 cm do 1 m vo všeobecnosti nazývame mikrovlnami.

V technickej praxi boli pre mikrovlnný ohrev vymedzené frekvencie 915 a 2450 MHz. Elektromagnetické vlny sa generujú v magnetrónoch. Anténa magnetrónu vyžaruje elektromagnetické vlnenie do pracovného priestoru mikrovlnnej pece. Rovnomerný ohrev vzorky sa zabezpečuje jej otáčaním, resp. miešaním. V prípade potreby môže v jednom pracovnom priestore pracovať aj viac magnetrónov paralelne<sup>1,2</sup>.

Mikrovlnný ohrev sa odlišuje od konvenčných spôsobov ohrevu tým, že teplo vzniká rotáciou polárnych častíc (molekúl, iónov) vo vysokofrekvenčnom elektromagnetickom poli<sup>3</sup>. Výsledkom je vysoká rýchlosť ohrevu v celom objeme ohrievaného materiálu. Prioritou tohto ohrevu je schopnosť niektorých kvapalných a tuhých látok selektívne absorbovať mikrovlny a premeniť elektromagnetickú energiu na teplo.

## 3. Mikrovlnné zariadenia

Základom úspešného využitia mikrovlnnej energie je voľba vhodného mikrovlnného laboratórneho zariadenia a základné znalosti o chovaní a interakciách mikrovln s rôznymi látkami. V zásade sa rozlišujú dva druhy konštrukcií mikrovlnných zariadení: systémy s rozptýleným poľom a systémy s fokusovaným mikrovlnným poľom (špeciálne zariadenia). V prvom prípade pracuje magnetrón generujúci mikrovlny s rozptýleným poľom so stálym výkonom (väčšinou 600 až 1000 W) a výkon sa mení, resp. znižuje len časovým vypínaním a zapínaním magnetrónu (pulzy, ktoré môžu byť vysielané v časovom rozmedzí aj viac ako 10 sekúnd). Pre fokusované pole, t.j. pole s cieleným žiarením na vzorku, stačia nižšie výkony (do 300 W) a výkon magnetrónu je možné meniť plynule. Najjednoduchším zariadením na mikrovlnný ohrev materiálov je kuchynská mikrovlnná pec. Kuchynské piecky sa vyrábajú väčšinou s jedným vlnovodom a rozptyl elektromagnetického poľa sa dosahuje kovovou vrťou na výstupe. Pole vo vnútri pece je však nehomogénne a nie je jednoduche vzorku, resp. reakčnú zmes umiestniť vždy na to isté miesto, najlepšie s čo najvyššou intenzitou žiarenia. Novšie typy dosahujúce homogénnejšie rozloženie poľa sú vybavené dvoma vlnovodmi a otočným tanierom. Nevýhodou všetkých týchto zariadení sú problémy spojené s meraním teploty vo vnútri reakčnej zmesi (nie je možné použitie bežných teplomerov z dôvodu ich interakcií s mikrovlnami), problémy s miešaním vzorky a obmedzené možnosti uskutočňovania reakcií zahrievaním k bodu varu pod spätným chladičom<sup>4</sup>.

Pre realizáciu chemických experimentov je potrebné kuchynskú piecku jednoducho upraviť, aby mohla byť vybavená vonkajším spätným chladičom a aby bolo možné zabezpečiť meranie teploty a miešanie ožarovaných vzoriek. Kontinuálne snímanie teploty v mikrovlnnej peci sa realizuje prenosným infračerveným pyrometrom alebo prostredníctvom optických vlákien. Pre miešanie zrnitých, alebo kvapalných médií v mikrovlnnej peci sú vhodné mechanické sklenené miešadlá alebo magnetické miešadlá. Komerčne upravené kuchynské mikrovlnné pece zabezpečujú plynulú zmenu výkonu a reguláciu teploty. Laboratórne mikrovlnné zariadenia s pulzným systé-

mom, umožňujú používať meniteľný výkon po 10 W s pulzmi kratšími než 1 sekunda. Pece sú vybavené magnetickým miešáním, spätným vodným chladičom umiestneným mimo mikrovlnný priestor, ako aj meraním a reguláciou teploty. V súčasnosti sú vyvíjané zariadenia s fokusovaným mikrovlnným poľom. So stále sa rozširujúcim uplatnením mikrovlnného žiarenia v rôznych priemyselných odvetviach<sup>5</sup> sa na trhu objavujú nové mikrovlnné zariadenia, napr. mikrovlnné vysoko-templotné pece.

#### 4. Využitie mikrovlnnej energie v chémii a príbuzných priemyselných odvetviach

Mikrovlnný ohrev sa začal uplatňovať v potravinárskom priemysle pri tepelnom spracovaní potravín. Neskôr sa začali mikrovlny využívať pri realizácii chemických procesov, pri sušení rôznych materiálov, spracovaní plastov a skla, vulkanizácii gumených výrobkov, pri spracovaní uhlia a keramických materiálov, ako aj v ďalších priemyselných odvetviach. V Českej republike a v Slovenskej republike sa mikrovlnná energia v priemyselnom merítku využíva v pri sušení dreva, organických farbív a najnovšie na tavenie a spracovanie skla<sup>6</sup>. V Slovenskej republike sa využitie mikrovln pri spracovaní skla zatiaľ iba pripravuje.

Pri uskutočňovaní chemických reakcií bolo pozorované, že je možné výhodne využiť niektoré špecifické vlastnosti mikrovlnného ohrevu, ktoré nie sú možné pri konvenčných postupoch priebehu chemických reakcií. Pri mikrovlnnom ohreve materiálov môžu v objeme vzorky vznikáť horúce centrá (hot spots), čo môže v značnej miere ovplyvniť rôzne procesy, predovšetkým urýchlenie uskutočňovaných reakcií (napr. ak jedna komponenta v tuhej fáze absorbuje mikrovlny, je možné túto vlastnosť využiť k veľmi rýchlemu a objemovému ohrevu celej reakčnej zmesi). Aj napriek známym poznatkom o reflexii mikrovlnného žiarenia kovmi, jemné kovové prášky sú dobrými absorbentami mikrovln. Tieto vlastnosti boli využité pri príprave kovových sulfidov, selenidov, teluridov, boridov, nitridov, chloridov a ďalších anorganických zlúčenín, včítane supravodičov. Aj keď je využitie mikrovlnného ohrevu v organickej syntéze len v počiatočnom štádiu výskumu, doteraz publikované výsledky potvrdzujú, že značný počet základných organických reakcií môže byť uskutočňovaný za prítomnosti mikrovlnného žiarenia rýchlejšie a s dosiahnutím vyšších výťažkov než konvenčnými postupmi. Mikrovlnný ohrev umožňuje nielen rýchle dosiahnutie reakčnej teploty v celom objeme vzorky, ale umožňuje, aby sa na zahrievaní podieľali aj samotné substráty či rozpúšťadlá. Príčinou urýchlenia chemických reakcií mikrovlnným žiarením je aj možnosť prehriatia reakčnej zmesi (superheating). Je napr. známe, že body varu rozpúšťadiel sú v mikrovlnnom prostredí až o 30 °C a viac vyššie ako známe tabuľkové hodnoty<sup>7</sup>, napr. voda 104(100) °C, metanol 84(65) °C, etanol 103(78) °C, acetonitril 107(81) °C.

Na základe súčasných poznatkov je možné predpokladať, že urýchlenie chemických reakcií môže byť vo väčšine prípadov prísúdené tepelnému efektu, t.j. lokálnemu prehriatiu, pričom priemerná teplota v celkovom objeme môže byť podstatne nižšia. Je diskutovaný aj tzv. špecifický mikrovlnný efekt, t.j. jav na molekulárnej úrovni, súvisiaci s aktiváciou reaktantov a polárných väzieb. Tento prípad je veľmi aktuálny

pri uskutočňovaní heterogénnych reakcií bez rozpúšťadla, hlavne v katalýze, pretože tu existujú priaznivé podmienky pre absorpciu mikrovlnného žiarenia adsorbovanými polarizovanými molekulami reaktantov na aktívnych miestach. Výhody mikrovlnného ohrevu v katalýze boli zaznamenané už pri príprave alebo aktivácii katalyzátorov. Mikrovlnným ohrevom možno nielen významne skrátiť dobu sušenia, ale dosiahnuť aj dokonalejšie vysušenie, rovnomernejšiu distribúciu kovových častíc na nosiči a vyššiu mechanickú odolnosť. V prípade heterogénnych katalytických reakcií je možné nielen zvýšiť reakčnú rýchlosť, ale aj selektivitu reakcií. Tieto výhody sú zrejme spôsobené vlastnosťami mikrovln prenikať hlboko do katalyzátora a interagovať s kovovými aktívnymi centrami, u ktorých pri absorpcii mikrovln dochádza k lokálnemu prehriatiu aktívnych centier na povrchu katalyzátora, t.j. k selektívnemu ohrevu aktívnych centier. To vedie k selektívnej aktivácii, prípadne k štiepeniu väzieb adsorbovaného substrátu.

Mikrovlnná energia bola využitá pri urýchlení redukčných procesov oxidov niklu, kobaltu a mangánu pred lúhovaním a pri pražení medených sulfidov<sup>8</sup>. Standish<sup>9</sup> sa zaoberal aplikáciou mikrovln pri redukcii kovových oxidov uhlíkom. Pri aplikácii mikrovln v procesoch redukcie možno využiť poznatok, že uhlík dobre pohlcuje mikrovlnnú energiu. Ak oxidy vstupujúce do procesu mikrovlnného ožarovania nie sú „stratové“ dielektriká, t.j. nie sú dobrými receptormi mikrovln, selektívny ohrev uhlíka môže napomôcť pri ohreve týchto pre mikrovlny transparentných materiálov. Ak oxid je stratové dielektrikum, bude dobre absorbovať mikrovlnnú energiu a bude sa ohrievať. Aplikácia mikrovlnného žiarenia v procesoch redukcie oxidov uhlíkom má možnosť prekonať principiálne konvenčnú redukciu udržiavaním objemového ohrevu počas celého redukčného procesu znížením aktivačnej energie, ako aj urýchlením redukcie<sup>8</sup>.

Dobrym príkladom je redukcja  $Fe_2O_3$ , ktorý nie je dobrým mikrovlnným receptorom, ale  $Fe_3O_4$  je materiálom intenzívne sa ohrievajúcim v mikrovlnnom poli. Zaujímavým aspektom mikrovlnného ohrevu hyperaktívnych materiálov, ako je  $Fe_3O_4$  je, že dosahujú teplotné maximá pri prakticky všetkých výkonových stupňoch bez ohľadu na vstupný výkon. McGill a kol.<sup>10</sup> tvrdia, že ohrev  $Fe_3O_4$  je práve taký efektívny pri 500 W ako pri 2000 W.

Mikrovlnná energia sa využíva aj v keramických technológiách, napr. pri sušení keramických materiálov, spekaní feritov a karbidov, syntéze keramických práškov, povrchovej modifikácii skiel, ako aj pri spájaní keramik. Aplikáciou mikrovlnnej energie v keramickom priemysle je možné zabezpečiť rovnomernejší ohrev keramických materiálov. Pri ohreve vzniká inverzný tepelný gradient redukujúci tepelné napätia, ktoré by mohli spôsobiť vznik trhlin počas ohrevu väčších objemov. Ďalším dôležitým aspektom využívaným pri spracovaní keramik je selektivita absorpcie mikrovln rôznymi materiálmi, čo sa využíva pri vylepšení ich vlastností.

#### 5. Interakcie mikrovln s materiálmi (chemické zlúčeniny, minerály)

Interakcie mikrovln s materiálmi závisia predovšetkým na dielektrických vlastnostiach, tepelnej vodivosti, hustote, mernej tepelnej kapacite, chemickom zložení, obsahu prímеси

ožarovovaných látok, ako aj na parametroch použitého mikrovlnného zariadenia (frekvencii a výkone mikrovlnnej pece a intenzite elektrického poľa). V prípade vzájomného pôsobenia mikrovln s elektricky vodivými materiálmi, napr. kovmi, dochádza k odrazu mikrovlnného žiarenia. Pri interakcii mikrovln s bezstratovými dielektrikami (sklo, kremeň) dochádza k transmisii mikrovlnného žiarenia látkou. Pre technologické účely je nevyhnutná absorpcia mikrovlnného žiarenia, ku ktorej dochádza u materiálov, ktoré dobre pohlcujú mikrovlny (polárne látky – napr. voda; stratové dielektriká). Výsledkom absorpcie mikrovlnného žiarenia je premena elektromagnetickej energie na tepelnú.

Pre orientačný výpočet nárastu teploty objemovej jednotky materiálu v mikrovlnnom poli je možné použiť vzťah<sup>11</sup>:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{P}{\rho c} = \frac{55,65 \cdot 10^{-12} f \varepsilon'' E^2}{\rho c} \quad (1)$$

kde  $T$  – teplota [K],  $t$  – čas [s],  $P$  – výkon absorbovaný jednotkovým objemom [ $\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$ ],  $f$  – frekvencia [Hz],  $\varepsilon''$  – imaginárna zložka komplexnej dielektrickej permitivity,  $E$  – intenzita elektrického poľa [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ],  $\rho$  – hustota materiálu [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ],  $c$  – merná tepelná kapacita materiálu [ $\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ].

Hodnota imaginárnej zložky permitivity charakterizuje veľkosť dielektrických strát a možno ju použiť ako kritérium pre posúdenie vhodnosti ohrevu látok v mikrovlnnej peci. V prípade, ak dochádza pri ohreve v mikrovlnnej peci k fázovej premene materiálov (sulfidy, karbonáty), detailnejší popis ohrievacieho procesu je komplikovaný.

Tabuľka I

Mikrovlnný ohrev vybraných chemických prvkov<sup>12</sup>;  $t$  – čas mikrovlnného ohrevu,  $T$  – teplota nameraná po čase  $t$ , výkon mikrovlnnej pece 600 W

Chemický prvok	$T$ [°C]	$t$ [min]
Al	577	6
C (amorfný)	1283	1
C (grafit)	1073	1,7
Co	697	3
Cu	228	7
Fe	768	7
Hg	40	6
Mg	120	7
Mo	660	4
Nb	358	6
Ni	384	1
Pb	277	7
S	163	6
Sb	390	1
Sn	297	6
Ta	177	7
V	557	1
W	690	6,2
Zn	581	3

Problematickou mikrovlnného ohrevu rôznych látok sa zaoberali Walkiewicz a kol.<sup>12</sup> Sledovali rýchlosť ohrevu chemických zlúčenín v mikrovlnnej peci pri výkone 600 W. Maximálne dosiahnuté teploty a čas mikrovlnného ohrevu vybraných prvkov a chemikálií sú uvedené v tabuľkách I a II.

Z experimentálne získaných výsledkov vyplynuli nasledujúce závery:

- najvyššie teploty pri mikrovlnnom ohreve boli dosiahnuté u NiO, MnO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, WO<sub>3</sub>,
- väčšina kovových sulfidov sa v mikrovlnnom poli dobre ohrieva,
- niektoré materiály sa extrémne rýchlo ohrievajú, napr. amorfný uhlík dosiahol teplotu 1170 °C za 30 s,
- kovové prášky sa ohrievajú intenzívne,
- zlúčeniny ZnCl<sub>2</sub>, SnCl<sub>2</sub> sa ohrievajú slabo,
- sprievodné minerály, napr. kremeň sa v mikrovlnnom poli neohrievajú.

## 6. Výsledky a diskusia

### 6.1. Ohrev minerálov v mikrovlnnej peci

Vplyv mikrovlnného žiarenia na rýchlosť ohrevu bol sledovaný u rôznych typov minerálov. Vzorky minerálov zrnitostnej triedy 0,2–0,5 mm boli ohrievané v mikrovlnnej peci

Tabuľka II

Mikrovlnný ohrev vybraných chemikálií<sup>12</sup>;  $t$  – čas mikrovlnného ohrevu,  $T$  – teplota nameraná po čase  $t$ , výkon mikrovlnnej pece 600 W

Chemická zlúčenina	$T$ [°C]	$t$ [min]
Ag <sub>2</sub> S	652	5,2
AgCl	45	4
CaS	102	4,5
CdCl <sub>2</sub> ·2,5 H <sub>2</sub> O	144	2,5
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	153	4
Co <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1290	3
CuBr	722	11
CuCl	619	13
CuCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	171	2,7
CuO	1012	6,2
FeCl <sub>2</sub>	33	1,5
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	220	4,5
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·9 H <sub>2</sub> O	154	6
HgCl <sub>2</sub>	112	7
KCl	31	1
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	254	4
MgO	203	5,5
MnO	113	6
MnO <sub>2</sub>	1287	6
NiO	1305	6,2
SbCl <sub>3</sub>	224	1,7
WO <sub>3</sub>	1270	6
ZnCl <sub>2</sub>	609	7

Tabuľka III

Ohrev minerálov v mikrovlnnej peci;  $t$  – čas mikrovlnného ohrevu,  $T$  – teplota namieraná po čase  $t$ ; výkon mikrovlnnej pece 900 W

Minerál	Lokalita	$T$ [°C]	
		1 min	5 min
Baryt (BaSO <sub>4</sub> )	Rudňany	69	107
Galenit (PbS)	Banská Štiavnica	741	– <sup>a</sup>
Hematit (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Hačava	118	423
Chalkopyrit (CuFeS <sub>2</sub> )	Slovinky	780	– <sup>a</sup>
Chromit (FeCr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	Turecko	85	218
Kremeň (SiO <sub>2</sub> )	Švedlár	65	90
Magnetit (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	Rusko (Krivoj Rog)	547	– <sup>a</sup>
Pyrotín (FeS)	Zlatá Baňa	290	– <sup>a</sup>
Pyrit (FeS <sub>2</sub> )	Hnúšťa	670	– <sup>a</sup>
Sfalerit (ZnS)	Banská Štiavnica	176	192
Siderit (FeCO <sub>3</sub> )	Rudňany	152	257
Tetraedrit (Cu <sub>12</sub> Sb <sub>4</sub> S <sub>13</sub> )	Rožňava	413	– <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nebolo sledované

Whirlpool AVM 434 pri výkone 900 W v keramických nádobách. Navážka vzoriek bola 20 g. Teplota bola meraná počas mikrovlnného ohrevu vzoriek infračerveným bezkontaktným teplomerom Raynger MX4 otvorom v hornej časti piecky. Dosiagnuté výsledky sú uvedené v tabuľke III.

Na základe rýchlostí ohrevu boli ožarované minerály zaradené do nasledujúcich skupín:

- minerály, slabo sa ohrievajúce, alebo neohrievajúce sa v mikrovlnnom poli: kremeň, baryt,
- minerály, dobre sa ohrievajúce v mikrovlnnom poli: pyrotín, hematit, siderit, sfalerit, chromit,
- minerály, intenzívne sa ohrievajúce v mikrovlnnom poli: chalkopyrit, galenit, pyrit, magnetit, tetraedrit.

## 6.2. Sušenie

Pri úprave nerastných surovín, podobne ako v ostatných priemyselných odvetviach sú mikrovlny používané najmä na vyvolanie termického efektu, ktorý sa uplatňuje priamo pri sušení alebo ohreve nerastných surovín<sup>13</sup>. Pri mikrovlnnom sušení dochádza k dvom základným interakciám. Prvý druh predstavuje vplyv mikrovlnného žiarenia na tuhý komponent sústavy minerál – voda a druhý zase na vodu, ktorá sa v mikrovlnnom poli rýchlo ohrieva. V prípade, že sa suší minerálna látka, ktorá absorbuje mikrovlnné žiarenie lepšie ako voda, uplatňuje sa predovšetkým prvý druh interakcie. Voda sa ohrieva a vyparuje v dôsledku ohrevu od ožarovaného minerálu a priamy vplyv mikrovln na jej odparovanie nie je podstatný. V druhom prípade, keď minerál nedostatočne absorbuje mikrovlnné žiarenie, prevažujú interakcie mikrovln s vodou. Experimentálne bola sledovaná rýchlosť sušenia vybraných zrnitých minerálov – kremeňa (SiO<sub>2</sub>), sideritu (FeCO<sub>3</sub>) a zmesi kremeňa s magnetitom (SiO<sub>2</sub> + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Z teoretických a experimentálnych výsledkov vyplynulo:

- jemnejšie zrnitostné triedy sideritu a kremeňa vykazujú rýchlejší priebeh sušenia v porovnaní s hrubšími triedami,

- rýchlosť sušenia zmesi kremeňa a magnetitu, z ktorých sa prvý mikrovlnami slabo a druhý intenzívne ohrieva, sa zvyšuje s rastom podielu magnetitu.

Uvedené výsledky potvrdili možnosť mikrovlnného sušenia látok rôznych vlastností a urýchlenie procesu sušenia pridaním látky, ktorá sa účinkom mikrovln silne ohrieva. Efektívnosť mikrovlnného ohrevu v závislosti na veľkosti častíc bola potvrdená aj pri sušení hnedého uhlia. Bolo zistené, že rýchlosť sušenia v mikrovlnnej peci rastie so znižovaním zrnitosti ožarovaného materiálu, kým pri klasickom sušení bol pozorovaný opačný efekt.

## 6.3. Intenzifikácia rozpojovania a separácie rúd

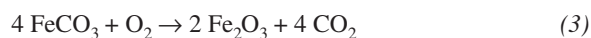
Vychádzajúc z teoretických poznatkov a experimentálnych výsledkov správania sa minerálov v mikrovlnnom poli a na základe selektívnych interakcií mikrovln, ktoré môžu ovplyvňovať pevnosť ožarovaných materiálov, je možné zvýšiť efektívnosť rozpojovania nerastných surovín. V prípade heterogénnych nerastov rôznych dielektrických vlastností mikrovlny selektívne pôsobia na jednotlivé minerálne komponenty, medzi ktorými dôsledkom nerovnakého ohrevu a tepelnej dilatácie vznikajú pnutia a deštruktívne javy, ktoré znižujú pevnosť upravovanej nerastnej suroviny. U minerálov, ktoré sa vplyvom tepla rozkladajú, sa evidentne zvyšuje už spomenutý deštruktívny účinok. Príkladom sú chalkopyritom prerastané sideritové valčeky, u ktorých došlo po 30 sekundách ožarovania v mikrovlnnej peci k deštrukcii v miestach vtrúsenia chalkopyritu následkom jeho intenzívneho ohrevu. Mikrovlnná predúprava rudných minerálov v procesoch ich rozpojovania umožňuje zvýšiť efektívnosť ich selektívneho lúhovania, flotácie a magnetickej separácie.

Intenzifikáciu magnetickej separácie nerastných surovín je možné vyvolať selektívnou modifikáciou ich magnetickej vlastností prostredníctvom mikrovlnného ohrevu. Napr. pri mikrovlnnom ohreve slabomagnetickej sulfidických a karbonátových rúd dochádza k ich rýchlej termickej dekompozícii následkom selektívneho ohrevu zložiek obsahujúcich Fe. Vyvolané fázové zmeny úžitkových zložiek spôsobia zvýšenie ich magnetickej vlastností (magnetickej susceptibility) na mieru dostatočnú k ich efektívnej magnetickej separácii.

Predúprava slabomagnetickej rúd mikrovlnným žiarením bola laboratórne odskúšaná na chalkopyritovej (CuFeS<sub>2</sub>) a sideritovej (FeCO<sub>3</sub>) rude. Modifikácia magnetickej vlastností chalkopyritu pôsobením mikrovln vyžaduje jeho termickú dekompozíciu a vznik silne paramagnetickej hematitu (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pri teplote nad 680 °C podľa rovnice:



Ožarovanie sideritu spôsobuje nárast teploty a jeho dekarbonizáciu podľa rovnice:



Mikrovlnné ožarovanie bolo realizované u chalkopyritovej rudy (Slovinky) zrnitostnej triedy 5–15 mm, ktorá bola po



mikrovlňnom ohreve dodrvená na zrnitosť pod 0,5 mm a následne magneticky rozdrúžovaná. Zrnitostná trieda 5–15 mm bola použitá na základe experimentálnych výsledkov mikrovlňného ohrevu chalkopyritovej rudy rôznych zrnitostných tried. Mikrovlňný ohrev bol realizovaný v mikrovlňnej peci Panasonic NN 5251 B pri výkone 900 W. Vzorky boli ožarované v keramických nádobách, čas ožarovania bol 60 a 90 s. Pre magnetické rozdrúžovanie vzoriek bol použitý valčekový elektromagnetický rozdrúžovač Mechanobr typ 138 T-SEM, určený pre suchý proces rozdrúžovania. Zvýšenie magnetických vlastností vyvolané mikrovlňnou predúpravou chalkopyritovej rudy umožnilo efektívne magnetické rozdrúžovanie, ktoré u pôvodnej rudy nebolo možné. V procese magnetického rozdrúžovania sledovanej chalkopyritovej rudy, ktorá bola ožarovaná 90 s, pri indukcií 0,65 T sa získal magnetický produkt, ktorý obsahoval 14,92 % Cu pri výťažnosti 73,23 %. Vplyv mikrovlňnej predúpravy na intenzifikáciu procesu magnetického rozdrúžovania bol sledovaný aj u vzorky rudnianskej sideritovej rudy. V procese magnetického rozdrúžovania vzorky zrnitostnej triedy 0,5–1 mm, ožarovanej 15 min sa získal magnetický produkt, ktorý obsahoval 45,6 % Fe pri výťažnosti 97,6 %.

Vplyv mikrovlňného žiarenia na magnetické vlastnosti minerálov študovali aj Kingman a Rowson<sup>14</sup> a zistili, že niektoré materiály vykazovali po mikrovlňnom ohreve podstatné zmeny magnetickej susceptibility.

#### 6.4. Desulfurizácia uhlia

Desulfurizácia uhlia roztavenými hydroxidmi je mokrý alkalický postup, určený na odsírenie uhlia s obsahom pyritickej a organickej síry s použitím NaOH, resp. KOH (cit.<sup>15</sup>). Zlúčeniny, ktoré v procese vznikajú, sú následne lúhované vodou, pričom dochádza k rozpusteniu prevažného množstva zlúčenín Si, Al, S, Cr a pod.

V súvislosti s hľadaním nových postupov odsírovania uhlia bol študovaný účinok mikrovlňného ožarovania uhlia v zmesi s alkalickými hydroxidmi na zníženie obsahu síry. Experimentálne bolo zistené, že uhlie sa v mikrovlňnom poli slabo ohrieva, avšak voda, pyrit, ako aj hydroxidy (NaOH, KOH) dobre absorbujú mikrovlňnú energiu, čoho makroskopickým prejavom je zvýšenie teploty ohrievanej zmesi<sup>16</sup>. Za účelom desulfurizácie slovenského hnedého uhlia bol sledovaný vplyv mikrovlňného žiarenia v procese RMCL (Radiation and Molten Caustic Leaching) na zníženie obsahu síry v zmesi uhlia s alkalickým tuhým činidlom (KOH). Uplatnenie mikrovlňného žiarenia v procese desulfurizácie bolo sledované na vzorke uhlia z bane Cígeľ, zrnitosti <3 mm. K mikrovlňnému ožarovaniu vzoriek bola použitá laboratórna mikrovlňná pec Whirlpool (výkon 400 W). Kontinuálne meranie teploty zmesi (KOH + uhlie v pomere 1:1) bolo realizované bezkontaktným teplomerom. Teplota bola udržiavaná na hodnote od 270 do 300 °C. Čas ohrevu bol 5, 8 a 10 minút. Za uvedených podmienok bol po 10 minútach mikrovlňného ožarovania dosiahnutý 85%-ný pokles síry oproti obsahu síry v pôvodnej vzorke. Porovnaním tohoto experimentálneho výsledku s konvenčným tavením v muflovej peci pri teplote 380 °C počas 45 minút bolo pozorované podstatné zníženie doby tepelnej úpravy uhlia v procese jeho desulfurizácie aplikáciou mikrovlňného žiarenia pri daných definovaných podmienkach.

## 7. Záver

Využitie získaných poznatkov o interakciách mikrovlňn s materiálmi predpokladá široké uplatnenie mikrovlňnej energie pri inovácii zaužívaných procesov úpravy nerastných surovín, napr. pri urýchlenní sušenia širokej škály materiálov, pri intenzifikácii procesov drvenia a mletia nerastov, v procesoch magnetického rozdrúžovania slabomagnetických rúd po ich mikrovlňnej predúprave, ako aj pri chemickej úprave uhlia a minerálov absorbujúcich mikrovlňné žiarenie.

Na základe dosiahnutých experimentálnych výsledkov boli zistené charakteristické prejavy mikrovlňného ohrevu:

- urýchlenní prebiehajúcich procesov,
- objemový charakter ohrevu, pri ktorom sa materiál ohrieva v celom objeme, zvnútra ožarovaneho materiálu smerom k vonkajším vrstvám,
- selektívnosť ohrevu materiálov na základe ich dielektrických vlastností,
- v mikrovlňnej peci sa materiál absorbujúci mikrovlňnú energiu začína ohrievať hneď po zapnutí pece,
- ekologická nezávadnosť procesu, nakoľko pri mikrovlňnom ohreve nedochádza k vzniku škodlivých spalín a plynov, ako pri iných spôsoboch ohrevu, pri ktorých sa pece vyhrievajú použitím paliva.

*Tento príspevok vznikol v rámci riešenia úloh VEGA (grant č. 6104/2001) a Medzinárodného slovensko-českého projektu č. 25.*

## LITERATÚRA

1. Rada J.: *Elektrotepelná technika*. SNTL, Praha 1985.
2. Smirenin V.: *Rádiotechnická príručka*. SNTL, Praha 1995.
3. Metaxas A. C., Meredith R. J.: *Industrial Microwave Heating*. Peter Peregrinus, London 1983.
4. Hájek M.: *XXI. konferencie organických chemiků, Opočno, 24.–27.6.1996*, sborník, poster P07.
5. Decareau R. V.: *6<sup>th</sup> Int. Conf. on Microwave and High Frequency Heating, Fermo, 9–13 September 1997*, Proceedings (Breccia A., ed.), str. 469.
6. Hájek M., Drahoš J., Volf V., Vosáb J. (Ústav chemických procesů AV ČR): PCT Int. App. WO 00/78684.
7. Hájek M.: *30. konferencie Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Liblice 6.–8.11.1995*, sborník, str. 67.
8. Worner H. K.: *Proc. First Australian Symposium on Microwave Power Applications, Port Pirie, South Australia, February 1989*, str. 179.
9. Standish N., Worner H. K.: *J. Microw. Power Electromagn. Energy* 3, 177 (1990).
10. McGill S. L., Walkiewicz J. W., Clark A. E.: *Report of Investigation no. RI 9518*. U.S. Bureau of Mines, Reno 1995.
11. Metaxas A. C.: *Foundations of Electroheat: A Unified Approach*. J. Wiley, Chichester 1996.
12. Walkiewicz J. W.: *Miner. Metall. Processing* 1988, 39.
13. Looock W. V.: *6<sup>th</sup> Int. Conf. on Microwave and High Frequency Heating, Fermo, 9–13 September 1997*, Proceedings (Breccia A., ed.), str. 421.

14. Kingman S. W., Rowson N. A.: *J. Microw. Power Electromagn. Energy*, 3, 145 (2000).
15. Turčániová L., Hredzák S.: *Acta Montanistica Slovaca* 3, 223 (1997).
16. Marland S., Han B., Rowson N. A., Marchant A. J.: *Acta Montanistica Slovaca* 3, 351 (1998).

**I. Murová<sup>a</sup>, M. Hájek<sup>b</sup>, and M. Lovás<sup>a</sup>** (*<sup>a</sup>Institute of Geotechnics, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia, <sup>b</sup>Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Application of**

### **Microwave Energy to Inorganic Compounds and Raw Materials**

This is a review of the literature information on application of microwave energy to inorganic materials and to chemical treatment of raw materials. Methods of microwave heating of various materials and suitable laboratory or pilot-plant microwave facilities are described. The results of microwave heating of various chemical elements, compounds, and minerals and possible use of microwaves for the reduction of sulfur in coal as well as in drying, disintegration and magnetic separation of ores are presented.



## **Vysoká škola chemicko-technologická v Praze**

### **Ústav technologie ropy a petrochemie**

Vám v rámci své hospodářské činnosti nabízí provedení komplexních analýz ropných produktů

- Vlastnosti a složení benzinů, naft a topných olejů
- Vlastnosti a komplexní analýza motorových a průmyslových olejů
- Analýza mazutu, asfaltu a dalších těžkých ropných produktů
- Analýza a stanovení škodlivin v ropných produktech a odpadních materiálech – polyaromatické uhlovodíky a PCB
- Nestandardní analýzy
  - plynová chromatografie (GC)
  - hmotnostní spektrometrie (GC-MS)
  - kapalinová chromatografie s UV, RI a fluorescenční detekcí
  - simulovaná destilace
  - FTIR spektrometrie
  - termická analýza (TG, tlaková DSC)

**Kontakt:** VŠCHT Praha, Ústav technologie ropy a petrochemie, Technická 5, 166 28 Praha 6, fax 02-24310481  
 Prof. Ing. Gustav Šebor, CSc., tel. 02-24354162, e-mail: seborg@vscht.cz  
 Ing. Milan Pospíšil, CSc., tel. 02-24354238, e-mail: pospisim@vscht.cz

# CHEMIE KŘEMÍKU VE VODÁCH

PAVEL PITTER

Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-  
-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
e-mail: Pavel.Pitter@vscht.cz

Došlo dne 23.X.2001

Klíčová slova: křemík ve vodách, formy výskytu, výskyt,  
vlastnosti, analytické stanovení

## Obsah

1. Úvod
2. Geneze
3. Formy výskytu
4. Analytické stanovení
  - 4.1. Způsob vyjadřování výsledků
  - 4.2. Analytické stanovení
5. Výskyt ve vodách
6. Hydrochemická a balneologická klasifikace
7. Vlastnosti a význam

## 1. Úvod

S výjimkou energetické chemie byla v hydrochemii a technologii vody věnována chemii a biologii křemíku dosud jen okrajová pozornost. Většinou není uváděn v požadavcích na jakost různých druhů vod, s výjimkou požadavků na jakost vody pro napájení parních kotlů a provoz turbín. Tato situace se v posledních letech poněkud mění, protože např. v povrchových vodách mohou být větší koncentrace křemíku příčinou nadměrného rozvoje některých organismů. Proto se zájem o sloučeniny křemíku ve vodách postupně zvyšuje. Chemie křemíku je poměrně složitá. Základní údaje lze najít v učebnicích chemie, např. v knize Greenwooda a Ernshawa<sup>1</sup>. Byly jí věnovány rozsáhlé, dnes již klasické monografie<sup>2</sup>. Křemičitany se však v přírodních a užitkových vodách vyskytují v relativně velmi nízkých koncentracích, kde chemie křemíku je poněkud jednodušší. V referátu je věnována pozornost právě této koncentrační oblasti.

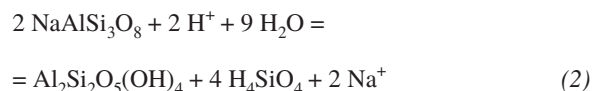
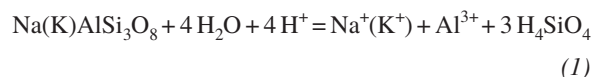
## 2. Geneze

Křemík je po kyslíku nejrozšířenějším prvkem v přírodě. Avšak na rozdíl od jiných prvků je rozšířen poměrně rovnoměrně. Vyskytuje se zejména ve formě křemičitanů silně elektropozitivních prvků; proto je křemík běžnou součástí různých druhů vod.

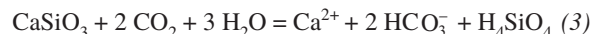
Hlavním přírodním zdrojem křemíku ve vodách je che-

mické zvětrávání křemičitanů, které jsou součástí hornin a půd (živce, slídy, amfiboly, pyroxeny, jílové minerály aj.). Jde o jejich rozpouštění a hydrolytický rozklad, který je podporován přítomností oxidu uhličitého. Při tomto procesu se tvoří sekundární minerály a část nadbytečného křemíku přechází do kapalné fáze. V prostých podzemních vodách je zvětrávání křemičitanů a hlinitokřemičitanů hlavním zdrojem křemíku a alkalických kovů. Značné množství křemíku je přítomno ve vodách, jejichž geneze je spojena s vulkanickou aktivitou.

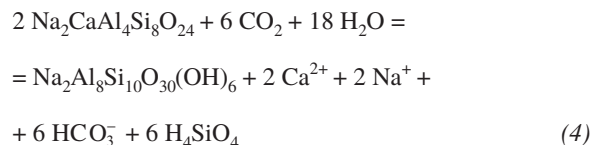
Mechanismus hydrolytického rozkladu lze demonstrovat na rozpouštění hlinitokřemičitanu (jílového minerálu) albitu, případně na jeho transformaci na kaolinit:



Na hydrolyze se může významně podílet rozpuštěný oxid uhličitý:



přičemž současně dochází k obohacení vody hydrogenuhlíčitany. Dalším příkladem může být reakce andezinu s oxidem uhličitým za vzniku montmorillonitu:



Z uvedených rovnic (1) až (4) vyplývá, že pokud se při tvorbě chemického složení podzemních vod uplatňuje především zvětrávání křemičitanových minerálů (tzv. silikátogenní vody), pak se obvykle nachází ve vodách látkový poměr  $\text{Si}:\text{HCO}_3^- = 1:1$  až  $1:2$  a poměr  $\text{Si}:\text{Na}^+ = 2:1$  až  $3:1$  (cit.<sup>3</sup>).

Zdrojem křemíku může být i značná rozpustnost samotného amorfního a krystalického  $\text{SiO}_2$ , která bývá příčinou vysokých koncentrací křemíku v podzemních vodách hlubinného původu.

Antropogenním zdrojem křemíku mohou být některé průmyslové odpadní vody z výroby skla a keramiky, kde se však sloučeniny křemíku vyskytují převážně v nerozpuštěné formě. Dalším zdrojem křemíku jsou pak prací prostředky (viz kap. 7.). V některých případech se sloučeniny křemíku (vodní sklo) přidávají do vody při její úpravě, protože zabraňují vylučování železa a manganu a inhibují korozi ocelového a litinového potrubí (viz kap. 7.). Aktivovaná kyselina křemičitá se dříve používala jako pomocný koagulační prostředek při úpravě vody čířením. Nyní se však již tento postup nepoužívá.

### 3. Formy výskytu, rozpustnost

Při rozpouštění  $\text{SiO}_2$  ve vodě se tvoří při 25 °C kyselina tetrahydrogenkřemičitá  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , resp.  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (formálně  $\text{H}_2\text{SiO}_3$ ) podle rovnice:



$$\log K = -2,6 \text{ (pro amorfní } \text{SiO}_2\text{)}$$

$$\log K = -4,0 \text{ (pro křemen)}$$

Rozpustnost amorfního  $\text{SiO}_2$  ve vodě v závislosti na teplotě byla podrobně sledována<sup>4,5</sup>. Přehled je uveden v tabulce I. Až do hodnoty pH 9 je závislost rozpustnosti na teplotě malá. Teprve při hodnotách pH nad 9 se rozpustnost značně zvyšuje, což je způsobeno disociací molekuly  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  na anion  $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$ . Podrobná teplotní závislost byla publikována<sup>6</sup>. Amorfní  $\text{SiO}_2$  se rozpouští na pravý roztok s molekulární  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ . Netvoří se koloidní disperze. Krystalické formy  $\text{SiO}_2$  jsou podstatně méně rozpustné, nejméně rozpustný je křemen. Jeho rozpustnost při 25 °C a hodnotách pH pod 9 je asi 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (asi 6 mg.l<sup>-1</sup> jako  $\text{SiO}_2$ ).

Za určitých podmínek může docházet ke vzniku přesycených roztoků. Avšak rozpouštěcí a srážecí rovnováha se ustaluje jen velmi zvolna. Přesycené roztoky mohou přetrvávat i několik týdnů až měsíců. Z přesycených roztoků (připravených např. ochlazením nasycených roztoků nebo okyselením alkalických roztoků) se hydratovaný  $\text{SiO}_2$  vylučuje v koloidní formě. Forma tuhé fáze závisí kromě uvedených faktorů také na rychlosti vylučování. Z horkých pramenů s teplotou nad 100 °C se za určitých podmínek vylučuje minerál opál, který je nestabilní a přeměňuje se postupně na chalcedon a křemen.

Pokud je křemík přítomen v pravém roztoku, nesráží se přidávkem elektrolytů, které rozpustnost ovlivňují jen velmi málo. Proto rozpustnost křemíku v mořské vodě je přibližně stejná jako rozpustnost ve vodách s malou celkovou mineralizací. Avšak  $\text{SiO}_2$  v koloidní disperzi přidávkem elektrolytů koaguluje a vylučuje se jako sraženina. Koloidní  $\text{SiO}_2$  se snadno sorbuje na jiné koloidy přítomné ve vodě a podle okolností dochází ke spolusrážení.

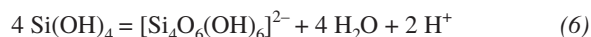
V závislosti na koncentraci (v přesycených roztocích), hodnotě pH a teplotě může docházet ke vzniku polykřemičitanů. Jde o polynukleární hydroxokomplexy. K tvorbě polykřemičitanů dochází především při vysoké počáteční koncentraci křemíku, v alkalickém prostředí a při vyšší teplotě. Polymerace na koloidní formy probíhá jen velmi zvolna, tak-

Tabulka I

Rozpustnost amorfního  $\text{SiO}_2$  ve vodě v hmotnostních a látkových koncentracích v závislosti na teplotě (pH < 9)

Rozpustnost	Teplota [°C]		
	0	25	90
Si [mg.l <sup>-1</sup> ]	28–37	46–65	140–178
$\text{SiO}_2$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	60–80	100–140	300–380
$\text{H}_2\text{SiO}_3$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	78–103	128–180	389–495
Si, $\text{SiO}_2$ ,	0,996–1,32	1,63–2,31	4,98–6,33
$\text{H}_2\text{SiO}_3$ [mmol.l <sup>-1</sup> ]			

že mnohé vody jsou dlouhodobě přesyceny vzhledem k amorfnímu  $\text{SiO}_2$ . Z polykřemičitanů přicházejí v úvahu např.  $[\text{Si}_2\text{O}_3(\text{OH})_4]^{2-}$ ,  $[\text{Si}_4\text{O}_6(\text{OH})_6]^{2-}$  a  $[\text{Si}_8\text{O}_{12}(\text{OH})_{12}]^{4-}$ . Vznik jednoho z uvedených komplexů lze znázornit reakcí<sup>7</sup>:



$$\log K = -12,6 \text{ (25 °C)}$$

V přírodních a užitkových vodách bývá však zastoupení polymerních forem poměrně malé a obvykle nepřesahuje 10 % celkové koncentrace křemíku.

Kyselina tetrahydrogenkřemičitá je velmi slabou kyselinou disociující v prvním stupni na anion  $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$  (formálně  $\text{HSiO}_3^-$ ). Disociační konstanta má hodnotu asi  $10^{-9,5}$  (25 °C). To znamená, že teprve při hodnotě pH 9,5 je v roztoku zastoupena disociovaná a nedisociovaná forma v látkovém poměru 1:1. Při disociaci do druhého stupně se uplatňuje anion  $[\text{SiO}_2(\text{OH})_2]^{2-}$ . Disociační konstanta do druhého stupně má při teplotě 25 °C hodnotu asi  $10^{-12,5}$  (cit.<sup>7</sup>). Nutno dodat, že údaje o disociačních konstantách se v literatuře dosti liší.

V kyselém, neutrálním až slabě alkalickém prostředí (asi do hodnoty pH 8) zcela převažuje nedisociovaná molekula  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ; proto se křemík ve vodách chová převážně jako neelektrolyt. Iontové formy křemíku se mohou uplatňovat ve vodách ve větší míře jen v silněji alkalickém prostředí, asi nad hodnotou pH 9.

Křemík tvoří s některými kovy komplexy. Jde např. o komplexy s  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , např.  $[\text{FeSiO}(\text{OH})_3]^{2+}$  nebo  $[\text{FeSiO}(\text{OH})_6]^-$ . Při vyšších koncentracích železa přichází pravděpodobně v úvahu i tvorba polynukleárních komplexů<sup>8</sup>. Vznik výše uvedeného komplexu lze znázornit reakcí:



Při hodnotě pH 3,3 a koncentraci celkového  $\text{Fe}^{\text{III}}$  0,05 mmol.l<sup>-1</sup> má rovnovážná konstanta reakce (7) hodnotu 0,57. Za tohoto předpokladu lze vypočítat, že v kyselých důlních vodách s hodnotou pH 3, s koncentrací celkového křemíku 1 mmol.l<sup>-1</sup> a celkovou koncentrací železa 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>, může být asi jedna třetina železa komplexována s křemíkem, což se může projevit na chemických a biochemických vlastnostech vody.

Další formou existence křemíku ve vodách jsou nerozpuštěné formy, obvykle v koloidní disperzi. Jde především o hlinítokřemičitanu (jílové minerály). Původní předpoklad, že ve vodách dominuje koloidně dispergovaný  $\text{SiO}_2$  se ukázal jako neopodstatněný. Ukázalo se, že dominující formou výskytu křemíku ve vodách jsou rozpuštěné formy. Teprve v kyselém prostředí a zejména za vyšší teploty dochází postupně ke vzniku polymerních koloidně dispergovaných forem až forem suspendovaných. Vzniklá tuhá fáze, v podstatě hydratovaný  $\text{SiO}_2$ , má převážně záporný povrchový náboj a vynikající sorpční vlastnosti (viz kap. 7.).

### 4. Analytické stanovení

#### 4.1. Způsob vyjadřování výsledků

V praxi se dosud obvykle preferuje vyjadřování koncentrace křemíku ve vodách v hmotnostních koncentracích jako



mg SiO<sub>2</sub> v 1 litru vody. V balneologických rozbořech se dosud někdy vyjadřují výsledky v mg H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> v 1 litru vody. Je to archaismus v porovnání s vyjadřováním většiny ostatních složek (Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn atd.). Vyjadřování složení vody prostřednictvím obsahu oxidů (CaO, MgO, Na<sub>2</sub>O, SO<sub>3</sub> atp.) bylo užíváno v 19. století. Obvyklým argumentem zastánců tohoto způsobu je, že při odpařování vody a sušení odparku se zpočátku vylučuje křemík jako hydratovaný SiO<sub>2</sub> a po vysušení a vyžhání odparku je přítomen jako SiO<sub>2</sub>. Na druhé straně je si však nutné uvědomit, že při odpařování vzorku vody a sušení odparku se v hydrogenuhlíčanových vodách vylučuje vápník jako CaCO<sub>3</sub> (po vyžhání jako CaO) a v síranových vodách převážně jako CaSO<sub>4</sub>. Obdobná situace je i u hořčíku. To však není žádný důvod k tomu, aby se koncentrace vápníku ve vodách vyjadřovaly jako uhličitán nebo síran.

Pokud se koncentrace křemíku vyjadřuje v hmotnostních koncentracích, mělo by být preferováno vyjadřování v mg Si v 1 litru vody; ovšem zásadní přednost by měla být dána vyjadřování složení v látkových koncentracích (mmol.l<sup>-1</sup> resp. μmol.l<sup>-1</sup>), které jsou jednoznačné, nezávisí na formě výskytu dané složky (1 mmol Si = 1 mmol SiO<sub>2</sub> = 1 mmol H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) a jsou na rozdíl od koncentrací hmotnostních porovnatelné. Např. 1 mg.l<sup>-1</sup> SiO<sub>2</sub> a 1 mg.l<sup>-1</sup> Ca neznamenají stejnou koncentraci, protože obě složky mají rozdílnou molární hmotnost a počet molekul či iontů je ve stejném objemu vody různý. O stejné koncentraci lze hovořit jen tehdy, když se rovnají látkové koncentrace jednotlivých složek, např. když 1 mmol.l<sup>-1</sup> SiO<sub>2</sub> = 1 mmol.l<sup>-1</sup> Ca (cit.<sup>9</sup>). Pro přepočty platí následující vztahy:

$$1 \text{ mg Si} = 2,14 \text{ mg SiO}_2 = 2,78 \text{ mg H}_2\text{SiO}_3 = 35,605 \text{ } \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ } \mu\text{mol} = 28,08 \text{ } \mu\text{g Si} = 60,10 \text{ } \mu\text{g SiO}_2 = 70,08 \text{ } \mu\text{g H}_2\text{SiO}_3$$

#### 4.2. Analytické stanovení

Přítomnost různých forem křemíku ve vodách má za následek problém s jeho analytickým stanovením. Jak z hygienického, hydrogeologického, limnologického a i technologického hlediska by měly být specifikovány formy výskytu, které se z chemického a biologického hlediska chovají odlišně (jde o analogický problém, jako je stanovení různých forem fosforu ve vodách). Proto je tendence stanovovat jednak celkovou koncentraci křemíku (celkový, resp. veškerý křemík), nebo jen některé jeho formy, které se však často překrývají. Přehled různých metod lze najít např. v cit.<sup>10,11</sup>, kde lze najít i další odkazy.

Pro oddělení rozpuštěných a nerozpuštěných forem se používá filtrace vzorku membránovými filtry s velikostí pórů 0,45 μm, což je poréznost běžně ve světě akceptovaná pro tyto účely<sup>9</sup>.

Rozpuštěné formy křemíku mohou být přítomny buď v monomerní nebo polymerní formě. Polymerní formy lze převést na monomerní. Nejčastěji se provádí alkalická hydrolyza při vyšší teplotě (na vodní lázni). K alkalizaci lze použít NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo NaOH (cit.<sup>10,12-14</sup>). Pro dělení monomerních a polymerních forem lze využít i různé reaktivy těchto forem s molybdenanem. Monomerní formy reagují na rozdíl od forem polymerních velmi rychle.

Důležité je, že se musí pracovat s laboratorním nádobím z odolného skla, protože v závislosti na iontové síle, teplotě,

času a hodnotě pH se může ze skleněného laboratorního nádobí vyluhovat křemík v množství až v jednotkách μmol.l<sup>-1</sup>. Zejména v alkalických vodách může být podíl vylouženého křemíku ze skla poměrně značný, což má velký význam při analýze vod s nízkou koncentrací křemíku<sup>15</sup>. Z tohoto důvodu lze doporučit práci v laboratorním nádobí z plastů; to se týká i nádob pro odběr vzorků. Vzorky se uchovávají ve tmě a nekonzervují se. Zmrazením vzorků se může snížit obsah rozpuštěných křemičitanů až o 40 %. K tomu může dojít i při okyselení vzorků.

Klasická gravimetrická metoda se pro stanovení křemíku používá již jen výjimečně. Po opakovaném okyselení vzorku vody kyselinou chlorovodíkovou a odpaření do sucha se vyloučený hydratovaný SiO<sub>2</sub> odfiltruje a vyžhává. Váží se SiO<sub>2</sub>. Odpařování vzorku vody a žhání zbytku se musí provádět v Pt misce a kelímku. Aby se pro kontrolu oddělil Si od event. stržených nečistot, odstraní se SiO<sub>2</sub> z vyžhání zbytku jako SiF<sub>4</sub> působením směsi HF a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Gravimetrická metoda je použitelná pro stanovení celkového křemíku ve vodách v koncentracích asi nad 10 mg Si v 1 litru.

Nejvíce se rozšířily metody založené na reakci (kondenzaci) křemičitanů s molybdenanem amonným v kyselém prostředí za vzniku různých heteropolykyselin, zpravidla koloidního charakteru. Molybdenan reaguje s monomerními formami křemičitanů za vzniku žluté molybdátokřemičité kyseliny. Absorpční charakteristika tohoto zbarvení má poměrně strmý průběh bez maxima, což není pro fotometrii příliš vhodné (měří se obvykle asi při 430 nm). Stanovit lze koncentrace křemíku vyšší než 0,2 mg.l<sup>-1</sup>.

Často se provádí redukce žluté molybdátokřemičité kyseliny na směs sloučenin označovaných obvykle jako silikomolybdenová modř. Jako redukční činidla se používají kyselina askorbová, kyselina 1-amino-2-naftol-4-sulfonová, chlorid cínatý, hydrogensířičitan sodný, sířičitan sodný aj. Absorpční charakteristika tohoto zbarvení má významné maximum asi při 820 nm. Těmito postupy lze za vhodných podmínek stanovit křemík v koncentracích v desítkách μg.l<sup>-1</sup>. Citlivost metody založené na tvorbě heteropolymodří lze podstatně zvýšit její extrakcí do butan-1-olu. V takovém případě lze stanovit i koncentrace v jednotkách μg Si v 1 litru vody<sup>14,16</sup>.

Podobně jako křemík reagují s molybdenanem amonným také fosforečnany. Rušivý vliv vyšších koncentrací fosforečnanů lze potlačit vhodnou volbou kyselosti prostředí nebo přidávkou látek, které na rozdíl od molybdátokřemičité kyseliny rozkládají molybdátofosforečné kyseliny. Pro tento účel se přidává kyselina šťavelová, vinná nebo citronová. Z dalších látek ruší stanovení fluoridy, jejichž vliv se odstraní přidávkou kyseliny borité nebo hliníkových solí<sup>10-14</sup>.

Metodami, při nichž se používá molybdenan amonný, lze do určité míry dělit monomerní křemičitanu od polymerních. Dělení je založeno na rozdílné kinetice procesu. Velmi rychle reagují s molybdenanem monomerní formy (během dvou až tří minut), kdežto polymerní formy podstatně pomaleji. Za uvedených podmínek jsou dimerní formy stanoveny jen zčásti<sup>17</sup>.

Protože molybdenanem nejsou stanovitelné všechny formy rozpuštěného křemíku, objevuje se v analytice a technologii vody místo stanovení orthokřemičitanů termín „reaktivní křemík s molybdenanem“. Část křemíku nereagující s molybdenanem se nazývá nereaktivní křemík s molybdenanem. Nerozpuštěné křemičitanu, včetně koloidních disperzí, nereagují s molybdenanem prakticky vůbec.

„Reaktivní“ formy mají v hydrochemii a hydrobiologii zvláštní význam. To se týká také hydrogeochemie a hydrogeologie.

V rámci mezinárodních norem byly navrženy postupy pro stanovení křemíku průtokovou analýzou<sup>18</sup> (FIA a CFA).

Pro stanovení křemíku ve vodách se stále více uplatňují instrumentální metody<sup>10</sup>. Používá se např. atomová absorpční spektrometrie (AAS), kdy lze stanovit koncentrace křemíku asi od 0,5 mg.l<sup>-1</sup>. Dále jde o různé techniky ICP, kterými lze přímo stanovit celkový křemík ve vodách, protože koloidně dispergované formy jsou v plasmě destruovány, např. ICP-AES, IEC+ICP-MS. Posledně jmenovanou metodou lze stanovit i jednotky ng křemíku v 1 litru vody<sup>19</sup>.

## 5. Výskyt ve vodách

Sloučeniny křemíku jsou přítomny v každé vodě. Rozdíl mezi analyticky zjištěnou koncentrací celkového (veškerého) křemíku a reaktivního rozpuštěného křemíku bývá jen malý. To potvrzuje výše uvedené poznatky, že ve vodách je křemík přítomen převážně v rozpuštěné monomolekulární formě. Výsledky se převážně týkají „reaktivního křemíku s molybdenanem“, a proto se metodám s molybdenanem dává v analýze vody přednost. Diferenciace mezi celkovým a reaktivním křemíkem se provádí jen výjimečně<sup>20</sup>. Dále uvedené údaje se týkají především stanovení reaktivního křemíku s molybdenanem.

Mimořádně nízké jsou koncentrace křemíku v atmosférických vodách, většinou pod 1 mg.l<sup>-1</sup>. Např. v okolí Čertova jezera na Šumavě byla ve srážkách na otevřené ploše v letech 1992 až 1995 zjištěna průměrná koncentrace křemíku 77 µg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub> 165 µg.l<sup>-1</sup>) a v podkorunových srážkách byla nalezena koncentrace křemíku 159 µg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub> 340 µg.l<sup>-1</sup>) (cit.<sup>21</sup>).

Koncentrace křemíku v prostých podzemních a povrchových vodách jsou poměrně malé. Pohybují se obvykle v rozmezí od 2,3 mg.l<sup>-1</sup> do 14 mg.l<sup>-1</sup> (Si), resp. od 5 mg.l<sup>-1</sup> do 30 mg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub>). Tyto poměrně nízké koncentrace, v porovnání s rozpustností sloučenin křemíku, jsou způsobeny tím, že tyto vody bývají ve styku s křemičitanovými minerály jen krátkou dobu. Například v labské vodě se vyskytuje křemík (Si) v koncentracích v jednotkách mg.l<sup>-1</sup> a nepřesahuje 10 mg.l<sup>-1</sup>. Pokud dochází v labské vodě k místnímu rozvoji fytoplanktonu s vysokým podílem rozsivek, jejichž buněčná

stěna má vysoký obsah křemíku, pak koncentrace křemíku klesá i pod 1 mg.l<sup>-1</sup> (viz kap. 7.). V roce 1999 byla průměrná koncentrace křemíku v české části Labe asi 5 mg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub> 10,7 mg.l<sup>-1</sup>, 0,178 mmol.l<sup>-1</sup>) (cit.<sup>22,23</sup>).

V jezerních vodách bývají koncentrace křemíku nižší než v tocích. Např. v šumavských jezerech byla zjištěna průměrná koncentrace křemíku v povrchových vrstvách 1,76 mg.l<sup>-1</sup>, u dna 2 mg.l<sup>-1</sup> a v přítocích asi 3 mg.l<sup>-1</sup> (cit.<sup>24</sup>).

Stanovení křemíku je běžnou součástí chemického rozboru minerálních vod, a proto je k dispozici poměrně velký počet údajů. V minerálních vodách, zejména fosilních, které jsou po delší dobu ve styku s křemičitanovými minerály, se nacházejí vyšší koncentrace křemíku. Ze souboru 101 rozborů minerálních vod<sup>25</sup> vyplývá, že minimální koncentrace křemíku byla 0,107 mmol.l<sup>-1</sup> (Si 3,00 mg.l<sup>-1</sup>, SiO<sub>2</sub> 6,43 mg.l<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 7,5 mg.l<sup>-1</sup>) a maximální koncentrace 1,57 mmol.l<sup>-1</sup> (Si 44,1 mg.l<sup>-1</sup>, SiO<sub>2</sub> 94,4 mg.l<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 110 mg.l<sup>-1</sup>). Nutno dodat, že stanovení křemíku bylo v těchto případech prováděno gravimetricky. Nebyl nalezen vztah mezi koncentrací křemíku a celkovou mineralizací. Naopak často vody s mimořádně velkou celkovou mineralizací (nad 10 g.l<sup>-1</sup>) mají poměrně nízké koncentrace křemíku v porovnání s vodami s relativně nízkou mineralizací (do 2 g.l<sup>-1</sup>). Typické příklady jsou uvedeny v tabulce II (cit.<sup>25</sup>). V karlovarských pramenech je průměrná koncentrace křemíku (Si) asi 30 mg.l<sup>-1</sup> (asi 1,07 mmol.l<sup>-1</sup>). Také v minerálních vodách Západních Karpat nepřesahují koncentrace křemíku (Si) hodnotu 50 mg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub> asi 100 mg.l<sup>-1</sup>, 1,78 mmol.l<sup>-1</sup>) (cit.<sup>26</sup>).

Mimořádně velké koncentrace křemíku, až 200 mg.l<sup>-1</sup> (7,12 mmol.l<sup>-1</sup>), lze zjistit v horkých vulkanických vodách (např. ve vodách gejzírů). V literatuře lze najít údaje o koncentraci křemíku v termálních a hypertermálních vodách<sup>5</sup>. Z horkých pramenů se může hydratovaný SiO<sub>2</sub> vylučovat jako minerál geysirit (opálový sintr).

V mořské vodě se v povrchových vrstvách nacházejí poměrně velmi nízké koncentrace křemíku 0,5 mg.l<sup>-1</sup> až 2 mg.l<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub>), resp. jako Si 0,23 mg.l<sup>-1</sup> až 0,93 mg.l<sup>-1</sup>. Ve hlubších vrstvách bývají koncentrace asi desetkrát vyšší. Je to způsobeno rozvojem planktonu (rozsivek) a některých mořských hub ve svrchních vrstvách vody oceánů a moří, které využívají křemík při své reprodukci.

Potvrzuje se, že v přírodních vodách je koncentrace celkového křemíku a reaktivního křemíku přibližně stejná, takže obvykle dominuje monomolekulární forma Si(OH)<sub>4</sub> (cit.<sup>20</sup>).

V pitné vodě se křemík běžně nesleduje. Podle starších údajů se v 80. letech minulého století nacházely v pitné vodě z 8 regionů ČR koncentrace křemíku, jejichž průměrné hodno-

Tabulka II

Celková mineralizace (Σρ) a koncentrace křemíku v některých minerálních vodách

Lokalita (pramen)	Σρ [mg.l <sup>-1</sup> ]	Si [mmol.l <sup>-1</sup> ]	Si [mg.l <sup>-1</sup> ]	SiO <sub>2</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]
Velké Losiny	284	1,174	32,9	70,45	82,3
Mariánské Lázně (Farská kyselka)	578	1,231	34,5	74,0	86,2
(Ferdinand IV)	1 814	1,570	44,1	94,45	110,0
Šarátice	28 066	1,346	37,8	80,9	94,3
Darkov	29 000	0,51	14,3	30,6	35,7
Zaječice	44 874	0,20	5,6	12,0	14,0

Tabulka III

Průměrné koncentrace křemíku v pitné vodě z osmi regionů ČR

Koncentrace	Pitné vody původu	
	podzemního	povrchového
Si [mg.l <sup>-1</sup> ]	6,5–8,7	3,46–7,7
SiO <sub>2</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	13,9–18,7	7,4–16,5
H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	18,0–24,2	9,6–21,4
Si, SiO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> [mmol.l <sup>-1</sup> ]	0,23–0,31	0,12–0,27

ty jsou uvedeny v tabulce III (cit.<sup>27</sup>). Koncentrace křemíku (Si) v jednotlivých zdrojích se pohybovaly převážně v jednotkách  $\text{mg.l}^{-1}$ . Vyšší koncentrace než  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  se již vyskytovaly zřídka. Nejvyšší nalezená jednotlivá koncentrace Si byla<sup>27</sup> asi  $19 \text{ mg.l}^{-1}$  ( $\text{SiO}_2$   $40 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $0,67 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Podle očekávání jsou ve vodách povrchového původu průměrné koncentrace křemíku poněkud nižší než u vod podzemního původu.

## 6. Hydrochemická a balneologická klasifikace

Dosavadní běžná hydrochemická klasifikace vod bere v úvahu pouze převažující anionty a kationty (tj. hydrogenuhličitan, sírany, chloridy, dusičnany, vápník, hořčík, sodík a draslík), nikoli neiontové součásti vod, kam patří i křemík. Proto se křemík v této klasifikaci nevyskytuje, což je určitým nedostatkem, protože zahrnutí křemíku do klasifikace umožňuje odhalit některé další hydrogeochemické zákonitosti. To umožňuje hydrochemická klasifikace podle molárního schématu, které řadí složky podle klesající látkové koncentrace bez ohledu na to, zda se jedná o kation, anion nebo neiontovou složku<sup>28</sup>.

Balneologická klasifikace je založena v podstatě na stejném principu jako hydrochemická, s tím rozdílem, že se podle okolností berou v úvahu ještě další složky vody. Hovoří se o vodách se zvýšeným obsahem příslušné látky (např. F, Li, Sr, B, Si aj.). Dosavadní ČSN 86 8000 „Přírodní léčivé vody a přírodní minerální vody stolní“ sice u křemíku limitní koncentraci neuvádí, avšak někteří autoři<sup>25</sup> navrhují koncentraci Si asi  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  ( $53,5 \text{ mg.l}^{-1}$  jako  $\text{SiO}_2$ ,  $896 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

## 7. Vlastnosti a význam

Křemík může ovlivňovat chemické i biologické vlastnosti vody. Biologické vlastnosti se uplatňují především v povrchových vodách, včetně vody mořské.

Křemík je hygienicky málo významný. Proto se v požadavcích na jakost pitné vody dosud neuvádí. Jen zcela výjimečně se udává, že vody s vyšší koncentrací křemíku mohou být příčinou podráždění pokožky u citlivých osob<sup>29</sup>.

Protože křemík má význam při hydrochemické a balneologické klasifikaci podzemních vod, bývá běžnou součástí rozborů těchto vod, včetně vod minerálních (viz kap. 6.).

V povrchových vodách není křemík dosud limitován, avšak ovlivňuje jejich biologické vlastnosti. Křemík je esenciální prvek, který je pro některé vodní organismy limitujícím mikronutrientem. Křemík je součástí buněčné stěny skupiny řas, tzv. *rozsivek* (*Bacillariophyta*), a je proto pro jejich rozmnožování a růst nezbytný. Proto také při vyšších koncentracích křemíku v povrchových vodách může dojít k nadměrnému rozvoji těchto forem fytoplanktonu. Tvoří se tzv. „rozsivkové květy“, ty byly pozorovány např. ve středním a dolním toku Labe. Původní koncentrace křemíku přesahující i  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  se během toku v důsledku tohoto rozvoje zmenšují až na hodnoty pod  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  (viz kap. 5.). Při biologickém rozkladu rozsivek se tvoří řada škodlivých a organolepticky závadných produktů, voda páchne a získává různé příchutě, což se nepříznivě projevuje při úpravě takové vody na vodu pitnou. Křemičité schránky dávno odumřelých rozsivek tvoří vrstvy tzv. křemeliny (rozsivkové zeminy), která má v technologii vody význam jako filtrační a sorpční materiál. Z výše

uvedených důvodů se v posledních letech při sledování eutrofizace povrchových vod bere v úvahu mezi živinami také křemík, nejen sloučeniny fosforu a dusíku.

Křemík je kumulován také v některých druzích hub. V jejich sušině lze najít až 30 % křemíku<sup>2</sup>.

Klasicky se uvádí, že ve větších koncentracích může křemík vadit v provozních vodách při výrobě kvalitního papíru a kvalitního umělého hedvábí. Někdy se uvádějí orientační přípustné koncentrace asi do  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  (asi  $0,7 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) (cit.<sup>30</sup>). V těchto případech jde hlavně o zadržování nerozpuštěných forem křemíku ovlivňujících povrch vyrobeného materiálu. Proto se kvalita provozní vody pro tyto účely posuzuje (kromě dalších ukazatelů) spíše podle zákalu a obsahu nerozpuštěných látek než podle obsahu Si.

Zvláště nebezpečný je křemík v kotelní vodě a v napájecí vodě pro parní kotle. Za vyšších teplot může křemík za přítomnosti Ca a Mg vytvářet velmi nebezpečné křemičitanové (silikátové) nánosy (kameny) s velmi malou tepelnou vodivostí. Tepelná vodivost je přibližně desetkrát menší než u  $\text{CaSO}_4$ , resp.  $\text{CaCO}_3$ , které tvoří tzv. síranový nebo uhličitanový kámen. Jde např. o sloučeniny  $\text{CaSiO}_3$ ,  $3 \text{ MgO} \cdot 2 \text{ SiO}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  aj. Může dojít až k destrukci stěny kotle. Kromě toho se tyto sloučeniny mohou usazovat i na lopatkách parních turbin. Přípustná koncentrace křemíku v těchto vodách závisí na jmenovitém pracovním tlaku. Například v napájecí vodě pro průtočné kotle se jmenovitým tlakem pod 8 MPa má být koncentrace křemíku (Si) nejvýše  $9,35 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ , resp. ( $\text{SiO}_2$ ,  $20 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ ,  $0,333 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) (cit.<sup>31</sup>), proto se napájecí voda pro vysokotlaké parní kotle podrobuje tzv. desilikaci.

Pokud se týká úpravy vody, používají se někdy křemičitanové buď jako inhibitory koroze, nebo jako prostředky pro zabránění vzniku úsad sloučenin železa a manganu v distribuční síti.

Při inhibice koroze působí křemičitanové jako anodický inhibitor, který tvoří na anodě korozního článku reakcí s korodovaným kovem či korozními produkty málo rozpustnou sloučeninu, která působí jako ochranná vrstva bránící další korozi. Dávkování křemičitanů vede ke zvýšení hodnoty pH, což je z hlediska protikorozní ochrany výhodné (poměrně těžko se odlišuje vliv vlastního křemičitanu od vlivu zvýšené hodnoty pH). Protikorozní dávky křemičitanů (Si) se pohybují obvykle v rozmezí od asi  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  až do  $14 \text{ mg.l}^{-1}$  (jako  $\text{SiO}_2$  asi od  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  do  $30 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Vyšší dávky jsou nutné u vod s větší celkovou mineralizací a u kyselých vod. V případě kyselých vod se někdy z ekonomického hlediska doporučuje nejprve alkalizace, např. přidáním  $\text{NaHCO}_3$  nebo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Křemičitanové se často používají ve směsi s jinými inhibitory koroze (např. s fosforečnany nebo sloučeninami zinku).

Druhou možnou aplikační oblastí křemičitanů při úpravě vody je inhibice vylučování hydratovaných oxidů železa a manganu v distribuční síti. Potřebné dávky křemičitanu (Si) pro stabilizaci železa a manganu ve vodě se pohybují obvykle v jednotkách  $\text{mg.l}^{-1}$ , asi do  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Účinnost závisí také na hodnotě pH, která by se měla pohybovat ve slabě alkalické oblasti, asi nad 7,5. Železo a mangan musí být přítomny v oxidované formě. Pro redukované formy je účinnost poměrně malá, a proto se doporučuje dávkovat křemičitanové např. současně s chlorací. Vysvětlení tohoto efektu je založeno na tvorbě komplexů mezi Fe, Mn a Si (viz kap. 3.). Inhibice vylučování manganu křemičitanové je účinnější, než je tomu v případě železa<sup>32,33</sup>.



Z úpravárenského hlediska je dále významné, že sloučeniny křemíku působí katalyticky a urychlují oxidaci  $\text{Fe}^{\text{II}}$  na  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Tím podporují proces odželezování vody. Např. při hodnotě pH 6,7 a při koncentraci křemíku  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  je rychlost oxidace  $\text{Fe}^{\text{II}}$  asi dvakrát vyšší, než když křemík není přítomen vůbec. Na druhé straně sloučeniny křemíku zpomalují proces hydrolyzy železitých iontů<sup>3</sup>.

Další oblastí aplikace křemičitanů jsou prací a odmašťovací prostředky. Patří mezi tzv. aktivační přísady, které mohou v kombinaci s jinými nahradit z environmentálního hlediska škodlivé polyfosforečnany. Nejčastěji se v pracích prostředcích používá dikřemičitan  $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ , který je technickou směsí monomeru a různých oligomerů. Křemičitany v pracích prostředcích působí komplexně. Mají účinky alkalizační, dispergační, detergenční, komplexační a inhibiční (zabraňují vylučování  $\text{CaCO}_3$  a málo rozpustných sloučenin hořčiku).

Koloidní hydratovaný  $\text{SiO}_2$  má vynikající sorpční vlastnosti. Hodnota pH nulového bodu náboje se pohybuje v kyselé oblasti, asi 1,5 až 3,0. U různých hlinitokřemičitanů se pohybuje v rozmezí asi od 2,0 do 4,5. Proto je jejich povrch ve vodách nabit převážně záporně a mají schopnost adsorbovat především kationty. Výměna kationtů na hlinitokřemičitanech je významným procesem ovlivňujícím chemické složení přírodních vod. Lze tak např. vysvětlit náhlý výskyt vyšších koncentrací sodíku ve vodách, který se uvolnil z hlinitokřemičitanů výměnou za vápník<sup>9</sup>.

#### LITERATURA

- Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků*, sv. 1. Informatorium, Praha 1993.
- Iler R. K.: *The Chemistry of Silica. Solubility, Polymerisation, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry of Silica*. Wiley, New York 1979.
- Schenk J. E., Weber W. J.: *J. Am. Water Works Assoc.* 60, 199 (1968).
- Krauskopf K. B.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 10, 1 (1956).
- White D. E., Brannock W. W., Murata K. J.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 10, 27 (1956).
- Alexander G. B., Heston W. M., Iler R. K.: *J. Phys. Chem.* 58, 453 (1954).
- Lagerström G.: *Acta Chem. Scand.* 13, 722 (1959).
- Weber W. J., Stumm W.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 27, 237 (1965).
- Pitter P.: *Hydrochemie*, 3. vyd. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
- Nollet L. M. L.: *Handbook of Water Analysis*, Chapter 24: *Determination of Silicon and Silicates*. M. Dekker, New York 2000.
- Eaton A. D., Clesceri L. S., Greenberg A. E.: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20. vyd. Am. Publ. Health Assoc., Washington 1998.
- Kobrová M.: *Metody chemické analýzy přírodních vod*. ÚÚG, Praha 1983.
- Horáková M.: *Analytika vody*, skriptum VŠCHT. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2000.
- Fähnrich V.: *Chemický rozbor průmyslových vod*. SNTL, Praha 1955.
- Zhang J., Fischer C. J., Ortner P. B.: *Water Res.* 33, 2879 (1999).
- ČSN 83 0530, část 23 *Chemický a fyzikální rozbor povrchové vody: stanovení křemičitanů*.
- Chow D. T., Robinson R. J.: *Anal. Chem.* 25, 646 (1953).
- ISO/DIS 15682:2000 *Water quality – Determination of soluble silicates by flow analysis (FIA and CFA) and photometric detection*.
- Hioki S., Lam J. W. H., McLaren J. W.: *Anal. Chem.* 69, 21 (1997).
- George S., Steinberg S. M., Hodge V.: *Chemosphere* 40, 57 (2000).
- Hruška J., Kopáček J., Hlavatý T., Hošek J.: *Silva Gabreta* 4, 71 (2000).
- Kolektiv: *Projekt Labe II a III*. VÚV, Praha 1998 a 1999.
- Küchler L., Roch K., Kormann B., Raschewski U.: *Sborník z 8. magdeburgského semináře o ochraně vod*, str. 187. Povodí Ohře, Chomutov a VÚV TGM Praha 1998.
- Vrba J., Kopáček J., Fott J.: *Silva Gabreta* 4, 7 (2000).
- Nevorál V., Berdychová M., Lstibůrková M., Tesář J.: *Balneol. Listy XVII*, supl. 28 (1989).
- Franko O., Gazda S., Michalíček M.: *Tvorba a klasifikácia minerálnych vôd Západných Karpát*. Geologický ústav D. Štúra, Bratislava 1975.
- Zýka V.: *Geochemie pitných vod České socialistické republiky*. Sborník geologických věd, sv. 18. Academia, Praha 1982.
- Jetel J., Pačes T.: *Hydrogeologická ročenka 1978*, 111.
- Rummel W.: *Wasserwirt. Wassertechnik* 13, 128 (1963).
- Heller A.: *Handbuch der Lebensmittelchemie*. Band VIII: *Wasser und Luft*. Springer, Berlin 1940.
- ČSN 07 7401 *Voda a pára pro tepelná energetická zařízení s pracovním tlakem páry do 8 MPa*.
- Dart F. J., Foley P. D.: *J. Am. Water Works Assoc.* 62, 663 (1970).
- Dart F. J., Foley P. D.: *J. Am. Water Works Assoc.* 64, 244 (1972).

**P. Pitter** (Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology, Praha): **Hydrochemistry of Silica in Water**

The review deals with the hydrochemistry of silicon in natural and service waters. The topics are its occurrence, analytical determination, concentrations in various waters, hydrochemical and balneological classification as well as its properties and importance.



## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NĚKTERÝCH HOŘKÝCH PEPTIDŮ Z KASEINU

MICHAELA VÍTKOVÁ<sup>a</sup>, LADISLAV FUKAL<sup>a</sup>,  
GARY BRETT<sup>b</sup> a PAVEL RAUCH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Institute of Food Research, Colney Lane, NR4 7UA Norwich, United Kingdom  
e-mail: Ladislav.Fukal@vscht.cz

Došlo dne 9.I.2002

Klíčová slova: hořké peptidy, enzymová imunoanalýza, kasein, zrání sýrů

### Úvod

Důležitým procesem během zrání sýrů je proteolytické štěpení molekul kaseinů i jejich fragmentů způsobující změnu textury kaseinové hmoty za vzniku sensoricky významných látek, které dávají jednotlivým typům sýrů charakteristickou chuť a vůni<sup>1</sup>; vedle nich však mohou vznikat i nežádoucí hořké peptidy<sup>2</sup>. Reziduální množství proteolytických enzymů, která se podílejí na těchto pochodech, mohou představovat v syrářské technologii přidávaná syřidla, proteolytický systém přidávaných startovacích mléčných bakteriálních kultur i přirozeně kontaminujících mléčných bakterií a také endogenní proteiny mléka. Průběh a produkty proteolýzy jsou ovlivňovány nejenom koncentrací a specifiitou působících enzymů, ale také fyzikálně-chemickými podmínkami při technologii (pH, koncentrace solí, obsah vody, teplota)<sup>3</sup>. Jako první je v kaseinové micelle atakována syřidlovými proteasami molekula  $\kappa$ -kaseinu, která je na povrchu micely. Odštěpením makropeptidu je  $\kappa$ -kasein konvertován na tzv. para- $\kappa$ -kasein, což destabilizuje kaseinové micely do té míry, že agregují a vypadávají z roztoku v podobě sraženiny. Během další technologie pak dochází k proteolýze  $\alpha_{s1}$ -kaseinu,  $\alpha_{s2}$ -kaseinu i  $\beta$ -kaseinu, zatímco para- $\kappa$ -kasein je již k účinku proteas odolný. Nejprve jsou uvolňovány velké, ve vodě nerozpustné peptidy, které jsou postupně štěpeny na menší<sup>4</sup>. Bylo zjištěno, že hořké kaseinové peptidy mají průměrnou hydrofobicitu vztaženou na jednu aminokyselinu vyšší než 5860 J.mol<sup>-1</sup>, zatímco fragmenty s hodnotou této veličiny nižší než 5440 J.mol<sup>-1</sup> hořké nejsou<sup>5</sup>. Pro případná technologická opatření proti hořké chuti sýrů je nezbytné posouzení, zda se vznikající hořký peptid v sýru akumuluje, nebo zda je dále hydrolyzován na nehořké fragmenty. Při studiu peptidů odštěpovaných během zrání sýrů je extrakt obvykle frakcionován podle rozpustnosti nebo velikosti molekuly, pomocí HPLC na reverzní fázi jsou separovány jednotlivé peptidy, které jsou finálně identifikovány Edmanovým odbouráváním nebo hmotnostní spektrometrií<sup>4,6</sup>.

Pokud jsou předmětem separace hořké peptidy, je intenzita hořké chuti jednotlivých frakcí porovnávána s chutí standardních roztoků chininu nebo kofeinu. Tento analytický postup je však pro provozní kontrolu velice nákladný a zdlouhavý. Za určitých okolností by mohly být vhodným nástrojem ke sledování konkrétního peptidu z molekuly kaseinu imunochemické metody.

Pomocí imunostanovení makropeptidu uvolňovaného z  $\kappa$ -kaseinu proteasami psychrotrofních bakterií byla predikována trvanlivost mléka při skladování<sup>7</sup>. Enzymovou imunoanalýzou sledované koncentrace odštěpeného fosfopeptidu (f1–28) z  $\beta$ -kaseinu při zrání sýra umožnily hodnotit jeho stáří<sup>8</sup>. Senocq a spol.<sup>9</sup> použili protilátky proti pěti peptidům z molekuly  $\beta$ -kaseinu k monitorování proteolýzy tohoto proteinu plasminem a chymosinem.

V této práci jsme připravili protilátky proti pěti dříve identifikovaným hořkým peptidům, které jsou odštěpovány z  $\alpha_{s1}$ -kaseinu a  $\beta$ -kaseinu během zrání sýrů<sup>10,11</sup>. Se získanými protilátkami byly sestaveny a charakterizovány postupy enzymové imunoanalýzy (ELISA) ke stanovení jednotlivých peptidů.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Hovězí sérový albumin (BSA), *o*-fenyldiamin a Tween 20 byly získány od Sigma Chemical Company, St. Louis, USA; želatina byla od firmy Fluka AG, SRN; konjugát peroxidasy s „druhými“ protilátkami (prasečími imunoglobuliny proti králíčím imunoglobulinům) byl získán od Sevapharmy, Praha (v katalogu označován jako SwAR/Px; koncentrace imunoglobulinů 8,1 mg.cm<sup>-3</sup>, molární poměr peroxidasa/imunoglobulin byl 1,15). Polystyrenové mikrotitrační destičky 8×12 jamek Costar 9018 byly dodány firmou Corning Costar, USA.

#### Pufrové roztoky

Tři nejčastěji používané pufrы při enzymové imunoanalýze byly značeny následujícími zkratkami: PBS („phosphate buffered saline“) – fosfátový pufr 0,01 mol.l<sup>-1</sup>, pH 7,4, obsahující 0,8% NaCl, PBS-Tw – promývací pufr, PBS obsahující 0,05% Tween 20, PBS-Tw (s 1% želatinou) – ředící pufr pro všechny imuno-reaktanty.

#### Peptidy

Bylo syntetizováno celkem 5 peptidů. Čtyři úseky z molekuly  $\alpha_{s1}$ -kaseinu: <sup>14</sup>EVLN<sup>17</sup> (označení GB29), <sup>17</sup>NENLL<sup>21</sup> (GB30), <sup>26</sup>APFPQVF<sup>32</sup> (GB31), <sup>26</sup>APFPQVFG<sup>33</sup> (GB34) a jeden úsek z  $\beta$ -kaseinu: <sup>61</sup>PFPGPIPNS<sup>69</sup> (GB33). Syntéza byla provedena na automatickém syntetizátoru peptidů Novasyn

Crystal (Calbiochem-Novabiochem, V. Británie). Čistota připravených peptidů (>95 %) byla kontrolována pomocí HPLC na reverzní fázi s použitím náplně kolon C<sub>18</sub> o velikosti částic 5 μm (Phenomenex, V. Británie), eluce gradientem acetonitril/voda. Identita peptidů byla kontrolována hmotnostní spektrometrií. Protože molekulová hmotnost všech uvedených peptidů je natolik nízká, že nemohou ve volné podobě provokovat tvorbu protilátek, byly pro potřeby imunizace syntetizovány imunogenní konjugáty peptidů s BSA. Pro tyto účely byla na volnou aminoskupinu peptidu zavedena sulfhydrylová skupina pomocí 2-iminothiolan hydrochloridu (tzv. Trautovo činidlo). Takto modifikovaný peptid spontánně konjuguje s BSA, který byl aktivován pomocí sukcinimidyl 4-(*N*-maleinimidomethyl) cyklohexan-1-karboxylátu<sup>12</sup>. Tyto konjugáty byly použity nejen jako imunogeny k imunizaci, ale také při vlastním imunochemickém stanovení jako molekuly obsahující epitopy, se kterými interagují připravené protilátky. V systému ELISA byly konjugáty imobilizovány na pevnou fázi.

### Protilátky

Polyklonální antiséra proti každému z pěti syntetizovaných peptidů byla připravena imunizací králíků postupem detailně popsaným dříve<sup>13</sup>. Jako imunogeny byly použity konjugáty peptidů s BSA. Imunoglobulinová frakce každého antiséra byla izolována a purifikována afinitní interakcí s Proteinem A pomocí komerčních kolonek Prosep A (Sigma Chemical Company, USA), mrazově sublimována, a dále uchovávána při -18 °C. Pro experimenty byl základní roztok protilátky o ředění 1:100 připravován rozpouštěním 1 mg sublimátu v 10 ml PBS.

### Enzymová imunoanalýza

Byla použita kompetitivní nepřímá enzymová imunoanalýza (ELISA) se separací vázaných a volných imunoreaktantů prostřednictvím zakotvení na pevnou fázi. Nejprve byl na stěny jamek mikrotitračních destiček zakotven prostou sorpcí příslušný protein (konjugát peptidu s BSA nebo kasein) – zásobní roztok proteinu byl vhodně naředěn karbonát–bikarbonátovým pufrům (0,05 mol.l<sup>-1</sup>, pH 9,6) a pipetován do jamek v množství 200 μl; po inkubaci 18 hodin při 4 °C byl roztok proteinu vylit a jamky čtyřikrát promyty 200 μl PBS-Tw. Vlastní kompetitivní imunochemická interakce byla zahájena pipetováním 50 μl roztoku peptidu (či jiné testované látky) v PBS-Tw (s 1% želatinou) a 50 μl vhodně naředěné anti-peptidové protilátky v PBS-Tw (s 1% želatinou). Reakční roztoky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C za mírného třepání. Poté byly jamky čtyřikrát promyty 200 μl PBS-Tw. Kvantifikace anti-peptidové protilátky, která byla zprostředkováně imunochemickou reakcí zakotvena na stěny jamek, byla učiněna pomocí tzv. druhé protilátky značené peroxidasou. Do jamek bylo pipetováno 100 μl konjugátu SwAR/Px ředěného 1:2000 v PBS-Tw (s 1% želatinou). Po inkubaci 1 hodinu při 37 °C byl nenavázaný konjugát odstraněn čtyřmi promyvy 200 μl PBS-Tw. Dále bylo do jamek pipetováno 100 μl roztoku peroxidasového substrátu a chromogenní látky (0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v citrátovém pufru 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, pH 5,0, s 0,05% *o*-fenylen-diaminem). Enzymová reakce byla po 15 minutách inkubace při 37 °C zastavena přidávkem 50 μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mol.l<sup>-1</sup>). Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační

destičky na přístroji Multiscan MCC/340 (Labsystems, Finsko).

### Vyhodnocení výsledků

Sigmoidní kalibrační křivky byly prokládány počítačovým programem Microsoft Excel pomocí čtyřparametrové regresní funkce

$$A = C + \frac{D - C}{1 + \exp(-2 \times (\alpha + \beta \times x))} \quad (1)$$

kde  $A$  je absorbance při 492 nm,  $C$  je dolní asymptota křivky,  $D$  je horní asymptota,  $\alpha$  charakterizuje posun lineární části sigmoidní křivky v systému souřadnic,  $\beta$  charakterizuje sklon lineární části sigmoidní křivky,  $x$  je dekadický logaritmus koncentrace antigenu ( $\log c$ ).

Detekční limit byl počítán jako koncentrace  $c_{80\%}$  odpovídající hodnotě absorbance, jež představuje 80 % z rozmezí  $D - C$  (označeno jako  $A_{80\%}$ ) podle rovnice

$$\log(c_{80\%}) = \frac{\ln \frac{(D - A_{80\%})}{(A_{80\%} - C)} - \alpha}{\beta} \quad (2)$$

kde  $A_{80\%} = C + 0,8(D - C)$

Podobně může být vyjádřen další charakteristický parametr kalibrační křivky  $c_{50\%}$  pomocí  $A_{50\%}$ . A pomocí stejné rovnice (2) lze vypočítat koncentraci analytu v analyzovaném vzorku ze změřené hodnoty absorbance.

### Výsledky a diskuse

Bylo syntetizováno pět peptidů, které jsou odštěpovány z  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kaseinu a  $\beta$ -kaseinu během zrání sýrů, a proti nim byly připraveny polyklonální protilátky. Se získanými protilátkami byly sestaveny a charakterizovány postupy enzymové imunoanalýzy (ELISA) ke stanovení jednotlivých peptidů.

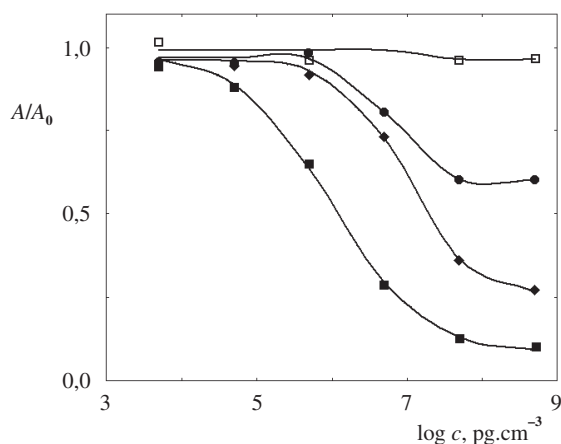
Metoda kompetitivní nepřímé ELISA používá obecně platné uspořádání analytické procedury. Nejprve je standard antigenu imobilizován na stěny jamek na mikrotitračních destičkách, potom je do jamek napipetována protilátka proti stanovovanému analytu (tzv. „první“ protilátka) a analyzovaný vzorek s analytem (nebo roztok standardu analytu). Po ustavení rovnováhy a vymytí všech reakčních složek nefixovaných na stěnu jamky je přidán přebytek konjugátu enzymu s tzv. „druhou“ protilátkou (protilátka proti „první“ protilátce). Finálně kvantifikovaná aktivita enzymu, který je zprostředkováně fixován na jamku destičky, je pak přímo úměrná množství „druhé“, a tím i „první“ protilátky fixované na jamku, a tudíž nepřímou úměrnou koncentraci analytu ve vzorku. Citlivost a specifitu popsané procedury ovlivňuje kombinace celé řady faktorů, jako jsou např. sorpční vlastnosti destiček, koncentrace standardu antigenu v potahovacím roztoku, afinita a specifita „první“ protilátky a její koncentrace v systému.

Pro každý ze sledovaných pěti peptidů byly nejprve zjištěny hodnoty vhodných koncentrací antigenu v roztoku pro imo-

Tabulka I  
Charakteristika kalibračních křivek ELISA s protilátkami proti peptidům

Peptid	Ředění protilátky v ELISA	Látka imobilizovaná na pevnou fázi (koncentrace <sup>a</sup> [mg.cm <sup>-3</sup> ])	Detekční limit [μg.cm <sup>-3</sup> ]	
			c <sub>50%</sub>	c <sub>80%</sub>
GB29	1:200	BSA-GB29 (2)	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
GB30	1:500	BSA-GB30 (2)	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
GB31	1:1000	BSA-GB31 (2)	13,5	4,1
GB34	1:4000	BSA-GB34 (2)	9,7	2,5
GB33	1:1000	BSA-GB33 (2)	14,4	4,6
GB29	1:1000	α-kasein (4)	6,9	2,1
GB30	1:1000	α-kasein (4)	6,6	1,1
GB31	1:500	α-kasein (10)	11,4	2,6
GB33	1:500	β-kasein (10)	7,6	2,8

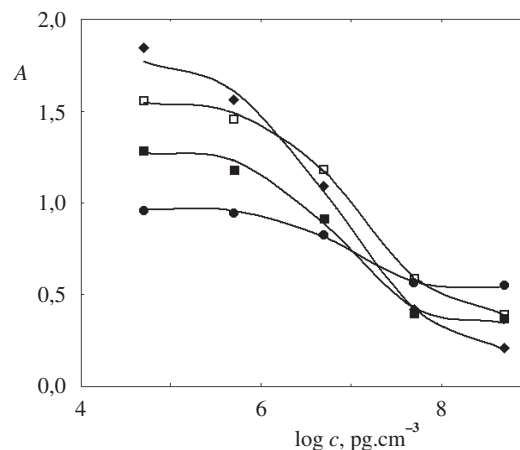
<sup>a</sup> Koncentrace v roztoku pro imobilizaci, <sup>b</sup> nebylo možné sestavit kalibrační křivku pro stanovení peptidu (peptid v roztoku neinhiboval interakci protilátky s látkou imobilizovanou na pevnou fázi)



Obr. 1. Kalibrační křivky pro různé kompetitory v systému ELISA s imobilizovaným konjugátem BSA-GB34 a s protilátkami proti tomuto konjugátu: ◆ peptid GB34, □ BSA, ● α-kasein, ■ konjugát BSA-GB34

bilizaci ve spojitosti s konkrétní koncentrací příslušné protilátky. Aplikovaný experiment představoval proceduru prezentované metody ELISA bez přidávání roztoku analytu do kompetice. Jednotlivé řádky a sloupce jamek na destičkách se lišily koncentrací antigenu v roztoku pro imobilizaci a koncentrací „první“ protilátky. Naměřené hodnoty absorbancí odpovídají parametru  $D$  v rovnici (1) (horní asymptota kalibrační křivky). Vhodné pro další experimenty ELISA jsou takové dvojice hodnot koncentrací uvedených imunoreagencií, při kterých je dosaženo absorbance v rozpětí hodnot 0,8 až 1,5.

V experimentech, kdy byl na stěny jamek imobilizován konjugát příslušného peptidu s BSA, se podařilo sestavit kalibrační křivky pouze pro peptidy GB31, GB34 a GB33. Tabulka I sumarizuje důležité parametry těchto kalibračních křivek. Pro koncentrace uvedených peptidů blízkých hodnotě  $c_{50\%}$  byla hodnota relativní směrodatné odchylky menší než 12 % (pro deset stanovení v rámci jedné destičky) a menší než 9 % (pro stanovení na čtyřech destičkách). Příklady křivek



Obr. 2. Kalibrační křivky v systému ELISA s imobilizovaným kaseinem a s protilátkami proti příslušnému konjugátu BSA-peptid: ■ GB29, ◆ GB30, □ GB31, ● GB33

získaných v tomto systému s protilátkami proti GB34 jsou uvedeny na obr. 1. Pro všechny tři zmíněné peptidy lze shrnout, že interakci protilátky s konjugátem BSA-peptid fixovaným na pevnou fázi vůbec neinhibuje BSA, do značné míry ji inhibuje kasein, ze kterého peptid pochází, mnohem více však příslušný peptid a jeho konjugát s BSA. Zbývající dva peptidy (GB29 a GB30) ani ve vysokých koncentracích nepůsobily významné snížení hodnoty absorbance dosahované v systému s nulovou koncentrací peptidu v roztoku. To vypovídá o tom, že schopnost interagovat s protilátkou má konjugát, ale ne samotný peptid. Může to být způsobeno tím, že se jedná o poměrně krátké peptidy (tetrapeptid a pentapeptid). Dosavadní práce o imunochemickém stanovení kaseinových peptidů se zabývají strukturami s 10–20 aminokyselinovými zbytky<sup>14,15</sup>.

Bylo zjištěno, že α-kasein interaguje s protilátkami proti GB29, GB30, GB31 a GB34 a že β-kasein interaguje s protilátkami proti GB33. Těto skutečnosti jsme využili pro sest-

vení ELISA, při kterých je na stěny jamek imobilizován kasein, jehož součástí je sekvence sledovaného peptidu. Ve všech případech bylo možno sestavit kalibrační křivky (obr. 2). Pro koncentrace analytů blízkých  $c_{50\%}$  byla hodnota relativní směrodatné odchylky menší než 15 % (pro stanovení v rámci jedné destičky) a menší než 11 % (pro stanovení na třech destičkách). Z důvodu interakce kaseinů s protilátkami proti peptidům musí být před imunochemickým stanovením těchto peptidů v extraktech sýrů předem odstraněny proteiny a vysokomolekulární peptidy.

## Závěr

Za použití polyklonálních protilátek proti peptidům byly vypracovány a charakterizovány analytické postupy kompetitivní nepřímé enzymové imunoanalýzy. Detekční limity pro jednotlivé peptidy se pohybovaly v rozmezí 1–5  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Pro koncentrace ve středu kalibrační křivky byly stanoveny hodnoty relativních směrodatných odchylek menší než 15 %. Pomocí výše prezentovaných imunochemických postupů bude sledována tvorba hořkých peptidů během zrání sýrů s cílem zjistit podmínky, při kterých k jejich tvorbě (resp. kumulaci) nedochází.

*Práce byla finančně podporována GA ČR, je součástí projektu GA ČR 525/99/1507.*

## LITERATURA

1. Fox P. F., Mc Sweeney P. L. H.: *Food Rev. Int.* 12, 457 (1996).
2. Habibi-Najafi M. B., Lee B. H.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 397 (1996).
3. Exterkate F. A., Lagerwerf F. M., Haverkamp J., Van Schalkwijk S.: *Int. Dairy J.* 7, 47 (1997).
4. Singh T. K., Fox P. F., Healy A.: *J. Dairy Res.* 64, 433 (1997).
5. Ney K. H.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 147, 64 (1971).
6. Gagnaire V., Mollé D., Herrouin M., Léonil J.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 4402 (2001).
7. Picard C., Plard I., Rongdaux-Gaida D., Collin J.-C.: *J. Dairy Res.* 61, 395 (1994).
8. Pizzano R., Nicolai M. A., Padovano P., Ferranti P., Barone F., Addeo F.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4555 (2000).
9. Senocq D., Dupont D., Rolet-Repecaud O., Faurie F., Levieux D.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 1571 (2001).
10. Richardson B. C., Creamer L. K.: *N. Z. J. Dairy Sci. Tech.* 8, 46 (1973).
11. Huber L., Klostermeyer H.: *Milchwissenschaft* 29, 449 (1974).
12. Bieniarz C., Husain M., Barnes G., King C. A., Welch C. J.: *Bioconjugate Chem.* 7, 88 (1996).
13. Vítková M., Rauch P., Fukal L.: *Czech J. Food Sci.* 20, 76 (2002).
14. Pizzano R., Nicolai M. A., Addeo F.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 766 (1998).
15. Black C. L., Reynolds E. C.: *J. Immunol. Meth.* 214, 63 (1998).

**M. Vítková<sup>a</sup>, L. Fukal<sup>a</sup>, G. Brett<sup>b</sup>, and P. Rauch<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup>*Institute of Food Research, Norwich, UK*): **Enzyme Immunoassay of Bitter Peptides from Caseins**

Five peptides have been targeted to be synthesised which are correlated to bitter flavour of cheeses. Four are from  $\alpha_{s1}$ -casein (<sup>14</sup>EVLN<sup>17</sup>, <sup>17</sup>NENLL<sup>21</sup>, <sup>26</sup>APFPQVF<sup>32</sup>, and <sup>26</sup>APFPQVFG<sup>33</sup>) and the fifth from  $\beta$ -casein (<sup>61</sup>PFPGIPIPN<sup>69</sup>). Using rabbit polyclonal antibodies raised against conjugates of these peptides with bovine serum albumine, competitive indirect ELISA methods for determination of peptides have been constructed and characterised. The detection limits for individual peptides are in the range 1–5  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . For concentrations in the centre of standard sigmoid curves, values of relative standard deviation were estimated to be less than 15 %.



## STANOVENÍ HYPERICINU *IN VITRO* V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH *Hypericum perforatum* POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

DAGMAR ŠTĚRBOVÁ<sup>a</sup>, BOŘIVOJ KLEJDUS<sup>a</sup>,  
EVA KRAMÁŘOVÁ<sup>b</sup> a VLASTIMIL KUBÁŇ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1–3, 612 42 Brno  
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 20.VIII.2001

Klíčová slova: *Hypericum perforatum*, hypericin, kapalinová chromatografie, HPLC, fluorescenční detekce

### Úvod

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) je vytrvalá bylina náležící do řádu Hypericaceae. Je rozšířena v Evropě, Asii, Severní Africe a zdomácněla také v USA. Do povědomí vstoupila již ve středověku, kdy se používala k léčení infekcí a mírných nervových poruch. Díky intenzivnímu studiu obsahových látek v posledních letech výrazně vzrostl její význam ve farmaceutickém průmyslu pro antivirové, protizánětlivé, antidepressivní, protirakovinné a antimikrobiální účinky naftodiantronových a floroglucinových derivátů<sup>1–3</sup>. Typickými představiteli naftodiantronů jsou hypericin a pseudohypericin (obr. 1).

V přírodních podmínkách jsou jejich obsahy limitovány řadou biotických i abiotických faktorů (klimatické podmínky, choroby, škůdci aj.). Vzhledem k těmto skutečnostem jsou předmětem zájmu alternativní zdroje hypericinu. Jedním z nich mohou být i tkáňové kultury. Řada autorů se zabývá studiem intenzity produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách. Kirakosian a spol.<sup>4</sup> uvádějí, že kalus *H. perforatum*, buněčné a orgánové kultury produkují hypericin v extrémně rozdílných množstvích. Produkce je závislá na morfologické diferenciaci a organogenezi. Autoři dokazují, že produkce hypericinu v buňkách může být stimulována elicitory, jako je mannan<sup>5</sup>, případně ovlivněna jinými faktory, jako jsou přísady sacharosy nebo antibiotik do kultivačního média. Tkáňové kultury poskytují příležitost lepší manipulace vedoucí ke zvýšení produkce hypericinu nad přirozenou hladinu obsaženou v rostlinách.

Vedle klasické spektrofotometrie patří k nejrozšířenějším metodám používaným při stanovení hypericinu a jeho derivátů vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou detekcí pomocí detektoru s diodovým polem (DAD), fluorimetrickou detekcí (FLD) a detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)<sup>6–9</sup>. Cílem této práce bylo vyvinout dostatečně účinný postup pro extrakci a optimalizovat podmínky pro přesné a citlivé stanovení hypericinu v tkáňových kulturách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v kombinaci s fluorescenční detekcí.

### Experimentální část

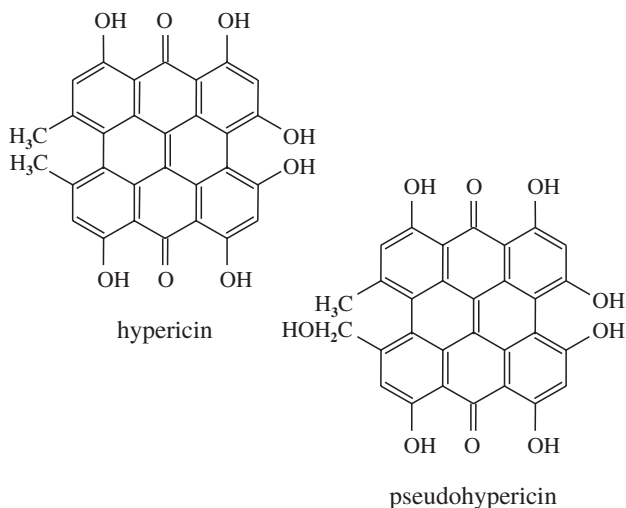
#### Chemikálie a přístroje

Acetonitril čistoty pro HPLC, který byl použit, byl výrobkem firmy Merck (Darmstadt, Německo). Pro veškeré roztoky a ředění byla použita deionizovaná voda Mili-Q (Millipore, Bedford, USA). Octan sodný byl analytické čistoty (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), hypericin čistoty HPLC byl dodán firmou Roth (Karlsruhe, Německo). Zásobní roztok standardu byl připraven rozpuštěním hypericinu v 80% ethanolu (v/v) čistoty pro HPLC a jeho koncentrace byly: 40  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 4  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 1,6  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 0,4  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  a 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Standardy byly uchovány ve tmě při teplotě 4 °C.

Ostatní chemikálie čistoty p. a. (6-(benzylamino)purin (BAP), kinetin, 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D), giberelová kyselina a sacharosa) a antibiotika (kanamycin a ticarcillin) byly běžně dostupné komerční preparáty firmy Sigma (Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA), Lachema (Brno, ČR) nebo Serva Feinbiochemica (Heidelberg/New York, Německo/USA).

Pro stanovení hypericinu byl použit kapalinový chromatograf HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, Německo) sestávající z vakuového odplynovacího modulu (model G1322A), binární pumpy (model G1312A), autosampleru (model G1313A), termostatu kolon (model G1316A), UV/VIS DAD detektoru diodového pole (model G1315A) a FLD fluorescenčního detektoru (model G1321A). Separace byla prováděna na koloně Zorbax SB C18 (75×4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ) s reverzní fází. Byla použita eluce mobilní fází acetonitril (složka A) a 10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octan sodný (složka B) o počátečním složení od A:B 40:60 v/v v čase 0 minut a s lineárním gradientem s pozitivní směrnici na 100:0 do 8 minut a následně s negativní směrnici na 40:60 B do 18 minut. Průtok byl 1  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$  a teplota termostatu kolon byla 40 °C. Signál byl snímán fluorescenčním detektorem při  $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$  a UV/VIS DAD detektorem ve viditelné oblasti při 592 nm.

Při přípravě vzorků byla použita rotační vakuová odparka Model 350 (Unipan, Polsko) a ultrazvuková lázeň (Cole – Parmer Instrument Comp., Chicago, USA), počítačem řízený



Obr. 1. Strukturální vzorce hypericinu a pseudohypericinu

extraktor fexIKA Werke 50<sup>®</sup> (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co., Staufen KG, Německo) a kulový mlýn Vibrom 2S (Jebavý s.r.o., Třebechovice p. O., ČR).

### Rostlinný materiál

Syntetické schopnosti byly studovány na rostlinách *Hypericum perforatum* L. var. Topaz pocházejících původně z kalusové kultury. Organogeneze byla navozena užitím 1,1 mg.dm<sup>-3</sup> 6-benzylaminopurinu (BAP), 0,45 mg.dm<sup>-3</sup> kinetinu, 0,45 mg.dm<sup>-3</sup> 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny (2,4-D) a 2 mg.dm<sup>-3</sup> gibberelové kyseliny. Rostliny byly kultivovány 6 týdnů na médiu „Murashige and Skoog“<sup>10</sup> v poloviční koncentraci (Murashige and Skoog – MS 1/2) s přidavkem sacharosy (10, 30 a 100 g.dm<sup>-3</sup> média). Pro zamýšlenou selekci transgenických rostlin byla stanovována současně rezistence tohoto druhu vůči vysoké (150 mg.dm<sup>-3</sup> kanamycinu a 750 mg.dm<sup>-3</sup> ticarcillinu) a extrémní (250 mg.dm<sup>-3</sup> kanamycinu a 1250 mg.dm<sup>-3</sup> ticarcillinu) hladině antibiotik.

### Příprava vzorků

Vzorky byly odebrány z tkáňové kultury, zmrazeny tekutým dusíkem a lyofilizovány. Následně byly homogenizovány mletím v tekutém dusíku. Byly použity tři extrakční postupy. Ve všech případech bylo 20 mg lyofilizovaného materiálu extrahováno celkovým objemem 40 cm<sup>3</sup> 80%-ního ethanolu po dobu 60 minut: *i*) pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny při teplotě 80 °C, *ii*) dvoustupňovou extrakcí v extraktoru<sup>11</sup> fexIKA Werke 50<sup>®</sup> při 80 °C po dobu 2× 30 minut nebo *iii*) extrakcí ultrazvukem (sonikací) při 40 °C po dobu 60 minut. Extrakty byly odpařeny na vakuové odparce do sucha při teplotě 40 °C a odparek byl rozpuštěn v 1 cm<sup>3</sup> mobilní fáze (acetonitril:10 mmol.dm<sup>-3</sup> octan sodný = 40:60 v/v). Takto připravený vzorek byl injektován v množství 10 mm<sup>3</sup> do chromatografického systému.

### Výsledky a diskuse

Srovnání efektivity extrakčních technik bylo provedeno na základě porovnání ploch píků hypericinu naměřených u extraktů jednotlivých vzorků (tab. I). Z uvedené tabulky vyplývá, že v případě extrakce extraktorem fexIKA Werke 50<sup>®</sup> byla výtěžnost v průměru o 30 % vyšší proti extrakci ultrazvukem a o 50 % vyšší než při extrakci pod zpětným chladičem.

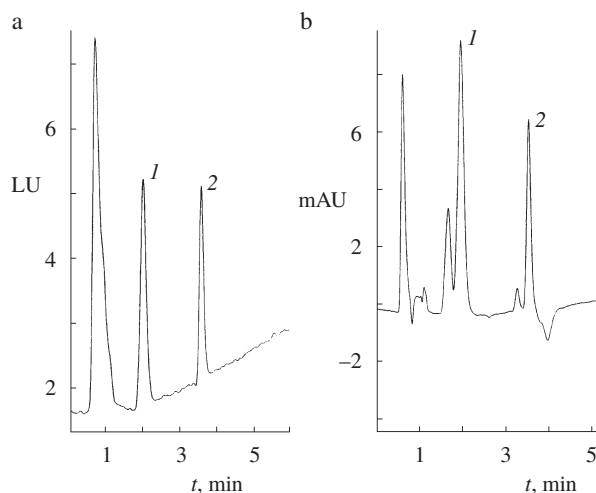
#### Tabulka I

Srovnání výtěžnosti extrakčních technik (uvedené v miliabsorbančních jednotkách – mAU jako průměrné výšky píků) pro shodné vzorky třezalky tečkované

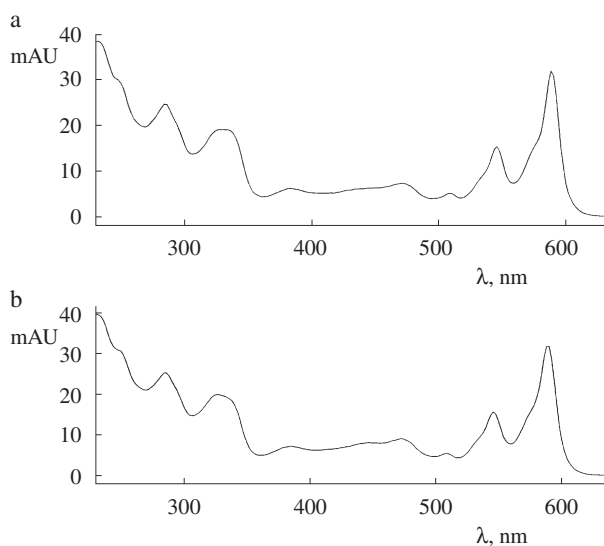
Typ extrakce	Hypericin [mAU.s]	RSD <sup>a</sup> [%]	Pseudohypericin [mAU.s]	RSD [%]
Ultrazvuk	41,6	5,2	97,9	4,5
Zp. chladič	30,1	5,8	70,6	5,1
FexIKA	60,3	4,3	141,5	3,8

<sup>a</sup> Pro  $n = 5$

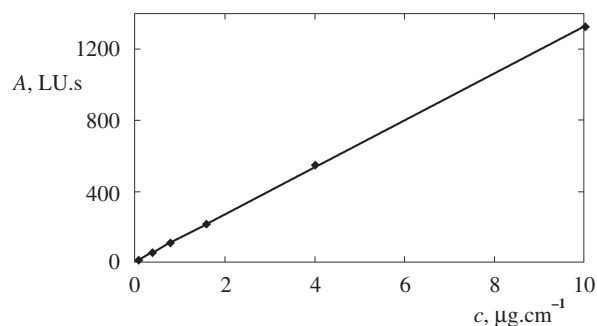
Pro stanovení hypericinu byla vypracována účinná metoda HPLC s tandemovou DAD a fluorescenční detekcí. Excitační a emisní maxima byla stanovena fluorescenčním detektorem FLD HP 1100 v tzv. režimu přímého nástřiku standardu. Emisní vlnová délka byla snímána přes vlnový rozsah 400 až 700 nm s konstantním krokem  $\Delta = 2$  nm a maximum bylo stanoveno na 600 nm. Excitační vlnová délka byla určena proměřením v rozsahu 200 až 350 nm s konstantním krokem  $\Delta = 2$  nm. Maximum bylo nalezeno při 295 nm.



Obr. 2. Chromatogram tkáňové kultury *Hypericum perforatum* var. Topaz s detekcí fluorescenčním  $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  nm a  $\lambda_{\text{Em}} = 600$  nm (a) a UV/VIS DAD detektorem při 592 nm (b); chromatografické podmínky: kolona Zorbax SB C18 (75×4,6 mm, 5  $\mu$ m velikost částic), mobilní fáze acetonitril (A) a 10 mmol.dm<sup>-3</sup> octan sodný (B) o počátečním složení A:B 40:60 v/v v čase 0 minut s lineárním gradientem na 100:0 v/v do 8 minut a na 40:60 v/v do 18 minut, průtok 1 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> a teplota termostatu kolon 40 °C



Obr. 3. Absorpční spektra hypericinu (a) a pseudohypericinu (b) v ultrafialové a viditelné oblasti spektra snímána in-line UV/VIS DAD detektorem na výstupu z kolony; chromatografické podmínky viz obr. 2



Obr. 4. Kalibrační křivka hypericinu při detekci fluorescenčním detektorem při  $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$ ; chromatografické podmínky viz obr. 2;  $A$  – plocha píku,  $c$  – koncentrace,  $y = 131,88x + 5,7542$ ,  $R^2 = 0,9998$

#### Tabulka II

Obsah hypericinu HP ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) v prýtech *Hypericum perforatum* L., var. Topaz kultivovaných *in vitro* v  $\mu\text{g.g}^{-1}$  s přidavkem 3 různých koncentrací sacharosy a při nulové, vysoké ( $150 \text{ mg.dm}^{-3}$  kanamycinu a  $750 \text{ mg.dm}^{-3}$  ticarcillinu) a extrémní ( $250 \text{ mg.dm}^{-3}$  kanamycinu a  $1250 \text{ mg.dm}^{-3}$  ticarcillinu) koncentraci antibiotik

Obsah sacharosy [ $\text{g.dm}^{-3}$ ]	HP na hladině antibiotik		
	nulová	vysoká	extrémní
10	41,23	24,53	0
30	28,20	41,19	20,82
100	7,55	9,23	9,82

Porovnáním naměřených hodnot obsahů hypericinu bylo zjištěno, že koncentrace hypericinu při detekci ve viditelné oblasti spektra ( $592 \text{ nm}$ ), obr. 2, vykazovaly v průměru o 15,6 % vyšší zjištěné hodnoty než při detekci fluorescenčním detektorem v důsledku současné eluce jiné látky (pseudohypericinu) s obdobným absorpčním spektrem ve viditelné oblasti spektra (obr. 3). Tuto odchylku lze snadno snížit nebo zcela vyloučit použitím fluorescenčního detektoru, vzhledem k tomu, že pseudohypericin a další látka/látky vycházející z kolony současně s hypericinem nevykazují/nevykazují fluorescenci v dané oblasti<sup>7</sup>. Optimalizací gradientového profilu (viz výše) bylo navíc dosaženo kvalitního rozdělení naftodianthronových derivátů hypericinu a pseudohypericinu i při použití tzv. „rychlé kolony“ (fast column – viz ukázka chromatogramu na obr. 2). Její použití zajistí výrazné zkrácení doby analýzy a je zvláště výhodné pro rychlou orientaci při hodnocení biologických pokusů. Kalibrační křivka (obr. 4) byla lineární v koncentračním rozsahu od 0,1 do  $10 \mu\text{g.cm}^{-3}$  hypericinu s korelačním koeficientem při fluorescenční detekci  $R > 0,999$  a limitem detekce (LOD pro 3  $S/N$ )  $0,006 \mu\text{g.cm}^{-3}$ .

Metoda byla aplikována na stanovení hypericinu v tkáňových kulturách *Hypericum perforatum* L. var. Topaz se stupňujícími se přidavky sacharosy do živného média a byla zároveň testována odolnost tkáňových kultur vůči antibiotikům. Rostliny kultivované při vysoké hladině sacharosy měly

změněný habitus (silně zkrácená internodia a oválný tvar čepelí listů vlivem omezení činnosti meristému) v důsledku osmotického stresu a nápadné změny v pigmentaci (listové čepele byly hnědočervené barvy, která však nebyla v korelaci s obsahem hypericinu).

Zeleně zbarvené rostliny kultivované na médiu Murashige and Skoog – MS 1/2 s přidavkem sacharosy  $10\text{--}30 \text{ g.dm}^{-3}$  vykazovaly významně vyšší obsah hypericinu (tab. II) než rostliny pěstované za osmotického stresu ( $100 \text{ g}$  sacharosy na  $1 \text{ dm}^3$  média). Narozdíl od přidavku sacharosy vliv antibiotik na syntézu hypericinu nebyl statisticky významný.

Rostliny *Hypericum perforatum* var. Topaz byly schopny tolerovat vysoké až extrémní hladiny antibiotik za předpokladu, že byl v médiu současně dostatek sacharosy. Při nízkých koncentracích sacharosy v médiu ( $10 \text{ g.dm}^{-3}$  média) a extrémních koncentracích antibiotik docházelo k odumírání rostlin během pokusu, zatímco rostliny pěstované na médiu s vyšším obsahem sacharosy ( $30 \text{ g.dm}^{-3}$  média) přežily i extrémní koncentrace antibiotik (tab. II).

#### Závěr

Pro stanovení hypericinu v tkáňových kulturách byla vyvinuta rychlá a selektivní chromatografická metoda. Použitím tzv. rychlé (fast) chromatografické kolony Zorbax SB C18 ( $75 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  velikost částic) bylo dosaženo velice krátkých retenčních časů sledovaných analytů (do 5 minut). Ve spojení s fluorimetrickou detekcí bylo dosaženo vysoké selektivity, neboť při dosud používané detekci ve viditelné oblasti spektra při  $592 \text{ nm}$  dochází k významným chybám při stanovení hypericinu vlivem současné eluce jedné nebo více látek s podobnými absorpčními spektry. Tyto chyby jsou díky použití fluorescenčního detektoru minimalizovány nebo zcela odstraněny, neboť tyto rušící látky nevykazují fluorescenci v dané oblasti. Metoda může s výhodou sloužit jako rychlá orientační metoda pro sledování dynamiky tvorby biologicky aktivních látek, pro fyziologické a biochemické studie sekundárních metabolitů i pro další vědecko-výzkumné účely.

Tato práce byla řešena v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR reg. č. MSM 432100001.

#### LITERATURA

- Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Meruelo D.: Med. Res. Rev. 15, 111 (1995).
- Singer A., Wonnemann M., Müller W. E.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 290, 1363 (1999).
- Jensen A. G., Hansen S. H., Nielsen E. R.: Life Sci. 68, 1593 (2001).
- Kirakosyan A., Vardapetyan H. R., Charchogyan A.: Russ. J. Plant Physiol. 47, 302 (2000).
- Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchogyan A., Vardapetyan H.: Phytochemistry 53, 345 (2000).
- Brolis M., Gabetta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F.: J. Chromatogr. A 825, 9 (1998).
- Draves A. H., Walker S. E.: J. Chromatogr., B 749, 57 (2000).
- Liu F. F., Ang C. Y. W., Heinze T. M., Rankin J. D., Beger R. D., Freeman J. P., Lay J. O., Jr.: J. Chromatogr., A 888, 85 (2000).

9. Sirvent T., Gibson D. M.: J. Liq. Chromatogr. 23, 251 (2000).
10. Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
11. Redeker J.: Patent Application, DEP 1961, 12037.3, DEG 8411 672.

**D. Štěrbová<sup>a</sup>, B. Klejduš<sup>a</sup>, E. Kramářová<sup>b</sup>, and V. Kubáň<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, <sup>b</sup>*Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **High Performance Liquid Chromatographic Determination of Hypericin in Plant Tissues of *Hypericum perforatum* Cultivated in vitro**

*Hypericum perforatum* is a medicinal plant that has been known in traditional medicine as an anti-inflammatory and

healing agent. The alcoholic extract of its aerial parts finds wide application for its antidepressant activity. Three methods of extraction into 80% ethanol were compared. An HPLC method with fluorimetric detection was developed for the identification of its constituents. The calibration curve was strictly linear in the concentration range from 0.1 to 10  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  of hypericin with the correlation coefficient  $R > 0.999$  and the detection limit (LOD for 3 S/N) 0.006  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . HPLC with fluorimetric detection can separate and detect naphthodianthrone derivatives in *Hypericum perforatum* in the presence of other constituents with a greater specificity than HPLC with spectrophotometric detection at 592 nm. Hypericin was quantified in the culture tissues of *Hypericum perforatum* L. var. Topaz cultivated under different conditions (saccharose and antibiotics concentrations) in the Murashige – Skoog medium.

# Jarmark

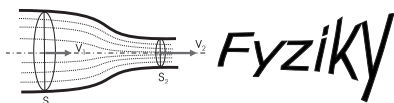
v pavilónu „A“ na výstavišti Flora

aneb poznej kouzlo

24. a 25. května 2002

V Olomouci

Chemie



$\sqrt[3]{(\text{Matematiky})^5}$

- měření tvrdosti přinesené vody (vodní kámen je prevít)
- určení obsahu metanolu v tatínkově slivovici
- kontrola kvality slunečních brýlí (vzhledem k UV záření)
- hrátky s plastovými lahvemi
- fyzika a chemie v kuchyni
- stanovení vitamínu C v ovocných nápojích
- počítačový „hyzdič“ dětí, rodičů, babiček a dědečků
- Debrujarijádá, matematické kvízy a hlavolamy
- soutěže („10× odpověz“, „Chemický kufr“), atd.

